

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MESTRADO

**ALTERAÇÕES RENAIIS CAUSADAS PELA
LECTINA DE SEMENTES DE
*Vatairea Macrocarpa***

ANA MARIA DE OLIVEIRA MONTEIRO

FORTALEZA- CE

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MESTRADO

**ALTERAÇÕES RENAIIS CAUSADAS PELA
LECTINA DE SEMENTES DE
*Vatairea Macrocarpa***

ORIENTADORA – PROFA DRA. HELENA SERRA AZUL MONTEIRO

COORIENTADOR – PROF. DR. BENILDO SOUSA CAVADA

FORTALEZA- CE

2004

**ALTERAÇÕES RENAIAS CAUSADAS PELA
LECTINA DE SEMENTES DE
*Vatairea Macrocarpa***

ANA MARIA DE OLIVEIRA MONTEIRO

Dissertação apresentada à Coordenação do curso de Pós graduação em Farmocologia da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Farmocologia e encontra-se à disposição dos interessados na biblioteca setorial desta instituição.

Data da defesa: 02/04/2004

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Helena Serra Azul Monteiro

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes Alencar

É impossível passar experiência pessoal,
no entanto, na observância de erros anteriores...
Crescemos na escala evolutiva.

A meus Pais
A meu companheiro Fernando
A minhas filhas Vitória e Isabel
dedico o fruto deste trabalho
pelo apoio e compreensão
presentes em todas as horas
intensificando os momentos bons
amenizando as horas
difíceis
tornando um sonho
realidade.

AGRADECIMENTOS

A minha irmã Judite pelo apoio incondicional em todas as horas.

A minha orientadora, Professora Helena Serra Azul Monteiro, pelo apoio, críticas e incentivos em todas as etapas deste trabalho.

Ao professor Manassés Claudino Fonteles, por sua indispensável colaboração científica.

Ao Professor Benildo Cavada, pela importante participação na elaboração desta pesquisa.

Ao Professor Dalgimar Beserra de Menezes, pela participação nas análises histopatológicas com motivação e competência.

A Alice, exemplo de dedicação, eficiência e amor à Farmacologia, imune ao orgulho, compondo uma personalidade rara e preciosa.

A Goreti por me permitir adentrar o seu espaço na Farmácia e contar com o apoio necessário naqueles momentos decisivos para estes resultados serem atingidos.

A Nylane pelo incentivo, sugestões, críticas e apoio contribuindo enormemente com o avanço dos estudos nesta linha de pesquisa.

A Taís, colega forte, oferecendo o melhor de si como complemento à execução deste trabalho.

Aos colegas da pós-graduação Alexandre, Paulo, Malu e Kátia pelo conforto de contar com suas opiniões tão valiosas.

Aos alunos da Iniciação Científica Almira, Iara, Éderson e Bruno pelo desempenho dentro das atividades durante a pesquisa.

A Bia, secretária do Laboratório de Pesquisas Renais, inigualável na sua presteza, possibilitando o bom andamento dos trabalhos com sua dedicação.

A Sílvia e Áurea, secretárias da pós-graduação pela atenção e solicitude com que nos atenderam durante esta jornada.

A técnica de laboratório Maria Sílvia Helena França pela presteza e seriedade profissional demonstradas no ambiente de trabalho.

Ao Bioquímico Domingos Barreto de Oliveira, pela realização cuidadosa dos ensaios bioquímicos.

A Kátia, Fabiana, Mento, Juciê, Tereza França, Joana Tavares e José, do corpo técnico do laboratório de Farmacologia Renal – UFC, pela acolhida e prestimosidade.

A bibliotecária Norma pela orientação precisa em relação às normas catalográficas possibilitando finalizar este trabalho no mais elevado padrão.

A todos os professores, colegas de mestrado e funcionários da Unidade de Pesquisas Clínicas e Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas da minha relação que estiveram envolvidas com este trabalho, de forma direta ou indireta dando suporte para que um ideal se concretizasse.

Meu muito obrigado!

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix

I. INTRODUÇÃO	1
1. Lectinas – Definições e Classificação	2
1.2 - Lectinas Vegetais	8
1.2.1 – Lectinas de Leguminosas	10
1.3 – Lectinas Animais	11
1.4 – Lectina – Vml	13
1.5 – Interação Lectina-Carboidrato	14
2. Sistema Renal	18
3. Justificativas	19
4. Objetivos	20
II. MATERIAIS E MÉTODOS	21
1. Animais Experimentais	22
2. Isolamento das Lectinas de Origem Vegetal	22
2.1 Purificação das Lectinas VML	23
2.2 Caracterização Molecular	23
2.2.1 Redução e S-Carboxilação da Lectina VML	23
2.2.2 Determinação da Composição e Sequencia de	24
Aminoácidos	
2.2.3 Atividade Hemaglutinante	24
2.2.4 Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares	24
2.2.5 Eletroforese em Gel de Policrilamida	25
3. Substâncias Utilizadas	26
4. Protocolo Experimental	26
4.1 Divisão de Grupos de Animais	27
4.2 O Sistema de Perfusão	29

4.2.1 Componentes do Sistema de Perfusão	29
4.2.2 Solução Perfusora e seu Preparo	31
4.2.3 Calibração do Sistema de Perfusão	31
4.3 Técnica Cirúrgica	33
4.4 Cálculo dos Parâmetros Avaliados	35
4.5 Análise Histológica	36
4.6 Estatística	36
III. RESULTADOS	37
IV. DISCUSSÃO	55
V. CONCLUSÕES	62
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

%pTNa ⁺	Percentual de transporte tubular proximal de sódio
%pTK ⁺	Percentual de transporte tubular proximal de potássio
%pTCI ⁺	Percentual de transporte tubular proximal de cloro
%TNa ⁺	Percentual de transporte tubular total de sódio
%TK ⁺	Percentual de transporte tubular total de potássio
%TCI ⁻	Percentual de transporte tubular total de cloro
µL	Microlitros
BPL	Lectina do veneno de serpente Borthrops pirajai
Con A	Lectina das sementes de Canavalia ensiformes
ConBr	Lectina Canavalia brasilienses
Cosm	Clearance osmolar
CRD	Domínio de reconhecimento para carboidrato
CRP	Proteína C reativa
FU	Fluxo urinário
IRA	Insuficiência Renal Aguda
kDa	Kilodaltons
mL	Mililitros
mM	Milimolar
PHA	Lectina de Phaseolus vulgaris
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PP	Pressão de Perfusão
RFG	Ritmo de filtração glomerular
RIP tipo I e II	Proteínas inativadoras de ribossomos tipo I e II
RPS	Ressonância plasmônica de superfície
RVR	Resistência vascular renal
TNF	Fator de necrose renal
VML	Lectina de semestre de Vatairea macrocarpa
Gal-VML	Complexo lectina conjugada com açúcar específico
WGA	Aglutínina de gérmen de trigo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação da lectinas com representação esquemática dos domínios lectínicos	7
Figura 2	Desenho esquemático do sistema de perfusão de rim isolado de rato	30
Figura 3	Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus pressão	32
Figura 4	Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus medida do fluxômetro	32
Figura 5	Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus fluxo na ponta da cânula	33
Figura 6	Fotografias da técnica cirúrgica do método de perfusão de rim isolado de rato	34
Figura 7	Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de Vatairea macrocarpa (10 µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-Vatairea macrocarpa (10µg/mL)	41
Figura 8	Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de Vataírea macrocarpa (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-Vatairea macrocarpa (10µg/mL).	42
Figura 9	Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de Vataírea macrocarpa (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-Vatairea macrocarpa (10µg/mL).	43
Figura 10	Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de Vatairea macrocarpa (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-Vatairea macrocarpa (10µg/mL)	44
Figura 11	Efeitos no percentual de transporte tubular de sódio (%TNa ⁺) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de Vatairea macrocarpa (10µg/mL).	45

- Figura 12** Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%TNa⁺) na ausência (controle) e da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **46**
- Figura 13** Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **47**
- Figura 14** Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **48**
- Figura 15** Efeitos no percentual de transporte tubular de cloro (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **49**
- Figura 16** Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de cloro (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **50**
- Figura 17** Efeitos na excreção de sódio (ENa⁺) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **51**
- Figura 18** Efeitos na excreção de potássio (EK⁺) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* (10µg/mL). **52**

- Figure 19** Efeitos na excreção de cloro (ECl^-) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* ($10\mu\text{g/mL}$), Galactose ($6,25\text{mM/mL}$) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* ($10\mu\text{g/mL}$). **53**
- Figura 20** Efeitos no clearance osmótico (Cosm) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* ($10\mu\text{g/mL}$), Galactose ($6,25\text{mM/mL}$) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* ($10\mu\text{g/mL}$). **54**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina na pressão de perfusão renal (PP).	41
Tabela 2	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina na resistência vascular renal (RVR).	42
Tabela 3	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no fluxo urinário (FU)	43
Tabela 4	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no ritmo de filtração glomerular (RFG).	44
Tabela 5	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no percentual do transporte tubular de sódio (TNa ⁺).	45
Tabela 6	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no percentual transporte tubular proximal de sódio (%pTNa ⁺)	46
Tabela 7	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no percentual do transporte tubular de potássio (%TK ⁺)	47
Tabela 8	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no percentual do transporte tubular de potássio (%pTK ⁺)	48
Tabela 9	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no percentual do transporte tubular de cloro (%TCl ⁻)	49
Tabela 10	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no percentual do transportes tubular proximal de cloro (%pTCl ⁻)	50

Tabela 11	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina na excreção de sódio (ENa^+)	51
Tabela 12	Efeito de lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina na excreção de potássio (EK^+).	52
Tabela 13	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina na excreção do cloro (ECl^-).	53
Tabela 14	Efeito da lectina de sementes da <i>Vatairea macrocarpa</i> , galactose e complexo galactose-lectina no clearance osmótico (Cosm).	54

RESUMO

ALTERAÇÕES RENAIS CAUSADAS PELA LECTINA DE SEMENTES DE *Vatairea macrocarpa* – ANA MARIA DE OLIVEIRA MONTEIRO. Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Faculdade de Medicina – UFC. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre. Orientadora: Helena Serra Azul Monteiro, 2004.

Lectinas são glicoproteínas que interagem de forma reversível e especificamente com carboidratos. A lectina *Vatairea macrocarpa* (VML) é uma lectina ligadora de galactose pertencente à família de leguminosas da tribo Dalbergiae. No presente estudo, nós investigamos os efeitos da lectina *Vatairea macrocarpa* (VML) no modelo de rim isolado de rato, bem como as alterações histológicas. O rim isolado a partir de ratos Wistar, pesando entre 240 e 280g foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit contendo 6% de albumina bovina sérica. Os parâmetros estudados incluem: pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), ritmo de filtração glomerular (RFG), fluxo urinário (FU), percentual de transporte tubular de sódio (%TNa), percentual de transporte tubular de potássio (%TK), e percentual de transporte tubular de cloro (%TCl). A lectina *Vatairea macrocarpa* (10 µg/ml) aumentou a pressão de perfusão, a resistência vascular renal, o fluxo urinário e o ritmo de filtração glomerular. Por outro lado, a *Vatairea macrocarpa* (VML) não alterou o percentual de transporte dos íons sódio, potássio e cloro. O complexo Galactose-Lectina (Gal-VML) quando utilizado não causou qualquer alteração nos parâmetros avaliados, ou seja, bloqueou significativamente o aumento dos parâmetros PP, RVR, UF e RFG, observados pela ação da lectina *Vatairea macrocarpa* (VML). No grupo controle a histologia apresentou um pequeno aumento de material proteináceo nos espaços urinários, no entanto, não foram detectadas alterações a nível de túbulos renais. A administração de galactose sozinha não modificou os parâmetros funcionais renais. Os rins pré-tratados com Gal-VML teve apenas um pequeno acúmulo de material proteináceo nos espaços urinários, mas nenhuma anormalidade foi nos túbulos renais. Estes resultados sugerem que a lectina obtida a partir de sementes de *Vatairea macrocarpa* apresenta importante efeito sobre o sistema renal relacionado com o sítio carboidrato-ligante, tendo em vista observamos reversão dos efeitos renais

quando se utilizou o inibidor específico. O presente trabalho é a primeira demonstração de atividade biológica da VML em rim isolado de rato.

ABSTRACT

RENAL ALTERATIONS INDUCED BY THE LECTIN FROM *Vatairea macrocarpa* SEEDS.

Lectins are glycoproteins that interact reversibly and specifically with carbohydrates. The *Vatairea macrocarpa* lectin (VML) is a galactose-binding lectin present in the family leguminosae and in the tribe Dalbergieae. In the present study, we investigated the effect of *Vatairea macrocarpa* lectin (VML) in the isolated rat kidneys, as well as histological changes. Isolated kidneys from Wistar rats, weighing 240 to 280g, were perfused with Krebs-Henseleit solution containing 6% of bovine serum albumin. The parameters studied included perfusion pressure (PP), renal vascular resistance (RVR), glomerular filtration rate (GFR), urinary flow (UF), percent of sodium tubular transport (%TNa⁺), percent of potassium tubular transport (%TK⁺) and percent of chloride tubular transport (%TCl⁻). The *Vatairea macrocarpa* lectin (10 µg/mL) increased the PP, RVR, UF and GFR. On the other hand, VML did not change the %TNa⁺, %TK⁺ and %TCl⁻. The *Vatairea macrocarpa* lectin plus galactose complex (Gal-VML) significantly blocked the increase in the PP, RVR, UF and RFG. In the control group showed a small amount of a proteinaceous material in the urinary space, although no alteration in the renal tubules was detected. The administration of galactose alone did not modify the functional kidney parameters. The kidneys perfused with VML showed moderate deposit of proteinaceous material in the tubules and urinary space. In the kidneys pretreated with Gal-VML had only small amount of a proteinaceous material in the urinary space. But no abnormalities were seen in renal tubules. These results suggest that lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds presents important effect on renal system reported carbohydrate-binding site, taken into account that showed the reversion of renal effects using the inhibitor specific. The current experiments are first demonstration of biological action of VML in the isolated kidney.

I. INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1. Lectinas

Lectinas são proteínas existentes na natureza em todas as classes de seres vivos que possuem afinidade por carboidratos e um vasto potencial para codificar informações biológicas. As mensagens codificadas nas estruturas destes carboidratos complexos podem ser decifradas através de domínios de reconhecimento. Estes domínios se encontram presentes naquelas proteínas que apresentam esta capacidade de ligação como os anticorpos e lectinas.

O estudo destas substâncias se justifica pela importância dos carboidratos nos processos bioquímicos na medida em que se esclarece os mecanismos envolvidos na interação entre células, deixando de ser vistos apenas como moléculas ricas em energia para participarem de uma grande variedade de processos biológicos.

1.1 - Definições e Classificação

A definição mais aceita atualmente para estas proteínas esta descrita da seguinte maneira: LECTINAS - constituem uma classe de proteínas estruturalmente muito distintas de origem não imune, que possuem pelo menos um sitio de ligação a carboidratos e a capacidade de ligar-se de forma reversível e com alta especificidade a mono e ou oligossacarídeos, sendo estas ligações estabelecidas através de sítios de ligação denominados domínios lectínicos (GOLDSTEIN et al., 1980; PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Lectinologia é a terminologia utilizada para se referir à área de estudos que se destina a pesquisas científicas envolvendo esta classe especial de proteínas denominadas lectinas. Por definição o termo Lectina do latim *legere* - capaz de escolher, selecionar - é utilizado por lembrar o aspecto seletivo de ligação dessas proteínas aos eritrócitos humanos. Estes autores observaram em seus estudos que extratos de sementes de *Phaseolus vulgaris* aglutinavam eritrócitos de apenas algumas espécies (POTAPOV, 1968, BOYD & SHAPLEIGH, 1954).

Um dos primeiros estudos descritos sobre lectinas teve inicio em 1888, quando Hermann Stillmark utilizando extrato de sementes de *Ricinus communis* na

sua tese de mestrado realizada em Dorpat - Estônia, faz referência a estas proteínas biologicamente ativas, hoje citadas como lectinas, utilizando o termo "fitohemaglutininas, referindo-se apenas as de origem vegetal, por ter observado que ao misturar o extrato destas sementes com o sangue causavam aglutinação de eritrócitos. A partir deste estudo seguiram-se varias definições na intenção de melhor identificá-las".

Em 1972, Sharon e Lis realizaram importante revisão definindo lectinas como proteínas aglutinadoras de células com especificidade por moléculas de carboidratos. Sua definição trazia a tona uma nova abordagem para estas proteínas, as lectinas poderiam aglutinar outras células e não somente eritrócitos, além de precipitar glicoconjugados em solução.

Em 1980, Goldstein e colaboradores propuseram que o termo lectina deveria ser usado para proteínas ou glicoproteínas ligantes de carboidratos, de origem não imune, que aglutinam células e ou glicoconjugados, no entanto esta definição exclui proteínas monovalentes ligantes de carboidratos como a haveína, lectina do látex da *Hévea brasiliensis*.

Em 1983, Kocourek e Horejsi continuaram as discussões quando descreviam lectinas como proteínas ligantes de carboidratos, mas expuseram que imunoglobulinas ligantes de carboidratos e enzimas com especificidade aos carboidratos não poderiam ser classificadas como lectinas.

Muitos pesquisadores defendiam que a expressão "de origem não imune" não poderia ser utilizada tendo em vista que uma grande vertente de estudiosos sobre o assunto identificava que a possível função destas proteínas em animais e plantas envolvia a defesa imunológica contra antígenos de forma direta ou indireta, contudo as lectinas não se assemelhavam estruturalmente a anticorpos embora muitas imunoglobulinas se ligassem a açúcares (BIRD & ROY, 1980).

A descrição da existência de um novo sitio de ligação não específico para carboidratos, representado pela cavidade hidrofóbica presente na estrutura das lectinas com grande influência na manutenção da estrutura nativa destas proteínas, permitindo sua ligação a moléculas diversas e não exclusivamente a carboidratos, além de excluir a exigência mínima de dois sítios de ligação a carboidratos por molécula protéica possibilitou ao autor definir lectinas como proteínas com afinidade por carboidratos, excluindo enzimas e anticorpos (BARONDES, 1988).

No entanto Kilpatrick em 2002, considerando que ainda em 1860, S. Weir Mirchel já estudava e descreveu a atividade hemaglutinante de venenos de serpentes, o que hoje se encontra já estabelecido serem atividades biológicas de lectinas animais, sugeriu que o mesmo deveria ser reconhecido como o verdadeiro "Pai das lectinas", muito embora nesta época o autor não relacionasse os achados com o termo lectinas.

A comunidade científica somente a partir da década de 80 manifestou empenho no estudo destas proteínas. Varias pesquisas foram realizadas e hoje as lectinas são consideradas como insumos extremamente importantes para a detecção e isolamento de glicoproteínas, bem como na caracterização parcial de seus carboidratos e detecção de mudanças na superfície celular em processos celulares. Existem evidências de que elas atuam como mediadoras do reconhecimento celular numa variedade de sistemas biológicos, tais como: adesão de vírus, bactérias e protozoários as células do hospedeiro e de leucócitos ao endotélio vascular, eventos de extrema importância na resposta de defesa do organismo contra hospedeiros (SHARON & LIS, 1989).

