

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
TRÊS LECTINAS APRESENTANDO
ESPECIFICIDADES POR AÇÚCAR
DISTINTAS, ISOLADAS DE SEMENTES
DE FRUTA PÃO (*Artocarpus incisa* L.)

Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

N.Cham. T 574.192 M836c

Autor: Moreira, Ana Cristina de Oliveir

Título: Caracterização estrutural de tr



13827546

Ac. 64648

BCT

Fortaleza — Ceará

2002

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE TRÊS LECTINAS
APRESENTANDO ESPECIFICIDADES POR AÇÚCAR DISTINTAS,
ISOLADAS DE SEMENTES DE
FRUTA PÃO (*Artocarpus incisa* L.)

Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza, 2002

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE TRÊS LECTINAS
APRESENTANDO ESPECIFICIDADES POR AÇÚCAR DISTINTAS,
ISOLADAS DE SEMENTES DE
FRUTA PÃO (*Artocarpus incisa* L.)**

Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE DOUTOR EM CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA).**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza, 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M836c Moreira, Ana Cristina de Oliveira Monteiro.

Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de Fruta Pão (*Artocarpus incisa* L.) / Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira. – 2002.

151 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2002.

Orientação: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira.

Coorientação: Profa. Dra. Leila Maria Beltramini.

1. Bioquímica. I. Título.

CDD 572

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica), outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A Transcrição de qualquer trecho desta Tese será permitida desde que seja de acordo com as normas da ética científica.

~~ANA CRISTINA DE OLIVEIRA MONTEIRO MOREIRA~~

TESE APROVADA EM: 28/02/2002

Dr. Renato de Azevedo Moreira

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Orientador

Dra. Leila Maria Beltramini

Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo

Co-Orientadora

Dra. Maria Luiza Oliva

Faculdade Paulista de Medicina
Universidade Federal de São Paulo

Dr. Ana Cecília Góes Horta

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas

Depto. Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

A Renato,
Com amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

A Renato de Azevedo Moreira, pela orientação, pelo entusiasmo contagiante, pelo apoio, o amor e por me encorajar a desenvolver esta Tese e a realizar um sonho. Ninguém pode dar presente maior a uma pessoa.

À Prof^a Leila Beltramini, do Instituto de Física da USP - São Carlos, por colocar o laboratório de biofísica à minha disposição e também sua casa, pela orientação competente, entusiasmo, e acima de tudo, pelo exemplo e amizade que ficam.

Às professoras Ana Cecília Góes Horta e Ana Lúcia Ponte Freitas pelas sugestões apresentadas, amizade e por acreditarem no meu propósito.

À professora Maria Luiza Vilela Oliva pelas sugestões e inestimável colaboração na determinação das seqüências de aminoácidos das lectinas estudadas neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC e aos do Grupo de Biofísica da USP a quem muito devo, em especial: Ana Cecília Góes Horta, Ana Lúcia Ponte Freitas, Ana Paula Araújo, Ilka Maria Vasconcelos, Leila Maria Beltramini, Norma Maria Barros Benevides, José Tadeu Abreu de Oliveira, Renato de Azevedo Moreira e Ricard Garratt.

Agradeço a cada professor que contribuiu com a minha formação. São pessoas que estão compartilhando os seus conhecimentos e sua sabedoria por uma razão – devolver um pouco da sua experiência na pesquisa e na vida, para que outros possam dar seu salto inicial.

Aos companheiros do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que me incentivaram e dividiram comigo as preocupações diárias, tornando mais suave o desafio de um doutoramento: Álvaro, Alessandra, André, Angélica,

Célio, Clébia, Daniele, Ed Carlos, Elisângela, Fábria, Gelinho, Gil, Jacira, Kelton, Lia, Marcus, Raquel, Raimundo, Renatinha, Renata, Ricardo, Rogildo, Sônia e Wagner.

A todos do grupo de Biofísica e Espectroscopia do Instituto de Física da USP, São Carlos, Patrícia, Andressa, Suzana, Cecília, Melissa. Agradeço em especial a colaboração inestimável da Bel (Isabel Derminda). Este agradecimento é extensivo ao grupo de Cristalografia do referido Instituto.

A todos que fazem a Universidade de Fortaleza, em especial a profa. Vânia Matos e profa. Fátima Veras.

Finalmente, agradeço a Deus por tudo que tem a mim concedido, a Vovó Maria e a Vovô Dudu (*in memoriam*) pelo que me proporcionaram.

A Todos que de alguma forma contribuíram para que este passo fosse dado,

MEU ETERNO AGRADECIMENTO.

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

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do Convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e auxílios institucionais ao Laboratório de Lectinas e Glicoconjugados (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Doutorado concedida à autora.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) através de vários projetos financiados ao LABLEC do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade de São Paulo e Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo em cujas dependências este trabalho foi desenvolvido.

Segundo Albert Einstein, mais importante que o conhecimento é a imaginação...

Se o conhecimento nos permite alcançar os limites do universo, a imaginação nos faz transpor os seus umbrais.

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XV
LISTA DE FIGURAS	XVII
LISTA DE TABELAS	XIX
RESUMO	XX
ABSTRACT	XXII
I. INTRODUÇÃO	
I.1. LECTINAS VEGETAIS	1
I.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
I.1.2. DEFINIÇÕES E SUBDIVISÃO DAS LECTINAS	2
I.1.3. DETECÇÃO E ESPECIFICIDADE DO DOMÍNIO LIGANTE A CARBOIDRATO DE LECTINAS DE PLANTA	5
I.1.4. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DAS LECTINAS DE PLANTA	7
I.1.5. PAPEL FISIOLÓGICO DAS LECTINAS VEGETAIS	9
I.1.6. ISOLAMENTO DE LECTINAS	11

IV.1.7.	APLICAÇÃO DAS LECTINAS VEGETAIS	13
I.2.	LECTINAS JACALINA RELACIONADAS	16
I.2.1.	HISTÓRICO	16
I.2.2.	OCORRÊNCIA	18
I.2.3.	ESTRUTURA MOLECULAR	19
I.2.4.	ESTRUTURA, BIOSÍNTESE E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAL	21
I.2.5.	ESPECIFICIDADE DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATO	24
I.2.6.	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL	24
I.2.7.	EVOLUÇÃO MOLECULAR	27
I.2.8.	PAPEL FISIOLÓGICO	30
II.	HIPÓTESE DE TRABALHO	31
III.	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	32
IV.	MATERIAIS E MÉTODOS	33

IV.1. MATERIAIS	33
IV.1.1. – Reagentes e Soluções	33
IV.1.2. – Equipamentos	33
IV.1.3. – Outros Materiais	34
IV.2. MÉTODOS	36
IV.2.1. Obtenção da Farinha	36
IV.2.2. Obtenção do Extrato Total da Farinha de Sementes de <i>A. incisa</i>	36
IV.2.3. Isolamento das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	38
IV.2.4. Determinação da composição em amino-ácidos	41
IV.2.5. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS (PAGE-SDS)	42
IV.2.6. Filtração em gel Superdex	42
IV.2.7. Cromatografia de Fase Reversa (C ₁₈)	43
IV.2.8. Estrutura Primária	43
IV.2.9. Espectro de Dicroísmo Circular (CD) e Estimativa da Estrutura Secundária por CD	44
IV.2.10. Medidas Fluorimétricas	46

IV.2.11.	Determinação da Atividade Hemaglutinante	46
IV.2.12.	Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples e por Glicoproteínas	47
IV.2.13.	Estudos da Estrutura Quaternária da Frutalina	47
V.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
V.1.	Purificação em Escala Preparativa das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	49
V.1.1.	Obtenção do Extrato Total	49
V.1.2.	Isolamento das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	50
V.2.	Caracterização Físico-Química das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	56
V.2.1.	Composição de Aminoácidos	56
V.2.2.	Determinação da Massa Molecular Aparente	58
V.2.2.1.	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β - mercaptoetanol (PAGE-SDS)	58
V.2.2.2.	Cromatografia de Exclusão Molecular	62
V.3.	Caracterização Estrutural das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	66
V.3.1.	Determinação da Estrutura Primária	66

V.3.2. Espectros de CD e Estimada da Estrutura Secundária por Dicroísmo Circular	71
V.3.3. Espectros de Fluorescência	77
V.3.4. Cromatografia de Fase Reversa	79
V.4. Caracterização Biológica das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	83
V.4.1. Atividade Hemaglutinante	83
V.4.2. Inibição da atividade hemaglutinante	83
V.5. Estudos do Efeito do pH na Estrutura Quaternária da Frutalina e sua Estabilização por Açúcares Ligantes Monitoradas por Cromatografia de Exclusão Molecular	86
VI. RESUMO DOS RESULTADOS	91
VII. CONCLUSÃO	93
VIII. PERSPECTIVAS	94
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
X. ANEXOS	

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A	ALA	ALANINA
C	CYS	CISTEÍNA
D	ASP	ÁCIDO ASPÁRTICO
E	GLU	ÁCIDO GLUTÂMICO
F	PHE	FENILALANINA
G	GLY	GLICINA
H	HIS	HISTIDINA
I	ILE	ISOLEUCINA
K	LYS	LISINA
L	LEU	LEUCINA
M	MET	METIONINA
N	ASN	ASPARAGINA
Q	GLN	GLUTAMINA
R	ARG	ARGININA
S	SER	SERINA
T	THR	TREONINA
V	VAL	VALINA
W	TRP	TRIPTOFANO
Y	TYR	TIROSINA
Z	GLX	GLUTÂMICO/GLUTAMINA
B	ASX	ASPÁRTICO/ASPARAGINA

A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
ACN	Acetonitrila
BSA	Albumina sérica bovina
CCA	Convex Constraint Analysis
CD	Circular Dichroism
HPLC	High-performance liquid chromatography
kDa	Kilo Dantons
Mr	Massa molecular relativa
nm	namômetro
PBS	Phosphate buffered saline – solução salina tamponada com fosfato
pI	Ponto isoelétrico
PVP	Polivinilpiridina
RMS	Root mean square – desvio médio quadrático
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SELCON	Self-consistent method (método auto-consistente)
Tris	Tris(hidroximetil) aminometano
TFA	Ácido trifluoracético
UH	Unidade hemaglutinante – definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução protéica que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2 %.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação Esquemática da Estrutura Molecular, Biossíntese, e Processamento das Lectinas Jacalina Relacionadas	23
Figura 2	Estrutura Tridimensional da Jacalina	26
Figura 3	Modelo da Evolução molecular das Lectinas Relacionadas à Jacalina	29
Figura 4	Obtenção do Extrato Total a partir da Farinha de Semente de Fruta Pão	37
Figura 5	Purificação das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	40
Figura 6	Cromatografia de Afinidade do Extrato Total de <i>Artocarpus incisa</i> , em Coluna de Galactomanana de <i>Adenantha pavonina</i>	53
Figura 7	Cromatografia de Afinidade em Agarose-D-manose do Pico I (livre de frutalina) Eluído da Coluna de Galactomanana de <i>Adenantha pavonina</i>	54
Figura 8	Cromatografia de Afinidade em Quitina do Pico I Eluído da Coluna de Agarose-manose	55
Figura 9	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (15 %) na Presença de SDS da Frutalina e Frutapina	60
Figura 10	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (15 %) na Presença de SDS da Frutaquina	61
Figura 11	Cromatografia de Exclusão molecular da Frutalina em Coluna Superdex 75 HR, Acoplada a um Sistema HPLC	63
Figura 12	Cromatografia de Exclusão molecular da Frutapina em Coluna Superdex 75 HR, Acoplada a um Sistema HPLC	64
Figura 13	Cromatografia de Exclusão molecular da Frutaquina em Coluna Superdex 75 HR, Acoplada a um Sistema HPLC	65
Figura 14	Alinhamento da Seqüência N-terminal da Lectina de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i> Galactose-ligante – FRUTALINA com Lecti-	68

nas Relacionadas

Figura 15	Alinhamento da seqüência primária da frutalina com a da Jacalina	69
Figura 16	Seqüência N-terminal das Cadeias 1 e 2 da Frutaquina – lectina quitina-ligante de sementes de <i>Artocarpus incisa</i> e das Cadeias 1, 2 e 3 da Jacaquina – lectina quitina-ligante de sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i>	70
Figura 17	Espectro de Dicroísmo Circular da Frutalina. O espectro foi Registrado de 195 a 240 nm	74
Figura 18	Espectro de Dicroísmo Circular da Frutapina. O espectro foi Registrado de 195 a 240 nm	75
Figura 19	Espectro de Dicroísmo Circular da Frutaquina. O espectro foi Registrado de 190 a 300 nm	76
Figura 20	Espectros de Emissão de Fluorescência da Frutalina, Frutapina, Frutaquina	78
Figura 21	Cromatografia de Fase Reversa da Frutalina em Coluna C18, Acoplada a um Sistema HPLC	80
Figura 22	Cromatografia de Fase Reversa da Frutapina em Coluna C18, Acoplada a um Sistema HPLC	81
Figura 23	Cromatografia de Fase Reversa da Frutaquina em Coluna C18, Acoplada a um Sistema HPLC	82
Figura 24	Cromatografia de Exclusão Molecular da Frutalina em Diferente Valores de pH (2,0-12,0) em Coluna Superdex 75 HR, Acoplada a um Sistema HPLC. Na Ausência e Presença de açúcares	90

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Aplicações das Lectinas Vegetais	14
Tabela II	Composição de Aminoácidos das Lectinas de Sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	57
Tabela III	Inibição da Atividade Hemaglutinante da Frutalina por Carboidratos	85

RESUMO

Três lectinas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L., com especificidades distintas foram eficientemente isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade. A lectina D-galactose-ligante foi isolada em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*, a lectina D-manose-ligante em coluna de agarose-manose e a lectina quitina-ligante foi isolada em coluna de quitina. Estas lectinas foram denominadas de FRUTALINA, FRUTAPINA e FRUTAQUINA, respectivamente. Elas são capazes de aglutinar hemácias de animais e humanas do sistema ABO, não sendo específicas para nenhum grupo. As lectinas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. foram caracterizadas estruturalmente. A massa molecular aparente determinada por filtração em gel em coluna Superdex 75 HR, em presença de D-galactose 0,2 M e D-glucose 0,2 M, para a frutalina e frutapina foi de aproximadamente 60 kDa, enquanto que a frutaquina apresentou uma Mr em torno de 12 kDa. Por PAGE-SDS a frutalina apresentou duas bandas protéicas de 15 e 12 kDa, a frutapina e frutaquina apresentaram uma única banda protéica de 13 e 6,3 kDa, respectivamente. Conciliando os dados de filtração molecular e os obtidos em PAGE-SDS podemos sugerir que as subunidades monoméricas da frutalina e frutapina se associam formando um tetrâmero, e as da frutaquina formando um dímero. A frutalina e a frutapina têm uma composição de aminoácidos rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados, um alto conteúdo de glicina e ausência de cisteína, por outro lado, a cisteína é um aminoácido abundante na frutaquina, representando mais de 14 % do total. A estrutura secundária das três lectinas é predominantemente composta por estrutura β , não apresentando α -hélice, embora a frutapina e frutaquina não apresentem espectros de dicroísmo circular característico de estrutura β . A seqüência N-terminal da frutalina e frutaquina foi determinada e, quando estas foram submetidas ao alinhamento do banco de dados BLAST, a frutalina apresentou uma

alta identidade com a jacalina, mais de 90 %, e com outras lectinas jacalina relacionadas enquanto a frutalina não apresentou identidade estrutural com nenhuma lectina até o momento seqüenciada. Desta forma ela deve constituir uma nova família de lectina. A estabilidade da estrutura quaternária da frutalina foi avaliada em função do pH, na presença e ausência de D-galactose e D-glucose. O efeito da variação do pH na estrutura da frutalina foi monitorado por cromatografia de exclusão molecular, verificando-se que os açúcares, de alguma maneira, estabilizaram a estrutura tetramérica da frutalina. O efeito destes dois monossacarídeos mostrou que a frutalina é uma lectina de especificidade múltipla, ou seja, ela reconhece monossacarídeos estruturalmente não relacionados. Assim, propomos uma nova subdivisão para as lectinas, **LECTINAS MULTIVALENTES**, proteínas constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou muito homólogos, mas que reconhecem açúcares não relacionados estruturalmente. Assim, lectinas que apresentam especificidade múltipla, estariam enquadradas nesta classe.

ABSTRACT

Three lectins from *Artocarpus incisa* L. seeds, showing different sugar-binding properties, were efficiently isolated and purified by affinity chromatography. The D-galactose-binding lectin was isolated on an *Adenantha pavonina* L. cross-linked galactomannan while the D-mannose-binding lectin was isolated on agarose-mannose and the chitin binding lectins was isolated on chitin columns. These lectins were named FRUTALIN, FRUTAPIN e FRUTACHIN, respectively. The three lectins showed hemagglutinating activities against animal and human ABO system red blood cells, although with no apparent group specificity. With respect to their structure, the three lectins showed some peculiarities. When the apparent molecular masses (M_r), determined by gel filtration on Superdex 75 HR, in the presence of D-galactose and D-glucose were determined, while frutalin and frutapin showed values of 60 kDa, frutachin showed a value of 12 kDa. On the other hand, by PAGE/SDS, frutalin showed two bands (15 and 12 kDa) while only one band was found both for frutapin (13 kDa) and frutachin (6.5 kDa). These data suggest that frutalin and frutapin are tetramers and frutachin a dimer. Frutalin and frutapin showed a very similar amino acid composition, with high contents of glycine and acidic and hydroxylated residues and absence of cysteine while frutachin showed a very high content of this amino acid (more than 14%). The secondary structures of the three lectins were showed to be predominantly β , with no significant α -helix, although frutapin and frutachin did not show CD spectra characteristics of β -structure. The frutalin and frutachin N-terminal amino acid sequences were determined and submitted to alignment (BLAST data bank); while frutalin showed more than 90 % of identity with jacalin, frutachin showed identity with no lectin described. Thus frutachin may constitute a new lectin family. The stability of frutalin quaternary structure, with to pH, was investigated by gel filtration, in the presence and absence of D-

glucose and D-galactose. The presence of these sugars stabilized the structure of the lectin. The effects of these two sugars, structurally non related, suggest that frutalin must recognize both monosaccharides, and allow us to define a new subdivision for the lectins, the MULTILECTINS, or proteins composed by carbohydrate-binding domains, which are identical or highly homologous, but recognizing structurally non related sugars. Thus, lectins showing multivalent specificity should be included in this class.

I. INTRODUÇÃO

1.1. O CONTEXTO

1.2. O CONTEXTO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal analisar a evolução da teoria da administração nos últimos cinquenta anos, com especial referência ao pensamento de Herbert A. Simon, autor de obras fundamentais como *Administrative Behavior* (1947) e *Models of Man* (1955). Para isso, serão abordados os seguintes pontos: a) a origem da teoria da administração; b) a evolução da teoria da administração; c) a contribuição de Herbert A. Simon para a teoria da administração; d) a aplicação da teoria da administração da administração; e) a importância da teoria da administração para a prática da administração.

I. INTRODUÇÃO

Como um dos principais autores da teoria da administração, Herbert A. Simon contribuiu para o desenvolvimento da teoria da administração através de suas obras fundamentais, como *Administrative Behavior* (1947) e *Models of Man* (1955). Estas obras abordam a teoria da administração e a importância da teoria da administração para a prática da administração.

I. INTRODUÇÃO

I.1 LECTINAS VEGETAIS

I.1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

No final do século XIX, mais precisamente em 1888, o estudo das lectinas teve seu marco inicial com a Tese de Doutorado de Herman Stillmark, desenvolvida na Universidade de Dorpad e intitulada: ***Über Rizin, ein Giftiges Ferment aus Samen von Ricinus communis L., und Einigen Anderen Euphorbiaceen*** (Sobre ricina, um fermento tóxico de sementes de ***Ricinus communis L.***, e algumas outras espécies de Euforbiaceas) (STILLMARK, 1888). Stillmark observou que extrato de sementes de *Ricinus communis* aglutinava células vermelhas. Embora, hoje esteja claro que a ricina isolada por Stillmark era uma mistura complexa das moléculas **ricina verdadeira** (tóxica) e **aglutinina** (não tóxica), seu trabalho pioneiro foi um evento significativo em biologia por ele ter sido o primeiro a relacionar a toxicidade da manoma (*Ricinus communis*) à ocorrência de um fator protéico hemaglutinante. Mais ainda, sua descoberta foi também um marco na bioquímica vegetal, pois a “**ricina**” foi a primeira proteína de planta a ter sua atividade biológica bem definida (VAN DAMME *et al.*, 1998a).

À medida que mais fatores aglutinantes foram descobertos em outras plantas, o termo “Blutkörperchenagglutinin” – hemaglutinina foi introduzido como um nome comum para todas substâncias que exibiam esta atividade biológica particular (ELFSTRAND, 1898). Esta denominação perdurou até a primeira metade do século XX. Entretanto, quando se descobriu que algumas hemaglutininas aglutinavam seletivamente células sanguíneas de um grupo sanguíneo humano particular, o novo termo **lectina** (derivado do verbo latim *legere*,

que significa selecionar) foi introduzido por denotar este aspecto da seletividade (BOYD & SHAPLEIGH, 1954). Independente do seu exato significado, etimologicamente falando, os termos aglutinina, hemaglutinina, fitohemaglutinina (aglutininas vegetais) e lectina são usados para indicar o mesmo grupo de proteínas. Ainda que não exista um consenso geral, o termo lectina é o mais comumente usado pela comunidade científica (VAN DAMME *et al.*, 1998a).

I.1.2. DEFINIÇÕES E SUBDIVISÃO DAS LECTINAS

Ao longo de mais de um século de estudo sobre lectinas, este grupo heterogêneo de proteínas recebeu diferentes definições. A primeira definição foi baseada primariamente na sua especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação. Desta forma, GOLDSTEIN *et al.*, (1980) definiram as lectinas como sendo **proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que interagem com carboidratos de maneira específica, aglutinando células e/ou precipitando glicoconjugados**. Esta definição era limitada, pois excluía toxinas que aglutinavam fracamente (tais como ricina, abrina e modecina, dentre outras). Posteriormente, esta definição foi estendida e as lectinas foram compreendidas como **proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que possuem um ou mais sítios de reconhecimento a carboidratos e/ou glicoconjugados capazes de se ligar específica e reversivelmente a terminais carboidratos sem alterar a estrutura química dos mesmos, podendo aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados** (KOCOUREK & HOREJSI, 1981). Esta definição exclui outras proteínas ligantes de açúcar, tais como as várias enzimas específicas por açúcares, hormônios e proteínas transportadoras, mas inclui as lectinas monovalentes, como as de orquídeas e bulbos. Da mesma forma a definição exclui ainda lipídios (como o ácido oléico e o dioleil fosfatídeo) e gangliosídeos, que aglutinam eritrócitos de coelho e de rato, mas que, ao contrário das lectinas, apresentam uma aglutinação insensível à varia-

ção de temperatura (RUSSEL *et al.*, 1983) e não são inibidos por açúcares simples (TSIVIAN e SHARON, 1981).

KENNEDY *et al.*, (1995) definiram as lectinas como **proteínas que se ligam hidrofobicamente a carboidratos com características específicas, tendo a habilidade de induzir a aglutinação de células**. Esta definição chama atenção para um tipo de interação que ocorre entre as lectinas e carboidratos. De fato BARONDES (1988) e SHARON & LIS (1990) já haviam relatado a existência de sítios hidrofóbicos adicionais. Hidrofobicidade é a principal força de interação de lectinas com carboidratos, através dos sítios de ligação a carboidratos (QUIOCHO, 1986), e com outras proteínas, ou outras substâncias, através dos chamados sítios hidrofóbicos (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983; KELLA *et al.*, 1984; ROBERTS *et al.*, 1986; BARONDES, 1988).

Mais recentemente PEUMANS & VAN DAMME (1995) apresentaram uma definição bem mais geral quando consideram que o único pré-requisito para uma proteína vegetal ser classificada como lectina é que esta **apresente, pelo menos, um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a mono ou oligossacarídeo**. Esta nova definição é muito mais abrangente do que aquelas propostas até então, desde que inclui um grande número de proteínas que se comportam de modo diverso no que diz respeito às suas propriedades aglutinantes e/ou de precipitação de glicoconjugados. Com base na estrutura das subunidades lectínicas (ou mais precisamente nos produtos da tradução dos genes das lectinas) quatro tipos principais de lectinas são distinguidos e denominados de **merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas** (VAN DAMME *et al.*, 1998a).

- **MEROLECTINAS** são proteínas pequenas consistindo exclusivamente de um único domínio ligante a carboidrato. Devido à sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Até o presente momento poucas merolectinas têm sido descritas. Exemplos bem conhecidos são a heveína, proteína ligante de quitina, isolada a

partir do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) e as proteínas monoméricas ligantes de manose isoladas de orquídeas e liliáceas.

- **HOLELECTINAS** também são constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos. Entretanto, em contraste com as merolectinas, elas contêm dois ou mais domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou muito homólogos e ligam o mesmo açúcar ou um outro estruturalmente similar. Como as hololectinas têm sítios ligantes múltiplos são todas capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas se enquadra no subgrupo das hololectinas.
- **QUIMEROLECTINAS** são basicamente proteínas de fusão compostas por um domínio ligante a carboidrato e um outro domínio não relacionado. Este domínio pode ter uma atividade catalítica bem definida (ou qualquer outra atividade biológica), mas que atue independentemente do domínio ligante a carboidrato. As quimerolectinas que possuem múltiplos sítios ligantes a carboidratos podem se comportar como hololectinas. As RIPs Tipo 2, que possuem dois sítios ligantes a carboidrato na cadeia B, são um exemplo, pois também aglutinam células. Por outro lado, quimerolectinas com um único sítio ligante a carboidrato têm um comportamento similar ao das merolectinas. As quitinases de planta Classe 1, por exemplo, que possuem apenas um domínio ligante por molécula, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.
- **SUPERLECTINAS** são um tipo especial de quimerolectinas. Elas são proteínas de fusão com dois domínios ligantes a carboidratos que são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Até o presente momento, somente uma superlectina foi descrita, a TxLC-I, uma lectina isolada de bulbos de tulipa (CAMMUE *et al.*, 1986). Esta lectina apresenta dois domínios ligantes a carboidrato, um específico por manose e o outro por N-acetilgalactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1996a).

I.1.3. DETECÇÃO E ESPECIFICIDADE DO DOMÍNIO LIGANTE A CARBOIDRATO DE LECTINAS DE PLANTA

Um obstáculo que deve ser superado nos experimentos de purificação de lectinas é a sua detecção. A presença de lectina em uma determinada amostra pode ser detectada verificando se a mesma aglutina eritrócitos ou precipita polissacarídeos e glicoproteínas, e demonstrando serem estes efeitos inibidos por açúcares simples ou complexos e abolidos após o tratamento térmico da amostra em questão.

A atividade hemaglutinante é usualmente, determinada pelo método de diluição seriada e o ponto final determinado a olho nu ou com a ajuda de uma lupa ou microscópio (MOREIRA *et al.*, 1991). Apesar deste método de detecção ser amplamente utilizado ele não é suficientemente sensível para detectar os vários grupos de lectinas, sendo mais eficaz na detecção das hololectinas. Técnicas mais sofisticadas têm sido desenvolvidas para a determinação da atividade das lectinas. Algumas tentativas não tiveram aceitação, como a determinação automática com ajuda de um fragilígrafo ou um agregômetro. Um outro método, denominado de eletroforese de afinidade, foi desenvolvido usando os princípios de cromatografia de afinidade e de eletroforese (LIS & SHARON, 1981). No entanto, esses métodos apresentam muitos inconvenientes e não são rotineiramente utilizados. Um método sensível para a detecção de lectinas foi estabelecido por KAMEMURA e KATO (1998), que usaram a combinação de "blotting" de lectinas em membranas de polivilideno, e sondas de carboidratos conjugados ligados à biotina e poliacrilamida (sondas carboidrato-bp), entre outras.

Usualmente a especificidade das lectinas de planta é expressa em termo de sua habilidade de ligação a um ou mais monossacarídeos específicos. Com base neste critério, as lectinas têm sua classificação subdividida em lectinas específicas por glucose/manose, por galactose/N-acetilgalactosamina, por

N-acetilglucosamina, por fucose e por ácido siálico (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Evidentemente, esta classificação, embora baseada nas posições das hidroxilas dos carbonos 2, 3, e 4 dos monossacarídeos e seus substituintes, não engloba todos os casos e exclui muitas lectinas. Por exemplo, a aglutinina de “snowdrop” e todas as lectinas manose-ligante de monocotiledôneas relacionadas, que exibem uma especificidade exclusiva por manose (SHIBUYA *et al.*, 1988), desta forma um sexto grupo foi adicionado – lectinas que ligam exclusivamente manose. Similarmente, todas as lectinas que ligam somente a oligossacarídeos não podem ser designadas em nenhum grupo de especificidade. Por conseguinte, elas são usualmente referidas como lectinas com **especificidade complexa** sem nenhuma especificação (VAN DAMME *et al.*, 1998a). A classificação das lectinas em grupos específicos, baseada na ligação a monossacarídeos sofre outro senão. O fato de algumas lectinas ligarem açúcares simples não implica que esses monossacarídeos sejam as suas verdadeiras moléculas receptoras desde que estas lectinas normalmente têm uma afinidade muito maior por oligossacarídeos (VAN DAMME *et al.*, 1998a).

Um outro aspecto que deve ser levado em consideração em relação à especificidade das lectinas de planta é sua aparente preferência por glicanos exógenos. A maioria das lectinas de planta tem uma maior afinidade por cadeias glicanas complexas de glicoconjugados animais do que por carboidratos típicos de planta (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Além disso, algumas lectinas ligam exclusivamente carboidratos que são raros ou totalmente ausentes em plantas. Lectinas quitina-ligante, por exemplo, reconhecem esse polissacarídeo típico da parede celular de fungos e do exoesqueleto de invertebrados. Da mesma maneira, lectinas ácido siálico-ligante de *Maackia amurensis* (KNIBBS *et al.*, 1991) e *Sambucus sp* (SHIBUYA *et al.*, 1987) reconhecem um açúcar, ausente em plantas, mas que é um componente glicídico predominante nas glicoproteínas de animal. Essa preferência das lectinas de planta por carboidratos de origem animal ou microbiana tem duas conseqüências importantes: indica que muitas lectinas são destinadas a se ligarem a glicoconjugados exó-

genos melhor que a seus receptores endógenos; torna as lectinas de plantas ferramentas importantes e úteis para o isolamento e análise de glicoconjugados humanos e de outros animais (incluindo aplicações clínicas) (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

I.1.4. OCORRÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DAS LECTINAS DE PLANTA

As lectinas são normalmente consideradas como um grupo muito grande e heterogêneo de proteínas (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Embora não exista dúvida que numerosas espécies de plantas de diferentes grupos taxonômicos contenham lectinas, o número total de casos bem documentados é menor que 500 (VAN DAMME *et al.*, 1998a). Assumindo que todas essas plantas proximamente relacionadas contenham aglutininas e que algumas novas lectinas sejam descobertas no futuro, a ocorrência esperada de lectinas é ainda limitada a uma pequena fração no reino vegetal. Pode-se concluir, então, que a ocorrência de lectinas aglutinantes clássicas em plantas é uma exceção e não uma regra. Entretanto, em contraste à relativa escassez de lectinas aglutinantes, quimerolectinas pertencentes às quitinases Classe I parecem estar presentes em quase todas as espécies de plantas (COLLINGE *et al.*, 1993).