As lectinas exibem especificidade por diferentes sacarídeos ou reconhecem diferentes determinantes da estrutura do carboidrato complexo e também são citadas como responsáveis por um grande número de processos biológicos; função de linfócitos, transdução de sinais, comunicação celular, desenvolvimento, diferenciação e transformação neoplásica bem como fertilização e defesa do organismo contra hospedeiro (KOCOUREK e HOREAJI, 1983; CALVETE et al., 1998).

Estudos recentes, utilizando tecnologia de última geração proporcionaram a identificação, isolamento e caracterização bioquímica de inúmeras destas proteínas classificadas como lectinas. Descobertas em feijões há centenas de anos atrás e desde então estudadas, mostraram-se amplamente distribuídas na natureza por terem sido isoladas de todas as classes e família de seres vivos a partir de plantas, animais, fungos, algas, bactérias e vírus, apresentando uma grande variedade de formas e tamanhos podendo ser agrupadas em famílias distintas que exibem similaridades quanto as suas propriedades estruturais e de sequência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas. No reino vegetal onde são encontradas em maior diversidade foram descritas lectinas com alto grau de

homologia de sequência evidenciando assim, uma taxonomia bem definida (CAVADA et al., 1993; SHARON & LIS, 1995).

As lectinas, principalmente as de plantas superiores, em geral, são classificadas de acordo com a estrutura geral e suas especificidades por carboidratos (monossacarídeos, oligossacarídeos e derivados). O estabelecimento desta especificidade através da técnica de inibição da atividade hemaglutinante ou precipitação de glicoconjugados por haptenos tem sido de grande importância para os estudos bioquímicos e imunohistoquímicos até então realizados com estas proteínas (LANDSTEINER, 1962).

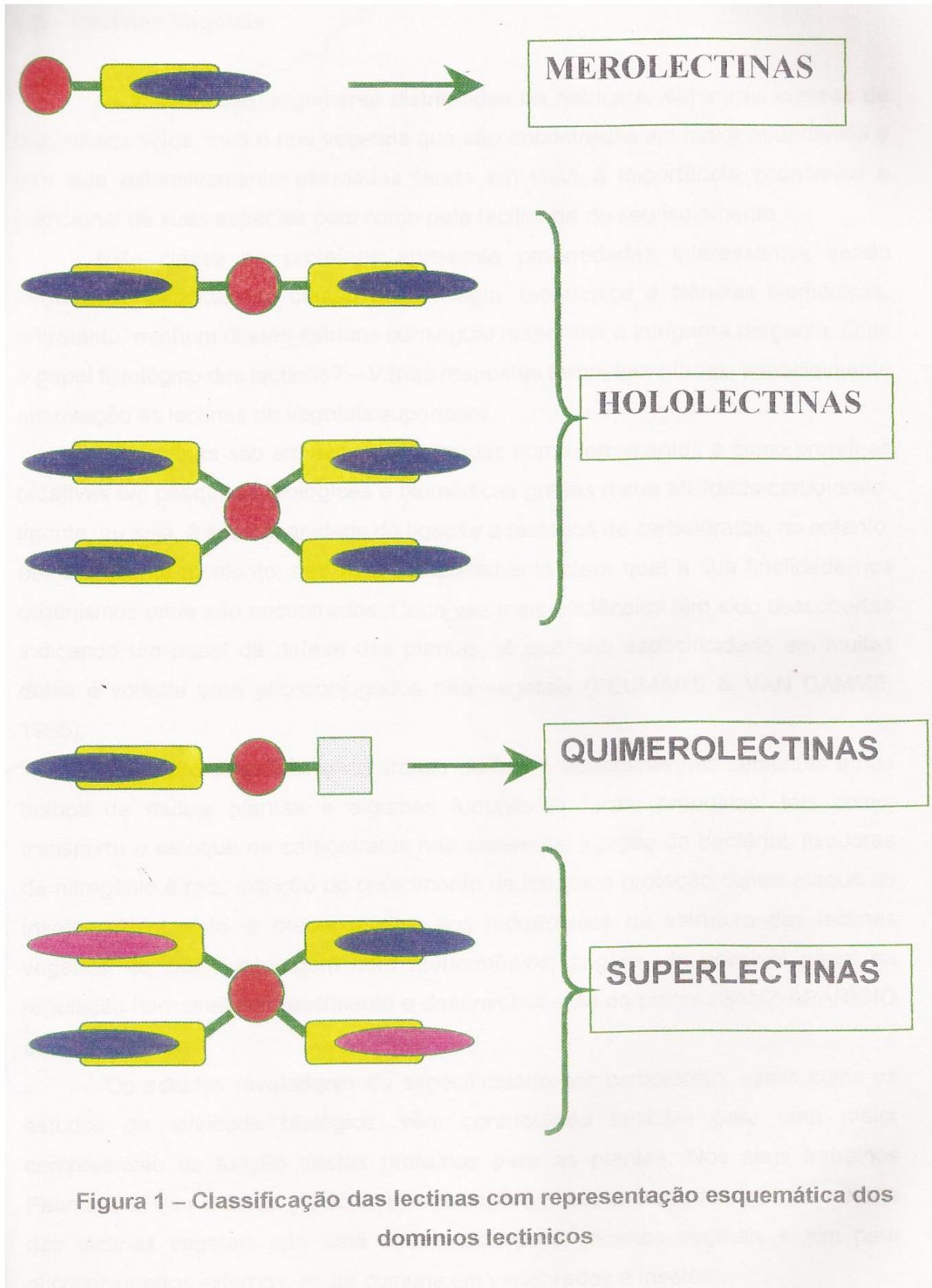
Esta classe de proteínas foi classificada inicialmente em grupos pela sua especificidade por monossacarídeos por Makela em 1957 da seguinte maneira: **Grupo I** - reúne as lectinas inibidas por L-Frutose; **Grupo II** - engloba as lectinas com especificidade por galactose/N-Acetilgalactosamina; **Grupo III** - encerra as lectinas com afinidade por Glicose e Xilose; **Grupo IV** - lectinas específicas por N-acetilgalactosamina e **Grupo V** - lectinas com especificidade por ácido siálico.

No entanto, a classificação mais recente utilizada para as lectinas baseada na estrutura geral destas proteínas e suas especificidades por carboidrato as distribuem em quatro grande grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

- ◆ Merolectinas - inclui lectinas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos, consistem de um único domínio lectínico não apresentando a propriedade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Podemos citar as lectinas de orquídeas, proteínas monoméricas que são específicas por manose e a haveína - proteína do látex da seringueira (VAN PARIJS et al., 1997).
- ◆ Hololectinas - compreende lectinas que- tem múltiplos sítios de ligação a carboidratos, possuem no mínimo dois domínios lectínicos, podem aglutinar células e glicoconjugados, são chamados “hemaglutininas” ou “fitohemaglutininas” estão representadas pelas lectinas de plantas.
- ◆ Quimerolectinas - possuem um ou mais sítios de ligação a carboidrato, contém além dos domínios lectínicos, um domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica ligada a um outro domínio molecular não dependente dos sítios de ligação a açúcares. Dependendo do numero dos sítios de ligação a açúcares, as quimerolectinas se comportam como holo ou merolectinas, sendo

as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPS - 2 - abrina e ricina) e as quinases de plantas classe I representantes deste grupo.

- ◆ Super-lectinas - Apresentam dois ou mais domínios carboidratos ligantes, porém, com especificidades diferentes, ou seja, possuem dois domínios estruturalmente e funcionalmente distintos com capacidade de ligação a açúcares de estruturas diversas. A lectina de tulipa ilustra bem esta classe.



1.2 - Lectinas Vegetais

As lectinas são largamente distribuídas na natureza, em várias classes de organismos vivos, mas e nos vegetais que são encontradas em maior abundância e tem sido extensivamente estudadas tendo em vista a importância econômica e nutricional de suas espécies bem como pela facilidade de seu isolamento.

Esta classe de proteínas apresenta propriedades interessantes sendo largamente utilizadas no campo da fisiologia, bioquímica e ciências biomédicas, entretanto, nenhum destes estudos conseguiu responder a intrigante pergunta: Qual o papel fisiológico das lectinas? - Várias respostas foram formuladas, especialmente em relação as lectinas de vegetais superiores.

As lectinas são amplamente utilizadas como ferramentas e como proteínas bioativas em pesquisas biológicas e biomédicas graças a sua atividade carboidrato-ligante, ou seja, a sua capacidade de ligação a resíduos de carboidratos, no entanto, até o presente momento, não esta completamente clara qual a sua finalidade nos organismos onde são encontrados. Cada vez mais evidências têm sido descobertas indicando um papel de defesa das plantas, já que sua especificidade em muitas delas é voltada para glicoconjugados não vegetais (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Estas proteínas são encontradas de forma abundante nas sementes e nos bulbos de muitas plantas e algumas funções já foram propostas, tais como: transporte e estoque de carboidratos nas sementes, ligação de bactérias fixadoras de nitrogênio a raiz, inibição do crescimento de fungos e proteção contra ataque de insetos. Além disto, a presença de sítios hidrofóbicos na estrutura das lectinas vegetais, os quais interagem com fitohormônios, sugere um possível papel na regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento da planta (SANZ-APARYCIO et al., 1997).

Os estudos reveladores de especificidade por carboidrato, assim como os estudos de atividade biológica, vêm contribuindo também para uma maior compreensão da função destas proteínas para as plantas. Nos seus trabalhos Peumans e Van Damme (1995 a, b) evidenciaram que a especificidade da maioria das lectinas vegetais não esta direcionada para glicanos vegetais e sim para glicoconjugados externos, muito comuns em vertebrados e insetos.

Estas evidências vêm corroborar com a idéia de que as lectinas teriam um papel de defesa contra herbívoros e invertebrados fitófagos. Estes dados têm incentivado o uso destas proteínas como ferramentas de defesa contra pestes em plantas transgênicas (GATEHOUSE et al., 1995; PUSZTAI e BARDOCZ, 1996).

Uma vasta quantidade de trabalhos tem também se dedicado aos estudos dos efeitos biológicos destas lectinas vegetais, porém, grande parte destes estudos se concentra num pequeno grupo de lectinas, apesar disto, este pequeno grupo tem influenciado inúmeras áreas biomédicas com a utilização destas proteínas como ferramentas biológicas com possíveis funções terapêuticas.

Durante as duas ultimas décadas os estudos da moderna bioquímica no campo das lectinas, especialmente o uso de técnicas mais apuradas de purificação, facilitaram o isolamento e a caracterização de inúmeras lectinas vegetais. Cerca de 300 tipos de lectinas de plantas foram identificadas sendo estudadas podendo se obter a purificação e caracterização no tocante a suas estruturas moleculares, propriedades bioquímicas e especificidade por carboidratos (VAN DAMME et al., 1998).

Diversas tentativas foram, feitas para consolidar uma classificação entre as lectinas vegetais. O uso de classificações relacionadas com a especificidade por carboidrato auxiliou aqueles que trabalhavam com lectinas como ferramentas biológicas, mas dificultou os estudos entre a relação evolutiva das mesmas. Felizmente, o rápido progresso das análises estruturais e a clonagem molecular tem desvendado a sequência detalhada de pelo menos 100 tipos de lectinas.

Os pesquisadores Peumans e Van Damme em 1998, analisando os dados levantados a partir do progresso no estudo da estrutura destas proteínas e na clonagem molecular de lectinas propuseram uma classificação das lectinas vegetais em famílias observando suas relações evolutivas agrupando-as em sete famílias: (1) lectinas de leguminosas; (2) lectinas compostas de domínios que se ligam a quitina, semelhantes aos da proteína da Heveína; (3) lectinas relacionadas com a estrutura das proteínas inativadoras de ribossomos tipo II (RIP tipo II); (4) lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose; (5) lectinas de floema Cucurbitaceae; (6) lectinas relacionadas com a jacalina e (7) lectinas relacionadas a amarantina. Outras lectinas como a lectina de sementes de *Parkia platycephala* (leguminosae, mimodoideae) já estão em estudo e deverão constituir um novo grupo de leguminosas (CALVETE et al., 2001).

1.2.1- Lectinas de leguminosas

Lectinas de leguminosas compreendem uma ampla família de proteínas intimamente relacionadas que ocorrem exclusivamente em espécies da família de plantas Leguminosae (Fabaceae) (SHARON 8; LIS, 1990). Aproximadamente uma centena de lectinas de leguminosas já foram caracterizadas em 70 espécies diferentes, pertencentes a vários grupos taxonômicos desta família. Muitas lectinas de leguminosas foram isoladas de sementes quiescentes, sendo que em algumas espécies, pode ser visto mais de uma lectina na mesma semente, entretanto, a concentração destas é muito baixa nas folhas, no caule e na raiz, sendo abundante na casca de muitas árvores. As lectinas de sementes de leguminosas são predominantemente estocadas no parênquima celular dos cotilédones e armazenadas em vacúolos protéicos encontradas em diferentes tipos vegetativos (ETZLER, 1986), no entanto já foram identificadas lectinas de leguminosas presentes em outros tecidos vegetais como folhas, raízes e cascas do caule (BABA et al., 1991).

As lectinas de leguminosas assemelham-se em suas propriedades bioquímicas e estruturais embora se diferenciem em suas especificidades a carboidratos. São constituídas de protômeros (produto maduro da translação primária do RNAm da lectina) com peso molecular de 30 kDa. A maioria dos protômeros consiste em uma única cadeia polipeptídica de 250 aminoácidos, denominados de lectinas de leguminosas de uma só cadeia, no entanto em algumas circunstâncias, os protômeros podem ser clivados em dois pequenos polipeptídeos que, dependendo da posição de clivagem, podem ter tamanhos semelhantes ou não sendo então chamados de lectinas de leguminosas de duas cadeias (CAVADA, 1985).

As lectinas de leguminosas são, muitas vezes, metaloproteínas, apresentam sítios específicos para metais divalentes, e sua atividade de ligação a carboidrato depende simultaneamente da presença destes íons, em geral, cálcio e magnésio. Cada subunidade contém sítios de ligação a metais os quais necessitam estar ocupados para que as lectinas exerçam suas atividades biológicas. Uma característica comum é a alta conservação de aminoácidos ligados ao sítio de acoplamento dos íons de metais divalentes. Ambos os cátions divalentes são

requeridos para a estabilização da conformação funcional do sítio de ligação a monossacarídeos (BOURNE et al., 1990).

Algumas lectinas de leguminosas são N-glicosiladas e os protômeros podem conter uma ou duas cadeias glicanas que costumam ser classificadas de cadeias tipo manose ou cadeias do tipo complexa (SHARON e LIS, 1990). As lectinas de leguminosas são formadas por dois ou quatro protômeros que se conectam através de interações não covalentes. A formação de dímeros ou tetrâmeros, combinada com a ocorrência de protômeros de uma ou duas cadeias glicosiladas ou não, permite que as lectinas de leguminosas possam se apresentar em oito formas diferentes (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas de leguminosas apresentam um alto grau de diversificação na especificidade por carboidrato, mas suas sequências primárias são amplamente homologas. Relatos recentes afirmam que mínimas substituições dentre os aminoácidos de cada lectina e modificações no comprimento de voltas (loops) podem modificar profundamente a estrutura do sítio de ligação para carboidrato sem, contudo, alterar a estrutura tridimensional do protômero (CAVADA et al., 2001).

As lectinas de leguminosas na forma nativa são formadas de dois ou quatro protômeros. A formação de dímeros ou tetrâmeros combinados com a ocorrência ou não de glicosilação, implica na existência de diferentes formas moleculares para estas proteínas. A heterodimerização é comum nas lectinas desta família, originando assim, estruturas tetraméricas com quatro sítios de ligação a carboidratos. Dados estruturais têm demonstrado que uma unidade monomérica conservada pode oligomerizar de maneiras variadas, e desta forma, serem usadas no estudo detalhado da interação proteína - proteína (LORIS et al., 1998).

1.3 - Lectinas Animais

Ao longo do século vinte, a atividade hemaglutinante e somente ela continuou a ser utilizada para identificar lectinas de moluscos, crustáceos, répteis, anfíbios e peixes. Contudo muitas lectinas animais não foram consideradas lectinas por algum tempo visto que foram descobertas através de outras atividades. Podemos citar a Conglutinina bovina, primeira Lectina isolada de mamíferos, identificada nos trabalhos de Bordet e Gay em 1906 e a Proteína C reativa descrita inicialmente em 1930, desde então muitas outras lectinas já foram identificadas e estudadas.

Entre as décadas de 1930 e 1960 foram descobertas lectinas que tinham a capacidade de identificar tipos sanguíneos específicos, inicialmente identificadas em enguias e, posteriormente, a lectina de ostra *Saxidomus giganteus* foi caracterizada e mostrou-se como identificadora do tipo sanguíneo A (JOHNSON, 1964).

No entanto, no decorrer das duas últimas décadas, algumas lectinas animais têm sido identificadas e clonadas, utilizando técnicas de biologia molecular o que possibilitou a partir do conhecimento das suas estruturas primárias uma classificação em cinco categorias: lectinas **tipo-C** ou cálcio-dependentes (DRICKAMER, 1988), são incluídas neste grupo as lectinas: proteína ligante de manose (TAYLOR et al., 1990), as selectinas (SPRINGER, 1991), as calnexinas chaperonas (WARE et al., 1995) e as lectinas da superfície das células natural "killer" (BEZOUSKA et al., 1994).

Lectinas tipo C - Embora o termo tipo C seja referente à dependência do íon cálcio para exercer suas atividades, algumas lectinas dependentes de cálcio não são incluídas neste grupo; sendo esta expressão relacionada com as lectinas que apresentam homologia estrutural com o domínio de reconhecimento para carboidratos tipo C (CRD), cujo domínio apresenta de 100 a 130 resíduos de aminoácidos dos quais 30 resíduos são altamente conservados e catorze destes são invariáveis, envolvidos de forma direta com o sítio de ligação a carboidrato (DAY, 1994). As lectinas tipo C são amplamente variáveis, com grandes diferenças de peso molecular, mesmo dentro de cada subunidade, com uma larga diversidade de especificidade aos carboidratos e são distribuídas por todo o reino animal.

As lectinas tipo C são divididas em sete grupos:

Proteoglicanos ou hialectans; Receptores endocíticos tipo II; Colectinas; Selectinas; Receptores de leucócitos; Receptores de manose em macrófagos e Lectinas primitivas.

As lectinas **tipo S** que apresentam ligações dependentes de tiosis, sendo denominadas galectinas e mostram especificidade por β -galactosídeos (RINI & LOBSANOV, 1999).

Lectinas tipo S (galectinas) - De acordo com suas características bioquímicas estas lectinas requerem condições redutoras para exercerem suas atividades, podem ser inibidas por lactose e usualmente apresentam subunidades com peso molecular em torno de 14 kDa (HARRISON, 1991). O termo S foi adotado inicialmente por Drickamer, 1988 quando propôs a segunda família de lectinas animais como um grupo estruturalmente homólogo de lectinas cálcio-independentes,

extraídas com soluções de lactose, cujo domínio de reconhecimento para carboidratos é composto de 130 resíduos de aminoácidos formando uma estrutura terciária semelhante a encontrada nas lectinas de legumes e composto por duas alças β (RINI, 1995).

As lectinas **tipo I** que apresentam o domínio N-terminal semelhante ao domínio variável das imunoglobulinas incluídas neste grupo estão as sialoadesinas que apresentam especificidade de ligação por ácido siálico, são encontradas em macrófagos e tem sido proposto para estas proteínas um papel na adesão de linfócitos e desenvolvimento de células mielóides (KELM et al., 1996). As lectinas do **tipo P** que apresentam receptores para manose-6-fosfato dependentes ou não de cátions (DRICKAMER & TAYLOR, 1993) e as lectinas **tipo L** que apresentam semelhança com as lectinas de leguminosas (WEIS & DRICKAMER, 1996).

1.4 - Lectina de sementes de Vatairea Macrocarpa – VML

Os nossos experimentos foram realizados analisando os efeitos biológicos sobre a função renal da lectina obtida a partir de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) identificada como uma leguminosa pertencente à tribo Dalbergieae, em relação à estrutura apresenta-se na forma de um tetrâmero formado por quatro subunidades idênticas de 25 kDa cada, independente do pH. Esta proteína classificada como lectina desencadeia aglutinação de hemácias de coelho e de humanos, sendo esta atividade inibida pela galactose, N-acetilgalactosamina e outros açúcares relacionados (CALVETE et al., 1998).

Investigações anteriores em relação à especificidade de ligação a carboidratos da VML através da inibição da hemaglutinação por sacarídeos e glicoproteínas, bem como por ressonância plasmônica de superfície, têm demonstrado que a VML é uma típica lectina ligadora de Gal/Gal/Nac (RAMOS et al., 1999). Entretanto, estudando a especificidade fina desta lectina através de cromatografia de afinidade de oligossacarídeos e glicoproteínas de estruturas conhecidas em coluna imobilizada de VML, os autores demonstraram que esta lectina reconhece sequências de N-Acetilgalactosamina não reduzidas. Esta interação parece ser dependente do número de sequências em cada estrutura glicídica, bem como do pH. Estes achados são importantes e credenciam a VML como uma importante ferramenta para o fracionamento e análise estrutural de

oligossacarídeos e glicoproteínas de diversas origens e que contém N-Acetilgalactosamina (RAMOS et al., 2000).

A lectina utilizada em nossos experimentos foi fornecida pelo BIOMOLAB (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas), através de colaboração com o Professor Benildo Cavada do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

1.5- Interação lectina-carboidrato e elicitação de atividades biológicas

Dentre suas funções fisiológicas, os estudos com lectinas deram importante contribuição para o entendimento da interação proteína-carboidrato e são largamente utilizadas para purificação e caracterização de glicoconjugados como reagentes específicos para pesquisas biomédicas.

As lectinas são responsáveis pelo reconhecimento de açúcares na superfície de células de bactérias, animais e plantas. Como exemplos, estão algumas toxinas bacterianas, receptores que medeiam a interação célula-célula em animais, neutralização de patógenos, toxinas de plantas e mitógenos. O estudo do reconhecimento de carboidrato pelas lectinas está bem documentado e a base molecular destas interações tem sido estudada com uma variedade de técnicas biofísicas, incluindo cristalografia em raios-X, ressonância nuclear magnética (RNM) e microcalorimetria, e mais recentemente, ressonância plasmônica de superfície (RPS), além de novas técnicas de Biologia Molecular que estudam a importância dos aminoácidos envolvidos na ligação lectina-carboidrato (NAGAHORA et al., 1995). Estas interações são importantes para elucidar as atividades biológicas relacionadas e estabelecer com clareza suas funções dentro dos organismos, podendo acontecer com açúcares simples bem como com açúcares complexos.

Nos últimos anos estudos foram direcionados no sentido de esclarecer as bases do reconhecimento celular, levantando a forte possibilidade de que vários eventos envolvidos sejam mediados através de interações entre carboidratos e lectinas. Em consequência da enorme diversidade das lectinas dois aspectos da sua organização devem ser esclarecidos. Primeiro - a atividade de ligação ao açúcar é atribuída a uma porção limitada da molécula de lectina - o domínio de reconhecimento de carboidrato ("carbohydrate-recognition domain" - CRD). Segundo

- a semelhança entre CRDs em relação a sequência de aminoácidos, possibilita organizar as lectinas em grupos (DRICKAMER, 1988).

A ligação das lectinas com estruturas complexas, como os oligossacarídeos de glicoproteínas, é responsável pela especificidade fina das lectinas. Esta ligação é muito mais específica e discrimina lectinas similares em relação à especificidade por monossacarídeos (DEBRAY et al., 1981). A ligação de lectinas multivalentes aos açúcares presentes na superfície das células sempre leva a mudanças em receptores lipídicos e glicoproteicos, elicitando assim uma variedade de respostas biológicas.

Estudos mostraram que na interação lectina-estruturas glicanas complexas, existente nas glicoproteínas, o sítio de reconhecimento a monossacarídeos tem um papel chave na ligação destas estruturas. Uma única unidade de monossacarídeo é reconhecida pelo sítio de ligação da lectina, enquanto que outras interações não covalentes são estabelecidas (interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio mediadas por molécula de água) e desta forma estabilizam o complexo lectina-ligante (RAMOS et al., 1996; BOURNE et al., 1992).

Foi demonstrado que mesmo com especificidade semelhante por carboidratos, a afinidade de cada proteína pelo mesmo ligante pode ser consideravelmente diferente, sugerindo que diferença estrutural entre as lectinas pode ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido lectina-ligante (CAVADA et al., 2001).

Dentre as classes de proteínas estudadas, muitos outros tipos interagem com açúcares, entre estas estão as enzimas que têm açúcares como substratos, anticorpos específicos por carboidratos e proteínas transportadoras de membranas. Estas proteínas foram classificadas como proteínas ligadoras de carboidrato tipo I, nas quais os sítios de ligação a açúcares estão em lugares profundos e a interação desta com o ligante é de alta afinidade. Em contraste, os sítios de ligação das proteínas ligadoras de açúcar tipo II, incluindo as lectinas, estão expostos na superfície da proteína e a afinidade de ligação é menor em relação as do tipo I. (WEIS & DRICKANIER, 1996).

É importante ressaltar que, independente de suas especificidades por monossacarídeos as lectinas geralmente apresentam diferenças nas suas estruturas quaternárias. As diferenças espaciais entre os sítios de ligação aos carboidratos de diferentes lectinas, combinado com as diferenças nas suas epítomos em ligantes

multivalentes são, provavelmente, as razões pelas quais lectinas com especificidades similares por monossacarídeos, exercem diferentes atividades biológicas. Além disto, estudos de análise estrutural com lectinas tem revelado a importância da multivalência das subunidades como determinantes da atividade biológica destas proteínas, visto que características da ligação podem mudar devido a alterações nos resíduos de monossacarídeos ou na orientação espacial destes (SANZ-APARICIO et al., 1997).

Algumas lectinas exibem especificidade por estruturas complexas tais como glicoproteínas. A afinidade das lectinas por monossacarídeos é usualmente fraca, mas frequentemente a especificidade é bem definida.

As lectinas por apresentarem propriedades particularmente interessantes, tem sido empregadas largamente no campo da fisiologia, bioquímica e ciências biomédicas, no entanto, a propriedade mais amplamente conhecida das lectinas é a sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies, relacionando-as com diferentes atividades biológicas em geral, ligadas a interação célula-célula dependente da presença de glicoproteínas presentes nas superfícies celulares. Não apenas eritrócitos, mas outras células, também podem ser aglutinadas por lectinas, como leucócitos e células tumorais (BEUTH et al., 1995) possibilitando o desenvolvimento de variados trabalhos nos campos da oncologia e imunologia; Desta forma, levando em consideração suas atividades frente ao sistema imunológico, as mesmas incrementam funções imunogênicas, mitogênicas, antiinflamatórias, pro-inflamatórias e citotóxicas dentro dos seres vivos.

A determinação da mitogenicidade de lectinas se realiza através de ensaios onde suspensões celulares são inoculadas com lectinas de várias concentrações diferentes, determinando-se o aumento da incorporação da timidina triciada no DNA após 48 a 72 horas. Esta descoberta desencadeou um grande número de pesquisas nas quais lectinas vegetais que apresentam especificidade a diferentes tipos de carboidratos foram utilizadas em diversos sistemas celulares a fim de estudar sua ação biológica (BARRAL et al., 1992).

A capacidade mitogênica foi inicialmente identificada pela lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA). Posteriormente, a capacidade de ativar linfócitos foi conferida a outras lectinas e atualmente a concanavafina-A (Con-A), purificada de sementes de *Canavalia ensiformis* (HAVT et al., 2001), o mitogeno "pokeweed" (Pokeweed mitogen, PWM), isolado de *Phytolacca americana*, e a WGA, extraída do

germe de trigo, são amplamente utilizadas em diversos ensaios imunológicos, induzindo diferentes efeitos biológicos sobre populações de linfócitos (PEACOCK, et al., 1990). Além da atividade estimuladora de linfócitos, as lectinas são capazes de mediar fagocitose em células alvo (NORIN & PINHO, 1986) e ainda induzir atividade citotóxica pelos macrófagos em células tumorais (MacDERMONT et al., 1986) bem como apresentar atividade pré-inflamatória nos modelos de peritonite, edema de pata (ALENCAR et al., 1999).

O reconhecimento celular é o primeiro passo para numerosos processos (vegetais e animais) baseados nas interações célula-célula incluindo fertilização, embriogênese, migração celular, formação de órgãos, defesa imune e infecção microbiana. Além disso, o reconhecimento de células anormais está por trás do crescimento descontrolado de células que caracterizam a transformação neoplásica e a metástase. A natureza das moléculas envolvidas em tal reconhecimento ainda não está totalmente elucidada.

O potencial dos açúcares como moléculas de informação é muito grande, pois enquanto um peptídeo ou um oligonucleotídeo tem sua informação baseada somente no número de unidades monoméricas e sua sequência, os açúcares veiculam a informação codificada na posição e configuração estereoquímica relativa de todos os seus carbonos assimétricos das unidades glicosídicas e na ocorrência de pontos de ramificação. No entanto, duas moléculas de um único aminoácido ou nucleotídeo só podem formar um único peptídeo ou um único dinucleotídeo (SHARON & LIS, 1989).

Pelo fato das lectinas muitas vezes detectarem estas diferenças de configuração dos carboidratos, elas seriam instrumentos poderosos para esta troca de informações entre células.

Aub e colaboradores em 1963 relataram que a lectina de trigo era capaz de distinguir células normais de outras malignas dentro de um mesmo tecido, através de aglutinação específica das células transformadas.

Como atividades biológicas das lectinas citam-se ainda: (1) Indução da produção de Óxido Nítrico *in vivo* e *in vitro* (ANDRADE et al., 1999); (2) Indução de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (ALENCAR et al., 1999); (3) Indução de liberação de histamina (GOMES et al., 1994); (4) Atividades biológicas de lectinas leguminosas, correlacionando estas atividades com aspectos estruturais e em rins de ratos (TEIXEIRA et al., 2001).

2. O Sistema Renal

Pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas focalizam atenção sobre as possibilidades de que o reconhecimento celular seja mediado por carboidratos e lectinas, levando em conta já ser bem estabelecido que quase todas as células têm sobre suas superfícies carboidratos na forma de glicoproteínas, glicopeptídeos e polissacarídeos, as lectinas ganham espaço e tornam-se credenciadas como potentes ferramentas para diferentes estudos de atividades biológicas.

O interesse crescente da comunidade científica levando muitos grupos de pesquisa a investigar exaustivamente esta classe de proteínas se deve ao fato de que o reconhecimento celular seja realmente mediado por carboidratos e lectinas expandindo assim o leque para suas aplicações, possibilitando o incremento da sua utilização nas pesquisas, visto que são largamente encontradas na natureza.

A intenção de utilizar o sistema renal para o estudo configura-se pela importância deste na homeostasia e manutenção do volume sanguíneo circulante, bem como na filtração e eliminação de substâncias exógenas que permeiam a corrente sanguínea.

As principais funções do rim consistem, na excreção de produtos de degradação; na manutenção da homeostasia, regulando o conteúdo de sais e eletrólitos, bem como do volume do líquido extracelular e na regulação do equilíbrio ácido-básico.

Os rins recebem 25% do débito cardíaco, que fluem através dos capilares glomerulares possibilitando que estes filtrem uma quantidade equivalente a 15 vezes o volume do líquido extracelular. Esse filtrado assemelha-se ao plasma na sua composição, e a principal diferença reside na quantidade muito pequena de proteína ou de substâncias ligadas as proteínas. Ao passar pelo tubulo renal, cerca de 99% desse filtrado são reabsorvidos, enquanto algumas substâncias são secretadas, e por fim 1% do filtrado é eliminado na forma de urina.

A dinâmica da troca de fluídos entre os meios interno e externo é fundamental para a existência dos seres vivos. Em seres cujo nível de organização celular é complexo, as trocas de fluídos entre compartimentos do próprio corpo também são de fundamental importância para a manutenção da vida (POWELL et al., 1995; CTGRADY et al., 1987).

A vida das células depende da homeostase do meio intracelular. No processo evolutivo, houve crescente especialização das membranas celulares. São os canais protéicos, as proteínas carreadoras implantadas na bicamada lipídica, que conferem seletividade as membranas celulares; Principalmente pela manutenção dos gradientes de concentração de eletrólitos e/ou proteínas, as membranas celulares vivas e seletivas são responsáveis por fenômenos de osmose e conseqüentemente controle de fluxo de fluidos. Em seres pluricelulares, a seletividade da membrana plasmática das células que compõem os epitélios é de importância primordial, através destes epitélios se faz a absorção de água, eletrólitos, aminoácidos e carboidratos, além da excreção e eliminação de subprodutos do metabolismo. A natureza seletiva da membrana celular nos ajuda a compreender a vida (POWELL et al., 1995; CTGRADY, et al., 1987; GUYTON, 1997; BORK et al., 1993).

3. Justificativa:

O presente trabalho se propõe a estudar as alterações causadas pela lectina obtida a partir de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) sobre a função renal, utilizando o sistema de rim isolado de rato, que oferece excelentes condições como modelo experimental, para elucidar atividades biológicas sobre a função renal sem interferências sistêmicas, vislumbrando abrir perspectivas para utilização desta substância como ferramenta farmacológica e possivelmente instrumento terapêutico na prática clínica.

A escolha da substância para o nosso estudo, foi baseada em relatos da literatura sobre a ação de outras classes de lectinas sobre o sistema renal. O reconhecimento celular é o evento central para desencadear uma variedade de fenômenos biológicos e o primeiro passo em numerosos processos baseados na interação célula-célula.

Demonstrou-se na algumas décadas que existe na superfície de todas as células carboidratos na forma de glicoproteínas, glicopeptídeos e polissacarídeos sendo evidenciado também que os carboidratos têm sido indicados como moléculas que possuem um enorme potencial para codificar informações biológicas (SHARON & LIS. 1989).

Tendo em vista, após resultados de numerosos estudos, que as lectinas são capazes de se ligarem de forma específica a resíduos de açúcares e, somados a possibilidade de purificação e caracterização da suas estruturas moleculares através de tecnologia de ultima geração, estas tornam-se credenciadas como insumos importantes dentro do arsenal farmacoterapêutico.

Além disto, o incremento de métodos analíticos refinados tem revelado uma grande diversidade de estruturas de carboidratos associados com glicoconjugados solúveis ou ligados a superfície. Existem também fortes indicações de que esta diversidade é biologicamente significativa. Assim em muitos casos, carboidratos modificam a atividade de proteínas com as quais estão ligados.

4. Objetivos

4.1 Geral

Estudar o sistema renal investigando a ação biológica da lectina de sementes de *Vatairea Macrocarpa* (VML), na perspectiva da sua utilização como ferramenta farmacológica, bem como possível aplicabilidade terapêutica.

4.2 Específicos

- ➔ Avaliar efeitos biológicos da lectina *Vatairea Macrocarpa* no modelo de rim isolado de rato através de estudos de parâmetros funcionais pré-estabelecidos, excluindo interferências sistêmicas;
- ➔ Avaliar alterações histológicas em rins perfundidos com a lectina de *Vatairea Macrocarpa*;
- ➔ Caracterizar a ação biológica da lectina *Vatairea Macrocarpa*, bem como o envolvimento do domínio lectinico, através do bloqueio farmacológico com o açúcar específico.

II. MATERIAL E MÉTODOS

II. MATERIAL E MÉTODOS

1 - Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, sexo masculino, com variação de peso entre 240 e 280 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Biomedicina (IBIMED) da Unidade de Pesquisas Clínicas da Universidade Federal do Ceará. Todos os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno em temperatura ambiente e mantidos em jejum alimentar nas 24 horas que antecederam os experimentos com fornecimento de água “ad libitum”.

2 - Isolamento das Lectinas de Origem Vegetal

A lectina utilizada foi obtida a partir de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) que foi isolada e purificada no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), respectivamente, através de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 e goma de guar conforme metodologia anteriormente estabelecida por (CALVETE et al., 1998). A pureza das amostras foi avaliada em SDS-PAGE.

O isolamento da lectina vegetal a partir das sementes de *Vatairea Macrocarpa* (VML) foi realizado de acordo com os métodos descritos por Vasconcelos e colaboradores (1991); Oliveira e colaboradores (1991); e Sumner e Howell (1936), respectivamente. As sementes foram trituradas e o pó foi diluído em uma solução de NaCl 0,15 M (1:10 p/v). O material aquoso foi agitado por 3 horas e centrifugado com 16.000 x g durante 20 minutos, numa temperatura de 4°C. O sobrenadante foi aplicado em coluna de Sephadex G-50. A coluna foi equilibrada com a solução de NaCl 0,15 M contendo 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MnCl₂. O pico não retido foi eluído com o tampão de equilíbrio de NaCl 0,15 M e o pico retido na coluna foi extraído na presença do mesmo tampão de equilíbrio na presença de glicose 0,1 M. A seguir, o pico retido foi dializado contra ácido acético 0,1 M por 1 hora, com o objetivo de deslocar a lectina do sítio de ligação com seu açúcar inibidor e, em seguida, dializado exaustivamente contra água destilada. As amostras finais foram liofilizadas e estocadas a 4° C até serem utilizadas.

2.1- Purificação da Lectina (VML)

Inicialmente a lectina foi purificada por cromatografia de exclusão molecular em HPLC (Superdex 75) seguida por cromatografia de afinidade em coluna imobilizada com lactose. A massa molecular e homogeneidade foram analisadas em HPLC de fase reversa e eletroforese SDS-PAGE com tricina 12%.