Lectinas de plantas têm sido ao longo do tempo consideradas proteínas típicas de sementes. Obviamente, o fato de as lectinas terem sido descobertas em sementes e o grande impacto de algumas poucas lectinas de sementes no desenvolvimento da lectinologia como disciplina científica originou este equívoco. Contudo, a ocorrência de lectinas em tecidos vegetativos é bem documentada. Mais ainda, o surgimento crescente de lectinas de outras partes da planta (não-semente) indica que no mínimo elas são tão amplamente distribuídas como as lectinas de sementes, e que sua importância para planta bem co-

mo para os lectinólogos possa superar as lectinas clássicas de sementes (VAN DAMME *et al.*, 1998a).

Uma breve observação na ocorrência e concentração das lectinas de sementes bem como de tipos diferentes de tecidos vegetativos mostra surpreendentes diferenças na localização e abundância relativa das lectinas individuais (ELTZLER, 1986). Lectinas de sementes, por exemplo, estão localizadas nos cotilédones, no endosperma ou confinadas ao eixo embrionário. Normalmente, as lectinas perfazem de 0,1 a 5 % do conteúdo total de proteína da semente. Entretanto, algumas lectinas de sementes são as proteínas predominantes, representando mais de 50 % da proteína total (como em algumas espécies de *Phaseolus*), ao passo que outras estão em quantidades bem menores, são proteínas quantitativamente sem importância. As mesmas considerações são verdadeiras para as lectinas de outras partes da planta (não sementes) encontradas virtualmente em todos os tipos de tecidos vegetativos tais como as folhas, caule, casca, bulbo, tubérculo, rizoma, raiz, fruto, flores, floema e também no néctar (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

As lectinas de *Galanthus nivalis* (snowdrop) e do *Narcissus* cv. Carlton (narciso) têm sido detectada em praticamente todos os tecidos vegetativos, embora as lectinas sejam mais abundantes nos bulbos (VAN DAMME & PEUMANS, 1990). Da mesma forma, a lectina de *Solanum tuberosum* (batata) ocorre nos tubérculos, caule, folhas e frutos (KILPATRICK, 1980). A lectina de *Aegopodium podagraria*, por outro lado, é confinada ao rizoma (PEUMANS *et al.*, 1985). Similarmente, as lectinas de bulbos de tulipa estão presentes em grande quantidade nos bulbos, mas não são detectáveis no caule e folhas (PEUMANS & VAN DAMME, 1989). Finalmente, existem também alguns exemplos de lectinas que ocorrem tanto em sementes como em tecidos vegetativos. Algumas lectinas de leguminosas, por exemplo, a de *Robinia pseudoacacia*, são

encontradas tanto em sementes como em cascas. Entretanto, quando uma investigação acurada nos genes das lectinas dessas leguminosas foi feita, revelou que as lectinas de sementes e da casca são codificadas por genes diferentes, embora altamente homólogos (VAN DAMME *et al.*, 1995).

I.1.5. PAPEL FISIOLÓGICO DAS LECTINAS VEGETAIS

É intrigante e controversa a discussão sobre o papel fisiológico das lectinas de planta, mas é clara a sua contribuição para o desenvolvimento da lectinologia. Tão logo foi verificado que lectinas reconheciam carboidratos específicos, várias hipóteses foram propostas, sugerindo diferentes funções baseadas na sua atividade biológica particular (ETZLER, 1986; LIS & SHARON, 1981; PUSZTAI, 1991). Os papéis propostos foram baseados tanto na interação lectina-carboidrato endógena como na exógena. A interação entre lectinas e carboidratos de uma mesma planta, por exemplo, acreditou-se ser essencial para o transporte de açúcares, o acúmulo de compostos de reserva, interações célula-célula, reconhecimento e divisão celular, etc. Similarmente, interações entre lectinas e carboidratos de origem exógena foram consideradas como fator determinante para o estabelecimento de interações planta-microrganismo e mecanismos de defesa contra vários organismos (VAN DAMME *et al.*, 1998a). Infelizmente, muitas dessas hipóteses que foram propostas estavam fundamentadas mais em considerações hipotéticas que em evidências experimentais. Além disso, em alguns casos a evidência a favor de uma hipótese particular foi obtida a partir de experimentos com preparações impuras de lectinas. Como resultado, a atividade biológica da proteína contaminante foi atribuída erroneamente à lectina (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

O maior avanço na busca do papel fisiológico de lectinas de planta foi obtido quando foi constatado que muitas lectinas de planta além de desempenharem uma função endógena (como reserva de nitrogênio ou como um fator de reconhecimento específico) também eram capazes de interferirem com o funcionamento de outros organismos através de interações com glicoconjugados da superfície do trato digestivo desses organismos. Realmente, muitas lectinas vegetais estão provavelmente envolvidas na defesa da planta (LERNER & RAIKHEL, 1992; VAN DAMME *et al.*, 1995 a e b; FITCHES *et al.*, 2001). Enquanto a interferência direta com vírus e microrganismos é um tanto quanto excepcional, os efeitos deletérios das lectinas de planta tanto em predadores invertebrados como em animais superiores foram bem documentados. Para explicar a abundância da ocorrência de lectinas em órgãos de reserva e seu comportamento similar ao das proteínas de reserva, foi sugerido que as plantas acumulam parte de sua reserva de nitrogênio na forma de proteínas ligante a carboidrato, que podem ser usadas como proteínas de defesa passiva (PEUMANS & VAN DAMME, 1995a e b).

Embora não exista dúvida que algumas lectinas vegetais têm sua função relacionada com a defesa da planta, isto não significa que todas elas desempenhem este papel. Lectinas que ocorrem em baixa concentração podem estar envolvidas em processos de reconhecimento específicos tanto dentro como fora da planta. Lectinas de raízes de leguminosas, por exemplo, podem estar envolvidas no reconhecimento e/ou ligação de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e, portanto pode ser um fator determinante para o estabelecimento da simbiose (BOHOOL & SCHMIDT, 1974; DÍAZ *et al.*, 1989).

Assim, é evidente a necessidade de estudos criteriosos no sentido de se determinar as funções endógenas das lectinas vegetais.

I.1.6. ISOLAMENTO DE LECTINAS

Até o final da década de 70 do século passado, o isolamento de lectinas seguia as técnicas clássicas de purificação de proteínas (MOREIRA & PERRONE, 1977). Quando se tornou evidente que as lectinas ligavam reversivelmente carboidratos, tentou-se empreender um método de purificação que explorasse esta atividade biológica singular. Inicialmente, a introdução da cromatografia de afinidade no protocolo de purificação foi limitada ao uso de substratos naturais (como a quitina). Uma vez que técnicas de acoplamento de açúcares simples, oligo ou polissacarídeos e glicoproteínas a diferentes matrizes inertes foram desenvolvidas, a cromatografia de afinidade tornou-se uma etapa padrão no processo de purificação de quase todas as lectinas. Em muitos casos são empregadas matrizes comerciais, como a Sephadex, que é uma polidextrana (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1965; MOREIRA *et al.*, 1983; MOREIRA & CAVADA, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1997); em outros casos, são empregadas colunas de Sepharose ligada a mono ou oligossacarídeos ou a glicoproteínas como fetuína (PINTO, 1987) e mucina gástrica.

Até o momento, esquemas de purificação típicos inclui a extração da lectina contida no material, com solução salina ou solução tampão, seguida por uma etapa de purificação inicial, por precipitação com sulfato de amônio (não obrigatória). Extratos parcialmente purificados são, então, submetidos à cromatografia de afinidade na matriz adequada (RUDIGER, 1988). A matriz a ser utilizada depende da especificidade da lectina. Para a obtenção da lectina purificada, a mesma, depois de ligada deve ser eluída, preferencialmente, com o uma solução do açúcar ligante. Se necessário, a lectina purificada por afinidade pode ser submetida a uma segunda cromatografia de afinidade ou purificação adicional por técnicas clássicas tais como, filtração em gel, troca iônica, interação hidrofóbica, dentre outras.

Muitas plantas apresentam polissacarídeos sob a forma de gomas, presentes em endospermas e cotilédones (na semente) ou em exsudatos do tronco. Estes polissacarídeos são, em geral, mananas, glucanas ou galactomananas, ramificadas, contendo unidades de galactose, xilose e arabinose, principalmente, em proporções e posições diversas. Desta maneira, é possível ter-se as mais variadas estruturas de oligossacarídeos. Assim sendo, é possível preparar-se colunas de afinidade capazes de interagir diferentemente com lectinas que, embora apresentando a mesma especificidade segundo a classificação de MAKELA (1957) mostram afinidades diferentes (especificidade fina).

TAVARES (1994) mostrou que as lectinas galactose-específicas de sementes de *Artocarpus incisa* e *A. integrifolia*, que apresentam uma elevada semelhança tanto a nível químico e físico-químico, como a nível imunológico, interagem diferentemente com a goma de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e goma de carolina (*Adenantha pavonina*). O mesmo acontece com a lectina de *Vatairea macrocarpa*, embora as lectinas de *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus* não mostrem diferenças sensíveis. É interessante notar que, enquanto as lectinas de *Artocarpus* apresentam uma afinidade maior pela goma de carolina, a do gênero *Vatairea* apresenta mais afinidade pela goma de guar e as de *Abrus* mostraram afinidades praticamente iguais pela duas resinas.

Atualmente investigações estão sendo desenvolvidas visando o uso de diferentes polissacarídeos vegetais como matrizes mais específicas para o isolamento de lectinas vegetais (MOREIRA, 2002).

I.1.7. APLICAÇÃO DAS LECTINAS VEGETAIS

Devido às suas atividades peculiares, as lectinas têm sido utilizadas em uma série de sistemas (TABELA 1). As lectinas têm se mostrado ferramentas poderosas tanto para propósitos analíticos como preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas relacionadas. O uso das lectinas vai desde o isolamento, purificação e estudos de estruturas de carboidratos e superfície celulares; estudos de fisiologia e biossíntese de células do sistema imune e sanguíneo até o emprego na clínica médica, biotecnologia e em agronomia.

A aplicação das lectinas pode ser encontrada em capítulos específicos do livro LECTINS, BIOLOGY-BIOCHEMISTRY e CLINICAL BIOCHEMISTRY, editado de dois em dois anos, período em que ocorre o Encontro Internacional de Lectinas.

TABELA 1. Aplicabilidade das lectinas.

-
1. Isolamento, purificação e estudos estruturais de polímeros contendo carboidratos.
 2. Investigação de estruturas de carboidratos complexos na superfície de células e de partículas subcelulares de animais, bactérias e vírus.
 3. Investigação da arquitetura de superfícies celulares e suas mudanças sob transformação maligna.
 4. Tipagem sanguínea, estudos estruturais de substâncias de grupo sanguíneo, identificação de novos grupos sanguíneos, diagnóstico de secretores.
 5. Isolamento de subpopulações de linfócitos.
 6. Estudos de genética, biossíntese e função de glicoconjugados de superfícies celulares.
 7. Estimulação mitogênica de linfócitos, estudos de eventos após a iniciação da divisão celular, estudo de constituição cromossomial de células e detecção de anormalidades cromossomiais.
 9. Estudos de estimulação linfocitária (produção de linfocinas) e na citotoxicidade celular dependente de lectinas.
 10. Tipagem de parasitas.
 11. No diagnóstico e terapêutica do câncer.
 12. Na liberação controlada de drogas.
 13. Como agentes terapêuticos no tratamento do câncer, doenças autoimunes e infecciosas, sob a forma de toxinas recombinantes (imunotoxina).
 14. Agentes defensivos de pragas na Agricultura.
 15. Determinação da anomericidade da porção glicídica de glicoconjugados.
-

Abaixo estão relacionadas algumas referências que trazem, também, informações sobre a aplicação de lectinas.

GRIFFIN *et al.*, 1994; VIJAYAKUMAR *et al.*, 1993; AMBURS *et al.*, 1994; FISCHER *et al.*, 1994; ZSCHAEBITZ, 1994; NEOGRADY, 1994; LIS e SHARON, 1986; FREEMAN, 1983; FISCHER *et al.*, 1984; WATANABE *et al.*, 1981; ZIESKE e BERNSTEIN, 1982; SHARON e LIS, 1987; NICHOLSON, 1974; RAPIN e BURGER, 1974; LIS e SHARON, 1986; SCHAEFER *et al.*, 1979; FRASCH, 1980; CURTIS e SLACK, 1981; ALLEN *et al.*, 1980; DOYLE *et al.*, 1984; YAJKO *et al.*, 1984; COLE *et al.*, 1984; SCHOTTELIUS, 1982; SANCHEZ *et al.*, 1994; MARBAN-MENDOZA, 1987; BONE e BOTTJER, 1985; PASTAN, *et al.*, 1992; BRINKMANN & PASTAN, 1994; GIOANNINI *et al.*, 1982; HEDO *et al.*, 1981; HELM & FROESE, 1981; SHIRAKAWA *et al.*, 1983; CAMPBELL *et al.*, 1982; LIPSICK *et al.*, 1980; ASHERSON, 1973.

I.2. LECTINAS JACALINA-RELACIONADAS

Jacalina é o nome trivial da lectina D-galactose-ligante isolada de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Até o presente, o termo "lectinas jacalina relacionadas" é usado como coletivo para todas as lectinas que são estrutural e evolucionariamente relacionadas à jacalina. A família da jacalina compreende dois subgrupos de lectinas. O primeiro subgrupo é formado por lectinas de *Moraceae* N-acetilgalactosamina específicas, que são muito similares a lectina D-galactose-ligante de jaca. O segundo subgrupo é o das lectinas de *Convolvulaceae* que são homólogas às de *Moraceae*, mas exibem especificidade por manose/maltose (VAN DAMME *et al.*, 1998).

I.2.1. HISTÓRICO

A primeira evidência da ocorrência de lectinas da família da jacalina data de 1967 com o trabalho de JONES e colaboradores (1967). Eles mostraram que sementes de *Maclura pomifera* continham uma potente hemaglutinina. Esta lectina aglutina fortemente eritrócitos humanos (numa concentração de 4 ng/ml) e é mitogênica para linfócitos. A lectina nativa apresenta uma massa molecular entre 40 e 43 kDa e, em condições desnaturantes (PAGE-SDS), mostra duas cadeias polipeptídicas diferentes de 12 e 10 kDa (BAUSCH & PORETZ, 1977). A purificação da lectina de sementes de *Maclura pomifera* foi efetuada em 1974 (ULEVITTCH, JONES & FELDMAN, 1974) seguida pela lectina de *Artocarpus integrifolia*, a jacalina por MOREIRA (1977). Estudos detalhados da especificidade da lectina de *Maclura pomifera* e da jacalina (SASTRY *et al.*, 1986) logo revelou que ambas as lectinas têm forte preferência por resíduos de Gal β (1,3) GalNAc.

Após a descoberta da mitogenicidade e a capacidade de ligação específica à IgA da jacalina (ROQUE-BARREIRA *et al.*, 1985), esta lectina tornou-se uma importante ferramenta imunológica. A subsequente descoberta da

potente atividade anti-HIV (KABIR & DAAR, 1994) e propriedades inseticidas (CZAPLA & LANG, 1990) estimularam posteriores pesquisas com a jacalina e lectinas relacionadas.

Uma outra lectina, manose específica, com forte efeito estimulador de migração de neutrófilos, foi detectada, em sementes de *Artocarpus integrifolia* por MIRANDA-SANTOS *et al.*, (1991) e isolada posteriormente (SANTOS-OLIVEIRA *et al.*, 1994) sendo denominada de KM⁺.

Vários estudos foram feitos com as lectinas da família *Moraceae*, mostrando uma grande similaridade entre as mesmas, em diversos aspectos:

1. a lectina de *A. lakoocha* (artocarpina), com características estruturais similares àquelas apresentadas pela jacalina (CHOWDHURY *et al.*, 1987; CHOWDHURY & CHATTERJEE, 1993);
2. a lectina isolada de sementes de *A. hirsuta* por cromatografia de afinidade em goma de guar apresenta um Mr 45 kDa, é composta por duas subunidades associadas não covalentemente, uma glicosilada de Mr 16 kDa e outra não glicosilada de Mr 11 kDa. Liga-se especificamente a IgG e IgA humana mais não liga IgM (BASU & APPUKUTTAN, 1989), características também encontradas na jacalina;
3. a lectina de *A. incisa* (OLIVEIRA, 1980; MOREIRA & OLIVEIRA, 1983, PINTO, 1987; MOREIRA *et al.*, 1997) e a lectina de *A. altilis* (PINEAU *et al.*, 1990) também são muito similares a jacalina, apresentando o mesmo padrão de bandas por SDS/PAGE;
4. e até mesmo, a lectina galactose-ligante de *Maclura pomifera* é estruturalmente muito similar à jacalina (YOUNG *et al.*, 1989 e 1991). Ambas têm 133 resíduos de aminoácidos, com 85% de identidade, apresentando uma arquitetura em β -prisma e uma pseudo-simetria tripla, das lectinas relacionadas à jacalina (LEE *et al.*, 1998).

Por apresentar estas importantes propriedades as lectinas da família *Moraceae* têm se tornado ferramentas em imun química e imunologia celular (AUCOUTURIER *et al.*, 1989).

Ambas as lectinas jacalina e de *Maclura pomifera* foram completamente seqüenciadas por métodos químicos (YOUNG *et al.*, 1991). A jacalina também foi clonada (YANG & CZAPLA, 1993) e sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-X (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996).

A clonagem molecular da lectina de rizoma de *Calystegia sepium* (chamada de Calsepa) levou a uma descoberta inesperada, que esta lectina manose/maltose específica é relacionada evolucionariamente com lectinas de *Moraceae* (VAN DAMME *et al.*, 1996b). Por isso, Calsepa (e outras lectinas de *Convolvulaceae* proximamente relacionadas) são agora consideradas um subgrupo da família jacalina.

1.2.2. OCORRÊNCIA

As lectinas da família jacalina foram encontradas, inicialmente, em espécies de *Moraceae* e *Convolvulaceae*. Dentro do subgrupo *Moraceae*, a ocorrência de lectinas é relatada para sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca) e várias outras espécies de *Artocarpus*, bem como em sementes de *Maclura pomifera* (osage orange). Muito provavelmente, sementes de outras espécies de *Moraceae* também contêm lectinas similares. Dentro do subgrupo das *Convolvulaceae* têm sido isoladas lectinas de rizomas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*. Em adição, existem também evidências para a ocorrência de lectinas semelhantes em batata doce (*Ipomea batatas*). Desta forma, acredita-se que a existência de lectinas "jacalin-like" não esteja restrita as famílias das *Moraceae* e das *Convolvulaceae*. Por exemplo, a lectina de tubérculo da alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*, *Asteraceae*) assemelha-se com as lectinas de *Convolvulaceae* (VAN DAMME *et al.*, 1998). Além disso, uma lectina com seqüência similar à jacalina foi reportada na *Musa acuminata* (*Musaceae*)

(CLENDENNEN & MAY, 1997). Também uma lectina pertencente ao subgrupo das lectinas manose-ligante jacalina relacionadas foi isolada a partir do arroz (*Oryza sativa*) sob estresse salino (ZHANG *et al.*, 2000).

Lectinas de *Moraceae* são normalmente consideradas proteínas típicas de sementes. Tanto a lectina de *Maclura* como a de *Artocarpus* ligantes a galactose estão presentes em grandes quantidades na semente. A jacalina é a proteína mais abundante na semente, representando mais de 50 % do total das proteínas solúveis (KABIR *et al.*, 1993). Contudo, lectinas de *Moraceae* não estão rigorosamente confinadas às sementes. Por exemplo, a lectina de *Artocarpus lakoocha* é distribuída em todos os tecidos da planta com exceção no fruto fresco (WONGKHAM *et al.*, 1995).

Lectinas de *Convolvulaceae* normalmente são encontradas em tecidos de reserva que se localizam no subsolo. As lectinas de *Calystegia sepium* e *Convolvulus arvensis*, chamadas de Calsepa e Conarva, respectivamente, são proteínas abundantes de rizoma representando em torno de 25 e 5 %, respectivamente, da proteína solúvel total. Ambas as lectinas estão presentes também em pequenas quantidades em caules jovens. A lectina de batata doce representa apenas uma pequena fração da proteína solúvel (menos que 0,1 %) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.2.3. ESTRUTURA MOLECULAR

A família jacalina compreende dois subgrupos de lectinas com diferentes estruturas moleculares. Todas as lectinas de *Moraceae*, até agora caracterizadas, são compostas por quatro protômeros idênticos consistindo de uma cadeia α grande e uma cadeia β pequena. Ambas as cadeias são derivadas de um único precursor e não são unidas por pontes dissulfeto. Cada protômero contém um único sítio ligante a carboidrato. A lectina galactose ligante de *Artocarpus integrifolia* (jacalina) apresenta quatro cadeias α e quatro β com 133 e 20 resíduos de aminoácidos, respectivamente. A jacalina nativa é uma mistura

complexa de isoformas. Parte de sua complexidade é devido à ocorrência simultânea (mais provavelmente) de cinco cadeias polipeptídicas diferentes. Processamento pós-traducional diferencial cria microheterogenidade (YOUNG *et al.*, 1995). Somente uma isoforma da jacalina contém um glicano N-ligado na cadeia α . Portanto, a jacalina é uma mistura de formas glicosiladas e não glicosiladas.

Lectinas muito semelhantes à jacalina também têm sido isoladas de sementes de *A. incisa* (frutalina) (MOREIRA *et al.*, 1998), *A. altilis*, *A. champeden*, *A. integer*, *A. lakocha*, e *A. tonkinensis* (BLASCO *et al.*, 1996). Embora estas lectinas do gênero *Artocarpus* não tenham sido estudadas muito detalhadamente, não existe dúvida que todas elas apresentem a mesma estrutura. A lectina de *Maclura pomifera* também apresenta quatro cadeias α e quatro β com 133 e 20 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Muito provavelmente, a lectina da *Maclura pomifera* é uma mistura de duas isoformas. Processamento pós-traducional diferencial destas duas isoformas origina microheterogenidade adicional. Nenhuma das isoformas da *Maclura pomifera* é glicosilada.

As lectinas de *Artocarpus integrifolia* e *Maclura pomifera* foram completamente seqüenciadas por métodos químicos e mostraram conter uma repetição interna em suas cadeias α (YOUNG *et al.*, 1991). Posteriormente, a lectina de jaca foi clonada (YANG & CZAPLA, 1993).

A estrutura molecular das lectinas nativas de *Convolvulaceae* é, aparentemente, menos complexa do que a das lectinas de *Moraceae*. Tanto a lectina de rizoma de *Calystegia sepium* como a de *Convolvulus arvensis* consistem de dois protômeros idênticos não glicosilados de 153 resíduos de aminoácidos. A estrutura primária dessas lectinas pode ser deduzidas a partir das seqüências de nucleotídeos dos respectivos cDNAs (VAN DAMME *et al.*, 1996). Como as lectinas de *Moraceae*, as de *Convolvulaceae* também apresentam uma repetição interna.

I.2.4. ESTRUTURA, BIOSÍNTESE E MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUÇÃO

Por clonagem do cDNA da jacalina e das lectinas de *Calystegia sepium* e *Convolvulaceae arvensis* determinou-se a estrutura e as possíveis modificações pós-traducionais. Embora as proteínas maduras sejam similares, suas biossínteses e processamentos são diferentes (Figura 1) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A jacalina é sintetizada como uma preproteína consistindo de um peptídeo sinal seguido por um propeptídeo de 39 resíduos, um peptídeo β , ligado a quatro aminoácidos, e um peptídeo α de 133 resíduos. É muito provável, que a jacalina seja sintetizada no ER (retículo endoplasmático) e processada co-traducionalmente pela remoção do peptídeo sinal. O propeptídeo resultante é subsequente transportado para os corpos protéicos. Durante ou depois do transporte, o propeptídeo é clivado em três diferentes sítios, resultando na remoção do propeptídeo N-terminal e da excisão da ligação entre a cadeia α e cadeia β . A cadeia α e a cadeia β permanecem unidas através de ligações não covalentes e formam o protômero da jacalina. Uma das isoformas da jacalina contém uma cadeia glicana N-ligada, que é glicosilada co-traducionalmente. A clonagem do cDNA revelou a ocorrência de quatro diferentes formas moleculares altamente similares na jacalina. Análises posteriores por "southern blot" confirmaram que a jacalina é codificada por uma família de genes (YANG & CZAPLA, 1993). Muito provavelmente, o esquema de processamento descrito para a jacalina é o mesmo para todas as lectinas galactose-ligante de *Artocarpus* bem como para as de *Maclura pomifera*.

A clonagem do cDNA de Calsepa e Conarva revelou que o polipeptídeo da lectina madura corresponde ao fragmento inteiro dos respectivos genes da lectina (VAN DAMME *et al.*, 1996b). A aparente ausência do peptídeo sinal indica que as lectinas de *Convolvulaceae* são sintetizadas no citoplasma e não sofrem modificações pós-traducional. Interessantemente, a subunidade de Calsepa corresponde a um polipeptídeo composto pelos homólogos de ambas

as cadeias alfa e beta, da jacalina. Análise do cDNAs múltiplos demonstrou a ocorrência de duas isoformas muito similares de Calsepa, sugerindo que a lectina seja codificada por uma família de genes. Em adição, análise de fragmentos do DNA genômico amplificado por PCR revelou a presença de um único intron no(s) gene(s) de Calsepa (VAN DAMME *et al.*, 1998).

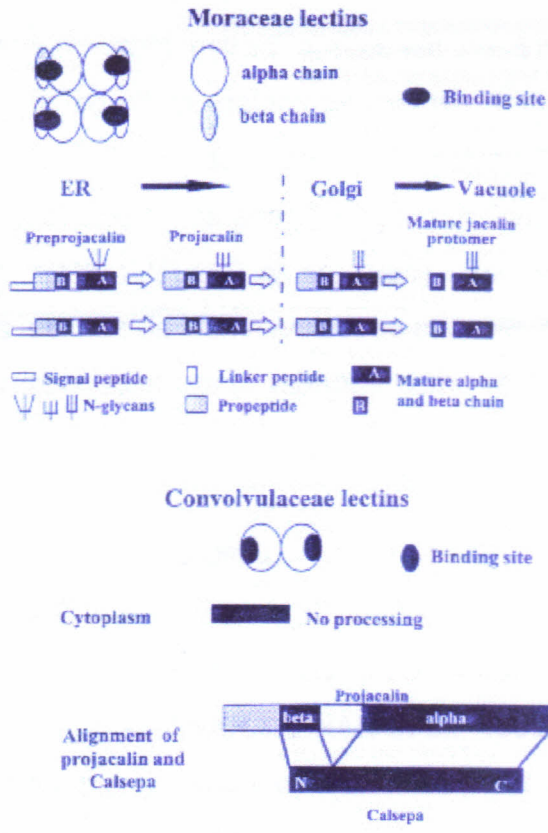


Figura 1. Representação esquemática da estrutura molecular, biossíntese, e processamento das lectinas jacalina relacionadas. São mostrados os exemplos: jacalina (de *Artocarpus integrifolia*) e da aglutinina *Calystegia sepium* (Calsepa). A e B representam as cadeias α e β da jacalina, enquanto N e C refere-se ao N e C-terminais da Calsepa (VAN DAMME *et al.*, 1998a).

I.2.5. ESPECIFICIDADE DE LIGAÇÃO A CARBOIDRATO

Lectinas da família jacalina compreendem dois subgrupos com especificidade de ligação a carboidrato completamente diferentes. Estudos na especificidade detalhada demonstram que as lectinas de *Artocarpus* bem como a lectina de *Maclura pomifera*, galactose-ligantes, interagem fortemente com terminais não redutores de resíduos de α -D-galactosil (MOREIRA *et al.*, 2002, dados não publicados) e têm uma alta afinidade por Gal β (1,3) GalNAc (antígeno T) (SASTRY *et al.*, 1986; SARKAR *et al.*, 1981). Estudos preliminares sobre a especificidade das lectinas de *Convolvulaceae* indicam, por outro lado, que Cal-sepa e Conarva reconhecem tanto manose como maltose (PEUMANS *et al.*, 1997b).

I.2.6. ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

A estrutura tridimensional da jacalina foi resolvida por análises de difração de raios-X (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996). Cada protômero consiste de um β -prisma triplo simétrico, constituído a partir de três folhas β de quatro fitas. Das doze fitas (numeradas de 1 a 12), onze são formadas pela cadeia α , enquanto, que a cadeia β forma a última fita (número 11). Quatro subunidades, 1, 1', 2 e 2', estão associadas não covalentemente formando uma estrutura tetramérica que provavelmente resulta da associação dos dois dímeros 1 – 2 e 1' – 2'. As cadeias β , que ocupam a região central do tetrâmero, desempenham um papel crucial na associação das quatro subunidades.

Cada protômero possui um único sítio ligante a carboidrato formado por Gly¹, Tyr¹²², Trp¹²³ e Asp¹²⁵ da cadeia α que cria um sistema complexo de nove ligações de hidrogênio com O3, O4, O5 e O6 do metil- α -D-galactose. Como a Gly¹ da cadeia α é liberada apenas depois do processamento proteolítico

da projacalina em cadeias α e β , a atividade ligante a açúcar da lectina, requer um correto processamento pós-traducional do precursor da lectina.

A conformação tridimensional da lectina de *Maclura pomifera* é muito similar a da jacalina (lectina de *Artocarpus integrifolia*) (LEE *et al.*, 1998), fato esperado, pois estas lectinas apresentam alta identidade entre si (YOUNG *et al.*, 1991). É razoável se esperar que outras lectinas com alta identidade de seqüência também apresentem uma estrutura similar, àquela mostrada pela jacalina.

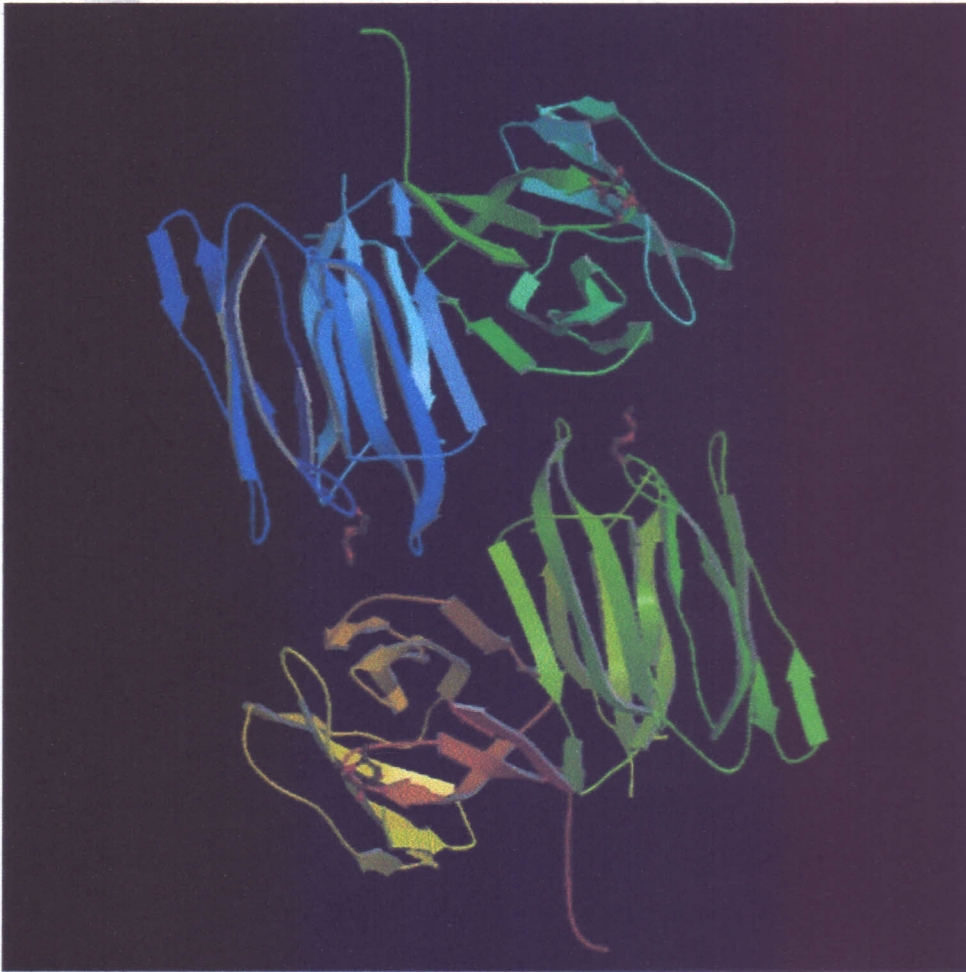


Figura 2. Estrutura tridimensional da jacalina (fonte PDB)

I.2.7. EVOLUÇÃO MOLECULAR

A família das lectinas relacionadas à jacalina compreende duas sub-famílias distintas: as lectinas de *Moraceae* e as de *Convolvulaceae*.

Algumas investigações demonstraram a presença de lectinas similares às lectinas de *Convolvulaceae* em *Helianthus tuberosus* (alcachofra de Jerusalém) (VAN DAMME *et al.*, 1999) e *Musa acuminata* (banana) (CLENDENNEN & MAY, 1997). A ocorrência de lectinas similares àquelas manose/maltose da família das *Convolvulaceae*, em *Asteraceae* e *Musaceae* não somente demonstram que a família jacalina é amplamente distribuída no reino vegetal, mas também sugere que as lectinas de *Moraceae* específicas por GalNAc são, provavelmente, um ramo lateral da linha evolucionária principal (Figura 3). A clonagem do cDNA da lectina *Helianthus tuberosus* (Heltuba) confirmou que a Heltuba partilha de uma clara similaridade de seqüência com Calsepa bem como com outras lectinas de *Moraceae*. Além disso, a modelagem molecular indica que Heltuba tem um enovelamento e uma estrutura global similar à jacalina. Desta forma, pode ser concluído que Heltuba é realmente um membro da família das lectinas jacalina relacionadas (VAN DAMME *et al.*, 1999).

Os protômeros das lectinas de *Moraceae* e *Convolvulaceae* consistem de duas repetições internas com uma similaridade de seqüência relativamente baixa. Por analogia com algumas famílias de lectinas, é tentador especular que os protômeros das lectinas relacionadas à jacalina que contêm dois domínios surgiram também por duplicação e inserção em seqüência ("tandem insertion") do domínio ancestral. Entretanto, devido ao fato da jacalina possuir apenas um sítio de ligação formado por resíduos de aminoácidos localizados nas regiões N-terminal e C-terminal do protômero, os dois subdomínios presumíveis não correspondem a sítios de ligação separados. Desta forma, ainda precisa ser demonstrado, que o domínio ancestral das lectinas jacalina relacionadas são proteínas ligantes a carboidratos que têm um único domínio. Ainda

que, todas estas sejam indubitavelmente relacionadas, as lectinas de *Moraceae* (galactose-ligantes) e de *Convolvulaceae* (manose-ligantes) definitivamente têm uma localização intracelular diferentes, nos vacúolos e no citoplasma, respectivamente (PEUMANS *et al.*, 2000). Estas observações sustentam a hipótese de que as lectinas jacalina relacionadas evoluíram a partir de seus homólogos manose-ligante através da aquisição de seqüências alvos vacuolares.

Por analogia com, por exemplo, as lectinas de *Allium*, é tentador especular que algumas espécies de *Moraceae* desenvolveram genes codificando proteínas de reserva, a partir de genes da lectina. Para construir genes de proteínas de reserva adequado, seqüências extras (p. ex. peptídeo sinal) tiveram que ser introduzidos de modo a dirigir a proteína produzida em direção ao sistema secretor. Isto explicaria porque os produtos primários da tradução das lectinas de *Moraceae* sofrem um processamento mais complexo que aqueles das lectinas de *Convolvulaceae*.

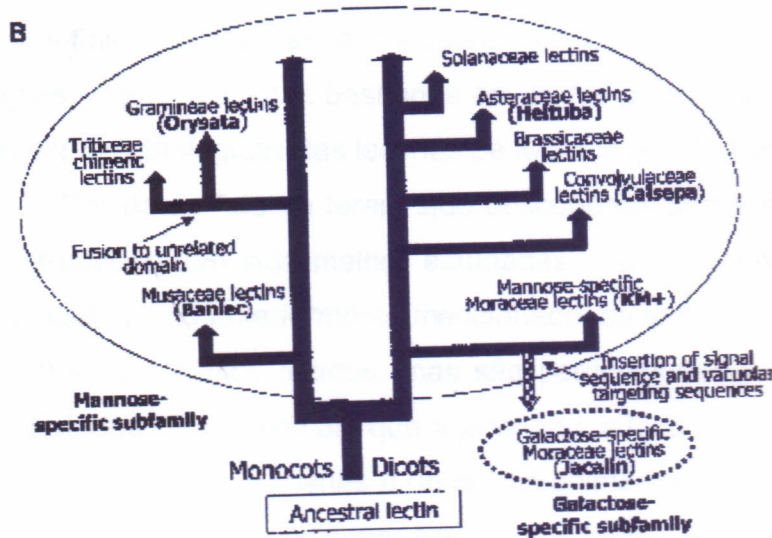


Figura 3. Modelo da evolução molecular das lectinas relacionadas à jacalina. Uma lectina jacalina relacionada manose-específica ancestral deu origem a uma grande família: a das lectinas monocotiledôneas e a das lectinas dicotiledôneas manose-específicas jacalina relacionadas. Um evento evolucionário, que ocorreu na família *Moraceae* envolveu a inserção de seqüências para um peptídeo sinal e destinação vacuolar dando origem a uma pequena subfamília de lectinas jacalina relacionadas (PEUMANS *et al.*, 2000).

I.2.8. PAPEL FISIOLÓGICO

A princípio, evidências não conclusivas foram relatadas para um papel bem definido para as lectinas jacalina relacionadas. Entretanto, algumas especulações podem ser feitas baseadas em dados disponíveis sobre a fisiologia e as atividades biológicas das lectinas de *Moraceae* e *Convolvulaceae*.

Devido ao fato de terem sido descobertas primeiro, as lectinas do subgrupo *Moraceae* têm sido melhor estudadas que as lectinas do subgrupo *Convolvulaceae*. Como anteriormente mencionado, as lectinas do subgrupo *Moraceae* ocorrem em muitos tecidos, mas são particularmente abundantes nas sementes. Estudos *in vitro* indicam que a jacalina e a lectina de *Maclura pomifera* interagem com células humanas e de outros animais e são capazes de induzir processos biológicos específicos. Não foi relatado o efeito das lectinas do subgrupo *Moraceae* quando administradas por via oral em animais superiores. Alimentação com dieta artificial demonstrou que as lectinas de *Moraceae* têm propriedades inseticidas. Por exemplo, lectina de *Maclura pomifera*, tem um significativo efeito inibitório na larva do gorgulho (*Callosobruchus maculatus*) (MURDOCK *et al.*, 1990). Similarmente, jacalina e a lectina de *Maclura pomifera* inibiram o crescimento da larva de *Diabrotica undecimpunctata* (CZALA & LANG, 1990) e a jacalina afeta a sobrevivência da *Empoasca fabae* de batata (HABIBI *et al.*, 1993). Baseando-se nestas observações parece que as lectinas de sementes do subgrupo *Moraceae* provavelmente são, com a maioria das outras lectinas abundantes de sementes, proteínas de reserva com uma função de defesa adicional contra potenciais predadores animais e/ou insetos de sementes.

II.

II. HIPÓTESE



II. HIPÓTESE DE TRABALHO

Em 1977 foi relatada a presença de uma lectina galactose-ligante (jacalina) em sementes de *Artocarpus integrifolia* L. (jaca) (MOREIRA, 1977). Posteriormente, em 1991, uma outra lectina, manose-ligante (KM+) foi detectada (MIRANDA-SANTOS, 1991). Mais recentemente, uma lectina muito similar à jacalina, isolada de sementes de *Artocarpus incisa* L. (fruta-pão), foi isolada e caracterizada e denominada frutalina (MONTEIRO, 1998 & MOREIRA *et al.* 1998). Uma lectina manose-ligante também foi encontrada em sementes de fruta-pão, frutapina (MONTEIRO-MOREIRA *et al.*, 1999) e em 2001 foi detectada uma lectina quitina-ligante em sementes de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia* (MONTEIRO-MOREIRA *et al.*, 2001).

Após a detecção das três lectinas em sementes de *Artocarpus incisa* (fruta-pão), surgiu a indagação sobre a conveniência, para a planta, da presença de mais de uma lectina e sobre o parentesco estrutural entre elas. Assim, a hipótese central desta Tese é investigar:

**SÃO AS TRÊS LECTINAS PRESENTES EM SEMENTES DE
ARTOCAPUS INCISA L. SEMELHANTES, DO PONTO DE VISTA FÍSICO-
QUÍMICO E ESTRUTURAL?**

III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



III. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para investigar a Hipótese proposta, foi seguida a estratégia abaixo:

- ✓ Isolar e purificar as lectinas de *Artocarpus incisa* (frutapina e frutaquina), em escala preparativa;
- ✓ Purificar a frutalina em escala preparativa;
- ✓ Analisar a constituição peptídica das lectinas por PAGE/SDS e filtração em gel, e suas propriedades isoelétricas;
- ✓ Determinar a composição de aminoácidos das três lectinas;
- ✓ Analisar suas seqüências N-terminal;
- ✓ Determinar os espectros de dicroísmo Circular (CD) e fluorescência das lectinas, bem como estimar o conteúdo das frações de estrutura secundária.
- ✓ Investigar a estabilidade e/ou modificações estruturais da frutalina induzidas pela variação de pH, na presença ou ausência de açúcares ligante (D-galactose e D-glucose), monitorando por técnicas cromatográficas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 - MATERIAIS

IV.1.1 - Reagentes e Soluções

Os reagentes empregados foram de grau analítico e de máxima pureza disponível. A água utilizada na preparação das soluções foi de grau analítico (MiliQ). Os seguintes reagentes foram empregados:

- 1. Tetracetato de amônio (NH₄)₂C₂O₄
- 2. Nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂)
- 3. Nitrato de estrôncio (Sr(NO₃)₂)
- 4. Nitrato de bário (Ba(NO₃)₂)
- 5. Nitrato de potássio (KNO₃)
- 6. Nitrato de sódio (NaNO₃)
- 7. Nitrato de lítio (LiNO₃)
- 8. Nitrato de amônio (NH₄NO₃)
- 9. Nitrato de magnésio (Mg(NO₃)₂)
- 10. Nitrato de zinco (Zn(NO₃)₂)
- 11. Nitrato de cobalto (Co(NO₃)₂)
- 12. Nitrato de níquel (Ni(NO₃)₂)
- 13. Nitrato de manganês (Mn(NO₃)₂)
- 14. Nitrato de cádmio (Cd(NO₃)₂)
- 15. Nitrato de urânio (UO₂(NO₃)₂)
- 16. Nitrato de tório (Th(NO₃)₄)
- 17. Nitrato de urânio (UO₂(NO₃)₂)
- 18. Nitrato de tório (Th(NO₃)₄)
- 19. Nitrato de urânio (UO₂(NO₃)₂)
- 20. Nitrato de tório (Th(NO₃)₄)

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

- Fluoreto de cálcio (CaF₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de estrôncio (SrF₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de bário (BaF₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de potássio (K₂CO₃) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de sódio (Na₂CO₃) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de lítio (Li₂CO₃) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de amônio (NH₄NO₃) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de magnésio (Mg(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de zinco (Zn(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de cobalto (Co(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de níquel (Ni(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de manganês (Mn(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de cádmio (Cd(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de urânio (UO₂(NO₃)₂) (rod. 11-200) (rod. 11-200)
- Fluoreto de tório (Th(NO₃)₄) (rod. 11-200) (rod. 11-200)

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. – MATERIAIS

IV.1.1. – Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados durante a purificação das lectinas de *Artocarpus incisa* foram todos de pureza analítica. A água utilizada na preparação dos reagentes foi a deionizada (MilliQ). Os seguintes tampões foram utilizados:

- ↗ Tampão glicina-HCl 0,01 M, pH 2,0;
- ↗ Tampão glicina-HCl 0,05 M, pH 2,6;
- ↗ Tampão acetato 0,01 M, pH 4,0;
- ↗ Tampão fosfato 0,01 M, pH 6,0;
- ↗ Tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0;
- ↗ Tampão borato 0,01 M, pH 10,0 e 12,0;
- ↗ Solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS) pH 7,4:

Cloreto de sódio.....	0,15 M
Fosfato de sódio dibásico.....	0,06 M

O pH foi ajustado com fosfato de sódio monobásico 0,15 M.

IV.1.2. – Equipamentos

- ↗ Espectrofotômetro Hitachi (mod. U-2000) e Ultrospec 2000 – Pharmacia
- ↗ Fluorímetro ISS
- ↗ Espectropolarímetro Jasco (mod. J-720)
- ↗ Analisador de aminoácidos BioChrom 20 – Pharmacia
- ↗ Centrífuga refrigerada Sorvall (mod. RC-5B)

- ↗ Sistema de Cromatografia Líquida de alta eficiência, HPLC, *High Performace Liquid Chromatography* – BioRAD (mod. 2800)
- ↗ pH-metro micronal (mod. B-374)
- ↗ Seqüenciador de Aminoácidos – “gas phase” 473 (Applied Biosystem)
- ↗ AKTA (Pharmacia – LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)
- ↗ Coletores de fração – (Pharmacia – LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)
- ↗ Sistema FPLC (*Fast Performace Liquid Chromatography* Pharmacia – LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)

IV.1.3. – Outros Materiais

- ↗ As sementes de *Artocarpus incisa*, L. (fruta-pão de caroço), utilizadas no presente trabalho foram provenientes do município de Maranguape, Estado do Ceará, colhidas maduras, na safra que ocorre no período compreendido entre os meses de maio a junho.
- ↗ Sementes de *Adenantha pavonina* (carolina) foram colhidas na Região Metropolitana de Fortaleza, Ceará.
- ↗ Hemácias de animais domésticos (coelho, porco, carneiro, pombo, capote) obtidas no Departamento de Zootecnia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Ceará.
- ↗ Hemácias humanas (sistema ABO), obtidas de doadores adultos e hígidos foram fornecidas pelo Hemocentro do Ceará (HEMOCE).
- ↗ Carboidratos simples e complexos, glicoproteínas, albumina sérica bovina, Coomassie Brilliant Blue R-250, epicloridrina, acrilamida, metileno-bisacrilamida, TEMED e quitina, fornecidos pela Sigma Chemical Co, St. Louis, USA.

- ↪ As matrizes de agarose-D-Galactose e agarose-D-Manose foram adquiridas da Pierce Chemical Co (Rockford, Illinois, USA).
- ↪ Matrizes cromatográficas Superose 12 HR 10/30 e Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia) acoplada a um sistema HPLC.
- ↪ Galactomanana extraída do endosperma de *Adenanthera pavonina reticulada* com epiclorigrina (preparada no Laboratório de Lectina e Glicoconjugados – UFC)
- ↪ Centricon 10 (Amicon Corp, rpm 6000) e Centriprep 10 (Amicon Corp, rpm 4000).
- ↪ Cubetas de quartzo retangulares (1,0 ou 3,0 mL) com caminho óptico de 1 cm com duas ou quatro faces polidas
- ↪ Cubeta de quartzo cilíndrica (0,3 mL) com caminho óptico de 1 mm.

IV.2. – MÉTODOS

IV.2.1. – Obtenção da Farinha

A farinha de sementes de *Artocarpus incisa* foi obtida, a partir da trituração em moinho, das sementes íntegras, livres de tegumento e previamente secas com acetona. A farinha obtida foi acondicionada em frascos fechados e estocada à temperatura ambiente.

IV.2.2. Obtenção do Extrato Total da Farinha de Sementes de *A. incisa*

A extração das proteínas solúveis de sementes de *A. incisa* foi feita suspendendo-se a farinha em solução de NaCl 0,15 M na proporção 1:10 (m/v) deixada sob agitação contínua por uma hora à temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 8.000 x g por trinta minutos a 4°C. Ao resíduo mais solução salina 0,15 M foi adicionada, na proporção 1:5 (m/v) e após 30 minutos de agitação ininterrupta o extrato foi submetido à centrifugação. Foram utilizados os mesmos parâmetros da primeira extração. O resíduo II foi descartado, e os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos e, então denominados de EXTRATO TOTAL (Figura 4).

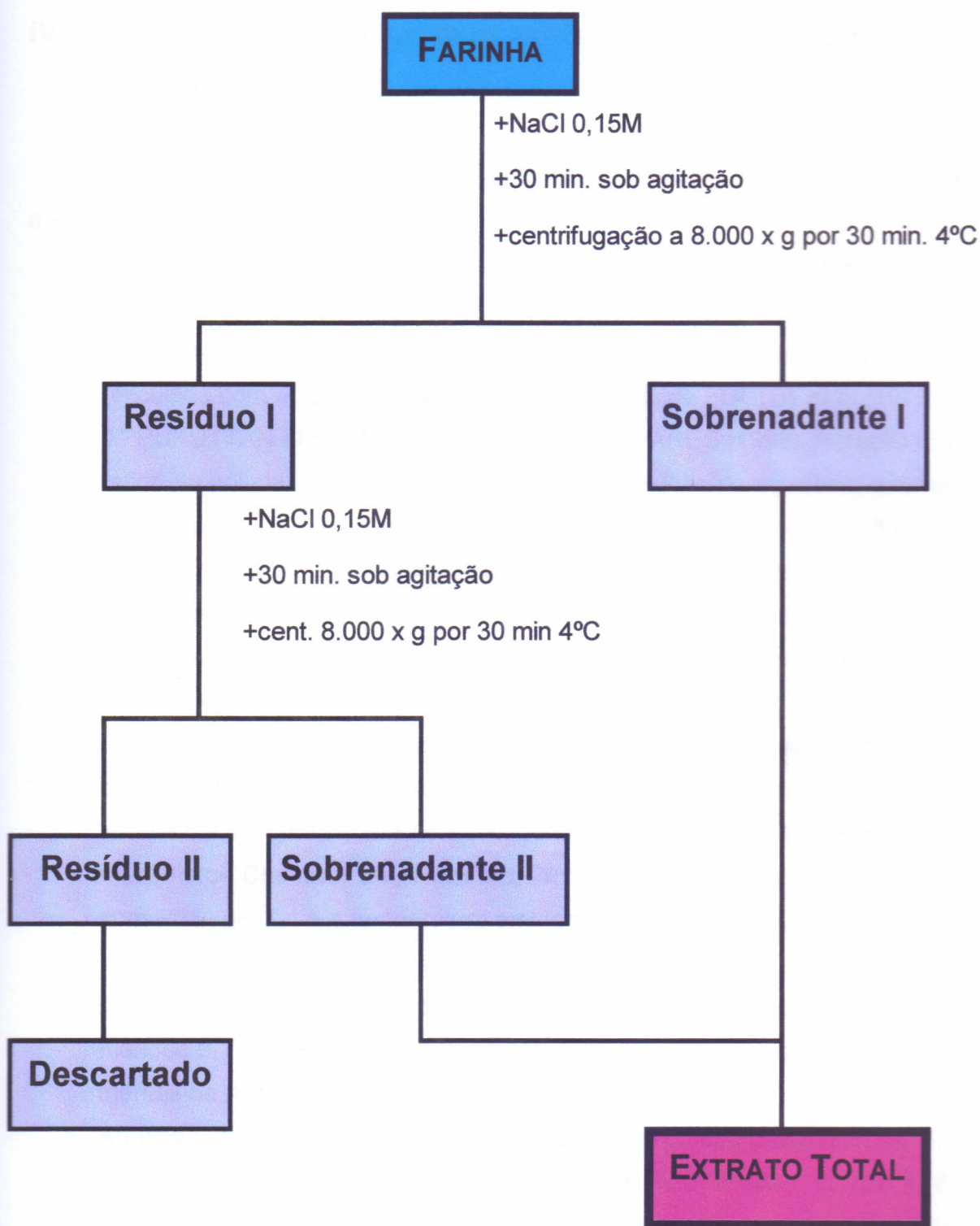


Figura 4. – Obtenção do Extrato Total a partir da Farinha de Semente de Fruta Pão.

IV.2.3. – Isolamento das Lectinas de Sementes de *Artocarpus incisa*

Para isolar as lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* foi seguida a seguinte metodologia (Figura 5):

1. O extrato total, preparado como descrito no item anterior, foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana (15,0 cm de altura e 2,0 cm de diâmetro) extraída do endosperma de *Adenantha pavonina* reticulada com epiclоридrina segundo metodologia de FUGITA *et al* (1975) e APPUKUTTAN *et al* (1977), modificada por TAVARES (1998). A fração não retida na coluna foi eluída com NaCl 0,15 M (solução de equilíbrio) e denominada pico I. A fração retida (pico II) na coluna e eluída com tampão glicina-HCl 0,05 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M foi chamada frutalina – a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* galactose-ligante. O pico I foi submetido a sucessivas cromatografias em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*, até que nenhuma fração permanecesse não ligada.
2. A fração não retida (pico I) obtida da cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana, livre da lectina galactose-ligante (frutalina) foi então submetida à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-Manose (5 mL) (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA) previamente equilibrada com PBS, pH 7,4 e à temperatura ambiente. As proteínas que não interagiram com a matriz cromatográfica foram eluídas com PBS, pH 7,4. Em seguida a fração retida foi desprendida da coluna com o auxílio de solução de manose 0,1 M em PBS e então denominada de frutapina – a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* manose-ligante.
3. Ao pico I, obtido da cromatografia em resina de agarose-D-Manose, foi adicionado NaCl até que a concentração final de NaCl ficasse igual a 1 M. Após este procedimento a amostra foi, então, aplicada em uma coluna de quitina (15 mL) equilibrada com solução salina (NaCl 1M). Dois picos foram obtidos, o pico I foi eluído com solução de NaCl 1 M e o pico II (fração retida) com solução de HCl 0,01 M contendo NaCl 0,15 M, esta fração foi de-

nominada de frutaquina – a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* quitina-ligante.

Os eluatos das colunas cromatográficas foram monitorados pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro.

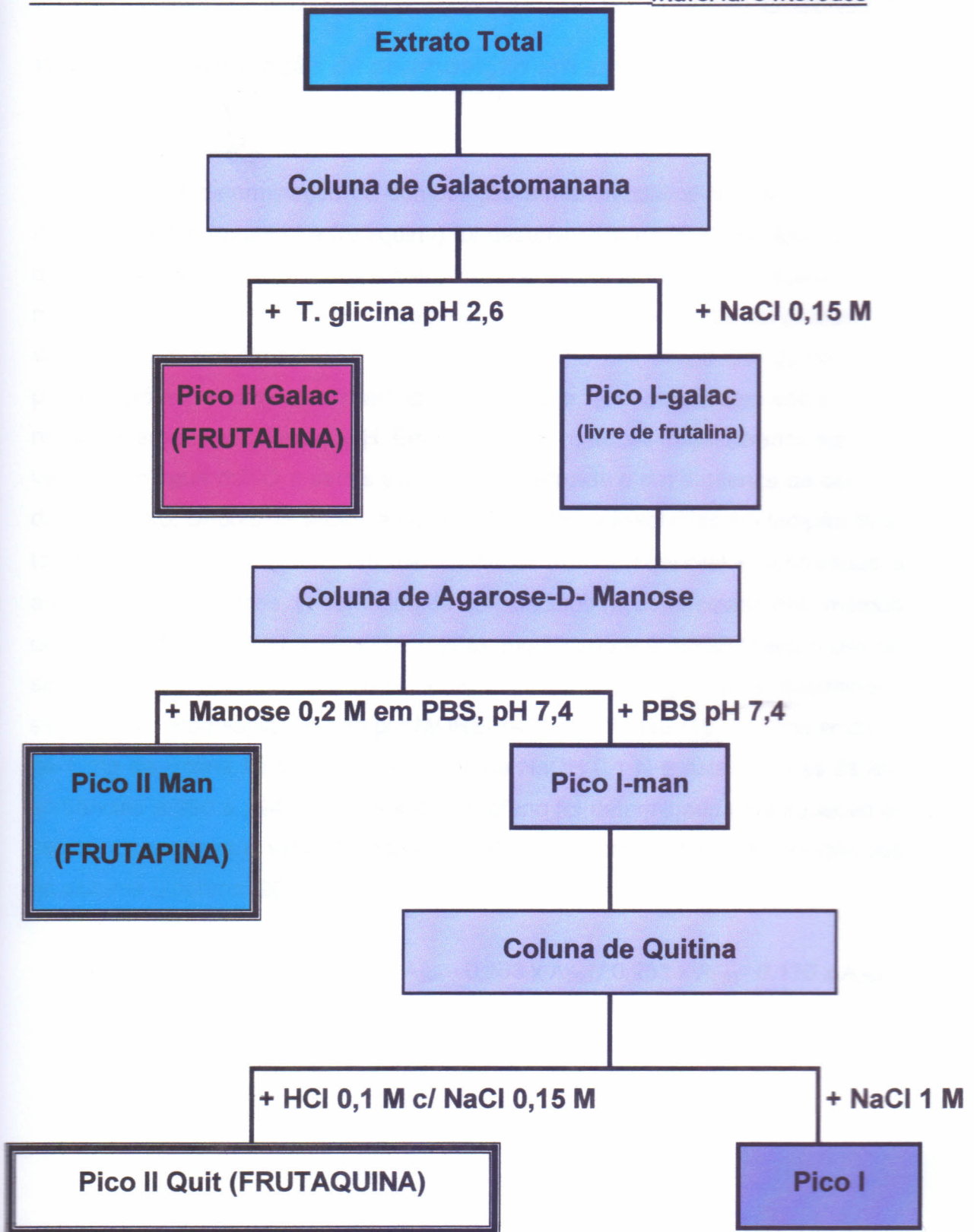


Figura 5. Purificação das Lectinas de sementes de *Artocarpus incisa*.

IV.2.4. – Determinação da composição em aminoácidos

A determinação da composição em aminoácidos das lectinas de *A. incisa* (frutalina, frutapina e frutaquina) foi desenvolvida em Sistema Biochrom 20 da Pharmacia-LKB. As lectinas puras (em torno de 1mg) foram hidrolisadas com 1 ml de HCl 6N, contendo 1% (m:v) de fenol. A hidrólise foi realizada em ampolas de vidro, seladas sob atmosfera de nitrogênio, a 110°C, em estufa, por 22 horas. Após a hidrólise, as ampolas foram abertas e HCl e fenol eliminados, sob pressão reduzida, em presença de NaOH. Em seguida, os resíduos foram lavados algumas vezes com água milli-Q e secos sob pressão reduzida e em presença de pentóxido de fósforo. Depois de secas, as amostras foram redissolvidas em tampão citrato de sódio pH 2,2, filtradas em membrana de 40 µm (Millipore) e submetidas à análise de aminoácidos. O conteúdo de aminoácidos foi determinado pelo método de SPACKMAN, STEIN & MOORE (1958), modificado e adaptado para o uso do sistema Biochrom 20 da Pharmacia - LKB. O triptofano da frutalina foi determinado segundo a metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977). Uma amostra de 1 mg da lectina foi dissolvida em 1 ml de NaOH 0,1 N e determinadas às absorvâncias a 280 e 294 nm. O teor de triptofano foi determinado pela equação abaixo, utilizando-se o valor de tirosina obtido pela cromatografia de aminoácidos no sistema Biochrom 20.

$$M_{\text{tyr}} / M_{\text{Trp}} = 0,592 \times A_{294} - 0,263 \times A_{280} / 0,263 \times A_{280} - 0,170 \times A_{294}$$

IV.2.5. – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS (PAGE-SDS)

Eletroforese foi feita segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando um sistema vertical da Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia. A placa foi montada com um gel de empilhamento a 3,5 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 1% e o gel de separação a 15% em tampão Tris-HCl 3 M pH 8,8 e SDS 1%. O tampão de corrida foi preparado com Tris 0,025 M, glicina 0,2 M e SDS 0,1 % a pH 8,3. Amostras liofilizadas de extrato total e frutalina, obtida em galactomanana, frutapina (concentrada em centricon) e frutaquina (concentrada em centricon) foram analisadas por eletroforese. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 glicerol e SDS a 1 %, na ausência e presença de β -mercaptoetanol e submetida à fervura de 5 a 10 minutos. As amostras foram coradas com azul de bromofenol (0,05 %), para controle das corridas eletroforéticas, que foram realizadas a 200 V, 150-200 mA por 1 hora. Os géis foram corados com solução contendo Coomassie Brilliant Blue 250 R a 0,05 % em metanol, ácido acético e água (1:3:8). O descoramento foi feito com uma solução de ácido acético, metanol e água (1:3:8). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa), citocromo C (12,4 kDa) e inibidor de caliceína (6,6 kDa).

IV.2.6. – Filtração em gel Superdex

Amostras de frutalina, frutapina e frutaquina a pH 7,4 (0,2 mg / ml), foram submetidas à cromatografia de filtração molecular em coluna Superdex 75 HR (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia) acoplada a um sistema AKTA

(Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia). As cromatografias foram monitoradas pela absorbância a 280 nm, coletando-se 0,5 ml / minuto. Para a calibração da coluna foram utilizadas as seguintes proteínas: Albumina Sérica bovina (BSA), Quimotripsina e citocromo C.