2.2 - Caracterização Molecular

2.2.1 - Redução e S-Carboximetilação da Lectina de VML

Uma amostra de 2 mg da lectina de VML foi dissolvida em 200 μ L de cloreto de guanidina (6 mol/L) (Merck, Darmstadt, Alemanha), contendo 0,4 mol/L de Tris-HCl e 2 mmol/L de EDTA e, a seguir, o pH foi ajustado em 8,15. O nitrogênio foi retirado da amostra e, em seguida, ela foi reduzida com DTT (ditiotreitól 6M, 200 μ L) e carboximetilada com 14 C-ácido iodoacético e ácido iodoacético refrigerado. O nitrogênio foi novamente retirado da superfície da solução e a reação no tubo foi escalonada. A solução foi incubada no escuro em 37 °C e a dessalificação foi realizada numa coluna de Sephadex G 25 (0,7 x 1,2 cm) com 1 mol/L de tampão de ácido acético. A proteína-RC eluída foi então liofilizada e estocada. BPL-RC (600 μ g) foi digerida por protease V8 de *Staphylococcus aureus* num período de 16 horas a 37 °C usando uma enzima para o substrato molar na razão de 1:30. A reação foi interrompida por liofilização. Em seguida, duas alíquotas de BPL-RC foram digeridas com tripsina (8 horas, 37 °C), e clostripaína (8 horas, 37 °C) e liofilizadas (TOYAMA et al., 2000).

O material digerido nos três processos foi fracionado por HPLC de fase reversa usando sistema Waters PDA 991 e uma coluna μ -Bondapack C18. A eluição dos picos de proteína foi realizada usando gradiente linear 0-100% de acetonitrila em 0,1 % de ácido trifluoroacético (v/v). BPL-RC (500 μ g) foi clivado com excesso molar (150 x) de brometo de cianogênio (CNBr) sobre os resíduos de metionina de BPL em 4 mL de ácido fórmico (70%), na presença de nitrogênio, por 24 horas, em temperatura ambiente. A mistura da reação foi diluída com 40 mL de água e liofilizada. O excesso dos reagentes foi removido por filtração em coluna de gel

Sephadex G25 (1,0 x 20 cm) e equilibrada com ácido acético (10%). Os fragmentos peptídicos CNBr foram separados por HPLC de fase reversa.

2.2.2 - Determinação da Composição e Sequência de Aminoácidos

A composição de aminoácidos da lectina VML foi determinada por hidrólise fásica a vapor usando 6 N de HCL em temperatura de 106 °C por 24 horas, seguido por um analisador automático de aminoácidos PICO-TAG (Waters), utilizando a metodologia de Henrikson e Meredith (1984).

2.2.3 - Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi realizada para assegurar que o material isolado mantinha sua capacidade hemaglutinante mesmo após a purificação (De CARVALHO, 1997).

2.2.4 - Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares

Este método teve a finalidade de identificar o açúcar ou açúcares que tem maior afinidade pela lectina testada utilizando metodologia anteriormente descrita na literatura (De CARVALHO, 1997). A lectina vegetal isolada das sementes de *Vatairea Macrocarpa* (VML), apresenta afinidade por galactose e N-acetilgalactosamina.

Inicialmente, a amostra teste (1mg/mL) foi diluída em um tampão de Tris de HCl (0,1M) com NaCl (0,5M) seguido pelo ajuste do pH em 7,6. Uma alíquota de 25 µL desta amostra foi pipetada na placa de poços e acrescida de 25 µL de todos os açúcares: d-lactose; d-galactose; d-rafinose; d-glicose; d-sucrose; d-maltose, d-manose; d-frutose e d-trealose. Em seguida, foi executada a diluição progressiva até o último poço. Cada açúcar foi testado em dois grupos de poços. Um grupo de poços foi utilizado como controle, onde nenhum açúcar foi adicionado. A placa foi levada a estufa em temperatura de 37 °C, onde permaneceu por 30 minutos. Trinta minutos após a retirada da placa de poços da estufa, foi acrescentado 50 µL de sangue humano tipo O em todos os poços, com exceção dos últimos poços de cada grupo. Após o acréscimo do sangue, a placa foi levada novamente para a estufa,

onde permaneceu na mesma temperatura e tempo acima descritos. A leitura final foi realizada trinta minutos após a retirada da placa de poços da estufa.

2.2.5 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol teve como objetivo analisar a pureza do material isolado ou ainda detectar, aproximadamente, o peso molecular do material testado.

Este método foi descrito por Laemmli (1970), adaptado para uso de géis de separação em placas. O gel de aplicação (3,5% de poliacrilamida) continha: 0,625 mL de acrilamida-bisacrilamida; 1,25mL de tampão tris-HCL 0,5 M pH 6,8; 50 μ L de SDS 10%; 2,82 mL de água destilada; 250 μ L de persulfato de amônio 1,5%; e 5 μ L de TEMED. O gel de separação (12,5% de poliacrilamida) foi preparado com; 1,25 mL de tris-HCl 3 M pH 8,8, 100 μ L SDS 10%, 3,98 de água destilada, 500 μ L de persulfato de amônio 1,5%, e 5 μ L de TEMED.

As alíquotas testadas continham 1mg das lectina vegetal isolada das sementes de *Vatairea Macrocarpa* (VML) diluídas em 1 mL de tampão de amostra contendo tris-HCl (0,0625M pH6,8), 2% de SDS, 10% cde glicerol e 5% de β -mercaptoetanol. A mistura foi aquecida em temperatura de 100°C durante 10 minutos. A solução aquecida foi adicionado o corante azul de bromofenol 0,02%. Os poços com material teste foram comparados ao poço controle contendo amostras de proteínas com pesos moleculares já conhecidos.

A corrida eletroforética teve uma corrente constante de 90 mA, 250 volts e 10 wats com uma duração de três horas. Ao final da corrida eletroforética o gel foi fixado em TCA 12,5% por uma hora e em seguida foi corado com Cromassie Brilliant Blue R-250 0,05%, que continna uma solução de metanol, ácido acético e água (1:3, 5:8). O excesso de corante foi retirado com a mesma solução, na ausência do corante, permitindo a visualização das bandas protéicas.

3 - Substâncias Utilizadas

Para realização do nosso trabalho as seguintes substâncias se fizeram necessárias:

→ NaHCO₃ (Synth)

- NaH₂PO₄.H₂O (Synth)
- NaCl (Synth)
- MgSSO₄.7H₂O (Reagem)
- CaCl₂. 2H₂O (Reagem)
- Manitol (Reagem)
- Uréia (Reagem)
- KCl (IVlerk)
- Glicose (Squibb)
- Penicilina G Potássica Cristalina (Squibb)
- Heparina (CEME)
- Inulina (Sigma) A
- Albumina Bovina - Fração V (Sigma)
- Pentobarbital Sódico (Cristália)
- Lectina Vatairea Macrocarpa (Bioquímica, UFC)
- Lectina-Galactose - Pó liofilizado (Bioquímica, UFC)
- Galactose (Squibb)

4 - Protocolo Experimental

Para avaliar as alterações na função renal decorrentes da atividade biológica da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa*, utilizamos o modelo de perfusão renal em rim isolado de rato, conforme técnica descrita anteriormente.

O tempo total de perfusão renal avaliado teve duração pré-estabelecida de 120 minutos computados somente após adaptação do rim ao sistema de perfusão por 20 minutos, quando então iniciou-se a observação experimental.

Durante este período registramos a cada 5 minutos a medida do fluxômetro e a pressão de perfusão e de forma intercalada a urina e o perfusato foram coletados a cada 10 minutos. Os frascos com urina foram pesados e juntamente com os de perfusato mantidos em temperatura de -20°C para realização das dosagens de sódio e potássio por fotometria de chama (Flame Photometer – modelo 443 IL); dosagem de cloreto através de kit LabTest; inulina, através de hidrólise direta, seguindo o método descrito por Fonteles e Leibach (1982); e a medida da osmolaridade, através de osmômetro (Vapor pressure osmometer - modelo 5100c ESCOR). Todas as dosagens bioquímicas foram realizadas na Unidade de pesquisas clínicas e

assessoradas pelo Farmacéutico bioquímico Domingos Barreto e a técnica de laboratório Sílvia Helena Freire de França.

Aos 30 minutos da observação foi introduzida ao sistema a substância testada: lectina VML na dose de 1mg diluída aos 100ml de perfusato. Com o rim direito montado no sistema, foi retirado o rim esquerdo para controle submetido à pesagem, tendo um fragmento sido separado para exame histopatológico. Ao final a avaliação procedemos de maneira semelhante com o rim direito para análise comparativa.

4.1 - Divisão Dos Grupos De Animals

Para executar nosso protocolo experimental dividimos os animais configurando quatro grupos com n=6 dispostos da seguinte maneira:

Grupo controle - Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit (100ml) modificada contendo 6% de albumina bovina durante os 120 minutos da observação.

Grupo Lectina - VML - Após a estabilização do sistema a perfusão foi estabelecida com solução de Krebs-Henseleit (100ml) contendo 6% de albumina bovina durante um período de 30 minutos, quando então foi adicionado a lectina VML na dose de 10µg estabelecendo concentração de 1% na solução perfusora, que durante os 90 minutos subsequentes permitiu registro dos parâmetros a serem analisados.

Grupo Galactose - Após estabilização do sistema e controle inicial por 30 min com solução de Krebs-Henseleit (100ml) modificada, os rins foram perfundidos com solução de galactose na concentração de 6,25mM/mL durante 90 minutos com registro dos parâmetros a serem analisados.

Grupo Complexo Lectínico (Gai-VML) - Os rins foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada durante os 30 minutos iniciais após estabilização do sistema, conforme descrito anteriormente e em seguida colocado o complexo Lectina+Açúcar específico na solução perfusora na dose de 10 µg/ml, os

parâmetros foram coletados para posterior análise do bloqueio da sua ação biológica ligada ao domínio lectínico.

4.2 - O Sistema De Perfusão Renal

Motivados por entender melhor os mecanismos de controle da função renal pesquisadores iniciaram o desenvolvimento da técnica de perfusão de rim isolado de rato. Os primeiros relatos de perfusão renal datam de 1849, realizadas por Lobeli.

Outros autores utilizaram o método, no entanto apenas nas duas últimas décadas configurou-se avanços marcantes na técnica original, possibilitando melhor aproveitamento da mesma somando-se as seguintes alterações:

- A adição da fração V de albumina bovina pura a solução perfusora (BOWMAN, 1972; BOWMAN Sr MACK, 1974; LITTLE & COHEN, 1974; DE MELLO & MAAK, 1976);
- A utilização da solução de Krebs-Henseleit (SCHUREK, 1980);
- O uso de substâncias como glicose, aminoácido, lactato e piruvato (BAHLMAN et al., 1987; TRIMBLE & BOWMAN, 1973; DE MELO & MACK, 1976);
- A adaptação do sistema para uso de um filtro de milipore no sistema (ROSS et al, 1973; COHEN et al., 1977; FONTELES et al., 1980 e 1982).

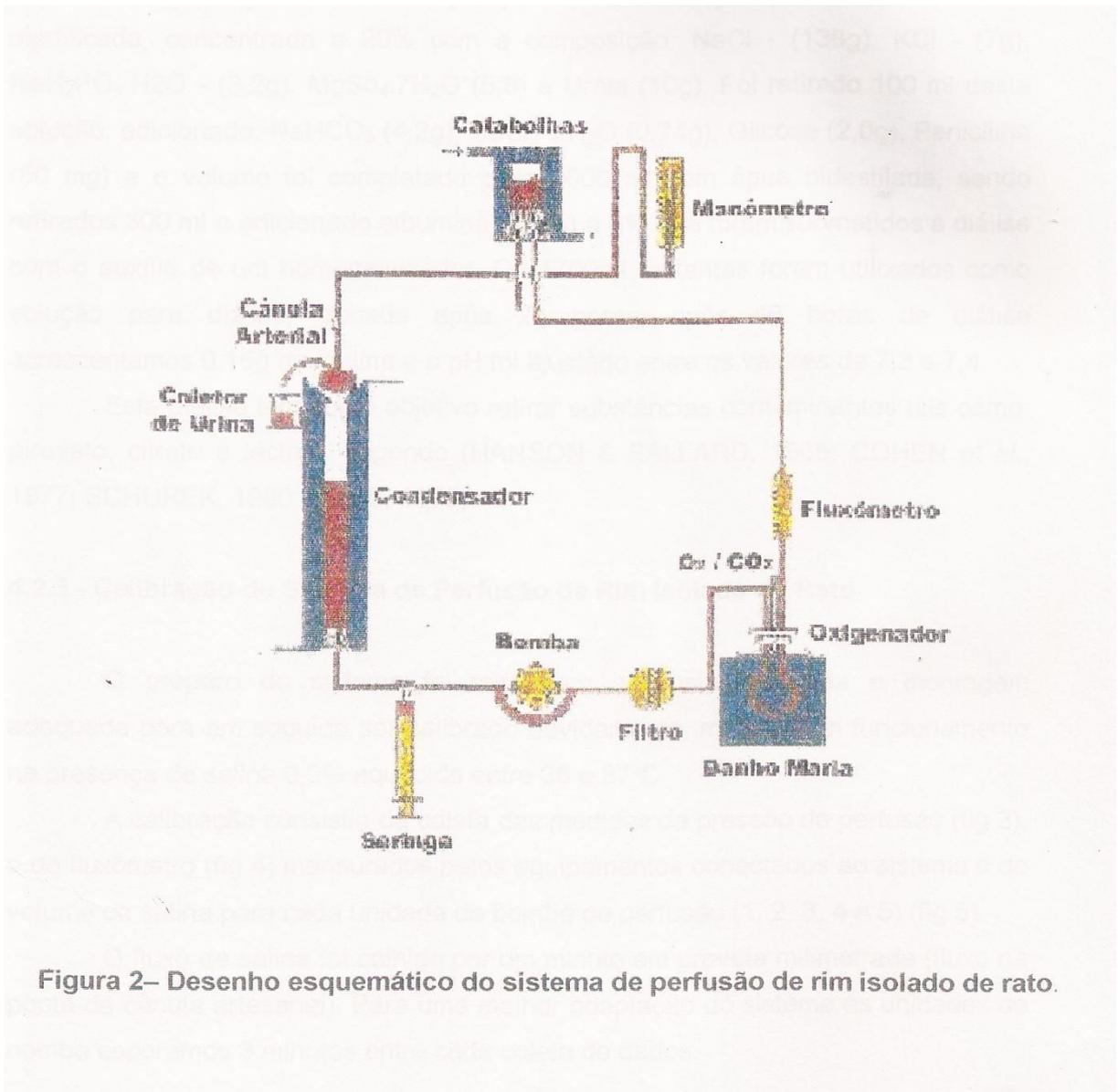
Atualmente existem dois sistemas de perfusão de rim isolados: O sistema aberto, no qual o perfusato não recircula pelo rim onde apesar de manter constante os parâmetros renais eleva o custo pelo gasto aumentado de albumina dificultando a realização dos projetos e o sistema fechado no qual o perfusato recircula pelo rim e apresenta vantagens sobre o primeiro, a saber - utilização de menores doses de albumina; manter as soluções dializadas na solução e a oxigenação pode ser adaptada ao próprio dializadr (MONTEIRO, 1990).

O sistema fechado utilizado em nossos experimentos foi baseado nos estudos de Bowman & Mack (1974) e Ross (1978), modificado por Fonteles (1980) e Moreira Lima (1983) adaptando a oxigenação pelo modelo de Hamilton et al., 1974.

4.2.1 - Componentes do Sistema de Perfusão Renal

A montagem do sistema está esquematizada na figura e descreveremos detalhadamente a função específica de cada componente do mesmo;

- Condensador - responsável pelo aquecimento do cilindro reto que comporta a solução do experimento.
- Coletor de urina - recipiente que permite a coleta da diurese ocorrida pelo rim montado no sistema a intervalo pre-estabelecido.
- Seringa coletora do perfusato - Retire perfusato para análise laboratorial sequenciada no decorso da observação experimental.
- Bomba de perfusão (Watson) - Impulsiona a solução de perfusão através do sistema, permite controle em cinco velocidades diferentes.
- Filtro de milipore - Retire impurezas da solução de perfusão por processo de filtração simples.
- Banho-maria - Mantém o oxigenador aquecido a temperatura entre 36 e 37°C.
- Fluxômetro - Permite o controle do fluxo da solução no sistema.
- Manômetro de mercúrio - Mensura a pressão de perfusão do sistema
- Catabolhas - Capta bolhas de ar do sistema evitando embolia.
- Oxigenador ou pulmão artificial - fornece concentração de oxigênio para promover as trocas gasosas (95% O₂ e 5% CO₂).
- Bomba aquecedora com termostato - aquece todo o sistema de perfusão a uma temperatura constante de 37°C.



4.2.2 - Solução Perfusora e Seu Preparo

Foi empregada como solução perfusora a Solução de Krebs – Henseleit modificada, concentrada a 20% com a composição: NaCl - (138g), KCl - (7g), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - (3,2g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5,8) e Uréia (10g). Foi retirado 100 ml desta solução, adicionado: NaHCO_3 (4,2g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,74g), Glicose (2,0g), Penicilina (50 mg) e o volume foi completado para 2000 ml com água bidestilada, sendo retirados 300 ml e adicionado albumina bovina a 6% que foram submetidos a diálise com o auxílio de um homogeneizador. Os 1700ml restantes foram utilizados como solução para diálise, trocada após 24 horas; após 48 horas de diálise acrescentamos 0,15g de inulina e o pH foi ajustado entre os valores de 7,3 e 7,4.

Esta diálise tem como objetivo retirar substâncias contaminantes tais como: piruvato, citrato e lactato, segundo (HANSON & BALLARD, 1968; COHEN et al., 1977; SCHUREK, 1980; ROSS, 1978).

4.2.3 - Calibração do Sistema de Perfusão de Rim Isolado de Rato

O prepare do sistema foi feito com assepsia criteriosa e montagem adequada para em seguida ser calibrado devidamente, mantido em funcionamento na presença de salina 0,9% aquecida entre 38 e 37°C.

A calibração consistia da coleta das medidas da pressão de perfusão (fig 3), e do fluxômetro (fig 4) mensurados pelos equipamentos conectados ao sistema e do volume de salina para cada unidade da bomba de perfusão (1, 2, 3, 4 e 5) (fig 5).

O fluxo de salina foi colhido por um minuto em proveta milimetrada (fluxo da ponta da cânula artesanal). Para uma melhor adaptação do sistema às unidades de bomba esperamos 3 minutos entre cada coleta de dados.

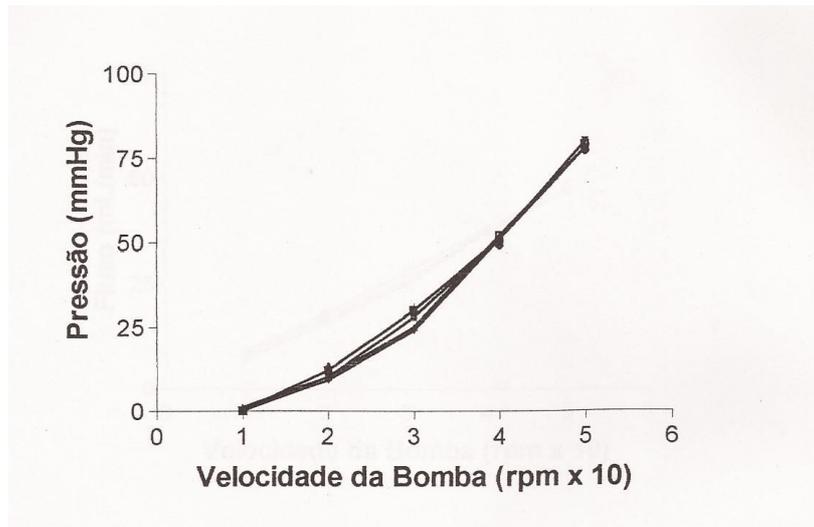


Figura 3 – Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus pressão.