IV.2.7. – Cromatografia de Fase Reversa (C₁₈)

Amostras de frutalina, frutapina e frutaquina a pH 7,4 (0,2 mg / ml), foram submetidas à cromatografia de fase reversa em coluna C₁₈ (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia) acoplada a um sistema HPLC (BioRAD). A eluição foi realizada no sistema TFA/ACN (solvente A: Acetonitrila 0,1 % e solvente B: acetonitrila: água: TFA, 80:20:0,8). As condições de eluição foram: 5 minutos com 5 % solvente B; 20 minutos de 5 a 100% de B; 5 minutos de 100% de B; 5 minutos de 100% B a 5% de solvente A. As cromatografias foram monitoradas pela absorbância a 280 nm, coletando-se 0,5 ml / minuto.

IV.2.8. – Estrutura Primária

As amostras de frutalina, frutapina e frutaquina tiveram o N-terminal seqüenciado no Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina (Universidade Federal de São Paulo). A degradação de Edman foi feita em sistema seqüenciador de proteínas modelo gas phase 473 (Shimadzu) utilizando as condições recomendadas pelo fornecedor.

Como a frutaquina apresenta pontes dissulfeto uma redução prévia se faz necessária. Esta redução foi feita conforme a metodologia descrita por Friedman e colaboradores (1970). Foram dissolvidos 2 nmol da lectina em 100 µL de tampão Tris-HCl 0,25 M, pH 8,5, cloridrato de guanidina 6 M, EDTA 1 mM, 5 % de

β -mercaptoetanol e incubados overnight, a 25 °C. Depois da incubação, 2,5 μ L de 4-vinilpiridina foi adicionado e a reação prosseguiu por 90 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida por acidificação com ácido fórmico e a proteína modificada foi, então, dessalinizada por cromatografia de fase reversa em coluna Lichrospher 100 RP (8,5 μ m).

As cadeias da frutauquina foram separadas por cromatografia de fase reversa utilizando coluna Aquapore RP 300.2. A eluição foi realizada por um sistema solvente contendo TFA/CH₃CN/H₂O/isopropanol (A= 0,1 % TFA em água, B= 0,1 % TFA em CH₃CN e C= 0,1 % TFA em isopropanol).

As cadeias isoladas da frutauquina e a frutalina foram clivadas enzimaticamente por tripsina, endopeptidase Asp-N, endopeptidase Glu-C e pepsina. Os peptídeos produzidos foram separados em coluna de fase reversa acoplada a um sistema HPLC usando um gradiente de ACN em 0,1 % de TFA (v/v), por 40 minutos a um fluxo de 1,0 mL/min.

IV.2.9. – Espectro de Dicroísmo Circular (CD) e Estimativa da Fração de Estrutura Secundária

As amostras utilizadas continham entre 0,15 e 0,20 mg / mL das lectinas purificadas, frutalina, frutapina e frutauquina. Foram determinados os espectros de CD para a lectina nativa, diluída em PBS 10 mM, pH 7,4 e água. As medições foram feitas em um espectropolarímetro Jasco, modelo J 720, num intervalo de 190 a 250 nm utilizando uma cubeta de quartzo cilíndrica de 1 mm de caminho óptico, com uma média de dezesseis varreduras. Os espectros de CD são obtidos numa escala de elipticidade (θ) em mgra.

Para o cálculo das frações de estrutura secundária utilizou-se os programas:

↳ CCA (Convex Constraint Analysis) desenvolvido por PERCZEL e FASMAN (1991). Este programa utiliza o algoritmo Simplex que extrai os espectros bási-

cos, ou seja, as cinco componentes puras (curvas associadas à conformação secundária das proteínas) de um grupo de espectros de referência no qual o espectro da proteína analisado é adicionado. As estimativas das frações da estrutura secundária foram feitas utilizando-se o programa Lincomb. O Lincomb baseia-se no método dos mínimos quadráticos para obter, a partir das componentes puras, uma curva que melhor se ajuste ao espectro a ser analisado e fornece a fração com que cada curva contribui, como também o erro deste ajuste. O intervalo de comprimento de onda que o programa utiliza é de 195 a 240 nm, com intervalo de 1 nm. Para usar o programa (CCA) se faz necessário a transformação dos dados obtidos em mgraug para elipticidade molar. Para isto é preciso conhecer a concentração da proteína em mg / mL, o caminho óptico da cubeta em cm (l) e a massa média dos resíduos de aminoácidos da proteína, em geral de 100-115. Para os cálculos com a frutalina foi utilizado o valor de 115 e uma concentração de 0,150 mg / mL.

$$[\theta] = \frac{100 \cdot \text{NMR}}{l \cdot [\text{mg/mL}]} \cdot 10^{-6} \times \theta = \text{fator} \times \theta$$

Pela equação acima se observa que basta multiplicar os dados em miligraus (θ) por um fator para que os transforme em elipticidade molar.

↪ SELCON – *Self Consistent* (SREERAMA *et al.*, 1993). Para estimar o conteúdo de estrutura secundária pelo SELCON foi utilizado um grupo de proteínas de referência contendo 33 espectros de CD, bem como suas frações de estrutura secundária determinadas por cristalografia de raios-X.

IV.2.10. – Medidas Fluorimétricas

As medidas de emissão da fluorescência foram feitas a 25 °C em um espectrofluorímetro ISS. As amostras (frutalina, frutapina e frutaquina) diluídas em PBS pH 7,4 foram excitadas em 280 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 290-450 nm. Cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, com 1 ou 3 mL de volume foram utilizadas nas medidas. A concentração de proteína usada nestes experimentos variou de 0,09 a 0,12 mg/mL e a absorbância das amostras foi sempre menor que 0,1. O espalhamento Raman foi subtraído usando-se os espectros dos solventes.

IV.2.11. – Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de determinação da atividade hemaglutinante do extrato bruto e das lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* (frutalina, frutapina e frutaquina) foram realizados segundo metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977), em placas de microtitulação (fundo em V).

As amostras foram submetidas a diluições duplo seriadas (1/2, 1/4, 1/8...) em NaCl 0,15 M e posteriormente, adicionadas a cada diluição o mesmo volume (50 µl) de uma suspensão de hemácias a 2% em NaCl 0,15M.

Após incubação por 30 min a 37 °C e por mais 30 min à temperatura ambiente, as placas foram examinadas visualmente. A atividade hemaglutinante (UH) foi considerada como sendo o inverso da última diluição ainda capaz de aglutinar a olho nu as células sangüíneas ou como sendo a menor concentração da lectina (µg/ml) ainda capaz de aglutinar. Os resultados obtidos foram expressos em UH / mg de proteína.

IV.2.12. – Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares Simples e por Glicoproteínas

Os ensaios de inibição da atividade hemaglutinante das lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* (frutalina, frutapina e frutaquina) foram realizados em placa de microtitulação, de fundo em V, marcadas de 1 a 12 horizontalmente e de A a H verticalmente, conforme a metodologia descrita por MOREIRA e PER-RONE (1977) e sua inibição por carboidratos, simples e complexos, bem como por glicoproteínas foi posteriormente testada.

Todos os açúcares foram utilizados na concentração inicial de 0,5 M e as glicoproteínas na concentração de 1 mg/0,5ml tendo como solvente NaCl 0,15 M.

Em uma placa de microtitulação foram feitas diluições seriadas (no sentido de A para H) da solução do açúcar sob investigação com NaCl 0,15 M. A seguir, foram feitas diluições seriadas da força ativa (no sentido de 1 para 12). Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi adicionada em cada poço 50 μ L da suspensão de hemácias e a placa colocada na estufa (37 °C) por 30 minutos e em seguida à temperatura ambiente por mais 30 minutos, quando os títulos de hemaglutinação foram determinados como descrito no item IV.2.11.

IV.2.13. – Estudos da Estrutura Quaternária da Frutalina

Amostras de frutalina (0,5 mg / mL) foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, em soluções tampão com pH variando de 2,0 a 12,0, nas seguintes condições: na presença de D-glucose 0,2 M, na presença de D-galactose 0,2 M e na ausência de açúcar. Uma mistura de glicina, acetato fosfato e borato (tampão misto 10 mM) foi utilizada na preparação das soluções tampão. Em seguida, as diversas amostras foram submetidas à cromatografia de filtração

molecular em coluna Superdex 75 HR (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia) acoplada a um sistema HPLC (Bio-Rad, 2800) e eluídas com os respectivos tampões. A cromatografia foi monitorada pela absorvância a 280 nm, coletando-se frações de 0,5 ml / minuto. Para a calibração da coluna seguintes proteínas foram utilizadas: Albumina Sérica bovina (BSA), Quimotripsina e citocromo C.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO



V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 – Purificação em Escala Preparativa das Lectinas de Sementes de *Artocarpus incisa*

V.1.1. Obtenção do Extrato Total

A obtenção do extrato total a partir da farinha de sementes de *Artocarpus incisa* (fruta-pão) visando o isolamento da lectina galactose-ligante foi relatado anteriormente, utilizando-se diferentes metodologias. Podemos citar os de OLIVEIRA (1980) que em sua Dissertação de Mestrado comparou as lectinas de *Artocarpus incisa* e *A. integrifolia*. Neste trabalho as lectinas eram extraídas com PBS, por 4 horas, com agitação ocasional. Em 1987, PINTO estudando apenas a lectina de *A. incisa* extraía as proteínas solúveis, de uma maneira semelhante, utilizando um outro solvente (NaCl 0,15 M), porém conservando o tempo de 4 horas. Mais recentemente, na tentativa de otimizar a preparação em larga escala, da lectina galactose-ligante (frutalina), MONTEIRO (1998), realizou a cinética de extração da lectina, determinando a atividade hemaglutinante em diferentes tempos de extração. Assim, extrações foram feitas, com NaCl 0,15 M (na proporção de 1:10, m:v) por diferentes períodos de tempo, tendo-se observado que, já com 30 minutos, toda a atividade hemaglutinante era extraída. Vale salientar que nos extratos obtidos a diferentes tempos o teor de açúcares total foi determinado (DUBOIS,) verificando-se que a quantidade de açúcares extraída nos diferentes tempos era a mesma. Este fato descartou então, a hipótese de que com o aumento do tempo de extração aumentasse também a extração de açúcares que pudessem desta forma inibir a atividade hemaglutinante e por isso era obtida a mesma atividade com o aumento do tempo de extração.

V.1.2. Isolamento das Lectinas de Sementes de *Artocarpus incisa*.

Os isolamentos da lectina de *A. incisa*, galactose-ligante, feitos por OLIVEIRA (1982) e por PINTO (1987), embora tenham obtido êxito (a lectina foi purificada) não eram muito eficientes, quer por utilizar uma matriz instável (estromas humanos glutarizados) quer por utilizar uma matriz de uma especificidade muito ampla (fetuína). Assim, MONTEIRO (1998) introduziu uma metodologia mais específica, eficiente e de baixo custo para o isolamento da lectina galactose-ligante. Eles utilizaram cromatografia de afinidade, em coluna de galactomanana obtida de endospermas de sementes de *Adenantha pavonina* (Carolina ou Carol) reticulada por tratamento com epícloridrina. Neste tratamento (TAVARES, 1998), ligações éter são estabelecidas entre terminais hidroxilas da galactomanana por meio do grupo epóxi da epícloridrina, de modo a se obter uma malha extremamente estável. Segundo TAVARES (1994), o endosperma da semente de *A. pavonina* é basicamente constituído de uma galactomanana composta de uma cadeia linear (α 1 \rightarrow 4) de D-manose, com substituições (α 1 \rightarrow 6) de D-galactose, na proporção de 1,8:1,0 e com alguns resíduos de arabinose e xilose. Assim, a lectina galactose-ligante de sementes de *Artocarpus incisa* foi isolada por uma metodologia simples e barata, que continuou a ser utilizada neste trabalho.

O extrato total obtido como descrito no item IV.2.2. foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de galactomanana de *A. pavonina*. Duas frações foram obtidas (Figura 6), uma das quais eluída com solução salina 0,15 M (solução de equilíbrio), fração não retida (Pico I) e uma segunda fração (pico II), liberada da coluna com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M. Esta fração, que foi denominado de FRUTALINA – a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* D-galactose-ligante, podia também ser eluído da coluna com uma solução de D-galactose 0,2 M, dissolvida na solução de equilíbrio, embora a eluição fosse mais demorada e o pico obtido mais largo, com um arraste maior devido, provavelmente, à maior afinidade da lectina por carboidratos mais complexos, encontrados na galactomanana constituinte da matriz, do que por monossacári-

deos (solução de D-galactose). Assim, devido à melhor resolução bem como o fator econômico, tampão glicina-HCl foi utilizado na liberação da frutalina da coluna de galactomanana.

A fração não retida na coluna de galactomanana (pico I galac) foi recromatografada três vezes, para a retirada total da lectina galactose-ligante (frutalina). A fração pico I-galac, livre de frutalina, foi então aplicada à coluna de agarose-D-manose (cromatografia de afinidade), previamente equilibrada com PBS, pH 7,4. As proteínas não retidas (pico I-man) à coluna foram eluídas com o tampão de equilíbrio enquanto a fração retida foi eluída com solução de manose 0,2 M em PBS, pH 7,4, (Figura 7). Esta fração foi denominada de FRUTAPINA – a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* **D-manose-ligante**. O procedimento acima descrito foi essencial para a purificação da frutapina, visto que, a frutalina além de interagir com a galactomanana (com resíduos galactosil), também interage com a resina de agarose-D-manose, assim, para a obtenção da frutapina, é essencial que a fração pico I-galac esteja livre de frutalina. A interação da frutalina com a matriz agarose-D-manose também pode ser desfeita por eluição com D-galactose, evidenciando que esta interação ocorre pelo mesmo sítio de ligação.

Ao pico I-man, fração não retida à coluna agarose-D-manose, acrescentou-se cloreto de sódio suficiente para se obter uma solução com concentração final igual a 1 M. Em seguida, o pico I-man em tampão fosfato de sódio, pH 7,4 e NaCl 1 M, foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de quitina, previamente equilibrada com NaCl 1 M. O perfil cromatográfico foi semelhante àqueles obtidos nas duas cromatografias anteriores (Figura 8), ou melhor, a ocorrência de duas frações foi verificada. Uma fração não retida (pico I-quit), eluída com solução de NaCl 1 M e uma fração retida (pico II-quit) eluída com solução de HCl 0,01 M em NaCl 0,15 M, posteriormente chamada de FRUTAQUINA – a lectina de sementes de *Artocarpus incisa* **quitina-ligante**.

A adição de NaCl 1 M na amostra aplicada à coluna de quitina foi feita para prevenir uma possível cromatografia de troca iônica, ou seja, que proteínas da amostra interagissem com a quitina exclusivamente ou principalmente por interações eletrostáticas, o que poderia descartar a presença de uma lectina quitina-

ligante (por afinidade) em sementes de *Artocarpus incisa*. Isto é plausível, pois, a quitina é um homopolissacarídeo constituído por unidades de N-acetilglucosamina, um amino açúcar, e, portanto carregado positivamente em valores de pH utilizados no experimento.

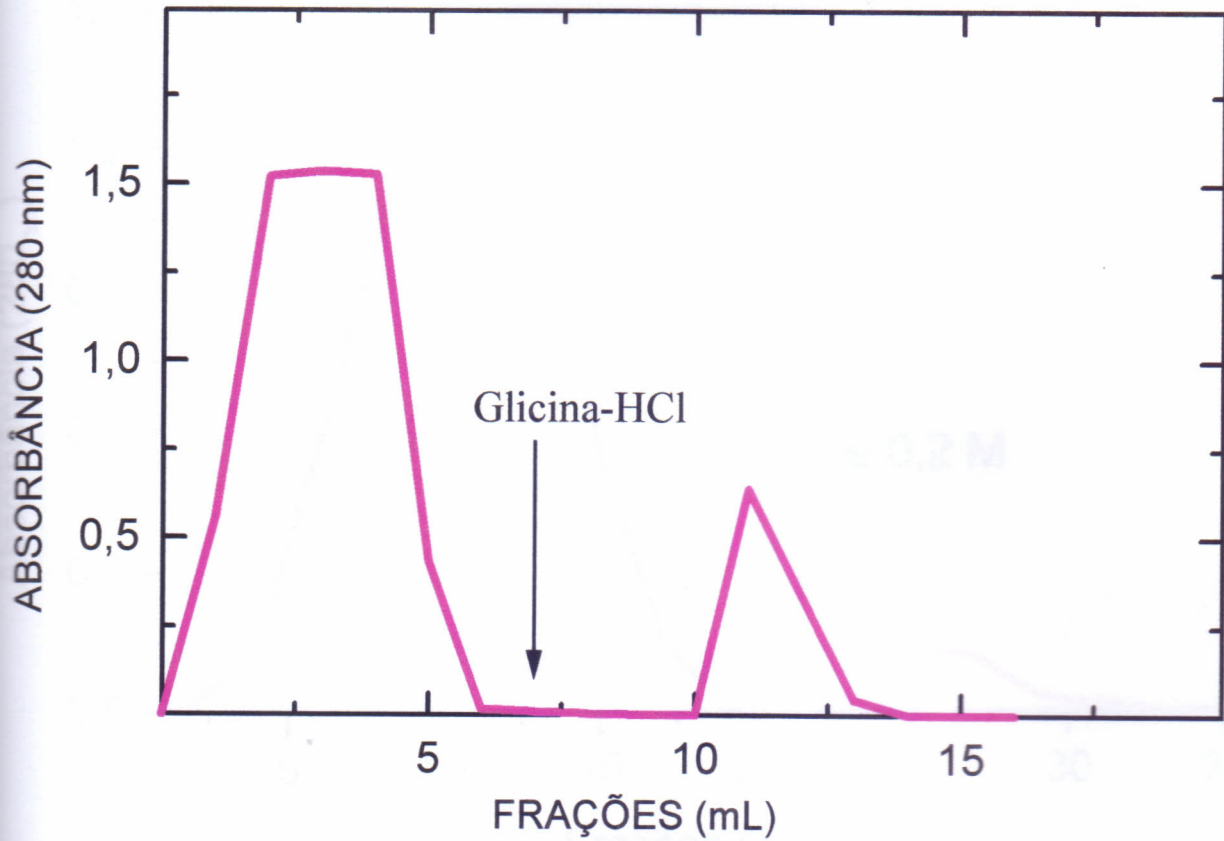


Figura 6. Cromatografia de afinidade do extrato total de *Artocarpus incisa* em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*. A amostra foi dissolvida em NaCl 0,15 M, aplicada à coluna previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida foi eluída com NaCl 0,15 M e a fração retida (FRUTALINA) com tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, contendo NaCl 0,15 M. Foram coletadas frações de 3,0 mL, sob um fluxo de 60 mL/h.

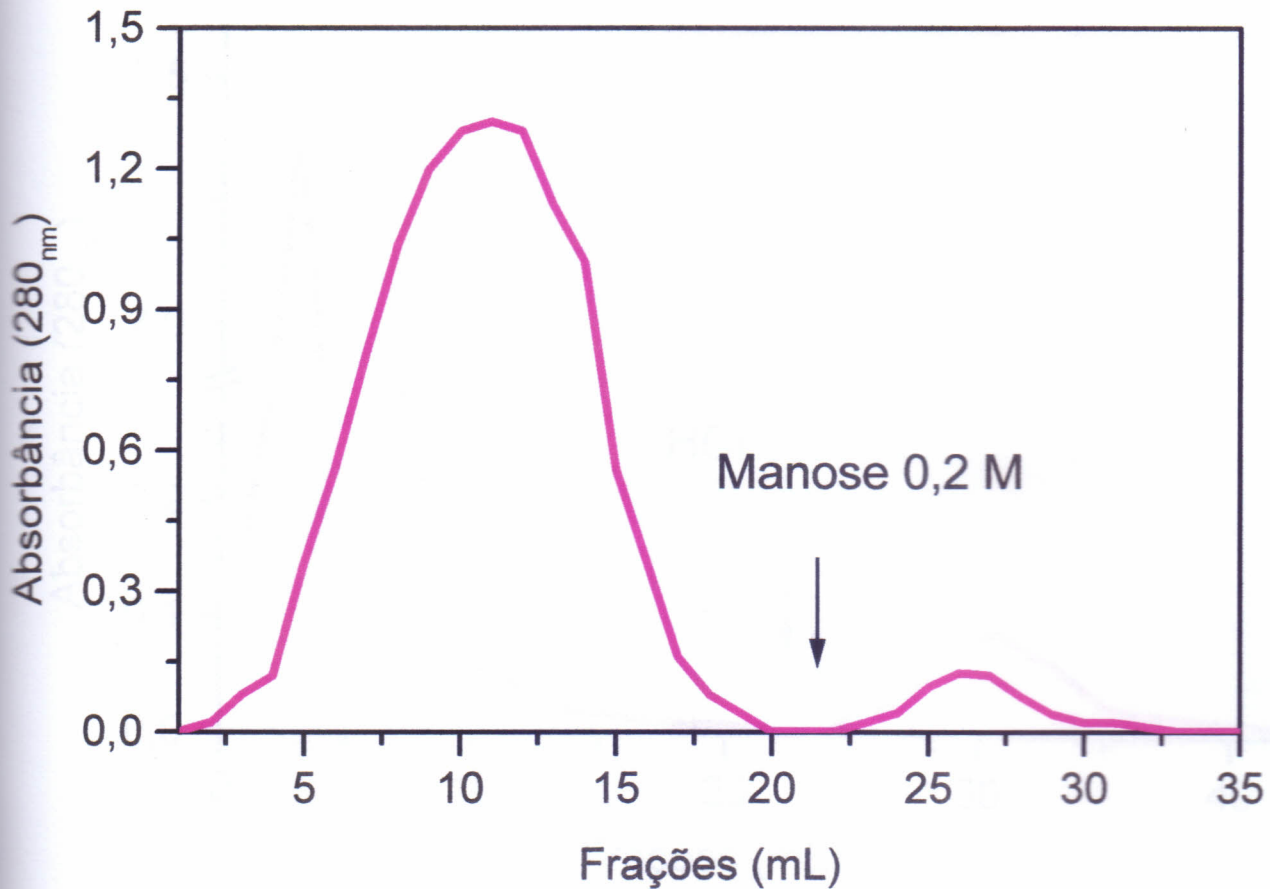


Figura 7. Cromatografia de afinidade em agarose-D-manose do pico I (livre de frutalina) eluído da coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*. A amostra em PBS, pH 7,4 e NaCl 0,15 M, foi aplicada à coluna previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida foi eluída com a solução de equilíbrio e a fração retida (FRUTAPINA) com solução de manose 0,2 M em PBS, pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M. Foram coletadas frações de 1,0 mL, sob um fluxo de 30 mL/h.

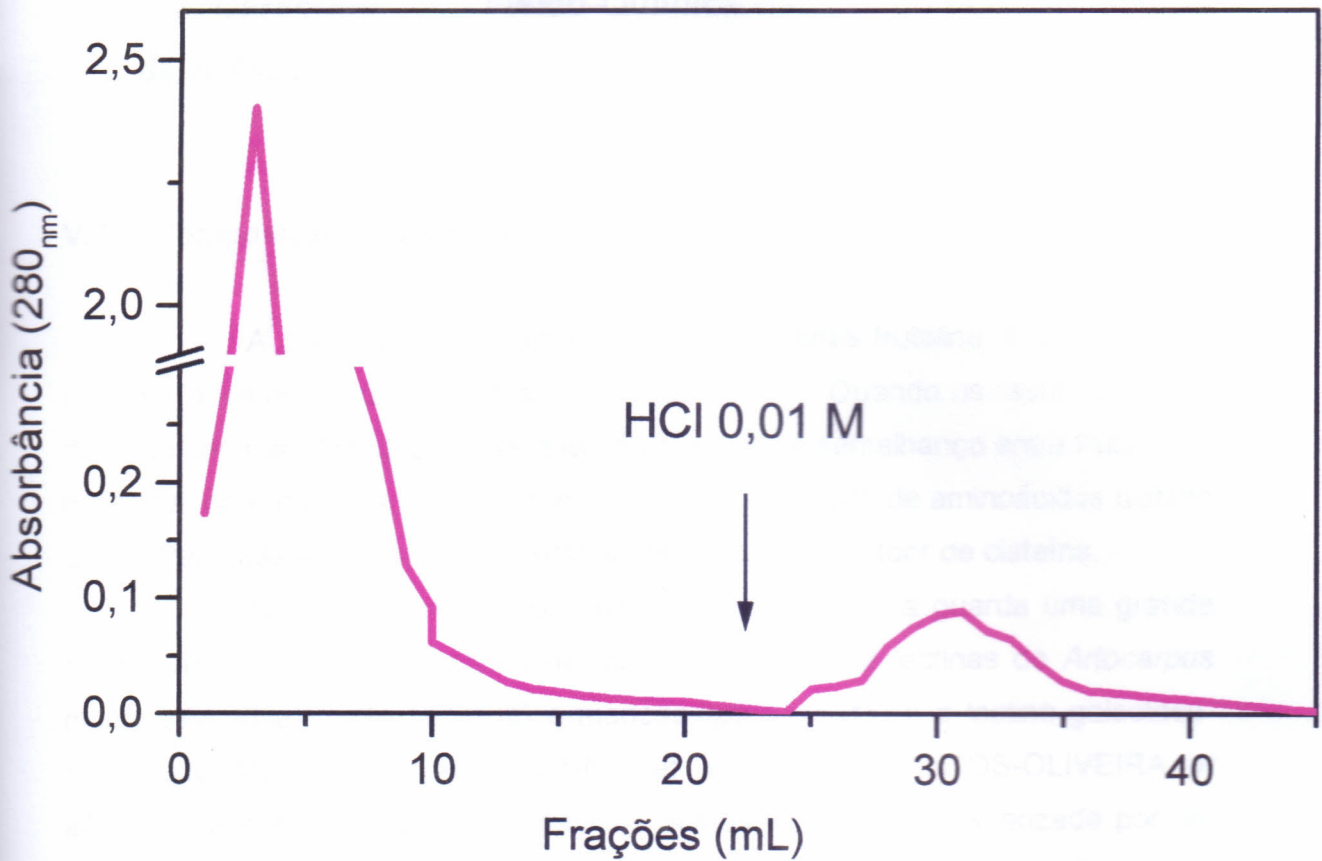


Figura 8. Cromatografia de afinidade em quitina do pico I eluído da coluna de agarose-manose. A amostra em PBS, pH 7,4 contendo NaCl 1 M, foi aplicada à coluna previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida foi eluída com a solução de equilíbrio e a fração retida (FRUTAQUINA) com solução de HCl 0,01 M contendo NaCl 0,15 M. Foram coletadas frações de 1,0 mL, sob um fluxo de 30 mL/h.

V.2. Caracterização Físico-Química das Lectinas de Sementes de *Artocarpus incisa*

V.2.1. Composição de Aminoácidos

A composição de aminoácidos das lectinas frutalina, frutapina e frutaquina foi determinada e pode ser vista na tabela 1. Quando os resultados obtidos são comparados observa-se que há uma grande semelhança entre frutalina e frutapina, no entanto, a frutaquina apresenta um conteúdo de aminoácidos distinto das outras duas lectinas, sendo caracterizado por um alto teor de cisteína.

O teor de aminoácidos da frutalina e frutapina guarda uma grande semelhança com outras lectinas de *Moraceae*, como as lectinas de *Artocarpus incisa* galactose-ligante (jacalina) e manose-ligante (KM+) e a lectina galactose-ligante de *Maclura pomifera* (YOUNG *et al*, 1989 e SANTOS-OLIVEIRA *et al*, 1994). A composição de aminoácidos destas lectinas é caracterizada por um alto conteúdo de aminoácidos ácidos, hidroxilados, hidrofóbicos e de glicina. Por outro lado o teor de aminoácidos básicos e sulfurados é baixo, sendo que resíduos de cisteína não foram detectados. Este perfil é também encontrado em muitas outras lectinas de plantas, no entanto não constitui uma regra, como foi evidenciado, por exemplo, para a frutaquina e lectinas de Gramíneas.

Tabela I - Composição de Aminoácidos de lectinas de sementes de *A. incisa*

	RESÍDUOS / 100		
	FRUTALINA ¹ (galactose-ligante)	FRUTAPINA (manose-ligante)	FRUTAQUINA (quitina-ligante)
Asx	8,7	11,4	6,0
Thr	7,4	8,8	8,6
Ser	7,0	8,1	6,0
Glx	8,6	12,3	9,8
Pro	5,8	5,0	5,8
Gly	12,4	17,6	8,2
Ala	4,9	8,7	5,5
Cys	nd ²	nd ²	14,8
Val	5,7	4,7	8,0
Met	1,2	0,60	nd ²
Ile	6,9	4,7	2,8
Leu	6,2	7,4	1,8
Tyr	5,8	2,4	5,0
Phe	7,3	3,4	2,7
Lys	6,7	2,2	11,6
His	1,6	0,60	1,4
Arg	2,4	2,1	2,0
Trp	1,4	nd ²	nd ²

¹MONTEIRO,1998² não detectado

V.2.2. Determinação da Massa Molecular Aparente

V.2.2.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS e β -mercaptoetanol (PAGE-SDS)

O Extrato Total obtido a partir da farinha de *Artocarpus incisa* (fruta-pão) e as lectinas isoladas a partir de seu fracionamento por cromatografia de afinidade foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 15 % (em condições desnaturantes) na presença e ausência de β -mercaptoetanol. A frutalina apresentou duas bandas protéicas, com massas moleculares aparentes de 12 e 15 kDa, respectivamente; e a frutapina apresentou uma única banda protéica com massa molecular aparente de 13 kDa (figura 9). Tanto a frutalina como a frutapina tiveram o mesmo comportamento na presença de β -mercaptoetanol, evidenciando assim, que estas lectinas não apresentam pontes dissulfeto. A frutaquina apresentou apenas uma banda protéica de massa molecular aparente de 12 kDa, (Figura 10), tanto na presença como na ausência de β -mercaptoetanol. Aparentemente estes resultados eram sugestivos de que esta lectina era constituída de uma única cadeia. No entanto a composição em aminoácidos mostrou alto teor de Cisteína (Cys), mesmo tendo sido realizada somente hidrólise ácida (o ideal seria hidrólise com ácido per fórmico, para preservar a integridade da cadeia lateral dos resíduos de Cys). Estes resultados foram esclarecidos quando da determinação do N-terminal desta lectina (veja item V.3.1), onde após a redução da frutaquina com polivinilpiridina (PVP) e subsequente cromatografia em colunas de fase reversa, a lectina foi separada em três cadeias. Desta forma, ficou claro que a frutaquina, embora apresente pontes dissulfeto, estas são resistentes à redução por β -mercaptoetanol nas condições experimentais empregadas.

Comparando-se os resultados aqui obtidos para a frutalina com outros anteriormente relatados, constata-se que dados semelhantes foram mostrados por outros autores para lectinas de *Moraceae* galactose-ligante. A lectina de

Maclura pomifera, por exemplo, em condições desnaturantes, PAGE-SDS, mostra duas cadeias polipeptídicas diferentes de 10 e 12 kDa, respectivamente (BAUSCH & PORETZ, 1977). Lectinas isoladas do mesmo gênero (*Artocarpus*) apresentaram comportamento similar. MOREIRA & AINOZ (1981) isolaram duas isolectinas galactose-ligantes de *A. integrifolia* (provavelmente duas formas estruturais da jacalina) que apresentaram duas bandas protéicas de Massa molecular aparente de 11 e 15 kDa, respectivamente. Por sua vez os resultados apresentados para a frutapina são análogos àqueles mostrados para KM+, lectina manose-ligante de *Artocarpus integrifolia*, que exhibe apenas uma única banda de massa molecular aparente de 13 kDa, assim como a frutapina, tanto em condições redutoras como não redutoras. A lectina manose-ligante de sementes de *Artocarpus integer* (champedak), por sua vez, apresenta duas bandas protéicas, em PAGE-SDS, com massa molecular aparente de 16,8 e 31,4 kDa. Entretanto na presença de agente redutor, apenas uma única banda de 16,8 kDa foi encontrada (LIM *et al.*, 1997).

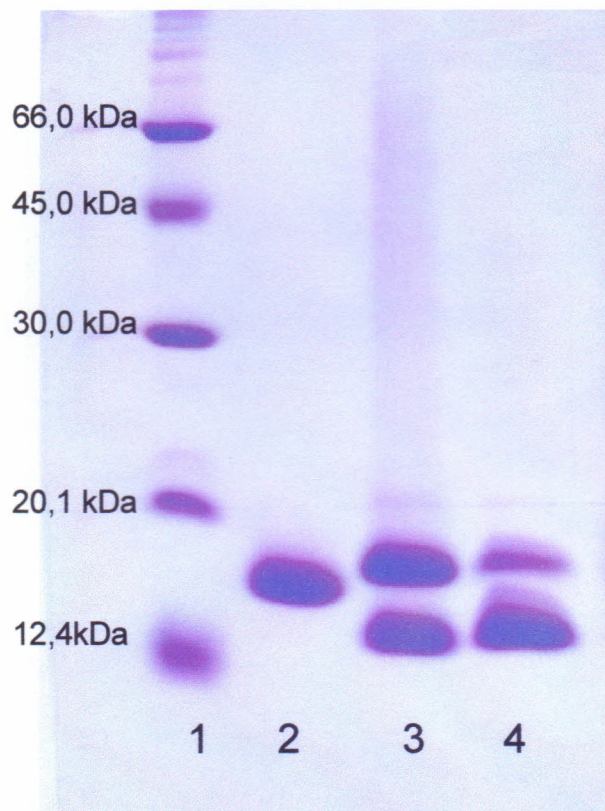


Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) na presença de SDS e β -mercaptoetanol. Pista (1) marcadores de massa molecular; (2) frutapina; (3 e 4) frutalina; marcadores de massa molecular: BSA (66 kDa), ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e citocromo C (12,4 kDa).

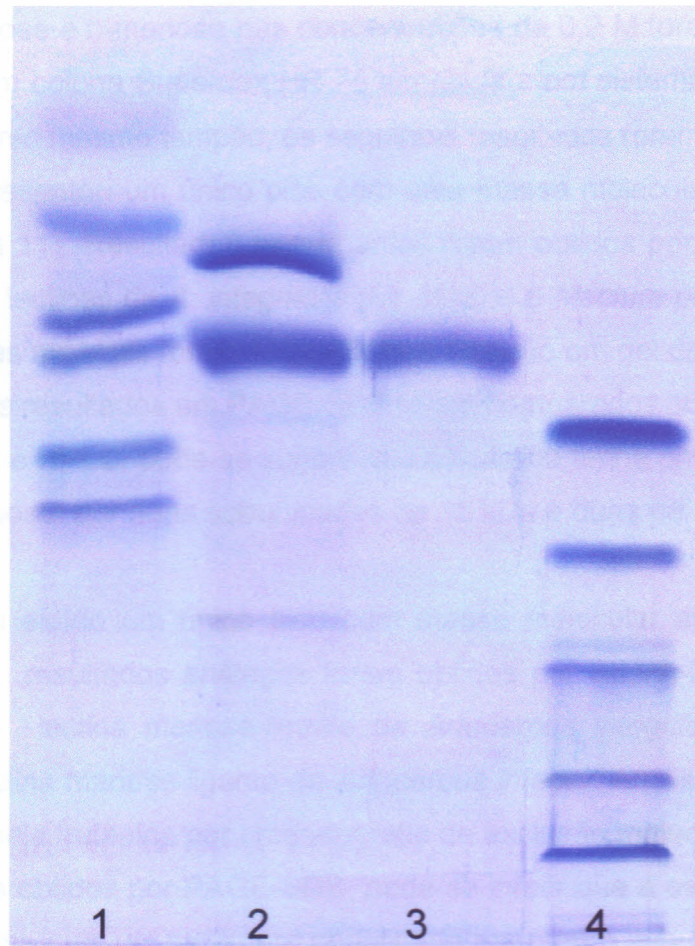


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (16 %) na presença de SDS e β -mercaptoetanol. Pista (1), marcadores de massa molecular, pista (2) frutalina, pista (3), frutaquina, pista (4) fragmento de mioglobina.

V.2.2.2. Cromatografia de Exclusão Molecular

Quando as lectinas: frutalina, frutapina e frutaquina em PBS pH 7,4, contendo D-galactose e D-manose nas concentrações de 0,2 M foram submetidas à cromatografia em coluna Superdex HR 75 acoplada a um sistema AKTA, equilibrada e eluída com o mesmo tampão, os seguintes resultados foram obtidos:

- ↪ Frutalina – apresentou um único pico com uma massa molecular aparente de 60 kDa (Figura 11). Resultados semelhantes foram obtidos por YOUNG *et al* (1989) para as lectinas de *A. integrifolia* (Mr 46kDa) e *Maclura pomifera* (Mr 44 kDa), quando as mesmas foram submetidas à filtração em gel de Sephadex G-100. Quando os resultados em PAGE-SDS foram comparados com aqueles obtidos por FPLC e HPLC, pode-se sugerir que a frutalina tenha uma estrutura tetramérica composta por duas subunidades de 15 kDa e duas de 12 kDa.

- ↪ Frutapina – foi eluído um único pico com massa molecular aparente de 63 kDa (Figura 12), resultados análogos foram obtidos por SILVA-LUCCA (1998) para a KM+ – lectina manose-ligante de *Artocarpus integrifolia* e por LIM (1997) para lectina manose-ligante de *Artocarpus integer*. Analisando os resultados obtidos pela frutapina por cromatografia de exclusão molecular juntamente com aqueles obtidos por PAGE-SDS, pode-se inferir que a estrutura quaternária da frutapina seja um tetrâmero constituído por quatro subunidades idênticas.

- ↪ Frutaquina – Também apresentou um único pico com massa molecular aparente de 12 kDa. Aliando este dado aos obtidos em PAGE-SDS e redução com PVP podemos sugerir que a frutaquina seja uma proteína monomérica constituída por três cadeias unidas por pontes S-S (Figura 13).

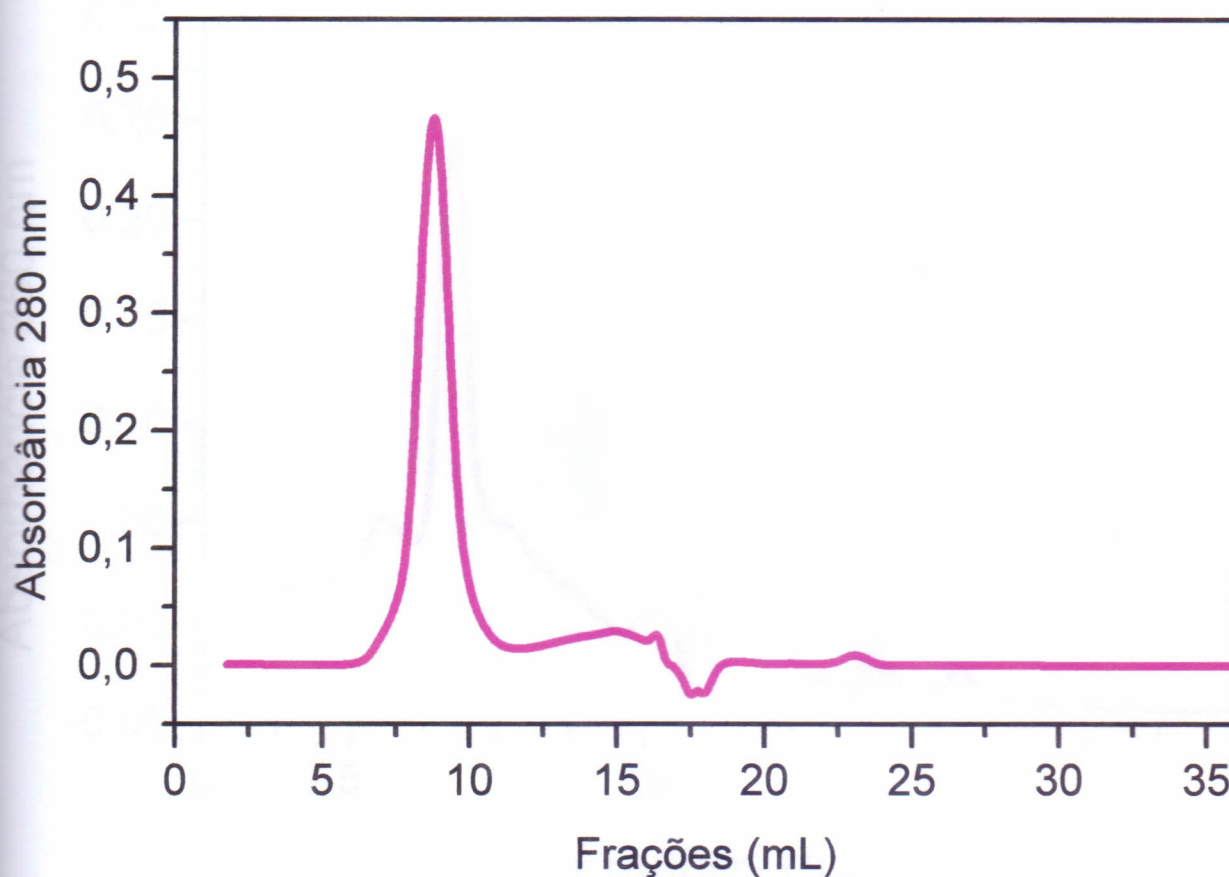


Figura 11. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 HR, acoplada a um sistema HPLC. À coluna equilibrada e eluída com PBS, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose e D-manose, à temperatura ambiente, frutalina foi aplicada dissolvida no tampão de equilíbrio. A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorbância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, sob um fluxo de 60 mL/h.

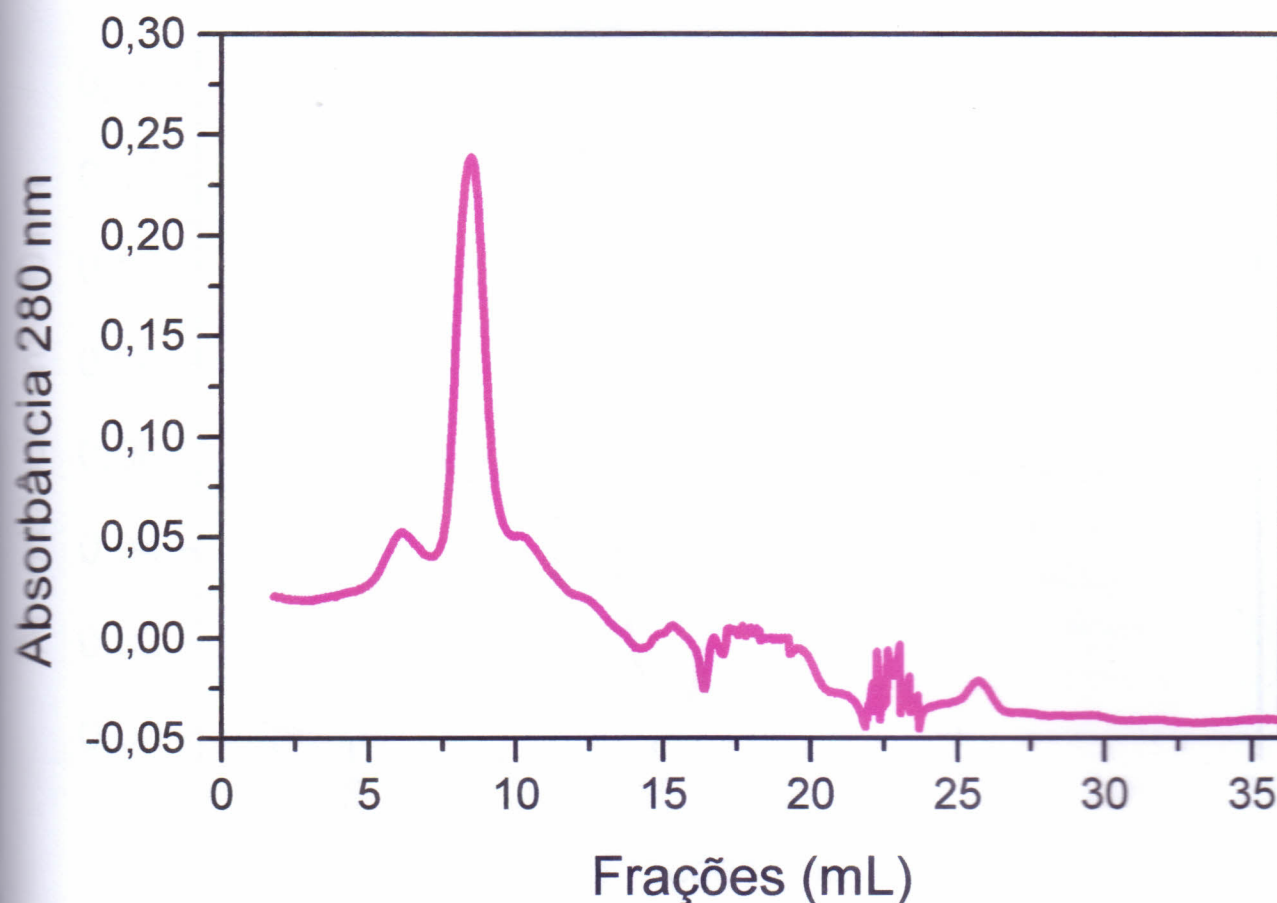


Figura 12. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 HR, acoplada a um sistema HPLC. À coluna equilibrada e eluída com PBS, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose e D-manose, à temperatura ambiente, frutapina foi aplicada dissolvida no tampão de equilíbrio. A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorbância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, sob um fluxo de 60 mL/h.

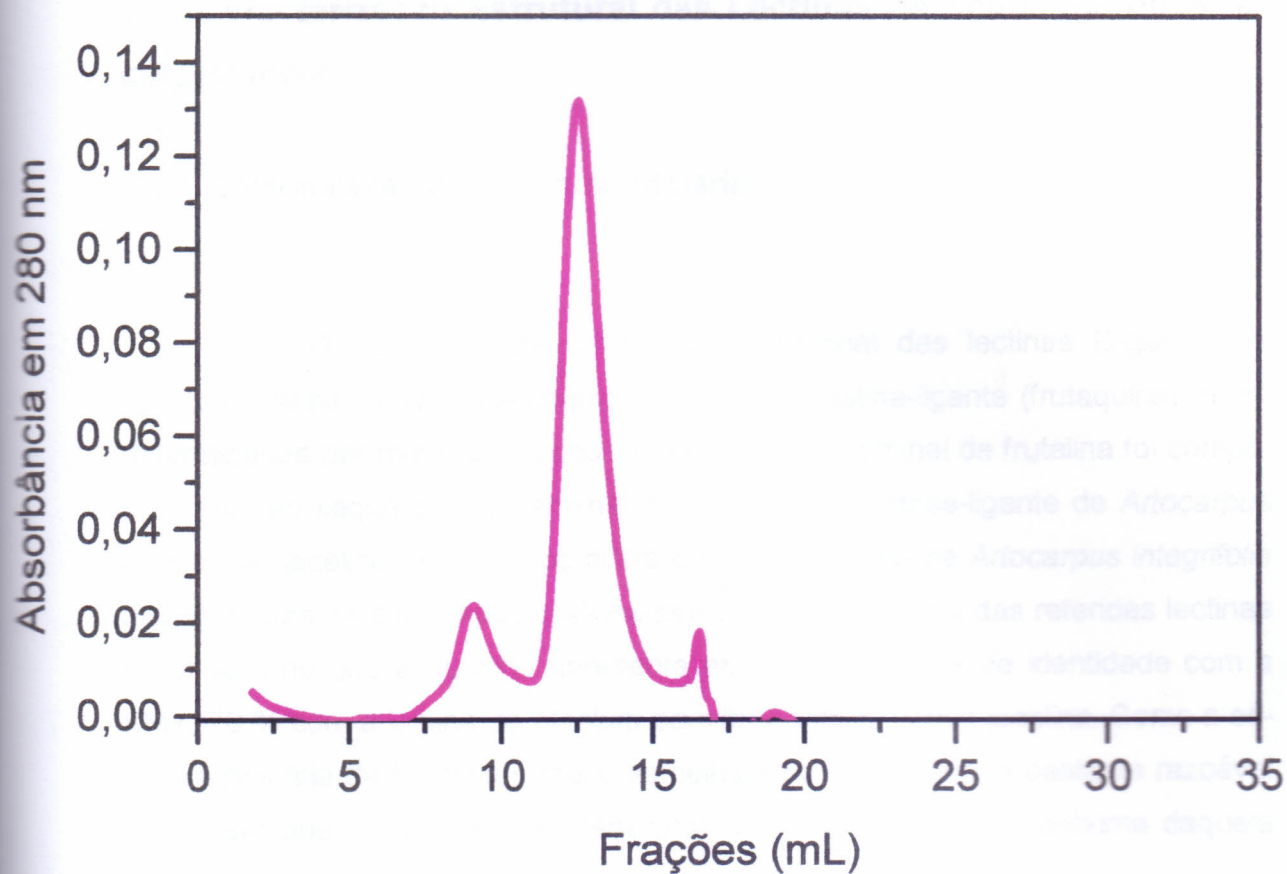


Figura 13. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 HR, acoplada a um sistema HPLC. À coluna equilibrada e eluída com PBS, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose e D-manose, à temperatura ambiente, frutakuina foi aplicada dissolvida no tampão de equilíbrio. A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorbância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, sob um fluxo de 60 mL/h.

V.3. Caracterização Estrutural das Lectinas de Sementes de *Artocarpus incisa*

V.3.1. Determinação da Estrutura Primária

Os aminoácidos da porção N-terminal das lectinas D-galactose-ligante (frutalina), D-manose-ligante (frutapina) e quitina-ligante (frutaquina) foram determinados por método químico. A seqüência N-terminal da frutalina foi comparada com as seqüências N-terminal das lectinas galactose-ligante de *Artocarpus integrifolia* (jacalina), *Maclura pomifera* e manose ligante de *Artocarpus integrifolia* (KM+) (Figura 14 e15). Após o alinhamento das seqüências das referidas lectinas foi observado que a frutalina apresenta em torno de 40 % de identidade com a KM+, 76 % com a lectina de *Maclura pomifera* e 98 % com a jacalina. Como a estrutura primária da frutalina é muito semelhante a da jacalina, é bastante razoável se pensar que a estrutura tridimensional da frutalina seja bem próxima daquela apresentada pela jacalina.

A frutapina apresentou seu resíduo amino-terminal bloqueada não sendo possível determinar seu N-terminal. Como a KM+ (também ligante de D-manose) apresenta seu N-terminal bloqueado, ROSA *et al.*, (1999), esta é mais uma evidência que a estrutura da frutapina seja muito similar a da KM+.

A seqüência N-terminal da frutaquina foi comparada com a seqüência N-terminal da lectina quitina-ligante de *Artocarpus integrifolia* (jacaquina) (figura 16). A frutaquina e jacaquina tratam-se de lectinas que não apresentam similaridades com outras até hoje seqüenciadas, pois a partir do N-terminal das cadeias que as constituem não foi encontrada lectina que apresentasse identidade com as mesmas. Em 1999, MOURÃO e colaboradores isolaram uma lectina quitina ligante de sementes de *Artocarpus integrifolia* com massa molecular aparente de 31,4; 18,5 e 16,3 kDa determinado por PAGE-SDS. A seqüência da região N-terminal do polipeptídeo de Mr 16,3 foi determinada e não mostrou nenhuma semelhança com a frutaquina ou com a jacaquina (lectina quitina-ligante de sementes de *Arto-*

carpus integrifolia). Os onze resíduos determinados por Mourão e colaboradores são idênticos aos onze primeiros resíduos da cadeia- α da jacalina. Além disso, os dois outros polipeptídeos que não foram seqüenciados apresentam massas moleculares aparentes, determinadas por PAGE-SDS, bem distintas daquela encontrada para a frutaquina que foi de aproximadamente 12 kDa. Diante do exposto pode ser sugerido que as lectinas quitina-ligante de sementes de *Artocarpus incisa* e *Artocarpus integrifolia*, frutaquina e jacaquina, respectivamente, constituem um novo grupo de lectinas, caracterizadas por serem monômeros, com três cadeias unidas por pontes S-S.



Figura 14. Alinhamento da seqüência N-terminal da lectina de sementes de *Artocarpus incisa* galactose-ligante – FRUTALINA com lectinas relacionadas: jacalina (Cadeia- α) e KM+ (manose-ligante) de sementes de *Artocarpus integrifolia* (YOUNG *et al.*, 1989 e ROSA *et al.*, 1999), lectina galactose-ligante de sementes de *Maclura pomifera* (YOUNG *et al.*, 1989). Em **magenta** – AA conservados e em **azul** – modificações conservativas.

Cadeia α		10	20	30	40	50
FRUTALINA	GKAFDDGAFT	GIREINLSYN	KETAIGDFQV	VYDLNGSPYV	GQNHKSFITG	
JACALINA	GKAFDDGAFT	GIREINLSYN	KETAIGDFQV	VYDLNGSPYV	GQNHKSFITG	
CONSENSUS	GKAFDDGAFT	GIREINLSYN	KETAIGDFQV	VYDLNGSPYV	GQNHKSFITG	
	60	70	80	90	100	110
FTPVKISLDF	PSEYIMEVSG	YTGNSVGYVV	VRSLTFKTNK	KTYGPYGVTS	GTPFNLPIEN	
FTPVKISLDF	PSEYIMEVSG	YTGNSVGYVV	VRSLTFKTNK	KTYGPYGVTS	GTPFNLPIEN	
FTPVKISLDF	PSEYIMEVSG	YTGNSVGYVV	VRSLTFKTNK	KTYGPYGVTS	GTPFNLPIEN	
	120	130				
GLIVGFKGSI	GYWLDYFSMY	LSL				
GLIVGFKGSI	GYWLDYFSMY	LSL				
GLIVGFKGSI	GYWLDYFSMY	LSL				
Cadeia β		10	20			
FRUTALINA	NQSGKSQTV	IVGPWGAKVS				
JACALINA	NEQSGKSQTV	IVGSWGAKVS				
CONSENSUS	N#QSGKSQTV	IVG#WGAKVS				

Figura 15. Alinhamento da seqüência primária da frutalina com a jacalina.

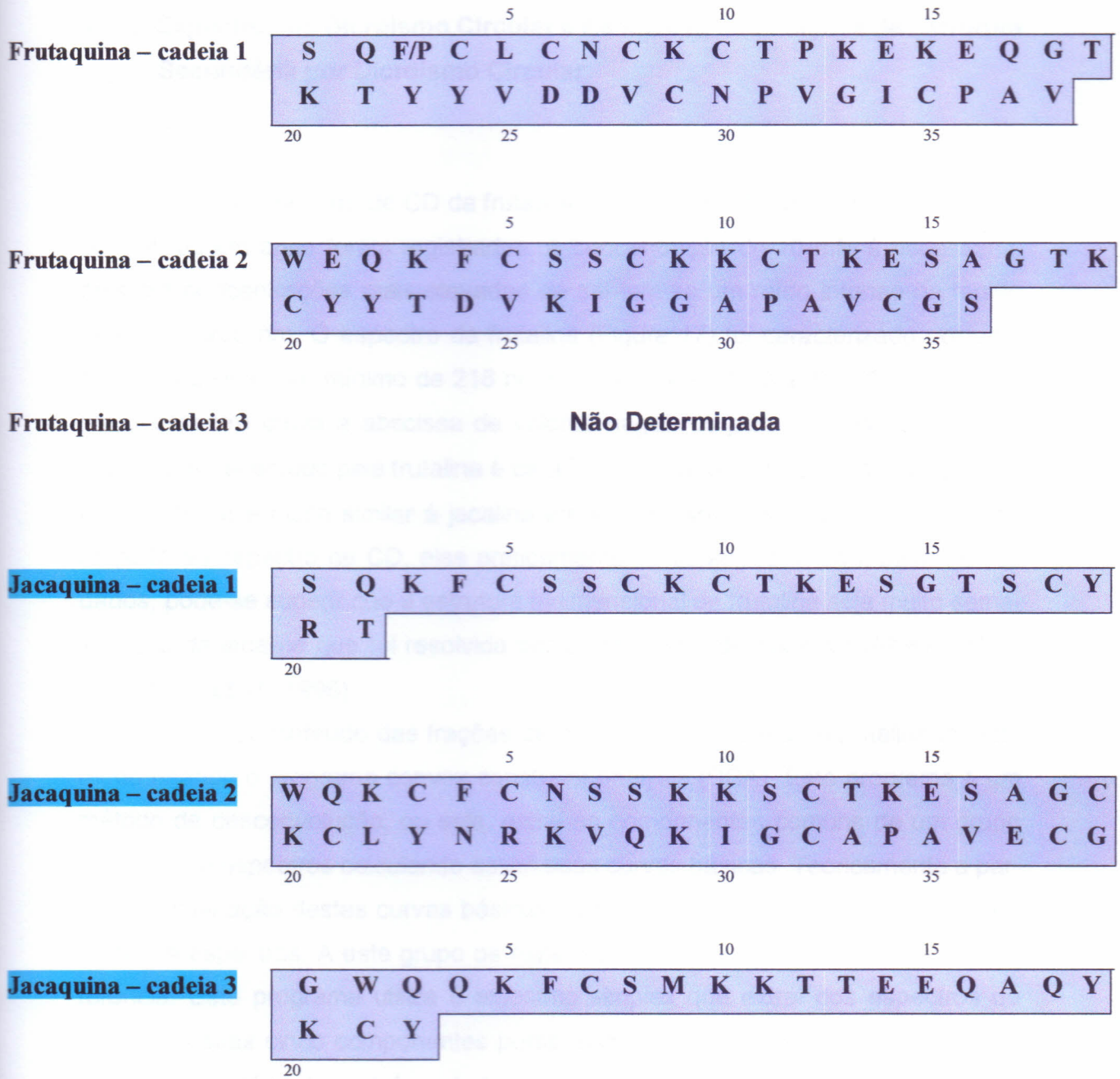


Figura 16. Seqüência N-terminal das cadeias 1 e 2 da frutaquina – lectina quitina-ligante de sementes de *Artocarpus incisa* e das cadeias 1, 2 e 3 da jacaquina – lectina quitina-ligante de sementes de *Artocarpus integrifolia*.

V.3.2. Espectros de Dicroísmo Circular e Estimativa das Frações de Estrutura Secundária por Dicroísmo Circular

O espectro de CD da frutalina, frutapina e frutaquina em PBS 10 mM, pH 7,4, ou em água foram registrados. A concentração de 10 mM é necessária, pois em concentrações mais elevadas de sal tem-se um ruído intenso na região abaixo de 200 nm. O espectro da frutalina (Figura 17) foi caracterizado por uma banda negativa com mínimo de 218 nm e uma banda positiva de 203 nm em 209 nm o espectro cruza a abscissa de valores negativos para valores positivos. O espectro apresentado pela frutalina é característico de estrutura folha- β antiparalela. A frutalina é muito similar à jacalina em vários aspectos, inclusive no que diz respeito ao espectro de CD, eles praticamente se superpõem. Com base nestes dados, pode-se sugerir que a estrutura tridimensional da frutalina seja muito semelhante à da jacalina que foi resolvida por cristalografia de raios-X (SANKARANA-RAYANAN *et al.*, 1996).

O conteúdo das frações de estrutura secundária da frutalina foi estimado usando o programa convex constraint analysis (CCA). Este programa é um método de desconvolução, ou seja, extrai as componentes comuns de um grupo qualquer de espectros calculando assim suas curvas básicas. Teoricamente a partir da combinação destas curvas básicas pode-se obter qualquer curva contida no grupo de espectros. A este grupo de espectros dá-se o nome de espectros de referência. Este programa utiliza o algoritmo simplex que extrai dos espectros de referência suas cinco componentes puras, isto é, as curvas associadas à conformação secundária de proteínas (α -hélice, folha- β , volta- β , estrutura não ordenada e contribuições aromáticas). O espectro a ser analisado é acrescentado ao grupo de dados de referência.

O conteúdo das frações de estrutura secundária da frutalina estimada por CD usando o programa CCA foi a seguinte: 0 % de α -hélice, 64 % de folha- β antiparalela, 21 % de volta- β (β -turn) e/ou folha- β paralela, 6% estrutura não or-

denada e 9% de contribuições adicionais, com um RMS (desvio médio quadrático) de 1%.

O espectro de CD da frutapina em água foi caracterizado por dois mínimos em 217 e 195 nm e um máximo em 203 nm, e cruza a abscissa de valores negativos para valores positivos em 189 nm (figura 18). Sua baixa elipticidade é consistente com uma proteína não helicoidal. O espectro de CD da frutapina é muito semelhante ao da KM+. A forma dos espectros apresentados pela frutapina e KM+ (lectina manose-ligante de *Artocarpus integrifolia*) não é comum, sendo característico para estas duas lectinas. O conteúdo de estrutura secundária foi estimado utilizando-se o programa CCA. As seguintes frações foram obtidas: α -hélice 0%, folha- β paralela e/ou volta- β 21 %, folha- β antiparalela 47%, desordenada 23%, contribuições adicionais 9% e um RMS de 1 %. As frações calculadas para as voltas β são coerentes com aquelas calculadas para as folhas β , isto é, aproximadamente metade do valor desta última.