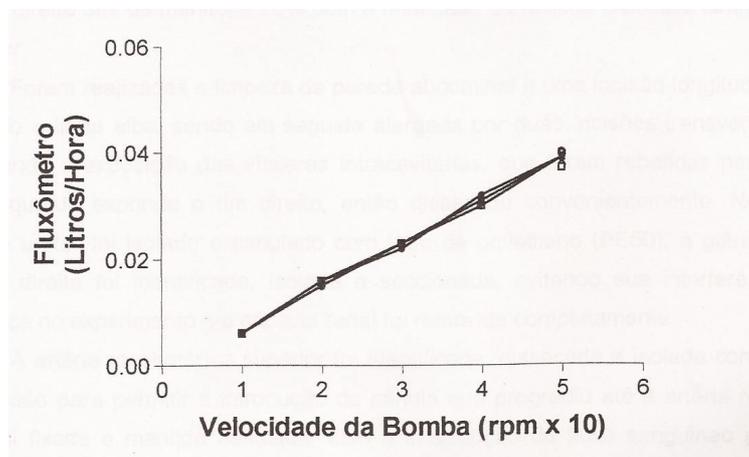


Figura 4 – calibração do sistema. Velocidade da bomba versus medida do fluxômetro.

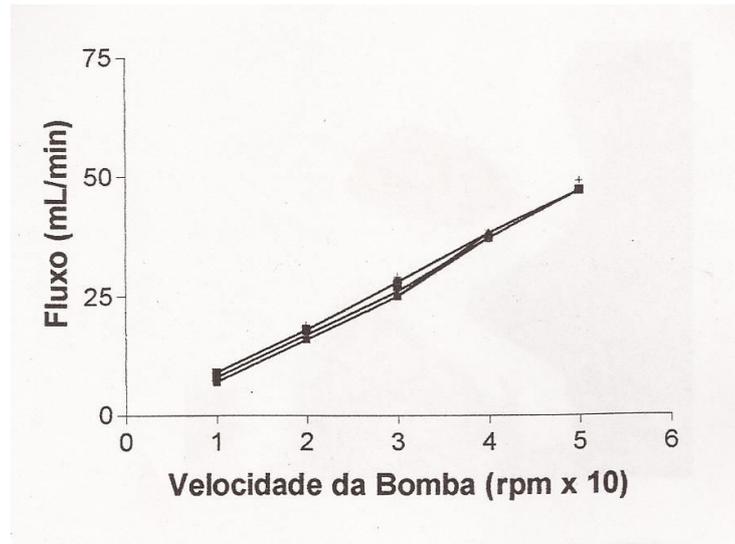


Figura 5 - Calibração do sistema. Velocidade da bomba versus fluxo na ponta da cânula.

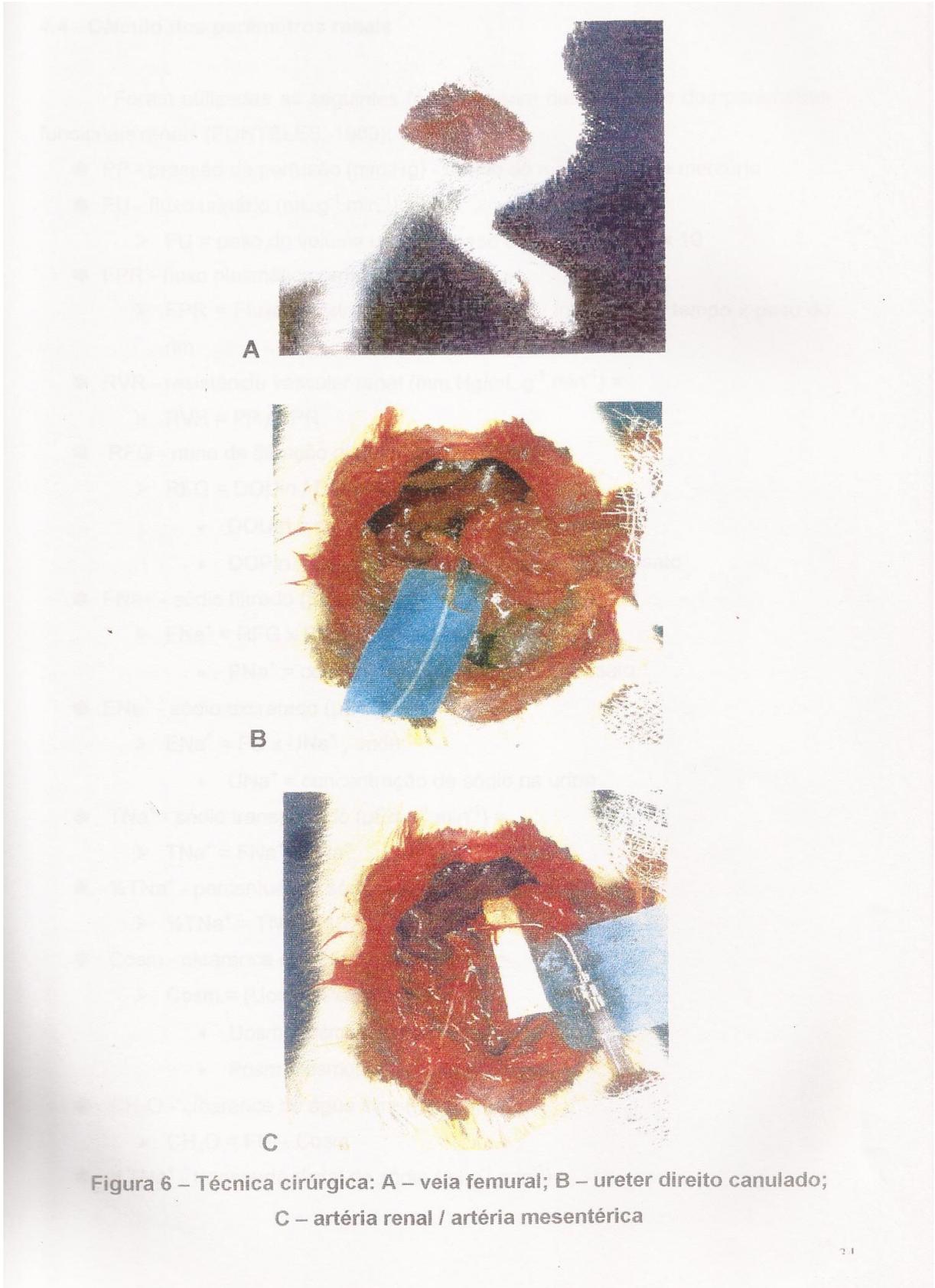
4.3 - Técnica Cirúrgica

Inicialmente, cada animal foi submetido à anestesia intraperitoneal com pentobarbital sódico na dose de 50mg/kg de peso vivo, a seguir foi injetado na veia femoral direita 3ml de manitol a 20% com a finalidade de facilitar o acesso cirúrgico ao ureter.

Foram realizadas a limpeza da parede abdominal e uma incisão longitudinal seguindo a linha alba, sendo em seguida alargada por duas incisões transversais melhorando a exposição das vísceras intracavitárias, que foram rebatidas para o lado esquerdo expondo o rim direito, então dissecado convenientemente. Neste ponto o ureter foi isolado e canulado com tubo de polietileno (PE50), a glândula adrenal direita foi identificada, isolada e seccionada, evitando sua interferência fisiológica no experimento e a cápsula renal foi removida completamente.

A artéria mesentérica superior foi identificada, dissecada e isolada com fio de algodão para permitir a introdução da cânula que progrediu até a artéria renal onde foi fixada e mantida canulada, sem a interrupção do fluxo sanguíneo para possibilitar a perfusão e sequencial acoplamento ao sistema.

A liberação do rim direito foi procedida pela secção dos pedículos com ureter e artéria devidamente canulados sendo interpostos ao sistema de perfusão para estabilização inicial in vitro (fig 6).



4.4 - Cálculo dos parâmetros renais

Foram utilizadas as seguintes fórmulas para determinação dos parâmetros funcionais renais (FONTELES, 1980);

- ❖ PP - pressão de perfusão (mm.Hg) - obtido do manômetro de mercúrio
- ❖ FU - fluxo urinário ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{FU} = \text{peso do volume urinário} / \text{peso do rim esquerdo} \times 10$
- ❖ FPR - fluxo plasmático renal ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{FPR} = \text{Fluxo registrado a cada 10 min.} / \text{intervalo de tempo} \times \text{peso do rim}$
- ❖ RVR - resistência vascular renal ($\text{mm.Hg/mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{RVR} = \text{PP} / \text{FPR}$
- ❖ RFG - ritmo de filtração glomerular ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{RFG} = \text{DOUin} / \text{DOPin} \times \text{FU}$, onde:
 - DOUin = densidade ótica da inulina na urina
 - DOPin = densidade ótica da inulina no perfusato
- ❖ FNa^+ - sódio filtrado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{FNa}^+ = \text{RFG} \times \text{PNa}^+$, onde
 - PNa^+ = concentração de sódio no perfusato
- ❖ ENa^+ - sódio excretado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{ENa}^+ = \text{FU} \times \text{Uma}^+$, onde:
 - Uma^+ = concentração de sódio na urina
- ❖ TNa^+ - sódio transportado ($\mu\text{Eq.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{TNa}^+ = \text{FNa}^+ - \text{ENa}^+$
- ❖ % TNa^+ - percentual de sódio transportado =
 - $\% \text{TNa}^+ = \text{TNa}^+ \times 100 / \text{FNa}^+$
- ❖ Cosm - clearance osmótico ($\text{mL.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{Cosm} = (\text{Uosm} / \text{Posm}) \times \text{FU}$, onde
 - Uosm = osmolaridade urinária
 - Posm = osmolaridade do perfusato
- ❖ CH_2O - clearance de água livre ($\text{ml.Q}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{CH}_2\text{O} = \text{FU} - \text{Cosm}$
- ❖ d TNa^+ - transporte distal de sódio ($\text{ml.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) =
 - $\text{d TNa}^+ = \text{CH}_2\text{O} \times \text{PNa}^+$

- ❖ $Ad Na^+$ - aporte distal de sódio ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) =
 - $Ad Na^+ = d TNa^+ + ENa^+$
- ❖ $pTNa^+$ - transporte proximal de sódio ($\mu Eq.g^{-1}.min^{-1}$) =
 - $pTNa^+ = FNa^+ \times AdNa^+$
- ❖ $pTNa^+$ - percentual de transporte proximal de sódio
 - $pTNa^+ = pTNa^+ \times 100 / FNa^+$

Todos os cálculos realizados para a determinação dos parâmetros do sódio foram repetidos para o potássio e cloreto.

4.5 - Análise histológica

Fragmentos dos rins direito (perfundidos) e esquerdo (controle externo) foram retirados ao fim de cada experimento, e acondicionados em frascos contendo formol 10%. Os fragmentos foram desidratados, diafanizados e, a seguir, cortados numa espessura de 5 μm . O material foi corado por hematoxilina-eosina e as lâminas avaliadas por microscopia óptica (CORMACK, 1991). Todas as lâminas foram confeccionadas no Laboratório de Patologia - BIOPSE, e analisadas no Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC pelo professor Dalgimar Beserra de Menezes.

4.6 – Estatística

Foi usado um computador PC - Pentium (300 Hz) e programa GraphPrism para análise dos dados, expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Todas as tabelas e gráficos que avaliaram os parâmetros renais foram estudados de acordo com a variável tempo, compilados em quatro grupos de 30 minutos denominados: 30, 60, 90 e 120 minutos. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, como comparativo entre os grupos, com significância de 5%.

III. RESULTADOS

Grupo 1 - Rins perfundidos com perfusato, sem Vatairea macrocarpa

Os parâmetros selecionados foram avaliados após perfusão renal com solução de Krebs-Henseleit durante o tempo total do experimento - 120 minutos, sem adicionar a lectina. Os resultados apresentados mostraram S.E.M para os quatro períodos observados 30, 60, 90 e 120 minutos. Os primeiros 30 min foram considerados controle interno.

Grupo 2 - Rins perfundidos com sementes de Vatairea macrocarpa

A administração da lectina obtida a partir de sementes de Vatairea macrocarpa (10 ug/ml) causou um significativo aumento da pressão de perfusão (PP), na resistência vascular renal (RVR), no fluxo urinário (UF), e no ritmo de filtração glomerular (RFG) com um efeito máximo aos 120 min (fig 7, 8, 9, 10). A adição de VML não alterou o percentual do transporte tubular de sódio (%TNa), o percentual do transporte tubular de potássio (%TK) e o percentual do transporte tubular de cloro (%TCl) durante o tempo total de perfusão (fig 11, 13, 15). O percentual do transporte tubular proximal, da mesma forma não foi alterado de maneira estatisticamente significativa (fig 12, 14, 16). Por outro lado a excreção dos íons sódio, potássio e cloro foram aumentadas, bem como a osmolaridade (fig 17, 18, 19, 20).

Grupo 3 - Rins perfundidos com galactose - açúcar específico VML

Para investigar o efeito renal da VML uma lectina ligadora específica de galactose, nós avaliamos a capacidade da galactose sozinha causar alterações nos parâmetros renais a serem investigados e que teriam sido diretamente alterados pela VML dependente do sítio de ligação a carboidratos. Os resultados encontrados foram compatíveis com ausência de interferência na função renal, quando comparado com o grupo controle, podendo-se supor que a galactose nesta dosagem não altera a função renal.

Grupo 4 - Rins perfundidos com o complexo VML - Gal

O complexo lectina conjugada com o açúcar específico (Gal-VML) bloqueou o incremento nos parâmetros avaliados observados após a aplicação da VML relacionados com a (PP) e (RVR). O tratamento com (Gal-VML) também reverteu o efeito observado com no (FU) e (RFG) fig. 1 e 2.

- Figura 07** A lectina Vatairea macrocarpa (VML) induz aumento da pressão de perfusão com diferença estatisticamente significativa nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 08** A lectina Vatairea macrocarpa (VML) interferiu na resistênola vascular renal nos períodos de 60, 90 e 120 minutos, causando aumento com significância estatística.
- Figura 09** A lectina Vatairea macrocarpa (VML) leva a incremento do fluxo urinário com aumento do volume de forma que evidência diferença com significância estatística, nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 10** A lectina Vatairea macrocarpa (VML) aumentou o ritmo de filtração glomerular numa dimensão importante, levando a representatividade estatística nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 11** O percentual de transporte tubular de sódio não foi alterado após a administração da lectina Vatairea macrocarpa (VML) ao sistema, mantendo-se todos os parâmetros analisados sem alteração de significância estatística, nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 12** O percentual de transporte tubular proximal de sódio não foi alterado pela adição da lectina Vatairea macrocarpa (VML).
- Figura 13** O percentual de transporte tubular de potássio não apresentou modificação após a inclusão da lectina Vatairea macrocarpa (VML) ao sistema.
- Figura 14** O percentual de transporte tubular proximal de potássio não apresentou modificação após a inclusão da lectina Vatairea macrocarpa (VML) ao sistema.
- Figura 15** O percentual de transporte tubular de cloro não apresentou modificação após a inclusão da lectina Vatairea macrocarpa (VML) ao sistema.

- Figura 16** O percentual de transporte tubular proximal de cloro não apresentou modificação após a inclusão da lectina Vatairea macrocarpa (VML) ao sistema.
- Figura 17** A excreção de sódio apresentou aumento após a inclusão da lectina Vatairea macrocarpa (VML) ao sistema, nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 18** A excreção de potássio mostra-se aumentada após a administração da lectina Vatairea macrocarpa (VML), nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 19** A excreção de cloro mostra-se aumentada após a administração da lectina Vatairea macrocarpa (VML), nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.
- Figura 20** O clearance osmótico mostra-se aumentado após a administração da lectina Vatairea macrocarpa (VML), nos períodos de 60, 90 e 120 minutos.

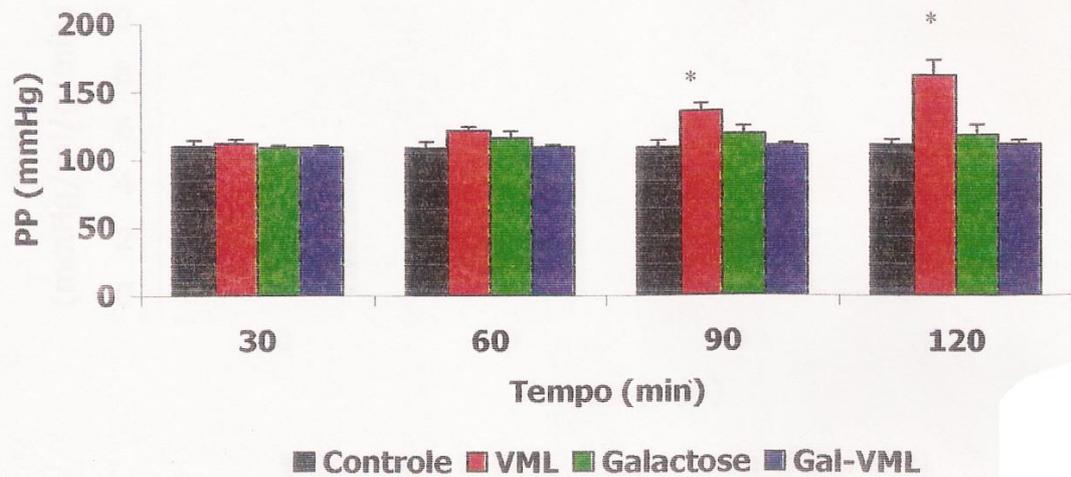


Figura 7 – Efeitos na pressão de perfusão renal (PP) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* – VML (10 μ g/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML (10 μ g/mL). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle

Variáveis (mmHg)	30 min	60 min	90 min	120 min
Controle	110,11 \pm 3,7	108,27 \pm 4,9	108,69 \pm 5,1	110,28 \pm 3,7
VML	112,1 \pm 2,7	121,5 \pm 3,9*	135,5 \pm 5,8*	161,6 \pm 10,6*
Galactose	108,9 \pm 2,1	115,9 \pm 4,9	118,4 \pm 6,2	117,6 \pm 7,6
Gal-VML	109,1 \pm 1,1	109,1 \pm 1,5	109,9 \pm 1,9	111,0 \pm 2,4

TABELA 1: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) na pressão de perfusão renal (PP).

Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

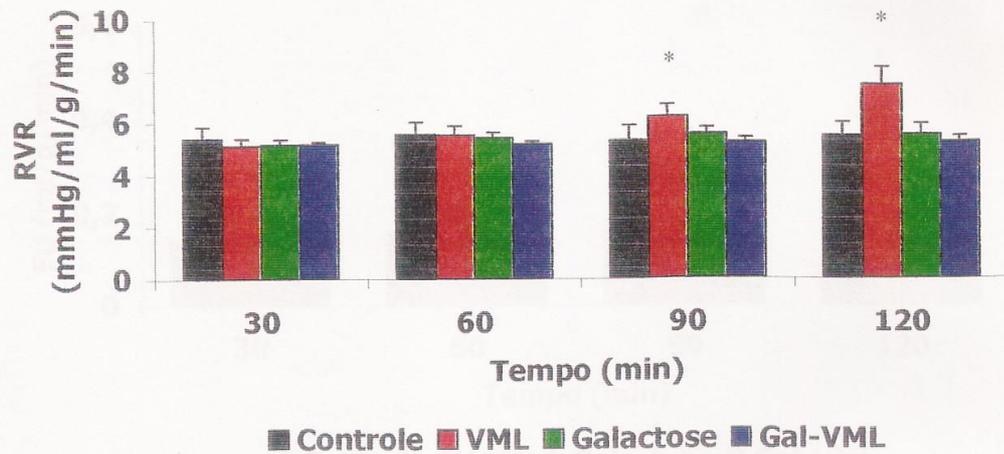


Figura 8 – Efeitos na resistência vascular renal (RVR) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* – VML (10 μ g/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML (10 μ g/mL). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

Variáveis (mm.Hg/mL.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	5,39 \pm 0,48	5,57 \pm 0,49	5,32 \pm 0,57	5,48 \pm 0,53
VML	5,12 \pm 0,28	5,56 \pm 0,33	6,23 \pm 0,45*	7,47 \pm 0,68*
Galactose	5,18 \pm 0,20	5,45 \pm 0,20	5,55 \pm 0,26	5,56 \pm 0,41
Gal-VML	5,18 \pm 0,11	5,19 \pm 0,14	5,23 \pm 0,17	5,29 \pm 0,19

TABELA 2: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) na resistência vascular renal (RVR) Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

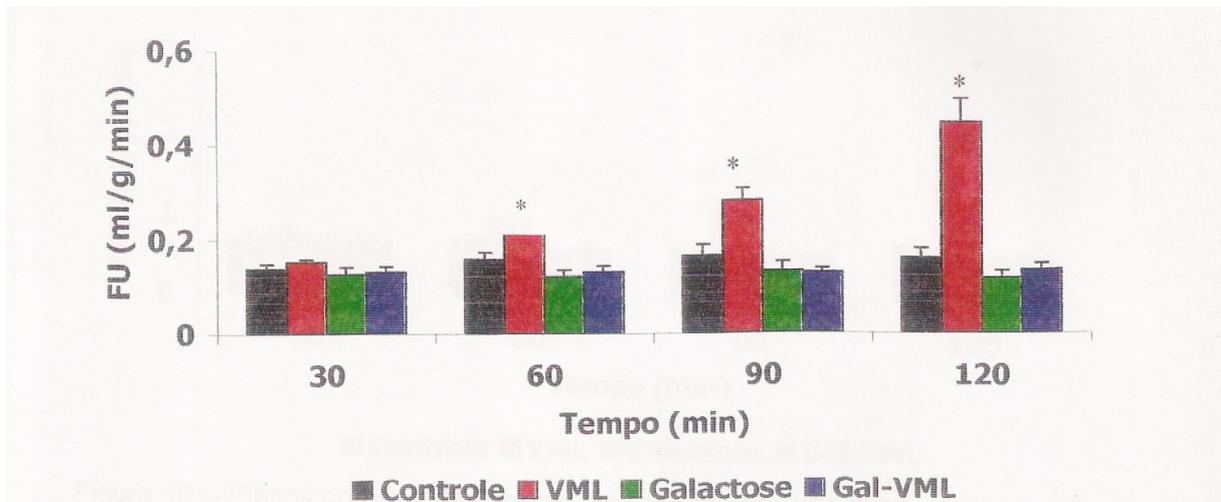


Figura 9 – Efeitos no fluxo urinário (FU) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* – VML (10 μ g/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML (10 μ g/mL). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

Variáveis (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	0,139 \pm 0,009	0,158 \pm 0,015	0,164 \pm 0,024	0,160 \pm 0,020
VML	0,153 \pm 0,007	0,218 \pm 0,018*	0,281 \pm 0,026*	0,445 \pm 0,050*
Galactose	0,126 \pm 0,015	0,122 \pm 0,014	0,132 \pm 0,019	0,118 \pm 0,015
Gal-VML	0,131 \pm 0,011	0,132 \pm 0,012	0,128 \pm 0,009	0,135 \pm 0,014

TABELA 3: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no fluxo urinário (FU).

Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$.*= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

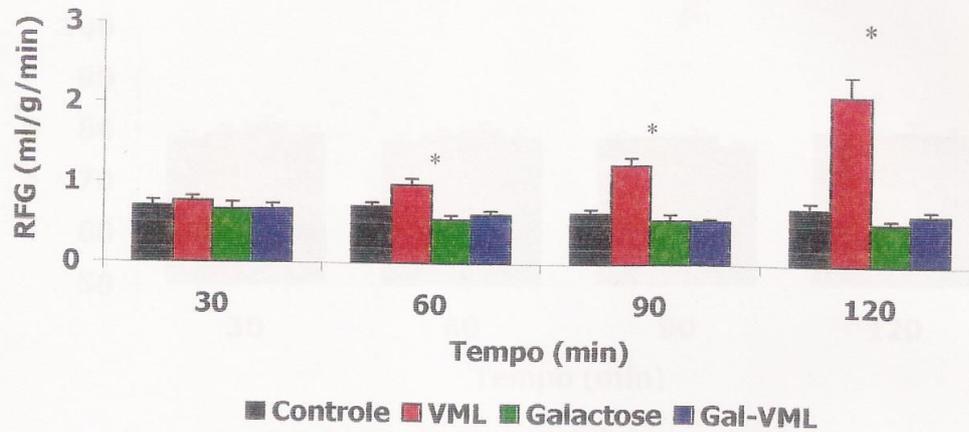
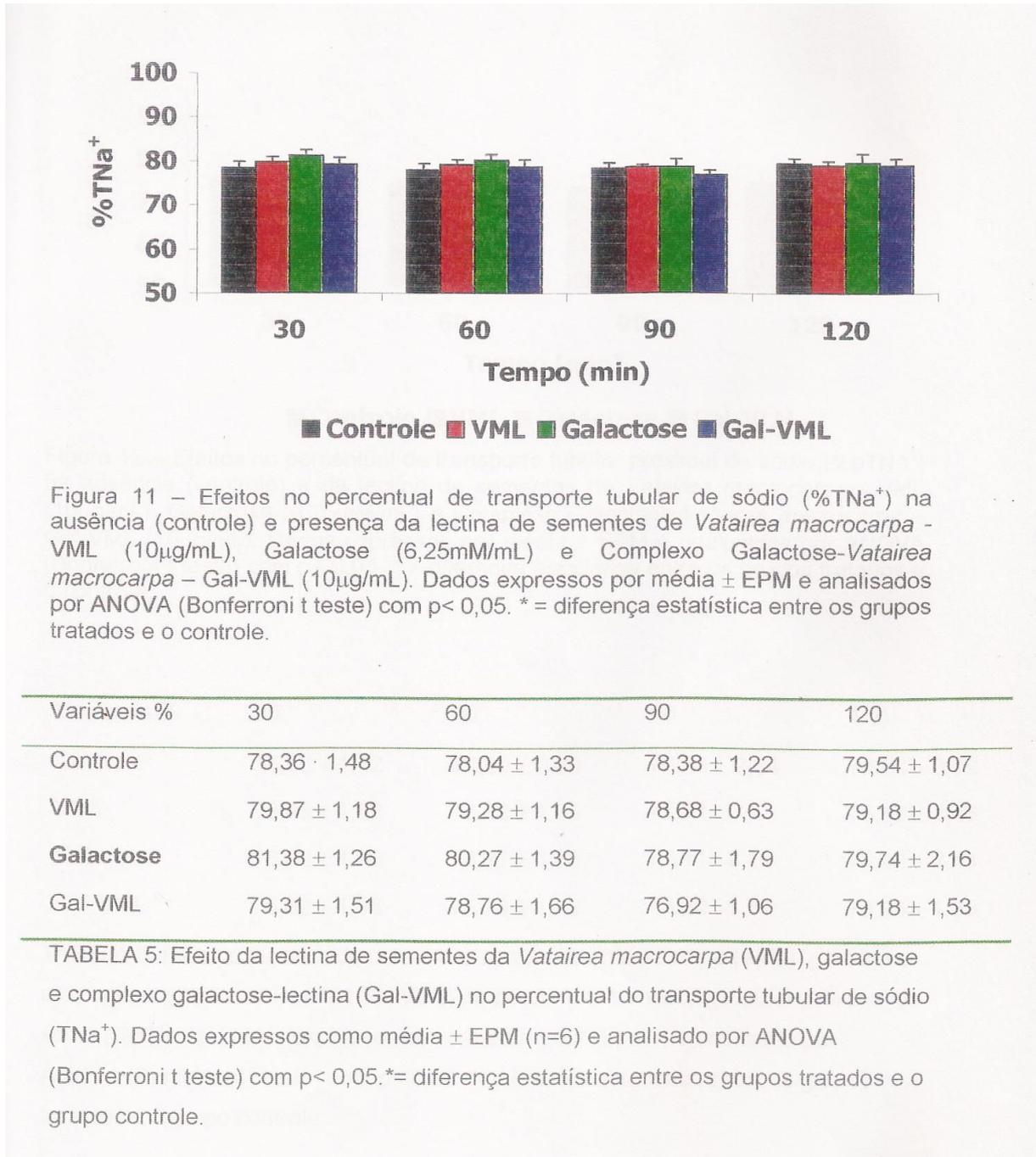


Figura 10 – Efeitos no ritmo de filtração glomerular (RFG) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* - VML (10 μ g/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML (10 μ g/mL). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle;

Variáveis (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	0,701 \cdot 0,073	0,707 \cdot 0,051	0,633 \pm 0,051	0,697 \cdot 0,084
VML	0,770 \cdot 0,059	0,978 \pm 0,076*	1,237 \pm 0,102*	2,121 \pm 0,249*
Galactose	0,663 \pm 0,091	0,551 \pm 0,056	0,552 \pm 0,075	0,530 \cdot 0,051
Gal-VML	0,661 \pm 0,074	0,617 \pm 0,043	0,542 \pm 0,031	0,639 \cdot 0,053

TABELA 4: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no ritmo de filtração glomerular (RFG). Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.



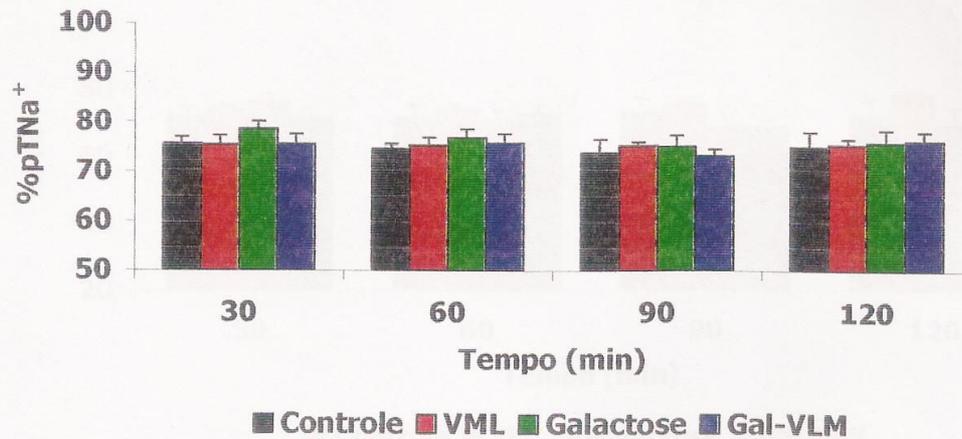


Figura 12 – Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺) na ausência (controle) e da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* - VML (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML (10µg/mL). Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle;

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	75,65 ± 1,42	74,69 ± 0,99	73,84 ± 2,64	74,94 ± 3,02
VML	75,46 ± 1,82	75,33 ± 1,65	75,21 ± 0,82	75,42 ± 1,13
Galactose	78,69 ± 1,46	76,97 ± 1,65	75,11 ± 2,15	75,96 ± 2,43
Gal-VML	75,62 ± 1,96	75,78 ± 1,89	73,22 ± 1,31	76,28 ± 1,85

TABELA 6: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no percentual transporte tubular proximal de sódio (%pTNa⁺). Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

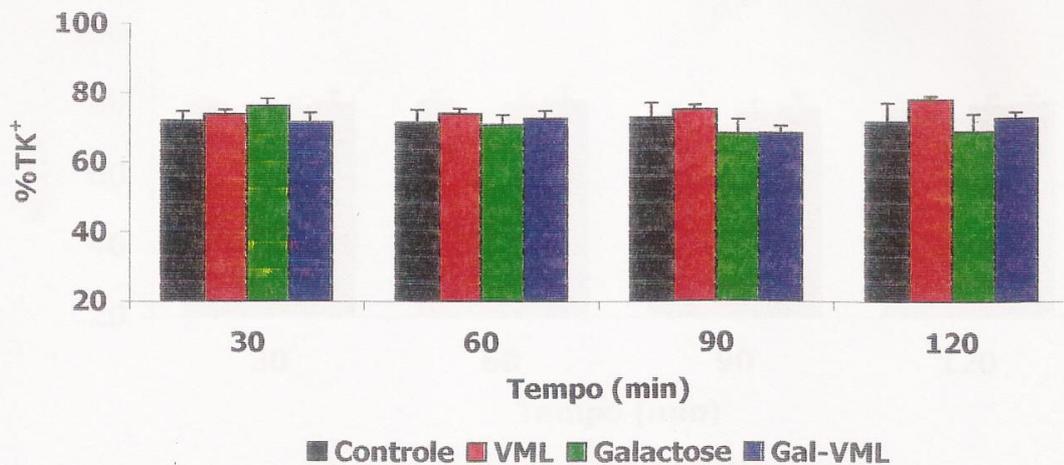


Figura 13 – Efeitos no percentual de transporte tubular de potássio (%TK⁺) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* - VML (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* - Gal-VML (10µg/mL). Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle;

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	72,00 ± 2,75	71,47 ± 3,76	72,97 ± 4,15	71,66 ± 5,53
VLM	73,98 ± 1,22	74,11 ± 1,43	75,28 ± 1,22	78,25 ± 0,89
Galactose	76,33 ± 2,03	70,86 ± 2,91	67,14 ± 3,21	67,55 ± 5,04*
Gal-VLM	71,46 ± 2,80	72,62 ± 2,28	68,28 ± 2,07	72,73 ± 1,86

TABELA 7: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no percentual do transporte tubular de potássio (%TK⁺). Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

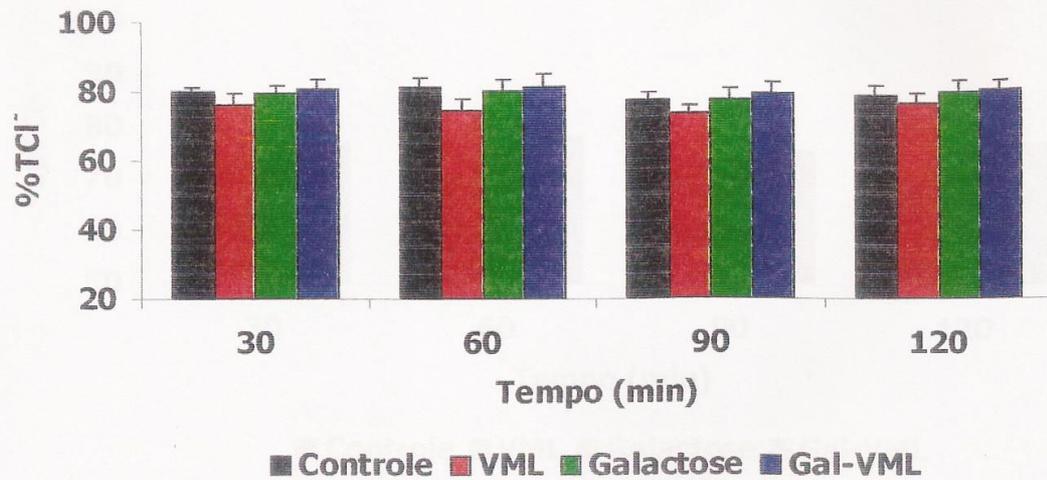


Figura 15 – Efeitos no percentual de transporte tubular de cloro (%TCl⁻) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* - VML (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML(10µg/mL). Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com p< 0,05. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	79,90 ± 1,03	81,25 ± 2,44	77,32 ± 2,22	78,53 ± 2,33
VML	76,38 ± 2,84	74,21 ± 3,30	73,61 ± 1,74	76,20 ± 2,61
Galactose	79,58 ± 2,16	79,84 ± 3,75	77,07 ± 3,42	79,66 ± 3,33
Gal-VML	80,63 ± 2,82	81,16 ± 3,84	78,88 ± 3,07	79,82 ± 3,16

TABELA 9: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no percentual do transporte tubular de cloro (%TCl⁻). Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p< 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

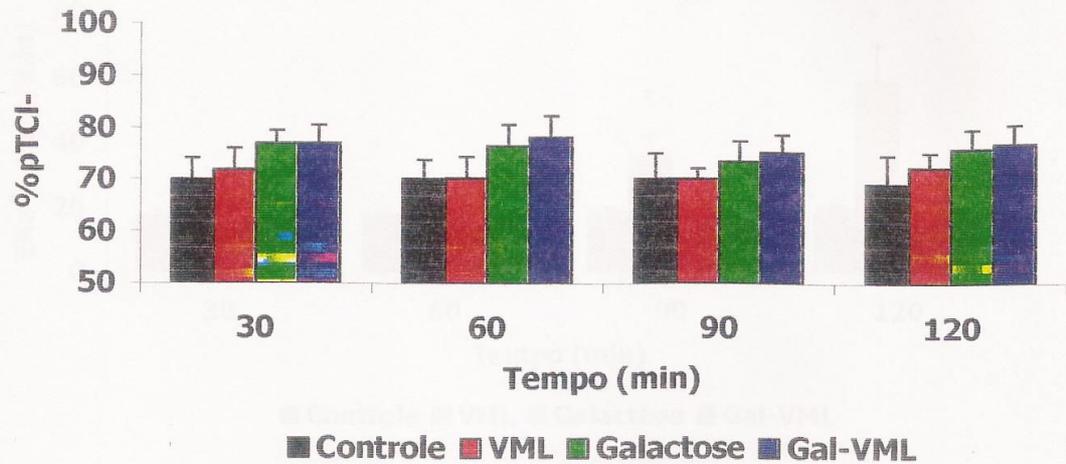


Figura 16 – Efeitos no percentual de transporte tubular proximal de cloro (%pTCl⁻) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* - VML (10µg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* - Gal-VML (10µg/mL). Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle;