A estrutura cristalográfica da jacalina é predominantemente β (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996) sendo também seu espectro de CD típico de proteínas β . Os espectros de CD da frutapina e KM+, entretanto, são diferentes daqueles encontrados na literatura para outras proteínas predominantemente β (Silva-Lucca, 1994). Na faixa de 250-200 nm (com um mínimo em 216 nm), seu espectro tem características de proteínas cuja estrutura secundária é predominantemente β , porém há a ausência do pico, positivo em 200 nm, característico da conformação β , o que os tornam peculiares. Entretanto, a desconvolução destes espectros utilizando os programas SELCON ou CCA identificaram a estrutura β como componente dominante, seguida de uma quantidade considerável de estrutura não ordenada.

Possivelmente, a ausência de pico positivo no espectro de CD da frutapina e KM+ deve-se a diversos resíduos de prolina presentes na KM+ em regiões homólogas às folhas β da estrutura da jacalina. Duas possibilidades podem estar ocorrendo: as substituições por prolina, que ocorrem na KM+, ou seja, podem levar a distorções nesses elementos de estrutura secundária, alterando também seu espectro de CD; os resíduos de prolina podem ter sua própria contribui-

ção espectral, com mínimos acentuados, na região de 200 nm, "deformando" assim o espectro da KM+. Estas possibilidades têm como base o fato de que em hélices contendo de um a três resíduos de prolina é necessário considerar a contribuição espectral destas prolinas, em particular, como previsto por Sreerama & Woody (SREERAMA & WOODY, 1994).

A frutapina como as outras duas lectinas descritas de sementes de *Artocarpus incisa*, também tem uma estrutura secundária predominantemente β . Seu espectro de CD é caracterizado por dois mínimos em 213 e 273,8 nm e dois máximos em 204 e 229,6 nm e em 246,8 nm o espectro cruza a abscissa de valores negativos para valores positivos (Figura 19). Após desconvolução do espectro da frutapina foram obtidas as seguintes percentagens das componentes puras: 31 % de folha- β , 22 % de β -turns e 47 % de estrutura não ordenada e um RMS 1%. O conteúdo de estrutura secundária foi estimado utilizando-se o programa SELCON 3.

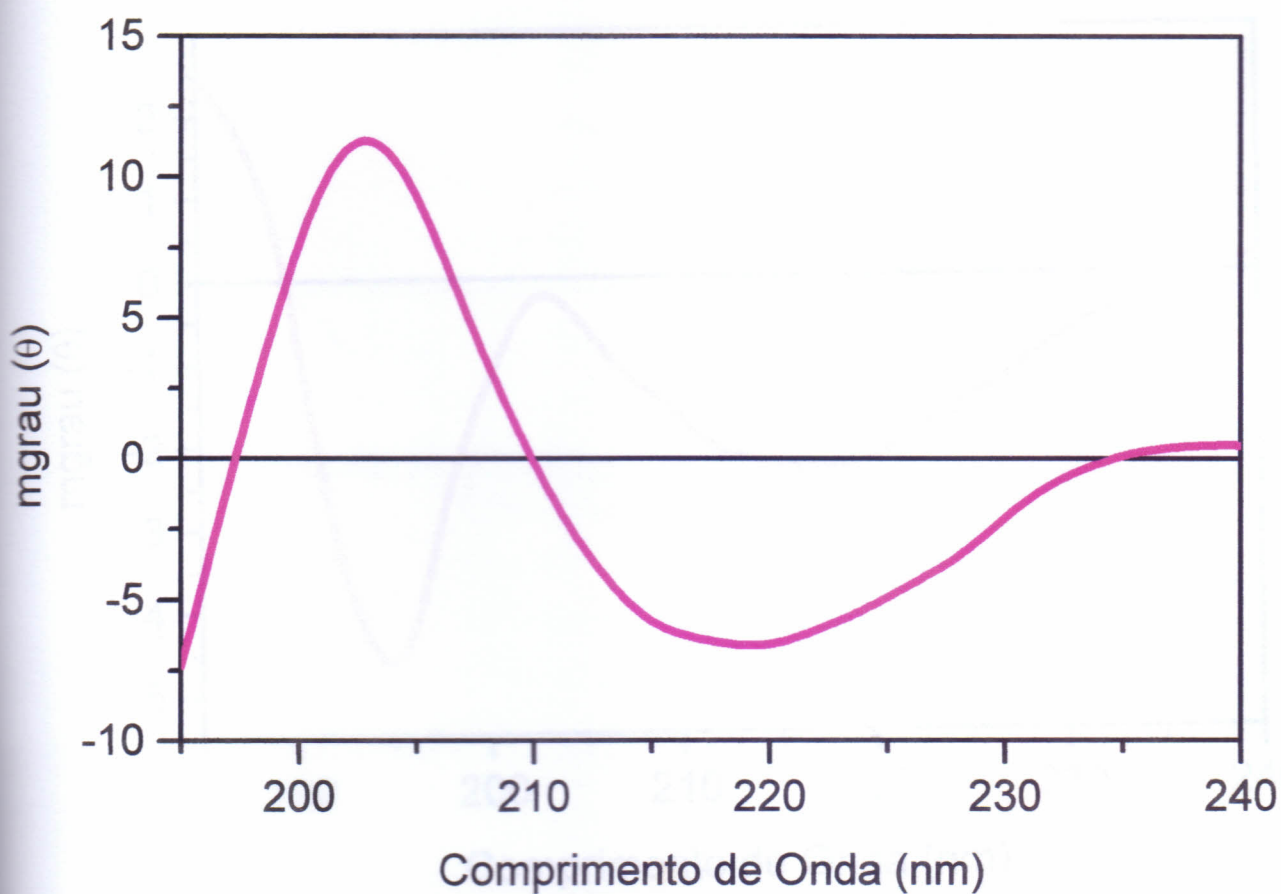


FIGURA 17 – Espectro de dicroísmo circular da frutalina (0,12-0,15 mg/mL) dissolvida em PBS 10 mM, pH 7,4. O espectro foi registrado de 195 a 240 nm, com uma média de 32 varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho óptico, a 25 °C. A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi calculada pelo programa CCA.

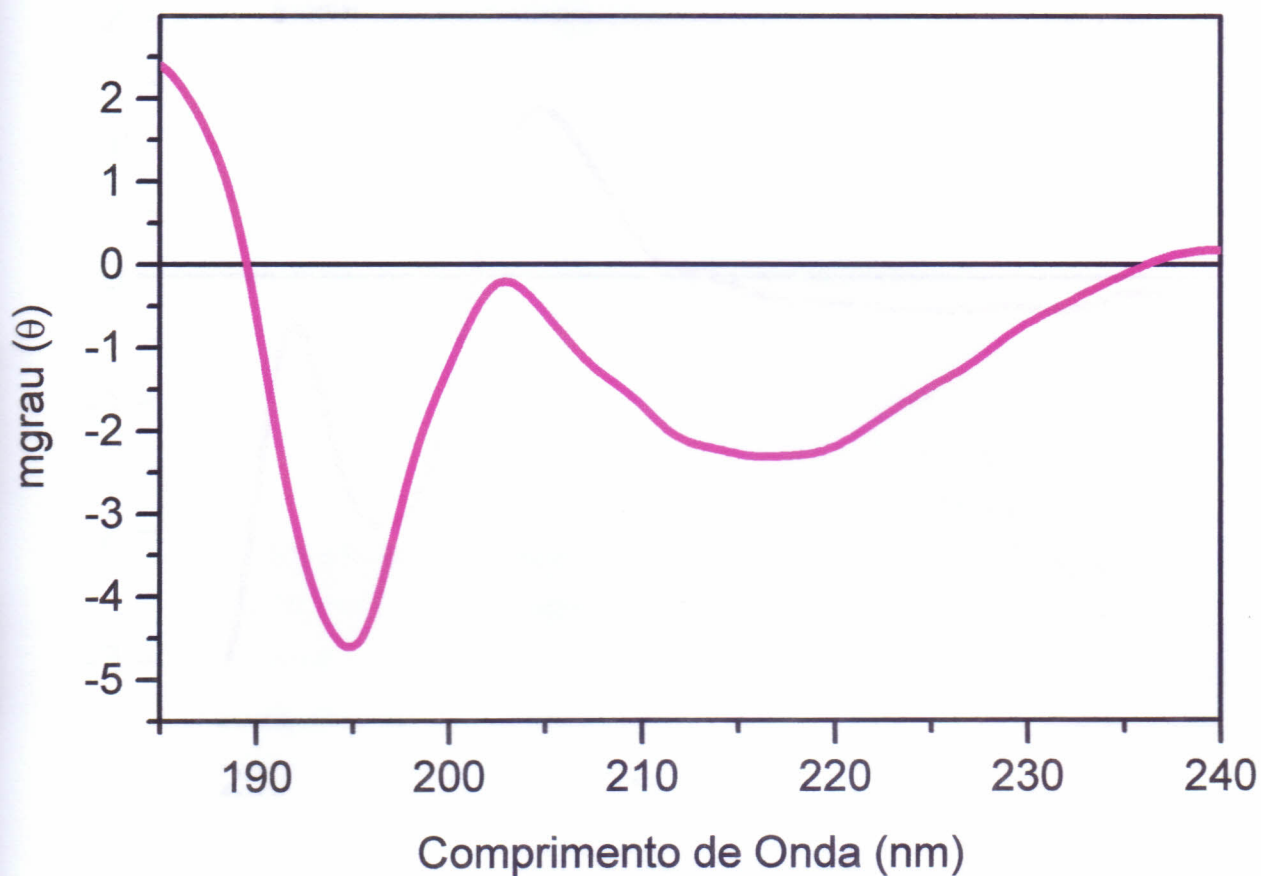


FIGURA 18 – Espectro de dicroísmo circular da frutapina (0,12-0,15 mg/mL) dissolvida em PBS 10 mM, pH 7,4. O espectro foi registrado de 195 a 240 nm, com uma média de 32 varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho ótico, a 25 °C. A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi calculada pelo programa CCA.

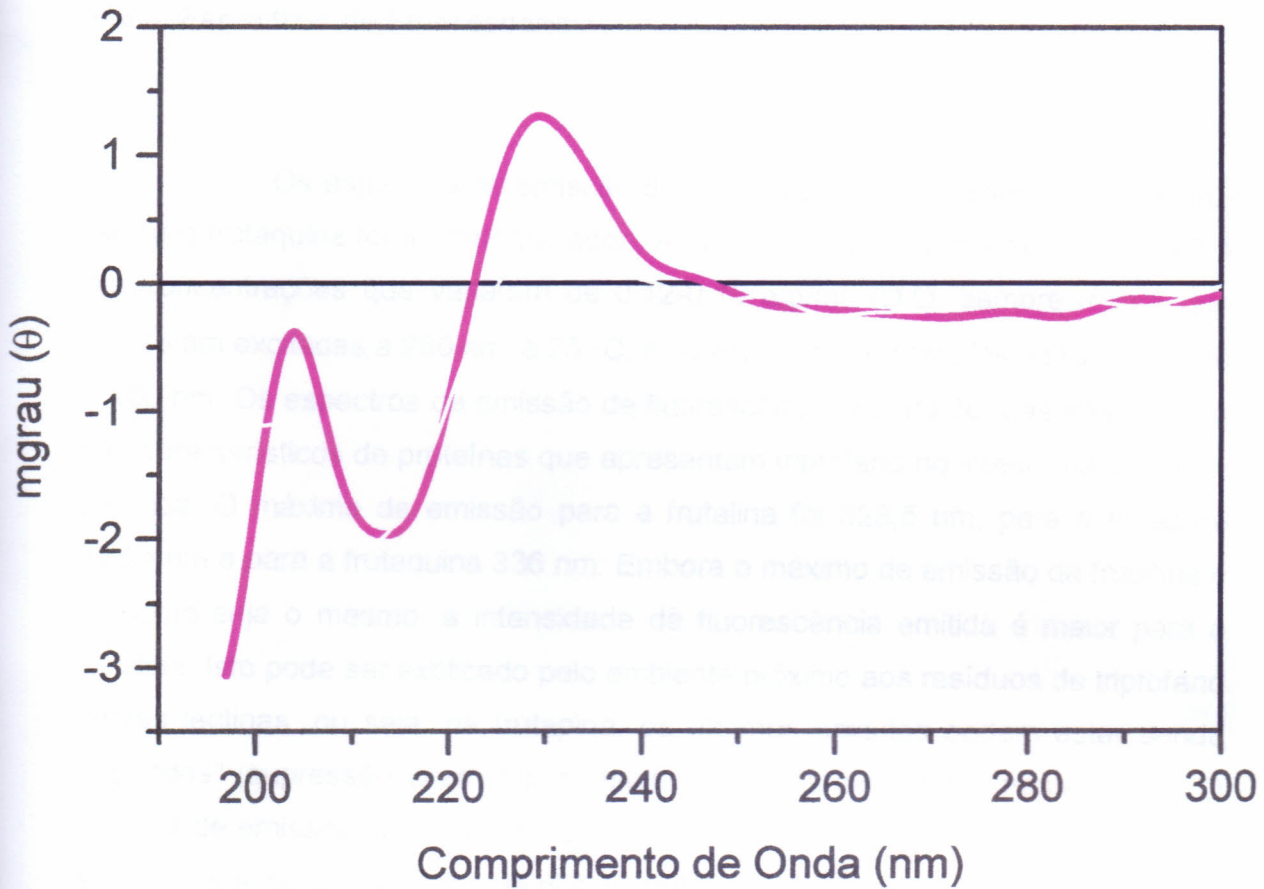


FIGURA 19 – Espectro de dicroísmo circular da frutakuina (0,12-0,15 mg/mL) dissolvida em água. O espectro foi registrado de 195 a 300 nm, com uma média de 32 varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho ótico, a 25 °C. A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi calculada pelo programa SELCON 3.

V.3.3. Espectros de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência das lectinas frutalina, frutapina e frutaquina foram determinados. As amostras dissolvidas em PBS, pH 7,4 em concentrações que variaram de 0,12-0,15 mg/mL (D.O. sempre menor que 0,1) foram excitadas a 280 nm, a 25 °C, e os espectros registrados na faixa de 300 a 450 nm. Os espectros de emissão de fluorescência (Figura 20) das três lectinas são característicos de proteínas que apresentam triptofano no interior da estrutura protéica. O máximo de emissão para a frutalina foi 328,5 nm, para a frutapina 328,5 nm e para a frutaquina 336 nm. Embora o máximo de emissão da frutalina e frutapina seja o mesmo, a intensidade da fluorescência emitida é maior para a frutalina. Isto pode ser explicado pelo ambiente próximo aos resíduos de triptofano nestas lectinas, ou seja, na frutapina, os elétrons emitidos podem estar sendo "captados" (supressão interna) por resíduos básicos localizados nesta região. O máximo de emissão da frutaquina de 336 nm indica que os resíduos de triptofano estão mais expostos ao solvente que na frutalina e frutapina.

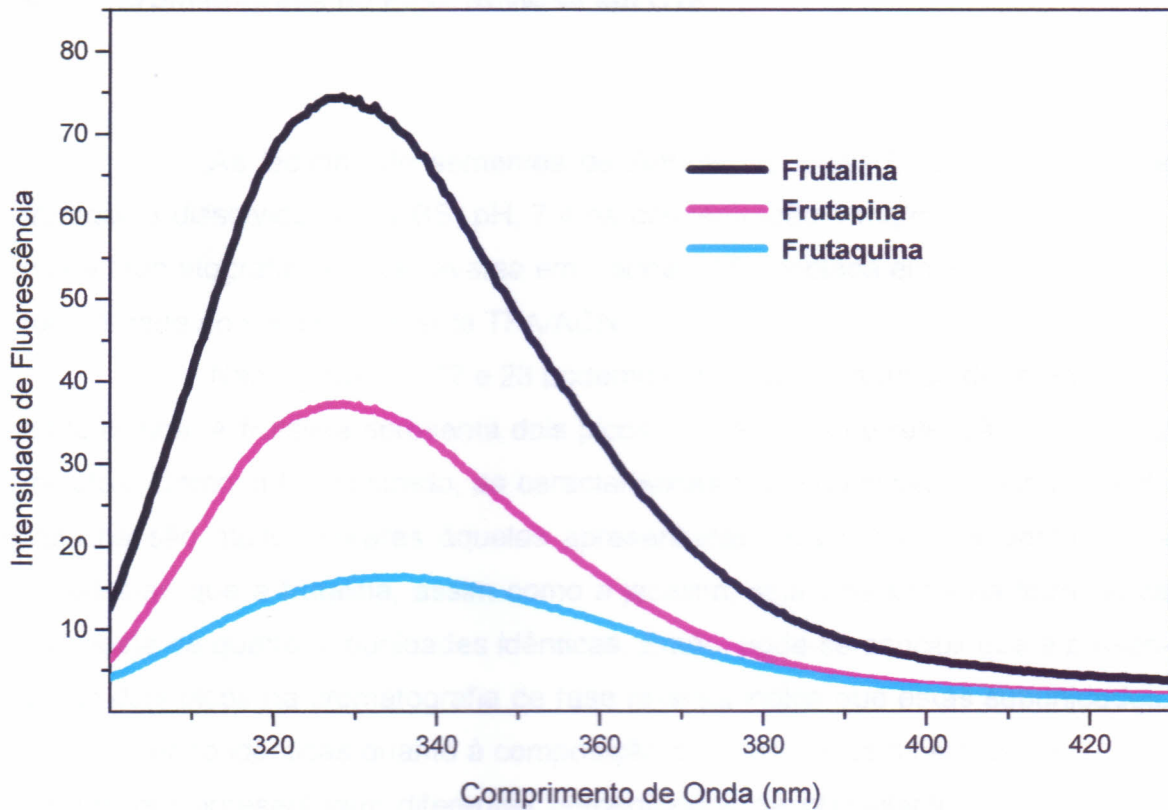


FIGURA 20 – Espectros de emissão de fluorescência da frutalina, frutapina, frutaquina dissolvidas em PBS, pH 7,4 em concentrações que variaram de 0,12-0,15 mg/mL, D.O. sempre menor que 0,1. As amostras foram excitadas a 280 nm, a 25 °C, e os espectros registrados na faixa de 300 a 450 nm.

V.3.4. Cromatografia de Fase Reversa em C18

As lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* frutalina, frutapina e frutaquina dissolvidas em PBS, pH, 7,4 na concentração 1 mg/mL foram submetidas à cromatografia de fase reversa em coluna C18 acoplada em HPLC. A eluição foi realizada no sistema solvente TFA/ACN.

Nas figuras 21, 22 e 23 podemos observar os tempos de retenção de cada lectina. A frutalina apresenta dois picos com tempos de retenção de 15 e 22 minutos; Como já foi mostrado, as características físico-químicas e estruturais da frutalina são muito similares àquelas apresentadas pela jacalina, e desta forma acredita-se que a frutalina, assim como a jacalina, seja uma proteína tetramérica composta de quatro subunidades idênticas. Então, pode-se concluir que a presença de dois picos na cromatografia de fase reversa indica que estas subunidades, mesmo sendo idênticas quanto à composição protéica, tenham caráter hidrofóbico distinto por apresentarem diferentes percentagens de glicosilação. A frutapina e frutaquina apresentam apenas um único pico com tempos de retenção diferentes, 22 e 15, respectivamente. Estes resultados traduzem que estas lectinas têm características hidrofóbicas distintas.

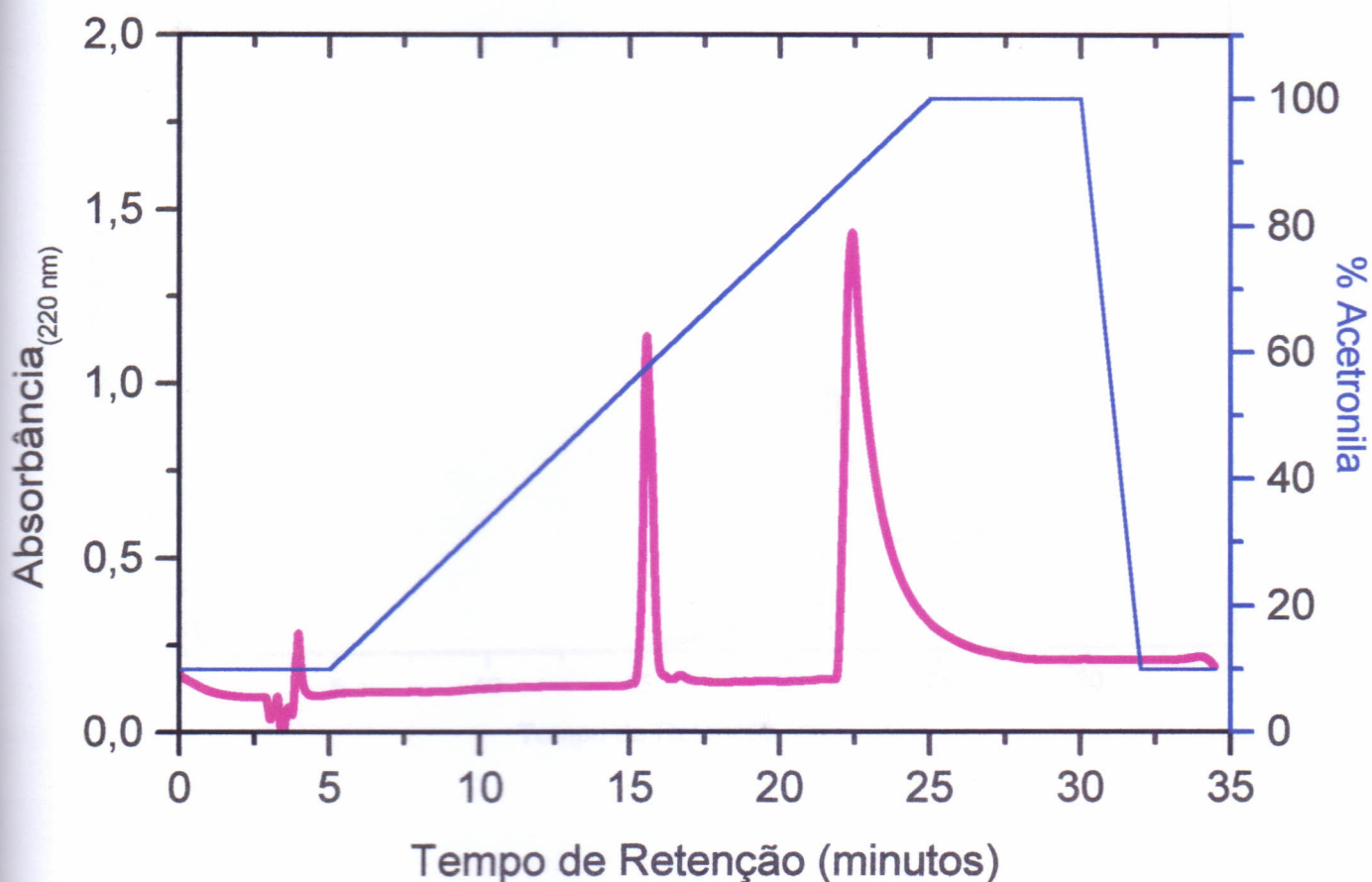


Figura 21. Cromatografia de fase reversa em coluna C18, acoplada a um sistema HPLC. À coluna equilibrada com PBS, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose e D-manose, à temperatura ambiente, frutalina dissolvida no tampão de equilíbrio foi aplicada na concentração de 1 mg/mL, no tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada no sistema solvente TFA/ACN (solvente A: Acetonitrila 0,1 % e solvente B: acetonitrila: água:TFA, 80:20:0,8). As condições de eluição foram: 5 minutos com 5 % solvente B; 20 minutos de 5 a 100% de B; 5 minutos de 100% de B; 5 minutos de 100% B a 5% de solvente A. A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorbância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, com fluxo de 60 mL/h.

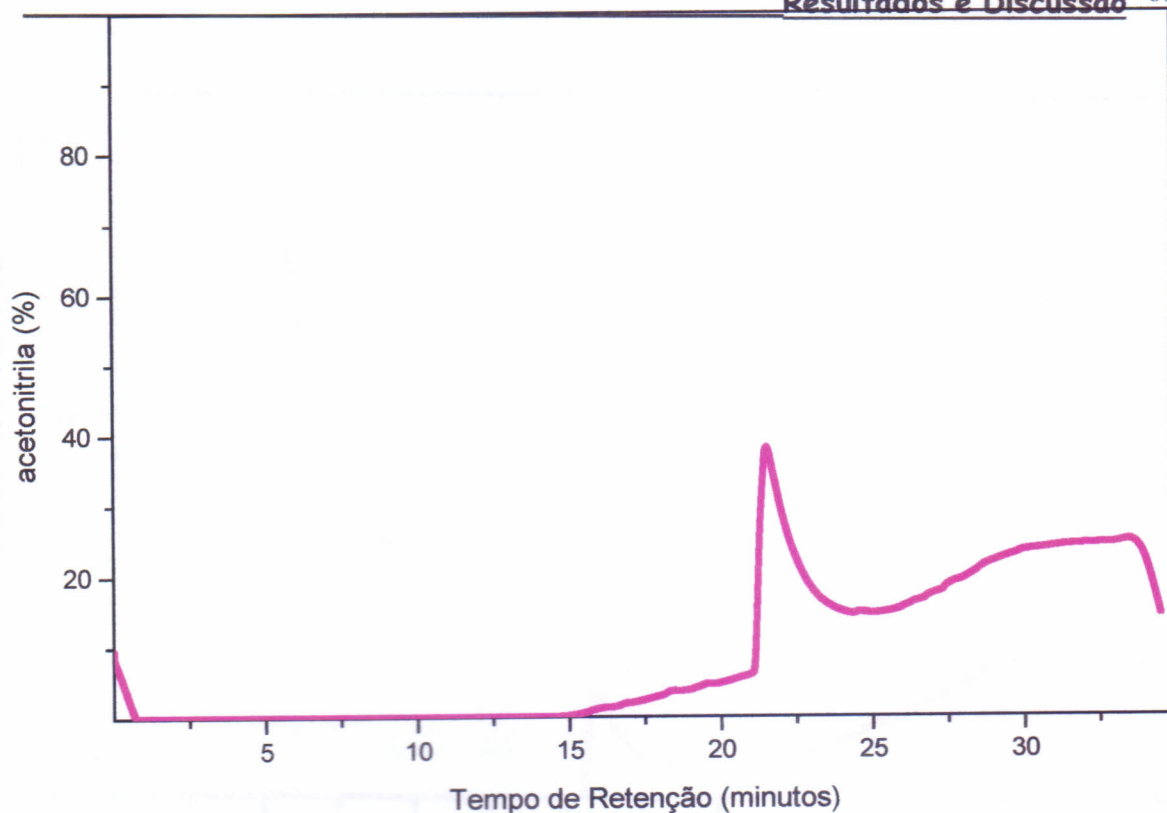


Figura 22. Cromatografia de fase reversa em coluna C18, acoplada a um sistema HPLC. À coluna equilibrada com PBS, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose e D-manose, à temperatura ambiente, frutapina dissolvida no tampão de equilíbrio foi aplicada na concentração de 1 mg/mL, no tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada no sistema solvente TFA/ACN (solvente A: Acetoneitrila 0,1 % e solvente B: acetoneitrila: água:TFA, 80:20:0,8). As condições de eluição foram: 5 minutos com 5 % solvente B; 20 minutos de 5 a 100% de B; 5 minutos de 100% de B; 5 minutos de 100% B a 5% de solvente A. A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorvância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, com fluxo de 60 mL/h.

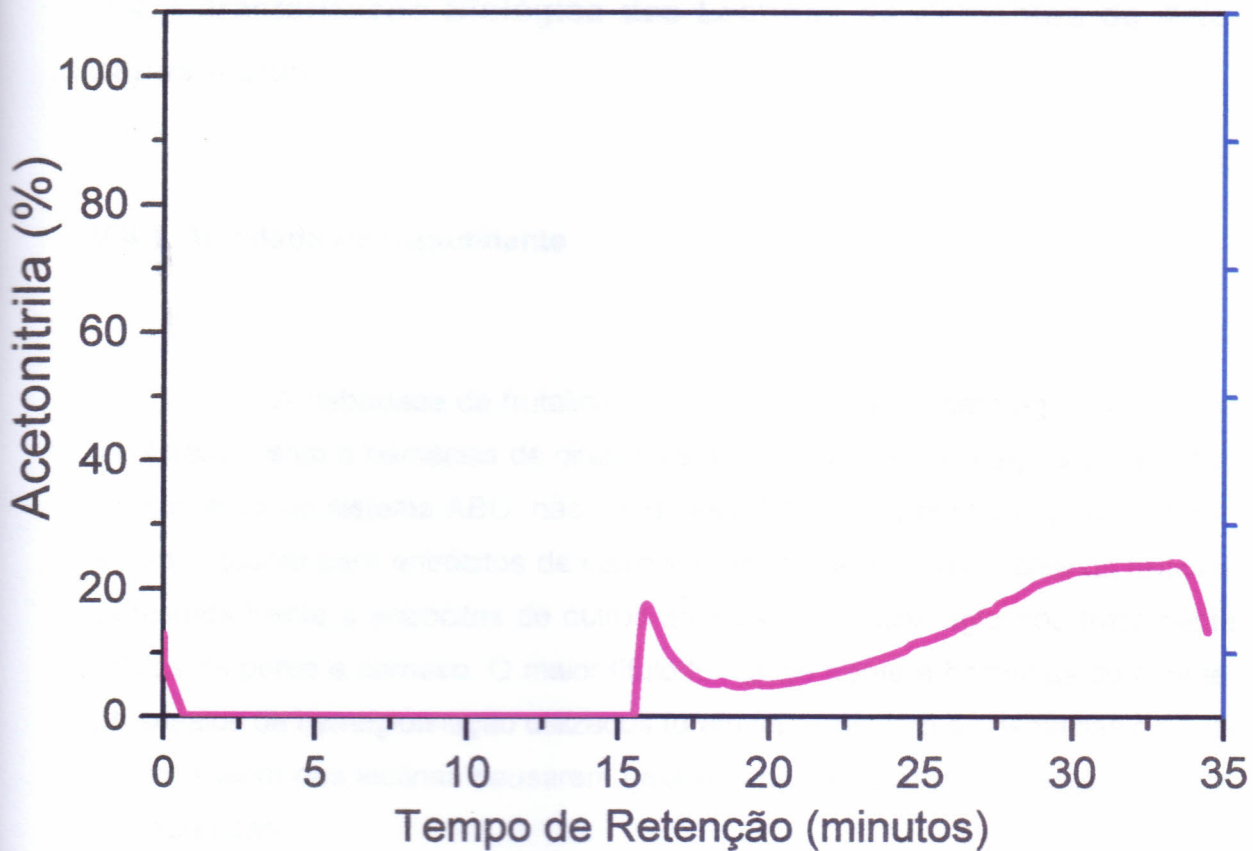


Figura 23. Cromatografia de fase reversa em coluna C18, acoplada a um sistema HPLC. À coluna equilibrada com PBS, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e D-galactose e D-manose, à temperatura ambiente, frutaguina dissolvida no tampão de equilíbrio foi aplicada na concentração de 1 mg/mL, no tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada no sistema solvente TFA/ACN (solvente A: Acetonitrila 0,1 % e solvente B: acetonitrila: água:TFA, 80:20:0,8). As condições de eluição foram: 5 minutos com 5 % solvente B; 20 minutos de 5 a 100% de B; 5 minutos de 100% de B; 5 minutos de 100% B a 5% de solvente A. A cromatografia foi monitorada pela leitura de absorvância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, com fluxo de 60 mL/h.