Variáveis %	30	60	90	120
Controle	69,92 ± 4,09	70,13 ± 3,69	70,18 ± 4,86	69,17 ± 5,64
VML	71,97 ± 4,02	70,26 ± 4,11	70,14 ± 2,06	72,45 ± 2,81
Galactose	76,90 ± 2,50	76,54 ± 4,14	73,41 ± 4,05	75,89 ± 3,85
Gal-VML	76,94 ± 3,51	78,17 ± 4,20	75,18 ± 3,51	76,91 ± 3,69

TABELA 10: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no percentual do Transporte tubular proximal de cloro (%pTCl⁻). Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

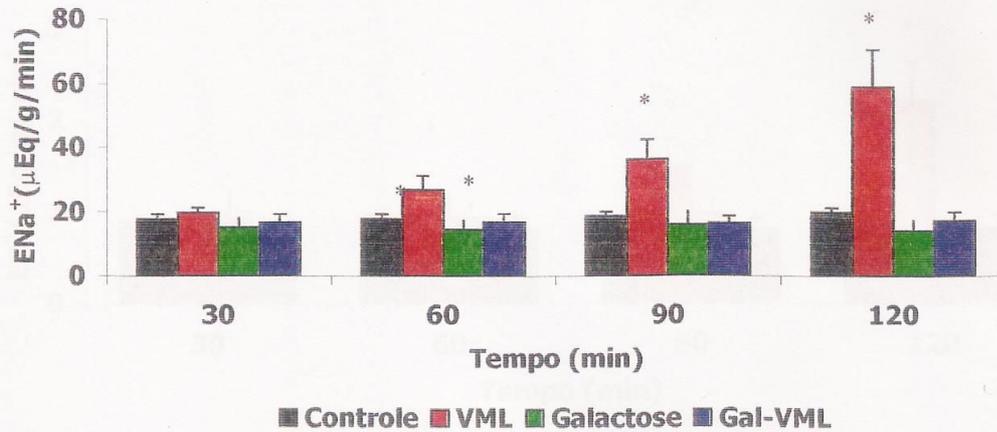


Figura 17 – Efeitos na excreção de sódio (ENa^+) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* – VML ($10\mu\text{g/mL}$), Galactose ($6,25\text{mM/mL}$) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML ($10\mu\text{g/mL}$). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

Variáveis	30	60	90	120
($\mu\text{Eq/g/min}$)				
Controle	17,81 \pm 1,43	17,74 \pm 1,51	18,76 \pm 1,31	19,74 \pm 1,48
VML	19,68 \pm 1,69	27,01 \pm 4,17*	36,26 \pm 6,14*	58,80 \pm 11,58*
Galactose	15,37 \pm 2,82	14,70 \pm 2,83	16,60 \pm 4,02	14,32 \pm 3,05
Gal-VML	16,86 \pm 2,37	16,99 \pm 2,49	16,53 \pm 2,01	17,23 \pm 2,89

TABELA 11: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) na excreção de sódio (ENa^+) Dados expressos como média \pm EPM ($n=6$) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

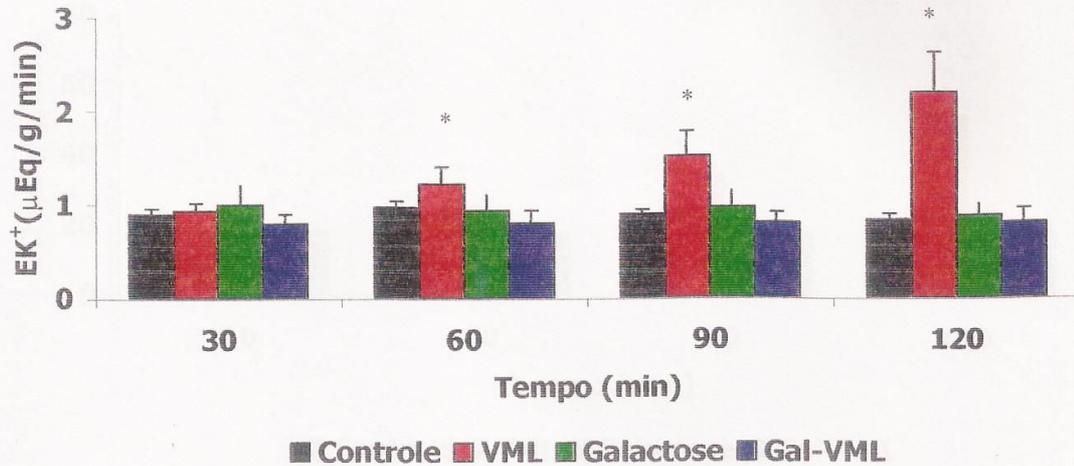


Figura 18 – Efeitos na excreção de potássio (EK^+) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* – VML ($10\mu\text{g/mL}$), Galactose ($6,25\text{mM/mL}$) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML ($10\mu\text{g/mL}$). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle;

Variáveis ($\mu\text{Eq/g/min}$)	30	60	90	120
Controle	$0,90 \pm 0,067$	$0,98 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,06$
VML	$0,94 \pm 0,08$	$1,22 \pm 0,19^*$	$1,51 \pm 0,27^*$	$2,20 \pm 0,43^*$
Galactose	$1,00 \pm 0,21$	$0,94 \pm 0,17$	$0,97 \pm 0,17$	$0,88 \pm 0,12$
Gal-VML	$0,80 \pm 0,10$	$0,81 \pm 0,13$	$0,81 \pm 0,11$	$0,81 \pm 0,15$

TABELA 12: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) na excreção de potássio (EK^+). Dados expressos como média \pm EPM ($n=6$) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

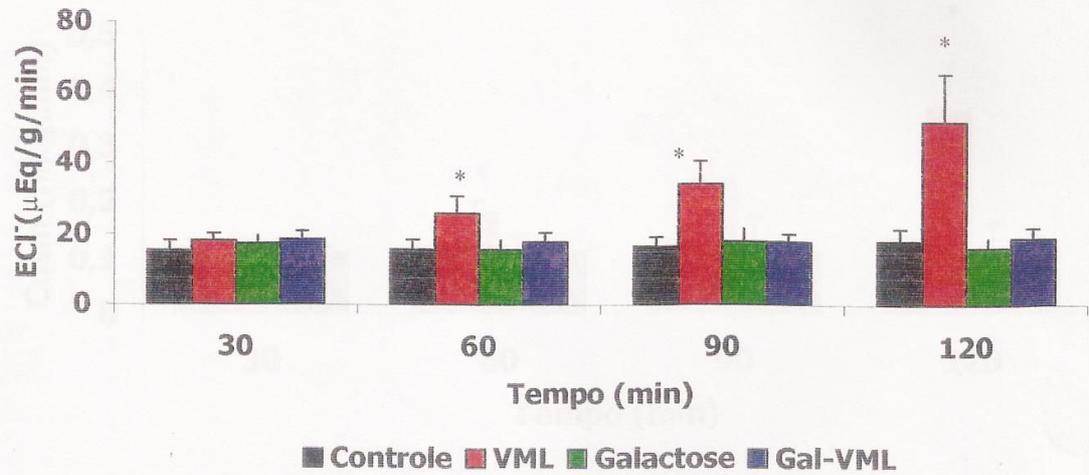


Figura 19 – Efeitos na excreção de cloro (ECI⁻) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* VML (10μg/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* – Gal-VML (10μg/mL). Dados expressos por média ± EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

Variáveis (μEq/g/min)	30	60	90	120
Controle	15,38 ± 2,87	15,62 ± 2,87	16,71 ± 2,70	18,17 ± 3,42
VML	18,27 ± 2,05	25,90 ± 4,95*	34,27 ± 6,50 *	52,12 ± 13,55*
Galactose	17,39 ± 2,33	15,70 ± 2,67	18,03 ± 3,62	16,25 ± 2,72
Gal- VML	18,63 ± 2,19	17,95 ± 2,56	17,98 ± 2,14	13,06 ± 2,85

TABELA 13: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) na excreção do cloro (ECI⁻). Dados expressos como média ± EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com p < 0,05. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

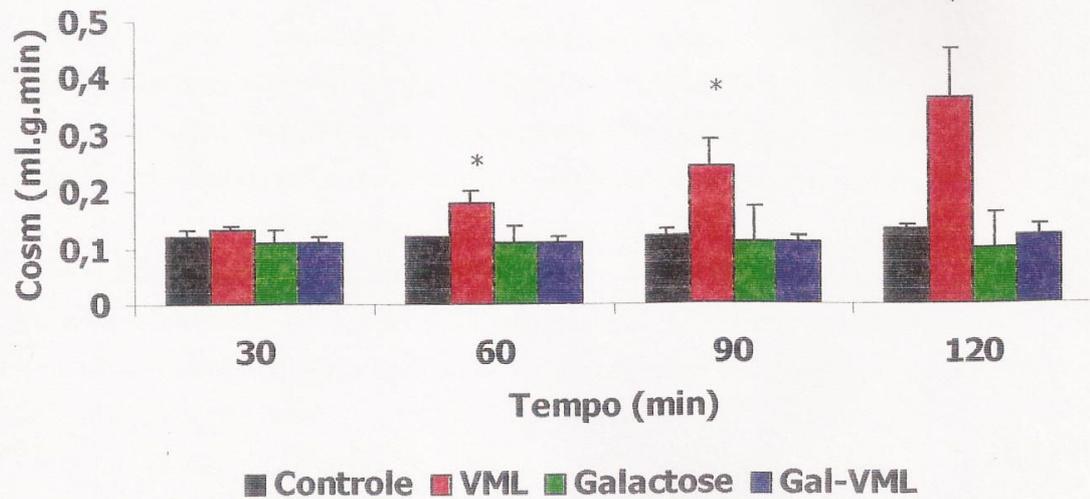


Figura 20 – Efeitos no clearance osmótico (Cosm) na ausência (controle) e presença da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* - VML (10 μ g/mL), Galactose (6,25mM/mL) e Complexo Galactose-*Vatairea macrocarpa* - Gal-VML (10 μ g/mL). Dados expressos por média \pm EPM e analisados por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. * = diferença estatística entre os grupos tratados e o controle.

Variáveis (ml.g ⁻¹ .min ⁻¹)	30	60	90	120
Controle	0,12 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,13 \pm 0,02
VML	0,13 \pm 0,02	0,17 \pm 0,02*	0,24 \pm 0,04*	0,36 \pm 0,07*
Galactose	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02
Gal-VML	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02

TABELA 14: Efeito da lectina de sementes da *Vatairea macrocarpa* (VML), galactose e complexo galactose-lectina (Gal-VML) no clearance osmótico (Cosm). Dados expressos como média \pm EPM (n=6) e analisado por ANOVA (Bonferroni t teste) com $p < 0,05$. *= diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle.

IV. DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

O objetivo geral deste trabalho foi investigar alterações sobre a função renal decorrentes de uma possível atividade biológica da lectina *Vatairea macrocarpa* (VML), levando em consideração modificações vasculares, glomerulares e tubulares, na perspectiva do entendimento dos mecanismos farmacológicos envolvidos nesta resposta, através do bloqueio com o açúcar específico para esta lectina, a galactose.

O rim é um órgão de extrema importância no metabolismo dos seres vivos, tendo em vista o alto fluxo sanguíneo e a capacidade de concentrar substâncias a serem eliminadas através da urina, utilizando para tanto, suas funções de filtração e depuração (BURDMANN, 1993).

A perfusão em rim isolado de rato tem sido largamente utilizada como modelo de estudo para investigação de efeitos vasculares de substâncias biologicamente ativas excluindo a interferência sobre a função renal de hormônios, substâncias vasoativas endógenas e outros fatores carregados através da corrente sanguínea (FONTELES, 1980; MONTEIRO, 1999).

As lectinas isoladas a partir de sementes vegetais exercem uma grande variedade de efeitos biológicos e numerosas evidências apontam o envolvimento desta classe de proteínas ligadoras de carboidratos mediando o reconhecimento celular em uma grande variedade de fenômenos biológicos: adesão de vírus, bactérias e protozoários as células do hospedeiro (SHARON & LIS, 1989); alterações de parâmetros funcionais renais (TEIXEIRA et al., 2001); alterações de natureza inflamatória (ALENCAR et al., 2001).

A investigação dos mecanismos envolvidos na interação célula-célula passou a ressaltar a importância dos carboidratos nos processos bioquímicos, até então vistos apenas como moléculas ricas em energia ou meros elementos prostéticos.

Nos últimos anos, tem havido um número crescente de evidências favorecendo o conceito de que os carboidratos são elementos determinantes de reconhecimento em uma grande variedade de processos biológicos, tanto fisiológicos quanto patológicos. Tendo sido bem estabelecido, a importância dos carboidratos nos mecanismos envolvidos na interação célula-célula relacionados com atividades biológicas, sendo assim, esta capacidade presente em algumas classes de lectinas que reagem de forma específica e com afinidade variável por carboidratos as transformam em valiosos insumos nas pesquisas e podem ser

utilizadas como ferramentas farmacológicas, justificando o aumento crescente no seu campo de estudo e alargando as possibilidades de aplicabilidade terapêutica (TEIXEIRA et al., 2001; ALENCAR et al., 2001; HAVT et al., 2003).

A evolução deste conceito baseou-se no fato de que estas moléculas, em função de seus múltiplos monômeros de ligação e de suas estruturas ramificadas, apresentam um enorme potencial para codificar informações biológicas. As mensagens codificadas nas estruturas de carboidratos complexos são decifradas por domínios de reconhecimento de carboidratos. Estes domínios estão presentes em proteínas com capacidade de ligação a estes tais como glicosidases, glicosiltransferases, anticorpos e lectinas.

Estas proteínas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas nos cinco grandes grupos da classificação geral dos seres vivos. No reino vegetal, os grupos mais estudados são as algas marinhas e os vegetais superiores. Entre as plantas superiores, as sementes quiescentes da família de leguminosas constituem uma das principais fontes de lectinas.

O isolamento de substâncias vegetais com possíveis aplicabilidades terapêuticas pode ser uma opção para diminuir os custos financeiros na condução dos tratamentos a longo prazo. No que diz respeito às lectinas de plantas, mais especificamente a utilizada no nosso trabalho, trata-se de proteínas que podem ser isoladas e purificadas de sementes de leguminosas abundantes em nosso estado, através de técnicas simples, de baixo custo e com possibilidades de excelente rendimento, podendo ser alvo de produção através de técnicas de biologia molecular.

Em 1997, Engel e colaboradores realizaram um estudo comparativo entre lectinas de distintas especificidades por carboidratos. Neste estudo, diversas peças de tecido renal foram expostas a diferentes lectinas, ao final do trabalho foi observado que as lectinas se ligavam em diferentes tipos de células renais, dependendo do açúcar pelo qual cada uma tinha especificidade. Ficou demonstrado que Jacalina, uma lectina específica para o monossacarídeo D-galactose ligava-se fortemente a células renais dos tubulos contorcidos distais e ductos coletores, no entanto, não se fixava a células dos tubulos contorcidos proximais. A lectina PHA, oriunda das sementes de *Phaseolus vulgaris*, uma lectina específica para estruturas glicanas, ligava-se em 50% aos tubulos contorcidos proximais.

Desta forma, seguindo-se nos estudos relacionando a classe de lectinas e afinidade por diferentes tecidos em diferentes espécies, pode-se observar que algumas lectinas podem se ligar particularmente ao mesmo tipo de células renais independente da espécie estudada, no entanto outras lectinas ligam diferentes células renais em diferentes espécies.

Os mesmos autores observaram também que a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA) em 30% dos experimentos, podia se fixar as células renais da alça de Henle, configurando a existência de afinidade por tecido renal distinta entre as diversas classes de lectinas estudadas, de intensidade variável, provavelmente relacionada com a especificidade das mesmas. Entretanto, não se fez nenhum relato, neste estudo, que justificasse a interferência destas proteínas sobre a fisiologia renal.

Em 2001, Teixeira e colaboradores demonstraram que a lectina de *Canavalia brasilienses* (ConBr) causava aumento da pressão de perfusão (PP) e resistência vascular renal (RVR), bem como do fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), no entanto, desencadeava redução dos percentuais de transportes tubulares dos íons sódio, potássio e cloro. Este foi o primeiro relato na literatura descrevendo interferências na fisiologia renal pela ação biológica de lectinas, tendo sido realizado em sistema de perfusão renal pelo nosso grupo de pesquisa.

Os mesmos autores, dando seguimento aos experimentos, a partir da observação de resultados de trabalhos anteriores demonstraram que semelhanças estruturais entre as lectinas de *Canavalia brasilienses* (ConBr), *Canavalia ensiformes* (ConA), *Dioclea guianenses* (Dguil) e *Cratylia floribunda* (CFL) resultaram em diferentes alterações da fisiologia renal, modificando por vezes o transporte tubular de íons, associado ou não a alterações dos parâmetros vasculares.

Na investigação do mecanismo de ação destas lectinas vegetais sobre a fisiologia renal, analisando os parâmetros vasculares e transportes tubulares de íons, foi sugerido que a origem destas ações se relacionasse com mecanismos distintos, agindo de forma direta sobre o leito vascular renal ou através da liberação de fatores vasoativos. De alguma forma estas proteínas estariam promovendo a de substâncias pelos rins com ação no endotélio e nos túbulos renais. Especula-se a presença de eicosanóides renais no decorrer do processo (HAVT et al., 2003).

Anteriormente outros autores, em trabalhos relacionando substâncias derivadas do ácido aracdônico com a função renal, descreveram a importância dos prostanóides produzidos no rim, estabelecendo que estas substâncias quando secretadas podem interferir tanto na hemodinâmica quanto no controle renal de sal e água (FOEGH et al., 1998). Encontra-se ainda descrito na literatura que as células mesangiais glomerulares são macrófagos e estes quando ativados podem liberar eicosanóides, com repercussão de intensidade variável na fisiologia renal (KOEPEN & STANTON, 1997).

A partir destes dados da literatura correlacionando a ação desta classe de proteínas com a função renal, na intenção de investigar a possível existência de mecanismos que possam ser estabelecidos como causadores de ações biológicas desta lectina sobre a fisiologia renal, e então configurar sua utilização no arsenal farmacoterapêutico decidimos estudar uma lectina ligadora de galactose, *Vatairea macrocarpa* (VML), cuja estrutura foi identificada recentemente.

Estudando uma lectina de especificidade diferente objetivamos configurar efeitos distintos.

Nos estudos relativos à função renal, as lectinas específicas para glicose e manose causaram menor intensidade de efeito que as lectinas com afinidade para galactose. Uma nova ótica desta investigação foi à busca do entendimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos nos efeitos induzidos pela *Vatairea macrocarpa* (VML), observando estes achados já estabelecidos, somados ao conjunto de dados encontrados, pode-se supor que decorrem de mecanismos distintos ainda não completamente esclarecidos.

Utilizando um modelo de perfusão renal em rim isolado de rato, semelhante ao descrito anteriormente, ficou estabelecido que a lectina a partir de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) produz alterações na fisiologia renal, modificando dentre os parâmetros estudados: a pressão de perfusão (PP), a resistência vascular renal (RVR), o ritmo de filtração glomerular (RFG) e o fluxo urinário (FU), entretanto esta lectina não alterou, de forma estatisticamente significativa, os percentuais de transporte tubulares dos íons cloro, sódio e potássio. Por outro lado a excreção dos íons estudados sódio, potássio e cloro, após a adição da *Vatairea macrocarpa* (VML), foram aumentadas, bem como a osmolaridade.