V.4. Caracterização Biológica das Lectinas de Sementes de *Artocarpus incisa*

V.4.1. Atividade Hemaglutinante

A habilidade da frutalina, frutapina e frutaquina para aglutinar células foi testada frente a hemácias de diferentes animais. As lectinas aglutinam eritrócitos humanos do sistema ABO, não sendo específica para nenhum grupo, tão fortemente quanto para eritrócitos de coelho. A atividade hemaglutinante da frutalina foi testada frente a eritrócitos de outros animais. A frutalina aglutinou fracamente células de porco e carneiro. O maior título foi obtido frente a hemácias de capote. Os ensaios de hemaglutinação utilizados foram feitos usando-se hemácias de coelho, pois além das lectinas causarem uma boa hemaglutinação, elas são de mais fácil obtenção.

V.4.2. Inibição da atividade hemaglutinante

Como a frutalina foi isolada em uma matriz que continha galactose (galactomanana de *Adenantha pavonina* e agarose-D-galactose) se pode afirmar que a mesma tenha afinidade por galactose ou açúcares mais complexos que a contenha. Com o objetivo de se investigar com maior profundidade a especificidade da lectina foi feito um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples, complexos e glicoproteínas, frente a hemácias de coelho.

Pode-se observar na tabela II que dos açúcares testados, nenhum foi hábil para inibir a atividade hemaglutinante da frutalina. Como sabemos, na membrana das hemácias temos açúcares complexos que contêm açúcares simples. Com os resultados obtidos pode-se sugerir que o sítio lectínico da frutalina é me-

lhor complementado por um açúcar complexo que contém galactose, assim sendo um açúcar simples não é capaz de deslocar a lectina da hemácia, pela qual apresenta uma maior afinidade.

No entanto, este deslocamento foi observado quando se usou asialo-fetuína, uma glicoproteína complexa que contém resíduos de D-galactose, indicando que esta glicoproteína se liga mais fortemente a lectina que os açúcares da membrana de hemácias de coelho. PINTO, já havia mostrado que a frutalina tinha afinidade por fetuína, quando conseguiu obter uma fração altamente purificada por cromatografia de afinidade em coluna de fetuína-agarose (PINTO, 1986).

A frutapina, ao contrário da frutalina, é inibida por açúcares simples. Ela foi inibida por glicose e manose. Por outro lado, a frutaquina tem um comportamento similar ao da frutalina no que diz respeito à inibição da atividade hemaglutinante, sua atividade não foi abolida na presença de N-acetil-glucosamina (a unidade monomérica do homopolissacarídeo utilizado na sua purificação – quitina).

Tabela II. Inibição da atividade hemaglutinante da frutalina por carboidratos.

AÇÚCAR	
D(+) xilose	NHI
D(-) arabinose	NHI
D(-) frutose	NHI
L(+) rhamnose	NHI
D(-) celobiose	NHI
D(+) maltose	NHI
D(+) trealose	NHI
D(+) melezitose	NHI
rafinose.	NHI
D(-) galactose	NHI
galactosamina	NHI
D(+) lactose	NHI
D(+) glicose	NHI
ac. Glicurônico	NHI
D(-) manose	NHI
N-acetil-galactosamina	NHI

- NHI - não houve inibição

V.5. Estudos do Efeito do pH na Estrutura Quaternária da Frutalina e sua Estabilização por Açúcares Ligantes Monitoradas por Cromatografia de Exclusão Molecular

Modificações conformacionais na estrutura da frutalina em função do pH foram investigadas e monitoradas por exclusão molecular em coluna Superdex acoplada a um sistema HPLC. Uma mistura tampão preparada com glicina/acetato/fosfato/borato foi utilizada para variação de pH de 2,0 a 12,0. Os resultados obtidos na ausência e na presença de D-galactose 0,2 M e D-glucose 0,2 M podem ser observados na figura 24.

Na ausência do ligante, a lectina apresentou-se a pH 10,0 sob a forma tetramérica, com Mr de 60 kDa. O mesmo não ocorreu em valores de pH mais baixos (8,0 e 6,0), onde a lectina se apresentou com massa molecular aparente que corresponde à forma dimérica da lectina; a mesma se encontra sob a forma monomérica a pH 2,6 e 4,0. No entanto quando este experimento foi realizado na presença dos açúcares: D-glucose e D-galactose 0,2 M, um comportamento diferente foi verificado. Já a pH 2,6, na presença de D-galactose 0,2 M, observa-se uma estabilização da estrutura quaternária da frutalina, pois temos uma forma molecular que provavelmente representa o equilíbrio entre o dímero e o tetrâmero. Quando os resultados obtidos na presença ou na ausência D-glucose são comparados nenhuma diferença significativa é percebida. No entanto, em pH 4,0, é nítida a diferença do comportamento da lectina diante das três condições experimentais. Na ausência do açúcar, como já foi comentado, a lectina encontra-se na forma monomérica, na presença de D-glucose, na forma dimérica e na presença de D-galactose, assim como em pH 2,6, se verifica um equilíbrio entre as formas dimérica e tetramérica. Em valores de pH 6,0 e 8,0, na presença de D-glucose e de D-galactose a lectina apresenta-se na forma tetramérica, já na ausência de açúcar a mesma permanece na forma dimérica. A pH 10,0 a frutalina apresentou-se sob uma forma molecular com massa molecular aparente ligeiramente maior que a Mr do tetrâmero, e este comportamento foi independente da presença de açúcares.

Este fato sugere que acima de pH 10,0 a frutalina forma agregados, e assim, não foi verificada diferenças significativas nas condições experimentais empregadas.

Fica claro que a presença de açúcar contribui na estabilização da estrutura quaternária da frutalina quando esta é submetida a diferentes valores de pH, fato também evidenciado por CAMPANA e colaboradores 2002 quando efetuaram estudos de "unfolding" e "refolding" da frutalina e mostraram a necessidade da presença de D-galactose para que a lectina, após passar por um processo de desnaturação fosse renaturada. Além disso, uma importante observação que deve ser levada em consideração é o fato da frutalina, uma lectina denominada D-galactose ligante, também ligar D-glucose, um açúcar que segundo a classificação de MAKELA (1957), que leva em consideração a posição da hidroxila dos carbonos 3 e 4, pertence a outro grupo, ou seja, é um açúcar estruturalmente não relacionado com a D-galactose, e há bem pouco tempo era impossível se imaginar uma lectina que fosse capaz de se ligar a açúcares de dois grupos distintos. Neste experimento isto ficou bastante evidente. Além do mais, no decorrer deste trabalho outras evidências foram observadas, por exemplo, a necessidade da amostra estar livre de frutalina no momento da purificação da frutapina (efetuada em coluna de agarose-D-manose). Como a matriz cromatográfica é constituída de agarose, poder-se-ia cogitar a possibilidade da interação da frutalina com a galactose que constitui a agarose, mas esta possibilidade é descartada, pois a eluição do material retido é efetuada mediante a adição de uma solução D-manose, logo, se a frutalina não interagisse com D-manose, embora retida à coluna por ligar-se à galactose da matriz (agarose), ela não seria eluída pela a solução contendo D-manose. A eluição da frutalina por D-manose foi comprovada quando se fez eletroforese do material eluído da coluna de agarose-D-manose com solução de D-manose quando a amostra de partida não estava completamente livre de frutalina. Neste caso, a frutapina apresentava-se contaminado com frutalina, obtinha-se em PAGE-SDS, ao invés de uma única banda protéica (frutapina pura), três bandas protéicas (duas da frutalina e uma da frutapina), mostrando claramente a presença de frutalina no eluato da coluna de agarose-D-manose. Diante desses relatos, constata-se que a frutalina, então, não se enquadra naqueles quatro grupos estabelecidos por VAN

DAMME e colaboradores (1997). Eles dividiram as lectinas de acordo com as estruturas de suas subunidades em:

MEROLECTINAS são proteínas pequenas consistindo exclusivamente de um único domínio ligante a carboidrato. Devido à sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células.

HOLELECTINAS também são constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos. Entretanto, em contraste com as merolectinas, elas contêm dois ou mais domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou muito homólogos e ligam o mesmo açúcar ou um outro estruturalmente similar.

QUIMEROLECTINAS são basicamente proteínas de fusão compostas por um domínio ligante a carboidrato e um outro domínio não relacionado que apresenta uma atividade biológica.

SUPERLECTINAS são um tipo especial de quimerolectinas. Elas são proteínas de fusão com dois domínios ligantes a carboidratos que são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados.

Como a classificação acima não engloba a jacalina, gostaria de sugerir uma nova classe de lectinas e denominá-la de **Multilectinas** – que seria definida como **proteínas constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou muito homólogos, entretanto reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados, ou seja, são lectinas de especificidade múltipla**. A jacalina também seria integrante dessa nova classe de lectinas, inclusive já foi relatado em alguns trabalhos que a mesma é uma lectina que reconhece açúcares estruturalmente não relacionados, como é o caso de ROSA e colaboradores (1999). Eles sugerem uma explicação de como a jacalina é capaz de reconhecer açúcares estruturalmente diferentes. Segundo aqueles autores as únicas interações envolvendo cadeias laterais situadas no sítio de ligação envolvem as hidroxilas C-4 e C-6. Galactose e manose diferem na orientação da hidroxila C-4 (axial na D-gal e equatorial na D-manose), no entanto como essas duas hidroxilas são doadoras na formação da ligação de hidrogênio e os acepto-

res de prótons distribuídos em torno do C-4 permite a acomodação de ambos os epímeros.



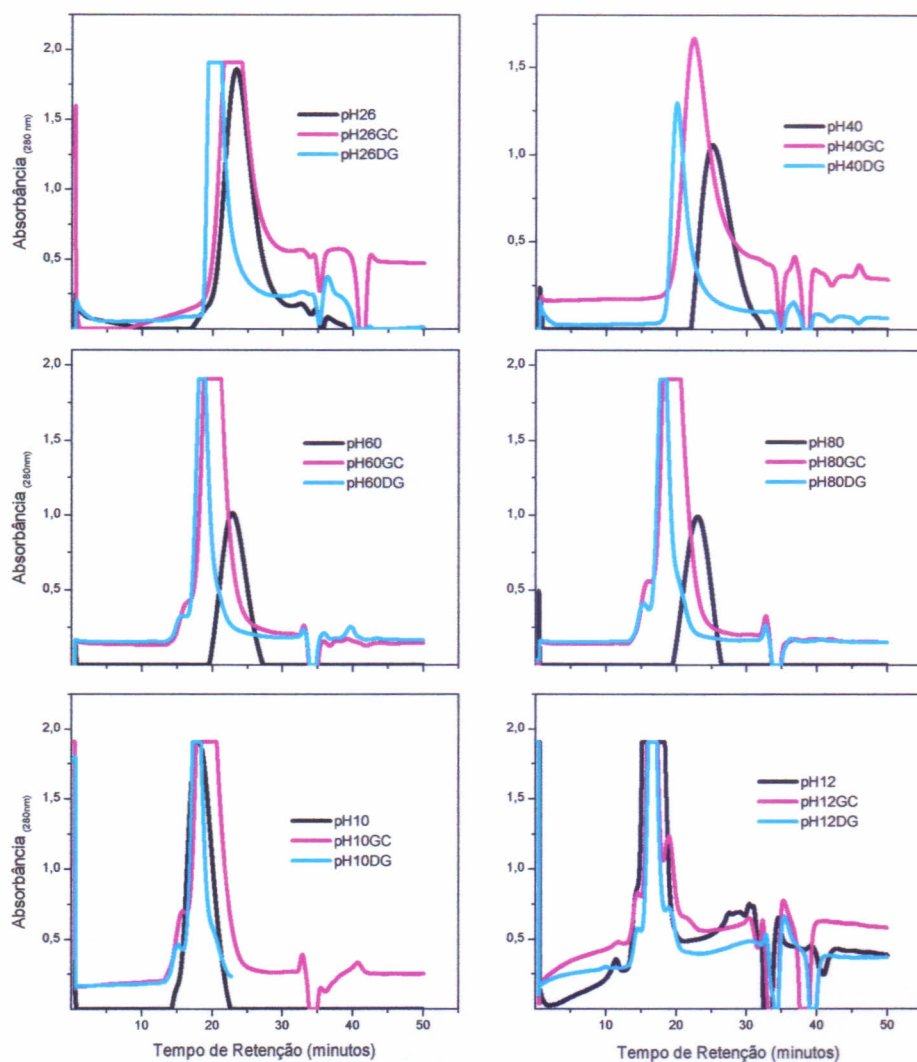


Figura 24. Cromatografia de exclusão molecular da frutalina (0,5 a 1 mg/mL) em diferentes valores de pH (2,0-12,0) em coluna Superdex 75 HR, acoplada a um sistema HPLC. A coluna foi equilibrada e eluída com o tampão misto glicina/acetato/fosfato/borato 0,01 M, contendo NaCl 0,15 M em três condições diferentes: 1 – na ausência de açúcar, 2 – na presença de D-glucose 0,2 M e 3 – na presença de D-galactose 0,2 M. A cromatografia, realizada à temperatura ambiente, foi monitorada pela leitura de absorbância a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,0 mL, com fluxo de 60 mL/h.

VI. RESUMO DOS RESULTADOS



VI. RESUMO DOS RESULTADOS

- ☛ As três lectinas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. com especificidades distintas foram eficientemente isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade. A lectina D-galactose-ligante foi isolada em coluna de galactomanana de *Adenantha pavonina*, a lectina D-manose-ligante em coluna de agarose-manose e a lectina quitina-ligante foi isolada em coluna de quitina. Estas lectinas foram denominadas de FRUTALINA, FRUTAPINA e FRUTAQUINA, respectivamente.
- ☛ A frutalina também mostrou afinidade por manose, já que ficou retida em coluna de agarose-manose, sendo eluída com uma solução de manose.
- ☛ As lectinas aglutinam hemácias de vários animais, aglutinando fortemente hemácias humanas não apresentando especificidade por qualquer antígeno do sistema ABO.
- ☛ A frutalina e a frutapina são proteínas oligoméricas, encontram-se como tetrâmeros em pH fisiológico, apresentando uma massa molecular aparente de aproximadamente 60 kDa e a frutaquina, apresenta-se como monômero, constituído de três cadeias unidas por ligações dissulfeto, com Mr em torno de 12 kDa.
- ☛ A composição de aminoácidos da frutalina e frutapina é caracterizada por um alto conteúdo de aminoácidos ácidos, hidroxilados e glicina e ausência de cisteína, enquanto a frutaquina é rica neste aminoácido, perfazendo mais de 14 % do total.

- ☞ A estrutura secundária da frutalina, frutapina e frutaquina estimada por dicromismo circular, é formada predominantemente por folhas β antiparalelas.
- ☞ As três lectinas apresentam espectros de fluorescência característicos de proteínas que apresentam triptofano no interior da estrutura protéica.
- ☞ A seqüência primária da frutalina foi determinada e comparada com outras lectinas. O alinhamento mostrou uma elevada identidade com a jacalina, acima de 90 %, e com outras lectinas jacalina relacionadas, por outro lado a frutaquina não mostrou identidade com nenhuma lectina até o momento seqüenciada.
- ☞ A estrutura quaternária da frutalina é dependente do pH do meio, sendo estabilizada por D-galactose e D-glucose, observação que corrobora com a sugestão de que a mesma é uma lectina poliespecífica, ou seja, reconhece açúcares não relacionados estruturalmente.
- ☞ Uma nova classe de lectinas é sugerida e denominada de **Multilectinas** – definida como **proteínas constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou homólogos, entretanto reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados, ou seja, são lectinas de especificidade múltipla.**

VII. CONCLUSÃO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

As peptídeos futeína e futapina são peptídeos relacionados a outras peptídeos jacalina relacionadas a proteína futaquina, não relacionados a outras peptídeos jacalina. A sequência de aminoácidos, constituída de 10 aminoácidos, é a seguinte: Metionina, Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Fenilalanina, Glicina, Serina, Alanina e Metionina.

VII. CONCLUSÕES



VII. CONCLUSÃO

As lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* pertencem a dois grupos estruturalmente distintos:

- ☞ As lectinas frutalina e frutapina, homólogas, pertencentes à família das lectinas jacalina relacionadas;
- ☞ A lectina frutaquina, não relacionada estruturalmente com nenhuma lectina já seqüenciada, constituindo uma nova família do ponto de vista estrutural.

PERSPECTIVAS

El presente informe tiene como objetivo principal analizar el estado actual de la economía nacional y proyectar sus perspectivas futuras. Se abordan temas como el crecimiento del PIB, la inflación, el desempleo y el comercio exterior. Se concluye que, a pesar de los desafíos, se proyecta un crecimiento sostenido en los próximos años, siempre que se mantenga la estabilidad macroeconómica y se continúen las reformas estructurales.

VIII. PERSPECTIVAS



VIII. PERSPECTIVAS

- ☞ Determinar a estrutura primária completa da frutapina e frutaquina;
- ☞ Comparar a estabilidade estrutural das lectinas, frente a agentes desnaturantes químicos e físicos, monitorando por métodos cromatográficos e espectroscópicos;
- ☞ Avaliar a especificidade fina das três lectinas bem como suas respectivas atividades biológicas;
- ☞ Resolver a estrutura tridimensional das três lectinas por cristalografia de raios-X ou por modelagem molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNEL, S. B. & WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified
method for the determination of the amino acid composition of
proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

CHANG, Z. M., CHANG, M. D. & AMELIN, A. (1990) Molecular cloning
and expression of the gene for the proteinase inhibitor, *trypsin*, in
transgenic mice. *Gene* 93, 1-10.

SCHULZ, G. D., HARTMAN, M. D., WILKINSON, J. Y. F. & WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

WILKINSON, J. Y. F. (1987) The use of a modified method for the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Protein Chemistry* 16, 1-10.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. (1965). Specific binding of concanavalin A to cross linked dextran gels. *Biochem J.*, 96:230.
- ALLEN, P.Z., CONNELLY, M.C. & APICELLA, M.A. (1980). Interaction of lectins with *Neisseria gonorrhoeae*. *Canadian Journal of Microbiology* 26: 468-474.
- ALTSCHUL, STEPHEN, F., MADDEN, T., SHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z. MILLER, W. & LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- AMBRUS, A., JANCOSO, G. & FISCHER, J. (1994). Tomato lectins: a new label for capsaicin-sensitive primary afferent neurons. IN VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T.C. (1994) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 3-6. Textop, Hellerup (Denmark), 374 pp.
- APPUKUTTAN, P. S., SUROLLA, A. & BACHHAWAT, B. K. (1977). Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. *Indian J. Biochem. Biophys.* 14: 382-384.
- ASHERSON, G.L., FERLUGA, J. & JANOSSY, G. (1973). *Clin. Exper. Immunol.*, 15: 573-589, citado por LIS & SHARON, 1986.
- AUCOUTURIER, P., MILHAESCO, E., MILHAESCO, C., PREUD'HOMME, J. L. (1987). Characterization of jacalin, the human IgA 1 and IgD binding lectin from jackfruit. *Molec. Immunol.* 24: 503-511.

- BARRONDES, S. H. (1988). Bifunctional properties of lectins redefined. *TIBS*, 13: (12): 480-482.
- BASU, L. A. D. & APPUKUTTAN, P. S. (1989). α -galactoside-binding isolectins from wild jack fruit seed (*Artocarpus hirsuta*): purification and properties. *Indian J. Bioche. Biophyscis*, 26: 361-366.
- BLASCO, E., NGOG, L.D., AUCOUTURIER, P. & PREUD'HOMME. J.L. (1996) Mitogenic activity of new lectins from seeds of wild *Artocarpus* species from Vietnam. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 319: 405-405.
- BOHLOOL, B. B. & SCHIMIDT, E. I. (1974). Citado por VAN DAMME, J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. (1998). *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. 452 pp.
- BLAUSCH, J. N. & PORETZ, R. D. (1977). Purification and properties of the hemagglutinin from *Maclura pomifera* seeds. *Biochemistry*, 16 (26):5790-5794.
- BONE, I.W. and BOTJER, K.P. (1985). Cuticular carbohydrates of three nematode species and chemoreception by *trichostrongylus colubiformis*. *J. Parasitol.*, 71: 235-238.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. (1954a). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119:419.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. (1954b). Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). *Blood*, 9, 1195-1198.
- BRINKMANN, U. & PASTAN, I. (1994). Immunotoxins against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198: 27-45.

- BROEKAERT, W.F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W. (1984). A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. *BiochemEMICAL JOURNAL*, 221: 163-169.
- CAMUE, B. P. A., PEETERS, B. & PEUMANS, W. J. (1986). A new lectin from tulip (*Tulipa*) bulbs. *Planta*, 169:583-588.
- CAMPANA, P.T., MORAES, D., MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. & BELTRAMINI, L.M. (2001). Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin. *European J. of Biochemistry*, 268 : 5647-5652.
- CAMPBELL, P.A., HARTMAN, A.L. & ABEL, C.A. (1982). Stimulation of B cell, but not T cells or thymocytes, by a sialic acid-specific lectin. *Immunology*, 45: 155.
- CHOWDHURY, S., AHMED, H. & CHATTERJEE, B. P. (1987). Purification and characterization of na D-Galactosyl-binding lectin *Artocarpus lakoocha* seeds. *Carbohydrate Res.* 159: 137-148.
- COLLINGE, D. B., KRAGH, K. M., MIKKELSEN, J. D., NIELSEN, K. K., RASMUSSEN, U., & VAD, K. (1993). Plant chitinases. *Plant Journal*. 3:31-40.
- CZAPLA, T. H. & LANG, B. A. (1990). Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera:Chrysomelidae). *Journal Econ. Entomol.* 83:2480-2485.
- COLE, H.B., EZZELL, J.W., KELLER, K.F. & DOYLE, R.J. (1984). Differentiation fo *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. *J. Clin. Immunol*, 19: 48-53.

- CURTIS, G.D.W. & SLACK, M.P.E. (1981). Wheat-germ agglutination of *Neisseria gonorrhoeae*. A laboratory investigation. Br. J. Vener. Dis. 57: 253-255.
- De MIRANDA-SANTOS, I.K.F., MENGEL, S. O., BUNN-MORENO, M. M. & CAMPOS-NETO, A. (1991). Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. J. Immunol. Meth. 140: 197-203.
- DÍAZ, C.L., MELCHERS, L.S., HOOYKAAS, P.J.J., LUGTENBERG, B.J.J. & KIJNE, J.W. (1989). Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Nature, 338: 579-581.
- DOYLE, R.J., NEDJAT-HAIEM, F., KELLER, K.F. & FRASCH, C.E. (1984). J. Clin. Microbiol. 19: 383-387.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chem. 28 (3): 350-356.
- EDMAN, P. (1950). Preparation of phenyl thiohydantoins from some natural amino acids. Acta Chem. Scand., 4: 277-282.
- EINSPAHR, H., PARKS, E.H., SUGUNA, K., SUBRAMANIAN, E. & SUDDATH, F.L. (1986). The crystal structure of pea lectin at 3.0-Å resolution. J. Biol. Chem., 261(35): 16518-16527.
- ELFSTRAND, M. (1898). IN R. Kbert Ed. Gorborschorfer Veroffentlichungen, 1-159, Engen, Stuttgart, citado por Gold and Balding 1975.

- ETZLER, M.E. (1986). 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. Academic Press, Inc. 600 pp.
- FASMAN, G.D.(1996). Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules. Plenum Press, New York, 738 pp.
- FISCHER, J., FAKLA, I., JOUBERT-CARON, R. & CARON, M. (1994). Lactoseries of glycoproteins as extracellular matrix components between some neurons and their glial envelope IN VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T.C. (1994) Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, 7-12. Textop, Hellerup (Denmark), 374 pp.
- FISCHER, J., KLEIN, P.J., VIERBUCHEN, M., SKUTTA, B., UHLENBRUCK, G. & FISCHER, R. (1984). Chrarakterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. I. Histochemical distribution of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastric neoplasms. J. Histochem. Cytochem., 32: 681-689.
- FITCHES, E.; WOODHOUSE, S.D.; EDWARDS, J.P. & GATEHOUSE, J.A. (2001). In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jackbean (*Canavalia ensiformis*; Con A) lectins within tomato moth (*Lacanobia olercea*) larvae; macahanisms of insecticidal action. Journal of Insect Physiology. 47:777-787.
- FREEMAN, H.J. (1983). Lectin histochemistry of 1,2 - dimethylhydrazine-induced rat colon neolpasis. J. Histochem. Cytochem., 31: 1241-1245.
- FRIEDMAN, M., KRULL, L. H., CAVINS, J. F. (1970). The chromatographic determination of cysteine and cysteine residues in proteins as s-beta-(4-pyridylethyl)cysteine. J. Biol. Chem., 245:3868-3871. Citado por OLIVA, M. L.

- V., SOUZA-PINTO, J. C., BATISTA, I. F. C., ARAUJO, M. A., SILVEITA, V. F., AUERSWALD, E. A., MENTELE, R., ECKERSKORN, C., SAMPAIO, M. U. & SDAMPAIO, C. A. M. (2000). *Biochimica et Biophysica Acta* 1477:64-74.
- FUGITA, Y., OISHI, K., SUZUKI, K. & IMA HORI, K. (1975). Purification and Properties of an Anti-B Hemagglutinin Produced by *Streptomyces* sp. *Biochemistry*. 14: (20) 4465-4470.
- GIOANNINI, T., FOUCAUD, B., MILLER, J.M., HATTEN, M.E. & SIMON, E.J. (1982). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105: 1128-1134.
- GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. (1986). Isolation and properties of lectins IN LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. eds. *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Academic Press, London.
- GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. (1986). Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J., eds.: *The Lectins: Properties, Functions, And Applications In Biology And Medicine*. Academic Press, Inc. 600 pp.
- GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. & SHARON, N. (1980). What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
- HABIBI, J., BACKUS, E. A. & CZAPLA, T. H. (1993). Plant lectins affect survival of the potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). *Journal Econ. Entomol.* 86: 945-951.
- HEDO, J.A., HARRISON, L.C., and ROTH, J. (1981). *Biochemistry*, 20, 3385-3393.

- HELM, R.M., & FROESE, A. (1981). *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 65: 3385-3393.
- JONES, J. M., CAWLEY, L. P. & TERESA, G. W. (1967). Hemagglutinins (lectins) extracted from *Maclura pomifera*. *Vox Sang.* 12: 211-214.
- KABIR, S., AEBERSOLD, R. & DAAR, A. S. (1993). Identification of a novel 4 kDa immunoglobulin-A-binding peptide obtained by the limited proteolysis of jacalin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1161: 194-200.
- KABIR, S. & DAAR, A. S. (1994). Composition and properties of jacalin, a lectin of diverse applications obtained from the jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. *Immunological Investigations.* 23: 167-188.
- KAMEMURA, K. & KATO, S. (1998). Detection of lectins using ligand blotting and polyacrylamide-type glycoconjugate probes. *Analytical Biochemistry.* 258: 305-310.
- KELLA, N.K.D., ROBERTS, D.D., SHAFER, J.A. & GOLDSTEIN, I.J. (1984). Fluorescence energy transfer studies on lima bean lectin. Distance between the subunit hydrophobic binding site and the thiol group essential for carbohydrate binding. *J. Biol. Chem.*, 259(8): 4777-4781.
- KENNEDY, J. F., PALVA, P. M. G., CORELLA, M. T. S., CALVACANTI, M. S. M. & COELHO, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate polymers.* 26: 219-230.
- KILPATRICK, D. C. (1980). Isolation of a lectin from the pericarp of potato (*Solanum tuberosum*) fruits. *Biochemical Journal.* 191: 273-275.

- KNIBBS, R., GOLDSTEIN, I. J., RATCLIFF, R. M. & SHIBUYA, N. (1991). Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from *Maackia amurensis*. *Journal of Biological Chemistry*, 266: 83-88.
- KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. (1981). Defining a lectin, *Nature*, 290: 188.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LERNER, D.R. & RAIKHEL, N.V. (1992). The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase. *J. Biol. Chem.*, 267(16): 11085-11091.
- LIM, S. B., CHUA, C. T. & HASHIM, O. H. (1997). Isolation of mannose-binding and IgE- and IgM-reactive lectin from the seeds of *Artocarpus integer*. *Journal of Immunological Methods*, 209: 177-186.
- LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. *The Lectins: Properties, Functions And Applications In Biology And Medicine*, 600 pp., Academic Press Inc., New York, 1986.
- LIPSICK, J.S., BEYER, E.C., BARONDES, S.H., & KAPLAN, N.O. (1980). Lectins from chicken tissues are mitogenic for Thy-1 negative murine spleen cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 97: 56-61.
- LIS, H. & SHARON, N. (1981). Lectins in higher plants. in MARCUS, A. ed. *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. Protein and Nucleic Acids*. Academic Press, vol 6, 371-447, New York.

- LIS, H. & SHARON, N. (1986a). Application of lectins IN Liener, I.E., Sharon N. and Goldstein, I.J. The Lectins: properties, fuctions, and applications in biology and medicine. Academic Press Inc. New York.
- LIS, H. & SHARON, N. (1986b). Lectins as molecules and as tools. Ann. Rev. Biochem., 55: 35-67.
- MAKELA, O. (1957). Studies in hemagglutinins of *Leguminosae* seeds. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn., 35(Suppl. 11): 1-156.
- MARBAN-MENDOZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSSEON, H.-B., DAMON JR., R.A. & ZUCKERMAN, B.M. (1987). Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. J. Nematol. 19: 331.335.
- MIRANDA-SANTOS, I.K., DELGADO, M., BONINI, P.V., BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. (1991). A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological acivities. Immunological Letters, 31, 65-72.
- MONTEIRO, A.C.O., BELTRAMINI, L.M., SILVA, F.M.B., CARLOS, E.R.C. & MOREIRA, R.A. Isolation of a mannose-binding lectin from seeds of *Artocarpus incisa* L. Simpósio Internacional em Bioquímica de Macromoléculas e Biotecnologua. UFPE, Recife, 26-28 de novembro de 1997.
- MOREIRA, R. A. & AINOUZ, I. L. (1978). Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. Plant Physiology, livro de resumos p 118.
- MOREIRA, R. A. & AINOUZ, I. L. (1981). Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. Biologia Plantarum, 23 (3): 186-192.