A partir dos resultados encontrados, demonstrou-se que a *Vatairea macrocarpa* (VML) apresenta ação sobre os parâmetros vasculares e/ou

glomerulares renais, podendo configurar ação direta ou indireta sobre a função renal, no entanto, apresentou pouco efeito sobre a filtração e reabsorção tubular renal mantendo os parâmetros de transporte tubular analisados sem alteração com representação estatística significativa, porém, foi observado um aumento da excreção renal de todos os íons estudados.

Para configurar o efeito renal da *Vatairea macrocarpa* (VML) uma lectina ligadora específica de galactose, nos avaliamos a capacidade da galactose sozinha causar alterações nos parâmetros renais a serem investigados e que poderiam ter sido diretamente alterados pela *Vatairea macrocarpa* (VML) dependente do sítio de ligação a carboidratos.

Os resultados encontrados foram compatíveis com ausência de interferência na função renal pela galactose em quase todos os parâmetros estudados quando comparados com o grupo controle, no entanto, o percentual de transporte tubular proximal de potássio (%pTK) aos 60, 90 e 120 minutos encontra-se ligeiramente reduzido, sendo de alguma forma compensado, visto que, o percentual de transporte tubular de potássio (%TK) encontra-se mantido, podendo-se supor que a galactose nesta dosagem pouco altera os parâmetros renais, talvez por algum tipo de compensação na função renal.

Portanto, o efeito renal observado, pode ser analisado como atividade biológica da *Vatairea macrocarpa* /ML, em decorrência de sua ação direta sobre as células glomerulares ou indiretamente a partir do estímulo a liberação de mediadores renais, que venham a desencadear tais alterações.

A considerável diferença encontrada no efeito renal pode estar relacionada a atividade carboidrato-ligante, ligada a especificidade da lectina estudada. Tendo em vista que a ConBr é uma lectina glicose-manose específica e a VML é uma lectina ligadora de galactose, que representaria uma maior potência de sua atividade biológica. Isto reforça a teoria de que diferenças estruturais, mesmo pequenas alterações nos resíduos de aminoácidos, podem interferir na atividade biológica.

O complexo lectina conjugada com o açúcar específico (Gal-VML) bloqueou o incremento nos parâmetros avaliados observados após a aplicação da lectina *Vatairea macrocarpa* (VML) relacionados com pressão de perfusão (PP), resistência vascular renal (RVR), fluxo urinário (FU) e ritmo de filtração glomerular (RFG), configurando efeito relacionado com o sítio carboidrato ligante.

Em 2001, Cavada e colaboradores afirmaram que características físico-químicas como especificidade aos complexos carboidratados, o equilíbrio dímero-tetrâmero dependente do pH e a orientação relativa dos sítios ligantes de carboidrato podem interferir na posição dos aminoácidos na estrutura primária e, conseqüentemente, na atividade biológica das lectinas.

Foi demonstrado ainda que a especificidade pelo carboidrato reflete diretamente a intensidade do efeito biológico e não sua estrutura primária, visto que lectinas com 98% de homologia estrutural causam efeitos de intensidade diferente na fisiologia renal (HAVT et al., 2001).

Algumas evidências indicam ainda que mediadores endógenos podem contribuir para os diferentes efeitos biológicos exercidos por esta classe de lectinas estudada.

A perfusão com o complexo lectina-açúcar (Gal-VML) não apresentou qualquer alteração nos parâmetros estudados, demonstrando que o efeito observado é relacionado com a lectina em si e tem relação com o domínio lectínico, portanto, a VML apresenta importante efeito sobre o sistema renal relacionado ao sítio carboidrato ligante, tendo em vista que demonstramos a reversão do efeito renal utilizando um inibidor específico.

Finalmente ressaltamos que o presente trabalho é pioneiro na demonstração da atividade da VML sobre o sistema renal.

V. CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que;

1. A lectina proveniente de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML), apresenta atividade biológica sobre o sistema renal.
2. A pressão de perfusão (PP) e a resistência vascular renal (RVR) apresentaram aumento significativo após a adição da lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) no sistema renal, podendo significar um reflexo da ação da substância diretamente sobre os vasos ou indiretamente por liberação de mediadores endógenos que contribuam para este resultado.
3. O fluxo urinário (FU) e o ritmo de filtração glomerular (RFG) apresentaram aumento importante, podendo-se supor um efeito diurético da substância ou ação sobre a filtração em decorrência da elevação da pressão de perfusão (PP) sobre os glomérulos com aceleração do processo de filtração.
4. A nível de túbulos renais as alterações observadas denotam ação compensada pela função tubular, ou seja, pouco efeito a nível de transporte no túbulo proximal, mantendo o percentual de transporte de íons como um todo sem significado estatístico.
5. A excreção dos eletrólitos sódio, potássio e cloro, bem como a osmolaridade estão aumentadas, levando em conta que o percentual de transporte tubular foi mantido, sugerimos um mecanismo compensatório, ainda não esclarecido, ter sido desencadeado para justificar tal alteração.
6. Os efeitos observados relacionados com a substância são dependentes dos domínios lectínicos, sítios de ligação a açúgar, visto que, foram revertidos quando se bloqueou os sítios carboidratos ligantes da VML, utilizando o complexo (Gal-VML) para configurar o bloqueio eficaz.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, NI. Lectin-induced NO production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-112, 1999.

ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, M.A.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leucocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, p. 107-113, 1999.

AUB, J.C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumour cell surfaces to enzymes. I Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 50, p. 613-619, 1963.

BABA, K.; OGAWA, M.; NAGANO, A.; KURODA, H.; SUMIYA, K. Developmental changes in the bark lectin of *Sophorajaponica* L. **Planta**, v. 183, p. 462-470, 1991.

BAHLMAN, J.; GIEBISH, G.; GCHWADT, B.; SCHOEPE, W. Micropuncture study of isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 212, p. 77-82, 1967.

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, p. 480-482, 1988.

BARONDES, S.H.; COOPER, D.N.; GITT, M.A.; LEFFLER, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J Biol Chem.** Aug 19;269(33):20807-10. 1994.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the DiocLeae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BEZOUSKA, K.; VLAHAS, G.; HORVÁTH, O.; JINOCHOVÁ, G.; FIEROVÁ, A., GIORDA, R., CHAMBERS, W. H., FEIZI, T., AND POSPÍL, M. Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. **J. Biol. Chem**, v. 269, p. 16945-16952, 1994.

BEUTH, J.; KO, H.L.; PULVERER, G.; UHLENBRUCK, G. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. **Glycoconjugate J.**, v. 12, p. 1-6, 1995.

BIRD, G. W. G.; ROY, T. C. F. Human antibodies to melibiose and other carbohydrates. **Vox Sanguinis**, v. 38, p. 169-171, 1980.

BIRD, G. W. G. Lectins in immunohematology. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 3, p. 55-62, 1989.

BORDET, J.; GAY, F.P. Sur les relations des sensibilisatrices avec l'alexine. **Annals Institute Pasteur**, v. 20, p. 467-498, 1906.

BORK, P.; BECKMANN, G. The CUB domain; a widespread module in developmentally regulated proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 231, p. 539-545, 1993.

BOURNE, Y., ROUGÉ, P., CABBILLAU, C. X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex at 2.3 angstroms resolution, **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 197-203, 1992.

BOURNE, Y.; ABERGEL, C.; CABBILLAU, C.; FREY, M.; ROUGE, P.; FONTECILLA-CAMPS, J. C. X-ray crystal structure determination and refinement at 1.9 Å resolution of isolectin I from the seeds of *Lathyrus ochrus*. **J. Mol. Biol.**, v. 214, p. 571-584, 1990.

BOWMAN, R. H. Glucose transport by the isolated perfused rat kidney, **Am. J. Physiol.**, v. 222, n° 6, p. 1499-1504, 1972.

BDWMAN, R. H.; MAAK, T. Effect of albumin concentration and ADH on H₂O and electrolyte in perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n. 2, p. 426-430, 1974.

BOYD, W. C. AND SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BURDMANN, E.A.; WORONIK, V.; PRADO, E.B.A.; ABDULKADER, R.C.; SALDANHA, L.B.; BARRETO, O.C.O.; MARCONDES, M. Snakebite induced acute renal failure: na experimental model. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.48, n° 1, p. 82-88, 1993.

CALVETE, J.J; SOLÍS, D.; SANZ, L; DIAZ-MAURINÓ, T; SCHAFER, W.; MANN, K.; TOPFER-PETERSEN, E. Characterization of two glycosilated boar spermadhesins. **Eur. J. Biochem.**, v. 218, p. 719-725, 1993.

CALVETE, J.J.; SANTOS, C.F.; MANN, K.; GRANJEIRO, T.B.; NINITZ, M.; URBANKE, C. AND CAVADA, B. S. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vaitarea macrocarpa* seeds. **FEBS Lett.**, vol. 425, p. 286-292, 1998.

CAVADA, B.S. **Isolement, structure e proprietes des isolectins des graines de *Lathyrus cicera* et de *Lathyrus ochrus***. Toulouse, 1985. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Paul Sabatier.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, RA.; OLIVEIRA, RA.; GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 5, p. 193-201, 1993.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting Proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and biotechnological uses of the Diocleinae subtribe. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 126-135, 2001.

COEHN, J.J. et al. Substrate - limited function and metabolism of the isolated perfused rat kidney: effects of lactate and glucose. **J. Physiol.**, v. 226, p. 103-121, 1977.

CORMACK, H. D. **Ham Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9ª ed., cap. 1, p. 3-9, 1991.

DAY, A.J. The C-type carbohydrate recognition domain (CRD) superfamily. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, p. 83-88, 1994.

DEBRAY, ef al. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycolyl proteins. **Euro J Biochem**; v. 117, p. 41-55, 1981.

De CARVALHO, D.D. **Purificação e caracterização de BjcUL, uma lectina do veneno da serpente Bothrops jararacussu**. Campinas, 1997. Tese (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP.

DE MELO, G.; MAAK, T. Nephron function of the isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 231, p. 1699-1707, 1976.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 9557-9560, 1988.

DRICKAMER, K. AND TAYLOR, NLE. Biology of animal lectins. **Annu. Rev. Cell Biol.**, v. 9, p.237-264, 1993.

DRICKANIER, K. Ca⁺² Dependent sugar recognition by animal lectins. **Biochem Soc. Trans.**, v.24, p.146-150, 1996.

EHREMPREIS, S. AND SCHERAGA, H.A. Observation on the analysis for thrombin and the inactivation of fibrin monomer. **J. Biol. Chem.**, v. 227, p. 1043-1061, 1957.

ETZLER, ME. Distribution and function of plant lectins. In: LIENER, I.E.; SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. (Eds.) *The lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine*. New York, Academic Press, 1986. p. 600.

FONTELES, M.C. **Efeitos do ácido 2-tetradecilglicídio no rim isolado papel dos lipídios endógenos no transporte de sódio e função renal**. Fortaleza, 1980. Tese (Titular) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará

FONTELES, M.C., LEIBACH, F.H. Glucose formation from glutathione in the isolated perfused rat kidney. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, v.90, p.159-161, 1982.

GATEHOUSE, A. M. R.; POWELL, K. S.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; GATEHOUSE, J. A. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. (Eds.), **Lectins: biomedical perspectives**. London: Taylor and Francis, 1995. p. 35-57.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OZAWA, T. & SHARON, N.. Whatshould be called a lectin? **Nature**, v.285, p.60 , 1980.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GUYTON, A.C.; HALL, E.J. Formação de urina pelos rins: filtração glomerular, fluo sanguineo renal e seu controle. In: Fundamentos de Guyton Tratado de Fisiologia Médica.9ª ed.

Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. Cap. 26, p. 292-300.

HAMILTON, R.L., BENNY, N.M.; WILLIAMS, M.C.; SEVERINGHAUS, E.M.A. Simple and inexpensive membrane "lung" for small organ perfusion. **J. Lipid. Res.**, v. 15, p. 182-186, 1974.

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

HARRISON, F. L. Soluble vertebrate lectins; ubiquitous but inscrutable proteins. **J. Cell Sci.**, v. 100, p. 9-14, 1991.

HAVT, A.; FONTELES, NI. C.; MONTEIRO, H. S. A. The renal effects of Bothrops jararacussu venom and the role of PLA₂ and PAF blockers. **Toxicon**, v. 39, p. 1841-1846, 2001.

HEINRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. **Anl. Biochem.**, v. 68, n. 1, p. 65-74, 1984

JOHNSON, H. M. Human blood group A1 specific agglutinin of the butter clam *Saxidomus giganteus*. **Science**, v. 146, p. 548-549, 1964.

KELM, S. SCHAUER, R. CROCKER, PR. The sialoadhesins - a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. **Glycoconj. J.**, v.13, p. 913-926, 1996.

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

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. A note on the recent discussion on definition of the term 'lectin'. In; BOG-HANSEN, T. C.; SPENGLER, G. A. (Eds). **Lectins: Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry**. Berlin: Walter de Gruyter, 1983. v. 3, p. 3-6.

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

LITTLE, JR. & COHEN, J.J. Effect of albumin concentration of functional isolated perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n° 3, p. 512-517, 1974.

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

MACDERMONT, R. P.; BRADGON, NI. J.; KODNER, I. J.; BERTOVICH, M. J. Deficient cell-mediated cytotoxicity and hiporesponsiveness to interferon and mitogenic lectin activation by inflammatory bowel disease peripheral blood and intestinal mononuclear cells, **Gastroenterology**, v. 90, p. 6-11, 1986.

MONTEIRO, H. S. A. **Efeitos nefrotóxicos do veneno de Bothrops jararaca no rim perfundido de rato. Estudo de antagonistas do PAF e da indometacina.** Campinas, 1990. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade de Campinas, UNICAMP.

MOREIRA LIMA, A. A. **Estudo dos efeitos das toxinas do V. cholerae e E. coli no rim isolado de rato.** Fortaleza, 1983. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências da Saúde, UFC.

NAGAHORA, H., HARATA, K., MURAKI, M. AND JIGAMI, Y. Site-directed mutagenesis and sugar-binding properties of the wheat germ agglutinin mutants tyr73Phe and Phe116Tyr. **European Journal Of Biochemistry**, 1995. 223, 27-34.

NORIN, A.J.; DE PINHO, R.A. Rate and deficiency of complement-dependent phagocytosis in cytosolic and non-cytosolic inflammatory macrophages. **Immunology**, v. 58, p. 561-568, 1986.

O'GRADY, SM; PALFREY, H.C; FIELD, M. Characteristics and functions of Na-K-Cl cotransport in epithelial tissues. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 253, p. 177-192, 1987.

OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 14, p. 61-66, 1991.

PEACDCK, J. S.; COLSKY, A. S.; PINTO, V. B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **J. Immunol. Methods**, v. 126, p. 147-157, 1990.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, W.J.N. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E. J. M. Proposal for a novel system of nomenclature of plant lectins. **Lectins**, v. 10, p. 105-117, 1995a.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defense. **Histochem. J.**, v. 27, p. 253-271, 1995b.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with **Plant Physiology** biotechnology. In: **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

POTAPOV, I. M. Izv. Akad. Nauk Kazah S.S.R. Ser. **Fiziol. Med.**, v. 5, p.712, 1968.

POWELL, L. D.; VARKI, A. I-type lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 14243-14246, 1995.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. Trends Glycosci. **Glycotechnol.**, v. 8, p. 149-165, 1996.

RAMOS, M.V.; MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A_ & ROUGE, P. interaction of Diocleinae lectins with specific ligands. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 82193-199, 1996.

RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J.; SAMPAIO, A.H.; MAZARD, A.M.; BARRE, A; THALLES, B.G; FREITAS, B.T; LEITE, B.H & ROUGE, P. Specificity of the Vatairea macrocarpa lectin towards glycans exhibiting exposed Gal/Gal/NAc. **Protein and Peptides Letters**, v. 5 (3), p.163-171, 1999.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, R.L.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; GRANGEIRO, T.B.; DEBRAY, H. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. **Protein and Peptides Letters**, v. 7 (4), p.241-248, 2000a.

RINI, J.M. Lectin structure. **Annual Review Of Biophysical and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 551-577, 1995.

RINI, J.M.; LOBSANOV, Y.D. New animal lectin structures. **Curr Opin Struct Biol**, v.9, p.578-584, 1999.

ROSS, B.D; EPSTEIN, F.H; LEAF, A. Sodium reabsorption in the perfused rat kidney. **Am. J. Physiol.**, v. 225, n° 5, p. 1165-1171, 1973.

ROSS, B.D. The isolated perfused rat kidney. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 55, p. 13-21, 1978.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CANADA. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, p. 114-118, 1997.

SCHUREK, H.J. **Aplication of the isolated periused** 19, p. 176-190, 1980.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cells agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-958, 1972.

SHARON, N. and LIS, H. Lecting as Cell Recognition Molecules. **Science**. 227-24; October 13, 1989.

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

SHARON, N, 8. LIS, H. Lectins - proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**, v. 30, p. 59-75, 1995.

SPRINGER, C.J.; ANTONIW, P.; BAGSHAW, K.D.; WILIVIAN, D.E.V. Comparison of half-lives and cytotoxicity of N-chloroethyl-4-amino and N-mesyloxyethyl-benzoyl compounds, products of prodrugs in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). **Anti-Cancer Drug Design**, v.6, p. 467-479, 1991.

STILLIVIARK, H. (1888) **Thesis, University of Dorpat, Dorpat** (Tartu).

SUMNER, J.; HOWELL, S. The Identification of the Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 32, p. 227, 1936.

TAYLOR, M.E.; CONARY, J.T.; LENNARTZ, M.R.; STAHL, P.D. Drickamer K. Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. **J. Biol. Chem.**, 1990, v. 265, p.21.

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

TOYAMA, M. H., SOARES, A. M., WEN-HWA, L., POLIKARPOV, I., GIGLIO, J. R., MARANGONI, S. Amino acid sequence of piratoxin-II, a myotoxic lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochimie**, v. 82, n° 3, p.245-250, 2000.

TRIMBLE, M.E.; BOWMAN, R.H. Renal Na⁺ and K⁺ transport: effects of glucose, palmitate and alfa-bromopalmitate. **Am. J. Physiol.**, v.225, n° 5, p. 1057-1062, 1973.

VAN DAMME, E.J.M. et al. 1998. Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications. **Published Chichester**; New York: John Wiley.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUNIANS, W.J.; BARRE, A. & ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VAN PARJIS, L.; BIUCKIANS, A.; IBRAGHIMOV, A.; ALT, F.W.; WILLERFORD, D. & ABBAS, A.K. Functional responses and apoptosis in CD25 (IL-2R) - deficient lymphocytes expressing a transgenic antigen receptor. **J. Immunol.**, v 158, p. 3738-3745, 1997.

VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, 15: 137-154, 1991,

WARE, F.E.; VASSILAKOS, A.; PETERSON, P.A. The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 4697-4704, 1995.

WEIS, W.I. AND DRICKAMER, K. Structural basis of lectin- carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, in press , 1996.