- MOREIRA, R. A. & PERRONE, J. C. (1976). Thermal stability of LcPA, a lectina isolated from *Phaseolus vulgaris*, L. cv rico 23. *Plant Physiology*, 57.
- MOREIRA, R. A. & OLIVEIRA, J. T. A. (1983a). Lectins from the Genus *Artocarpus*. *Biologia Plantarum*, 25 (5): 343-348.
- MOREIRA, R. A. & OLIVEIRA, J. T. A. (1983b). Comparative studies of seed proteins of the Genus *Artocarpus* with respect to lectin. *Biologia Plantarum*, 25 (5): 336-342.
- MOREIRA, R. A. (1977) Purification of a lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia* L.) seeds. *Plant Physiology*, livro de resumos p 68.
- MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.), isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, 26(2): 113-120.
- MOREIRA, R.A. & PERRONE, J.C. (1977). Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* 59: 783-787.
- MOREIRA, R.A., AINOUS, I.L., OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86(Suppl. II): 211-218.
- MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C. & PUSZTAI, A. (1983c). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). *Planta*, 158: 63-69.
- MOREIRA, R.A., CASTELO-BRANCO, C.C., MONTEIRO, A.C.O., TAVARES, R.O., BELTRMINI, L.M. (1998). Isolation and characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*, 46(1): 139-144.

- MOURÃO, R. H. V., XAVIER FILHO, J., ALVES, E. W., ORELLANO, E. G., MELO, D. F., ARAGÃO, M. E. F., LIMA, M. G. S. & PROUVOST-DANON, A. (1999). Isolation and partial characterization of Heterophyllin, a new lectin from *Artocarpus heterophyllus* seeds. *Acta Farm. Bonaerense*, 18 (1):41-47.
- MURDOCK, L. L., HUESING, J. E., NIELSEN, S. S., PRATT, R. C. & SHADE, R. E. (1990). Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry*, 29: 85-89.
- NEOGRADY, S., GALFI, P., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. (1994). Lectin-binding and characterization of rumen epithelial cells. IN VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T.C. (1994) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 58-65. Textop, Hellerup (Denmark), 374 pp.
- NICHOLSON, G.L. (1974). The interactions of lectins with animal cell surfaces. *Int. Rev. Cytol.*, 39: 89-190.
- OLIVEIRA, J.T.A. (1980). Estudo comparativo das lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero *Artocarpus*. Dissertação de Mestrado, Fortaleza (CE), Brasil.
- OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. & MOREIRA, R.A. (1991). Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. *Rev. Bras. Bot.*, 14: 61-66.
- PASTAN, I., CHAUDHARY, V., FITZGERRALD, F. J. (1992). Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *A. Ver. Biochem.* 61: 331-354.

- PERCZEL, A., HOLLÓSI, M., TUSNÁDY, G. & FASMAN, G. D. (1991). Convex Constraint Analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Engineering*, 4 (6): 669-679.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. (1995a). Lectin as plant defence proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. (1995b). The role of lectins in plant defence. *Histochemical Journal*, 27: 253-271.
- PEUMANS, W.J., HAUSE, B. & VAN DAMME, E.J.M. (2000). The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Letters*, 477: 186-192.
- PEUMANS, W.J., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & BROEKAERT, W.F. (1985). Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizomes. *Planta*, 164: 75-82.
- PINEAU, N., AUCOUTURIER, P., BRUGIER, J. C. & PREUD'HOMME, J. L. (1990a). Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 80: 420-425.
- PINEAU, N., POUSSET, J. L., PREUD'HOMME, J. L., AUCOUTURIER, P. (1990b). Structural and functional similarities of breadfruit seed lectin and jacalin. *Mol. Immunol.* 27: 237-240.
- PINTO, F.S.C. (1987). Isolamento e caracterização das lectinas de sementes de *Artocarpus incisa* L. var. seminífera. Dissertação de Mestrado, Fortaleza (CE), Brasil.

- QUIOCHO, F. A. (1986). A. Ver. Biochem., 55: 287-315. Citado por Kennedy, 1995.
- RAPIN, A.M.C. & BURGER, M.M. (1974). Tumor cell surfaces: general alterations detected by agglutinins. Adv. Cancer Res., 20: 1-78, 1974.
- ROBERTS, D. D., ARJUNAN, P., TOWNSEND, L.B., GOLDDTEIN, I. J. (1986). Specificity of adenine binding to lima bean lectin. Phytochemistry, 25(3): 589-593.
- ROBERTS, D.D. & GOLDSTEIN, I.J. (1983). Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). J. Biol. Chem., 258(22): 13820-13824.
- ROQUE-BARREIRA, M. C., CAMPOS-NETO, A.(1985). Jacalin, an IgA-binding lectin. J. Immunol. 134: 1740-3.
- ROQUE-BARREIRA, M.C., PRAZ, F., HALBWACHS-MACARELLI, L., GREENE, L.J. & CAMPOS-NETO, A. (1986). IgA affinity purification and characterization of the lectin jacalin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 19: 149-157.
- ROSA, J. C., OLIVEIRA, P. S. L., GARRATT, R., BELTRAMINI, L., RESING, K., ROQUE-BARREIRA, M. C., GREENE, L. J. (1999). Proteein Science, 8: 13-24.
- RUSSEL, C.S., RODRIGUES, J. & LAI, P.S. (1983). Hemagglutinin activity in Ne-reis coelmic fluid. Comp. Biochem, Physiol. 75A: 57.
- SANCHEZ. L., MASSO, F., PAEZ, A., ORTIZ, R., VAZQUEZ, L., MONTANPO, L.F. & ZENTENO, E. (1994). Glycoconjugates from *mycobacterium tuberculosis*. IN VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOG-

- HANSEN, T.C. (1994) Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, 94-98. Textop, Hellerup (Denmark), 374 pp.
- SANKARANARAYANAN, R., SEKAR, K., BANERJEE, R., SHARMA, V., SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. (1996). A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold. *Nature Structural Biology*, 3(7): 596-603.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., DIAS-BARUFFI, M., THOMAZ, S.M.O., BELTRAMINI, L.M. & ROQUE-BARREIRA, M.C. (1994). A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *The Journal of Immunology*, 153: 1798-1807.
- SARKAR, M., WU, A. M. & KABAT, E. A. (1981). Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. *Arch. Biochem. Biophys.* 209: 204-218.
- SASTRY, M. V. K., BARNAJIE, P., PATANJALI, S. R., SWAMY, M. J., SWARNALATHA, G. V. & SUROLIA, A. (1986). Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (β -D-Gal(1-3) D-GalNAc). *J. Biol. Chem.*, 261: 11726-33.
- SCHAEFER, R.L., KELLER, K.F. & DOYLE, R.J. (1979). Lectins in diagnostic microbiology: use of wheat germ agglutination for laboratory identification of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 10: 669-672.
- SHARON N. & LIS, H. (1987). A century of lectin research (1888-1988). *TIBS* 12: 488-491.
- SHARON, N. & LIS, H. (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 4: 3198-3207.

- SHIBUYA, N., GOLDSTEIN, I. J., BROEKAERT, W. F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W. J. (1987). The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α 2-6)Gal/GalNAc sequence. *Journal Biol. Chem.*, 262: 1596-1601.
- SHIBUYA, N., GOLDSTEIN, I. J., VAN DAMME, E. J. M. & PEUMANS, W. J. (1988). Binding properties of a mannose-specific lectin from the snow-drop (*Galanthus nivalis*) bulb. *Journal Biol. Chem.*, 263: 728-734.
- SHIRAKAWA, O., KUNO, T., & TANAKA, E. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 115: 814-819.
- SILVA-LUCCA, R.A. (1999). Estudos estruturais e termodinâmicos da lectina ligante de D-manose, KM^+ , por métodos espectroscópicos. Tese de Doutorado, Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 129 pp.
- SPACKMAN, D. H., STEIN, N. H. & MOORE, E. S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30: 1190-1198.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (1993) . A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.*, 209: 32-44.
- SREERAMA, N. & WOODY, R. W. (1994). Poly(Pro)II helices in globular proteins: identification and circular dichroic analysis. *Biochemistry*, 33: 10022-25.

- STILLMARK, H. (1888). Uber Rizin, ein Giftiges Ferment aus Samen von Ricinus Communis L., und Einigen Anderen Euphorbiaceen. Tese de doutorado, Universidade de Dorpad, Dorpad (Tartu), Citado por Liener (1986).
- TAKAHASHI, T., FUNATSU, G. AND FUNATSU, M. (1962). Biochemical studies on castor bean hemagglutinin II. hemagglutinin separated from crystalline ricin and its molecular weight. J. Biochem. (Tokyo) 52: 50-53, citado por Koucourek 1986.
- TAVARES, R.O.(1994). Utilização da goma de *Adenantha pavonina* L. como matriz para cromatografia de afinidade de lectinas. Monografia de Graduação, 49 pp.
- TAVARES, R.O.(1998). Galactomanana de *Adenantha pavonina* L.: Aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas. Dissertação de Mestrado, Fortaleza (CE), Brasil, 85 pp.
- TSIVIAN, Y. & SHARON, N. (1981). Lipid-mediated hamagglutination and its relevance to lectin-mediated agglutination. Biochem. Biophys. Acta, 642: 336-344.
- ULEVITCH, R.J., JONES, J.M. & FELDMAN, J.D. (1974). Isolation and chracterization of *Maclura pomifera* (MP) lectin. Preparative Bicohemistry, 4(3): 273-281.
- VAN DAMME, E.J.M., GOLDSTEIN, I.J., VERCAMMEN, G., VUYLSTEKE, J. & PEUMANS, W.J. (1992). Lectins of members of the *Amaryllidaceae* are encoded by multigene families which show extensive homology. Physiologia Plantarum, 86: 245-252.

- VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN DAMME, F., GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. (1996a). Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *European Journal of Biochemistry*, 236: 419-427.
- VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., VERHAERT, P., ROUGÉ, P. & PEUMANS, W. J. (1996b). Molecular cloning of mitogenic mannose/maltose specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. *FEBS Lett.*, 397: 352-356.
- VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F. & PEUMANS, W. J. (1995). The seed lectins of black locust (*Robinia pseudoacacia*) are encoded by genes which differ from the bark lectin genes. *Plant Molecular Biology*, 29: 1197-1210.
- VAN DAMME, J. M., PEUMANS, W. J., PUSZTAI, A. & BARDOCZ, S. (1998a). Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. 452 pp.
- VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. (1998b). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 17(6): 575-692.
- VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., MAZARD, A-M., VERHAERT, P., HORMAN, A., DEBRAY, H., ROUGÉ, P. & PEUMANS, W. J. (1999). Characterization and molecular cloning of lectin from *Helianthus tuberosus*. *Eur. J. Biochem.*, 259: 135-142.
- VAN DAMME, E. J. M. & PEUMANS, W. J. (1990). Developmental changes and tissue distribution of lectin in *Galanthus nivalis* L. and *Narcissus* cv. Carlton. *Planta*, 182: 605-609.

- VIJAYAKUMAR, T., REMANI, P., ANGUSTINE, J., BHATTATHIRI, V.N., SHANAVAS, K.R. & ANKATHIL, R. (1993). Lectins as histochemical markers for the early detection of solid tumors. IN BASU, J., KUNDU, M. & CHAKRABARTI (1993) Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, 161-171. Wiley Eastern Limited, New Delhi, 192 pp.
- WATANABE, M., MURAMATSU, T., SHIRAME, H. & UGAI, K. (1981). Discrete distribution of binding sites for *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA) and for peanut agglutinin (PNA) in mouse organ tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 779-790.
- WONGKHAM, S., WONGKHAM, C., BOONSIRI, P., SIMASATHIANSOPHON, S., TRISONTHIS, C. & ATISOOK, K. (1995). Isolectins from seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Phytochemistry*, 40(5): 1331-1334.
- YAJKO, D.C., CHU, A., & HADLEY, W.K. (1984). *J. Clin. Microbiol.* 19: 380-382.
- YANG, H. & CZAPLA, T. H. (1993). Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. *Journal of Biological Chemistry*, 268:5905-5910.
- YOUNG, N.M., JOHNSTON, R.A.Z. & WATSON, D.C. (1991). The amino acid sequences of jacalin and the *Maclura pomifera* agglutinin. *FEBS Letters*, 282(2): 382-384.
- YOUNG, N.M., JOHNSTON, R.A.Z., SZABO, A.G. & WATSON, D.C. (1989). Homology of the D-galactose-specific lectins from *Artocarpus integrifolia* and *Maclura pomifera* and the role of an unusual small polypeptide subunit. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 270(2): 596-603.

- ZHANG, W., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ASTOUL, C. H., ROVIRA, P., ROUGÉ, P., PROOST, P., TRUFFA-BACHI, P., JALALI, A. A. H. & VAN DAMME, E. J. M. (2000). Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Planta*, 210: 970-978.
- ZIESKE, J.D. & BERNSTEIN, I.A. (1982). Modification of cell surface glycoprotein: addition of fucosyl residues during epidermal differentiation. *J. Cell. Biol.*, 95: 626-631.
- ZISKA, P., KINDT, A., PFULLER, K. & FRANZ, H. (1990). The lectin from *Loranthus europaeus*: purification and characterization. In: BOG-HANSEN, T.C. ed.: *Lectins. Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Walter de Gruyter. Berlin/New York. pp. 41-44.
- ZSCHAEBITZ, A., SCHMIDT, W., GABIUS, H., KHAW, A. & STOFFT, E. (1994) Modification in lectin-binding patterns during development of the human lung. Glycoconjugates from *mycobacterium tuberculosis*. IN VAN DRIESSCHE, E., FISCHER, J., BEECKMANS, S. & BOG-HANSEN, T.C. (1994) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 94-98. Textop, Hellerup (Denmark), 374 pp.

X. ANEXOS



Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin

Patrícia T. Campana¹, Derminda I. Moraes¹, Ana C. O. Monteiro-Moreira^{1,2} and Leila M. Beltramini¹

¹Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil; ²Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

Protein refolding is currently a fundamental problem in biophysics and molecular biology. We have studied the refolding process of frutalin, a tetrameric lectin that presents structural homology with jacalin but shows a more marked biological activity. The initial state in our refolding puzzle was that proteins were unfolded after thermal denaturation or denaturation induced by guanidine hydrochloride, and under both conditions, frutalin was refolded. The denaturation curves, measured by fluorescence emission, gave values of conformational stability of 17.12 kJ·mol⁻¹ and 12.34 kJ·mol⁻¹, in the presence and absence of D-galactose, respectively. Native, unfolded, refolded frutalin and a distinct molecular form denoted misfolded, were separated by size-exclusion chromatography (SEC) on Superdex 75.

The native and unfolded samples together with the fractions separated by SEC were also analyzed for hemagglutination activity by CD and fluorescence spectroscopy. The secondary structure content of refolded frutalin estimated from the CD spectra was found to be close to that of the native molecule. All the results obtained confirmed the successful refolding of the protein and suggested a nucleation-condensation mechanism, whereby the sugar-binding site acts as a nucleus to initiate the refolding process. The refolded monomers, after adopting their native three-dimensional structures, spontaneously assemble to form tetramers.

Keywords: *Artocarpus incisa* lectin; frutalin; lectin refolding; lectin unfolding; protein refolding.

Our current understanding of the protein folding mechanism is the result of intense studies using both theoretical and experimental biophysical methods. This complex problem concerning the mechanism by which proteins adopt one specific fold among those possible, has been experimentally investigated recently [1–3]. Understanding this mechanism would provide a powerful tool for drug design and for comprehension of cellular organization at the molecular level. The fact that proteins with different sequences adopt the same fold suggests that the number of folding pathways is limited, probably, to a few hundred [4]. The β sheet class of proteins has been poorly represented in folding studies [5], even though this is critical for a complete understanding of the formation of the β sheet that differs from the folding properties of helical and mixed α/β

proteins. In recent years, the participation of abnormal β sheet structures in Alzheimer's, Huntington's and prion diseases has been demonstrated [6]. On the other hand, this class of β sheet proteins contains families whose members show high structural homology and sequential identity, although with different levels of specificity and affinity for ligands [7,8]. Some of these β sheet proteins are the lectins, a particular carbohydrate-binding protein class widely distributed in all life forms that can mediate several biological events such as the recognition of molecules present in membranes or in the extracellular matrix [9].

We have described and studied structural aspects of some members of this protein class, particularly from *Moraceae* plants [10–13]. These studies showed that KM+, a D-mannose-binding lectin homologous to jacalin [14], appears to have a very rigid structure, stable up to 55 °C for 4 h, and at high values of pH, with the presence of chaotropic agents. The thermal denaturation process of KM+ was consistent with an irreversible two-state model with first order kinetics ($N \rightarrow D$), where N represents native and D denatured forms [12]. In the present study we show refolding results for frutalin, a D-galactose-binding lectin, that shows structural homology with jacalin [14]. Like jacalin, frutalin binds D-glucose and D-mannose in addition to D-galactose [13], but has higher hemagglutination activity than jacalin. This lectin is a tetrameric molecule consisting of four monomers bound by noncovalent linkages, with an apparent molecular mass of 66 kDa, has a predominantly β sheet conformation and contains four binding sites for D-galactose [11]. Besides having hemagglutination properties, frutalin also activates natural killer cells *in vitro* and leukocyte migration *in vivo* and is a potent lymphocyte stimulator (Moreira, R.A., Beltramini, L.M., Barja-Fidalgo, A.C. unpublished results). Frutalin refolding

Correspondence to L. M. Beltramini, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, av. Trabalhador Saocarlenso, 400 CEP:13566–590, São Carlos-SP, Brasil. Caixa Postal: 369 (CEP 13560–970) Fax: + 55 16 2715381, E-mail: leila@if.sc.usp.br
Abbreviations: SEC, size exclusion chromatography; GndHCl, guanidine hydrochloride; Th, thermal; Ch, chemical; Ufrutalin-Th, unfolded form of frutalin under thermal conditions; Ufrutalin-Ch, unfolded form of frutalin under chemical conditions; Rfrutalin-Th, refolded form of frutalin under thermal conditions; Rfrutalin-Ch, refolded form of frutalin under chemical conditions; Mfrutalin, misfolded frutalin form; Gal, galactose; Glu, glucose; Xyl, xylose; CCA, convex constraint analysis

Publisher's note: this paper was originally published as *Eur. J. Biochem.* 268, 5647–5652. There were a number of errors in the article and it is reprinted correctly here; the publisher apologizes for these errors. (Received 2 July 2001, revised 4 September 2001, accepted 7 September 2001)

was obtained after denaturation with guanidine hydrochloride (GdnHCl) and with heat, but only in the presence of sugar binding. The results were compatible with the nucleation-condensation model [15,16], whereby the sugar-binding site acts as a nucleus for the initiation of the process at the monomer level. The refolded monomers, after adopting their native three-dimensional structures, spontaneously assemble to form tetramers, suggesting a cooperative mechanism.

MATERIALS AND METHODS

Frutalin purification and heamagglutination activity

Frutalin purification was performed as described by Moreira *et al.* [11]. Briefly, dried seeds from *A. incisa* were ground and stirred for 6 h in 0.15 M phosphate buffer solution (NaCl/P_i), pH 7.4, 1 : 10 w/v, at 4 °C. The mixture was centrifuged for 20 min at 2702 *g* at 4 °C. The supernatant was submitted to ultrafiltration through a YM10 membrane (Diaflo, Amicon) to half its original volume and this solution was called crude extract. Frutalin was purified on a Sepharose-D-galactose column eluted with 0.2 M NaCl/P_i/D-galactose and protein concentration was determined by the method of Bradford [17].

Hemagglutination activity was measured on microagglutination plates using a 2% suspension of human erythrocytes (O group), with an initial protein concentration of 0.1 mg·mL⁻¹. The extent of agglutination of a series of 1 : 2 dilutions was monitored visually after leaving microplates at room temperature for 30 min. The activity was expressed as the minimum amount of protein still promoting a visible agglutination.

Frutalin denaturation and refolding

The native form of frutalin in 0.1 M NaCl/P_i/D-galactose (0.18 mg·mL⁻¹) was submitted to two different denaturing conditions, thermal (Th) and chemical (Ch). Under the Th conditions, frutalin samples were incubated at 60 °C for 40 min and then frozen at -18 °C for up to 15 days. Incubation was carried out in a calibrated water bath with individual samples containing 1 mL of the solution. The unfolded form from this condition was denoted Ufrutalin-Th.

In the Ch condition, solutions containing 0.09 mg·mL⁻¹ of frutalin was incubated for 12 h at 20 °C in NaCl/P_i, as well as in NaCl/P_i/D-galactose, with several concentrations of GdnHCl. The concentrations of the denaturant were: 0.5, 1.0, 1.5, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.5 and 6.0 M for both cases, in the presence and the absence of D-galactose. The experiments were carried out in duplicate. Although the unfolding curves were determined up to 6 M GdnHCl, a concentration of 4 M GdnHCl was enough to promote the unfolding. Hence, for a preparative denaturation, the samples were incubated at room temperature (22 °C) in 4 M GdnHCl/0.1 M NaCl/P_i/D-galactose for 12 h. The CD and fluorescence spectra and heamagglutination activity were used to monitor the denaturing processes. The unfolded frutalin samples used in the Ch experiments were denoted Ufrutalin-Ch.

The frutalin from the Th process, after being frozen for 15 days, was thawed and concentrated threefold in Centriprep 3

with 0.1 M NaCl/P_i/D-galactose, and the CD and fluorescence spectra were measured. After this treatment, the sample was frozen at -18 °C for 8 days. After this second freezing period, the sample was again diluted threefold and concentrated in 0.1 M NaCl/P_i/D-galactose and the CD and fluorescence spectra were measured. The dilutions between these concentration processes were performed to avoid protein aggregation. This sample was denoted refolded frutalin form, Th process (Rfrutalin-Th).

The same procedure was carried out under three additional conditions: with NaCl/P_i but without D-galactose (called NaCl/P_i); using 0.1 M NaCl/P_i/D-glucose instead of D-galactose (called NaCl/P_i/D-Glu); and 0.1 M NaCl/P_i/xylose, which is not a frutalin sugar binding (called NaCl/P_i/Xyl).

The unfolded frutalin from the Ch process (Ufrutalin-Ch) was refolded using two strategies, dilution and direct dialysis. In the dilution method the Ufrutalin sample (containing 4 M GdnHCl, 0.1 M NaCl/P_i/D-Gal) was concentrated in Centriprep 3 (Amicon Corp.) to half the initial volume. The solution was again diluted in 2 M GdnHCl, 0.1 M NaCl/P_i/D-galactose and incubated at room temperature for 1 h. After another dialfiltration step, as described above, the spectroscopic measurements were made.

This process was repeated always using half the concentration of GdnHCl with 0.1 M NaCl/P_i/D-galactose until 0.05 M GdnHCl was reached. In the dialysis method, the Ufrutalin sample was dialyzed using NaCl/P_i/D-galactose for 12 h with six changes of the NaCl/P_i/solution. After this process, the sample was concentrated in Centriprep 3 to half the initial volume. These samples were denoted refolded frutalin form Ch (Rfrutalin-Ch).

Circular dichroism (CD) measurements

The CD spectra were recorded using a Jasco J-720 spectropolarimeter at the wavelength range of 195–240 nm. Measurements were made on all frutalin forms (native, unfolded and refolded forms), and in all steps described above. Sample protein concentration was in the 0.15–0.18 mg·mL⁻¹ range, using quartz cuvettes of 1-mm path length. Spectra were typically recorded as an average of eight or 16 scans. CD spectra were measured in NaCl/P_i, pH 7.4 (for the refolded forms), 0.1 M NaCl/P_i/D-galactose (for the native and thermal unfolded forms) and 0.1 M NaCl/P_i/GdnHCl-D-galactose (for the chemically denatured forms). CD spectra were obtained in millidegrees and converted to molar ellipticity [18] prior to secondary structure analysis. Analysis of the CD spectra in terms of the secondary structure content was performed using the convex constraint analysis (CCA) based on the simplex algorithm. We used spectra of 25 proteins from a program used as a standard for deducing the spectral contribution of secondary structures [19,20]. The spectra from Ch were stopped at 210 nm because of GdnHCl absorbance.

Fluorescence measurements

Fluorescence measurements were performed at 25 °C using a PerkinElmer LS50B spectrofluorometer. The same samples used for the CD experiments were also subjected to fluorescence measurements, but were first diluted to concentrations of 0.05–0.07 mg·mL⁻¹, so that the absorbance

at 280 nm was always less than 0.1. The samples were excited at 280 nm and the fluorescence emission was monitored in the 290–450 nm range. Quartz cuvettes (1 cm path length) with a 1.0 mL volume were used in the measurements.

For the GndHCl-induced equilibrium unfolding transition curves all spectra were measured with an ISS K2 spectrofluorimeter (ISS, Fluorescence, Analytical and Biomedical Instrumentation-Illinois, USA) in the steady state mode. The samples were excited at 290 nm and the fluorescence emission was monitored in the 305–450 nm range. Quartz cuvettes (1-cm path length) with a 1.0-mL volume were used as well. To avoid the GndHCl influence, the spectrum of each buffer was subtracted.

Size exclusion chromatography (SEC)

Native, denatured and refolding samples from the Ch experiments were diluted in NaCl/P_i, pH 7.4, at 1 mg·mL⁻¹ and filtered by SEC on a Superdex 75 HR 10/30 column using an Äkta explorer-10 apparatus (Pharmacia LKB Biotechnology). The column was equilibrated and eluted with NaCl/P_i, pH 7.4, containing or not 0.1 M D-galactose and 0.1 M D-mannose at 22 °C. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, monitored by absorbance at 280 nm, and the eluate was collected in 0.5 mL fractions. Standard sample proteins (BSA, carbonic anhydrase and cytochrome *c*) were used for column calibration.

Analysis of equilibrium unfolding

The GndHCl-induced equilibrium unfolding transition curves for frutalin, measured by fluorescence spectroscopy, were analyzed assuming that this is a reversible two state process [21]:



where N and U represent the native and reversibly unfolded forms of the frutalin and k_N and k_U , the equilibrium constants of the unfolding transitions from the N to the U state. The fraction of unfolded frutalin, f_U , is calculated from the relationship:

$$f_N + f_U = 1 \quad (2)$$

The observed maximum fluorescence emission of the protein at any concentration of the denaturant is given by the sum of the contributions by the two states as

$$\alpha_{(obs)} = \alpha_N f_N + \alpha_U f_U \quad (3)$$

where α_N and α_U are the maximum fluorescence emission of the native and unfolded states, respectively. The f_N and f_U terms are related to the equilibrium, k_N and k_U to the unfolding transitions from N to U, and hence are related to the free energy of the unfolded form. Thus:

$$f_U = (\alpha - \alpha_N) / (\alpha_U - \alpha_N) \quad (4)$$

$$f_N = (\alpha_U - \alpha) / (\alpha_U - \alpha_N) \quad (5)$$

from Eqns (4) and (5), the free energy can be estimated as

$$\Delta G_U = -RT \ln[(f_U)/(f_N)] \quad (6)$$

where R and T are the gas constant and the absolute temperature, respectively.

In order to estimate the conformational stability ($\Delta G_U^{H_2O}$) of frutalin, it was assumed that the linear dependence of the free energy of unfolding with the concentration of the denaturant continued to zero concentration. Hence, a least-squares analysis is used to fit the data to this equation:

$$\Delta G_U = \Delta G_U^{H_2O} - m[\text{GndHCl}] \quad (7)$$

where m is a measure of the dependence of ΔG on the GndHCl concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

The Th and Ch unfolding experiments that are described in Materials and methods were efficient enough to obtain the unfolded frutalin (Ufrutalin) form. The efficiency of both procedures was confirmed by the loss of heamagglutination activity, CD and fluorescence spectrum shapes. Rfrutalin-Th was obtained only when the refolding process was promoted in NaCl/P_i/D-galactose and NaCl/P_i/D-Glu, as described in Materials and methods, but the yield was very low (< 5%) in both situations. The frutalin refolding form was not obtained when the experiment was carried out with NaCl/P_i/xylose (a sugar that is not bound by frutalin). This nonbinding sugar was used to show that the viscosity of the sugar in solution did not interfere with the refolding process. In addition, the lectin molecules with residual structure are not present in the unfolded sample, as only binding sugars (D-galactose and D-Glu) improve this process, as shown in Fig. 2 and as discussed later.

Figure 1 shows the GndHCl-induced equilibrium unfolding curves of frutalin in the absence (Fig. 1, open circles) and in the presence (Fig. 1, solid diamonds) of D-galactose, measured by maximum fluorescence emission. The absolute difference between the duplicated points was below 1%. The transition curve of frutalin with sugar binding shown in Fig. 1 (solid diamonds) indicates the presence of one transition occurring above 1.5 M GndHCl. Although the transition curve of frutalin without this sugar

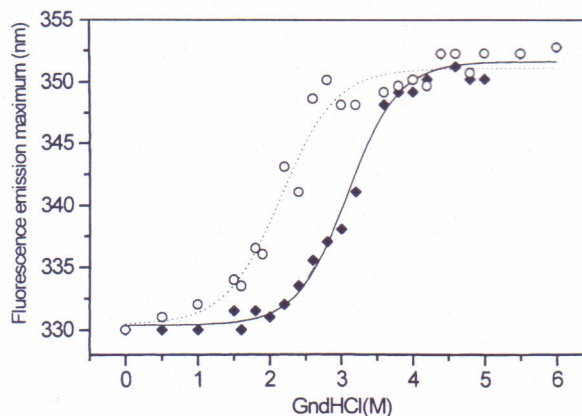


Fig. 1. GndHCl-induced equilibrium curves for the unfolding of frutalin. GndHCl-induced equilibrium curves for the unfolding of frutalin measured by maximum fluorescence emission at 20 °C. These samples were excited at 290 nm. (Open circles) Frutalin in the absence of D-galactose. (Solid diamonds) Frutalin in the presence of D-galactose.

Table 1. Conformational stability of frutalin.

	$\Delta G_U^{H_2O}$ (KJ·mol ⁻¹)	[GndHCl] _{1/2} (M)
Frutalin with NaCl/Pi/D-galactose	17.12	3.09
Frutalin with NaCl/P _i	12.34	2.29

(Fig. 1, open circles) was also found to be a first order reaction with one transition step, the concentration at which transitions started was above 0.5 M GndHCl. The conformational stability ($\Delta G_U^{H_2O}$) of frutalin is presented in Table 1. In the presence of the sugar, frutalin showed a $\Delta G_U^{H_2O}$ value of 17.12 kJ·mol⁻¹ and in the absence of the sugar, 12.34 kJ·mol⁻¹. According to these results, frutalin has more stability during the unfolding process in the presence of sugar binding.

Above 4 M GndHCl, frutalin was unfolded. Thus, this concentration was used to obtain preparative unfolded frutalin for the refolding experiments. After denaturation, two procedures, dialysis and dilution as described in Materials and methods, were used to obtain the refolding frutalin forms. These processes were conducted always in the presence of sugar, due to the results of the Th experiments.

Nfrutalin, Ufrutalin and Rfrutalin-Ch were filtered by SEC (Fig. 2). As can be seen in this figure, Nfrutalin was eluted between 8 and 10 mL, Ufrutalin was eluted around

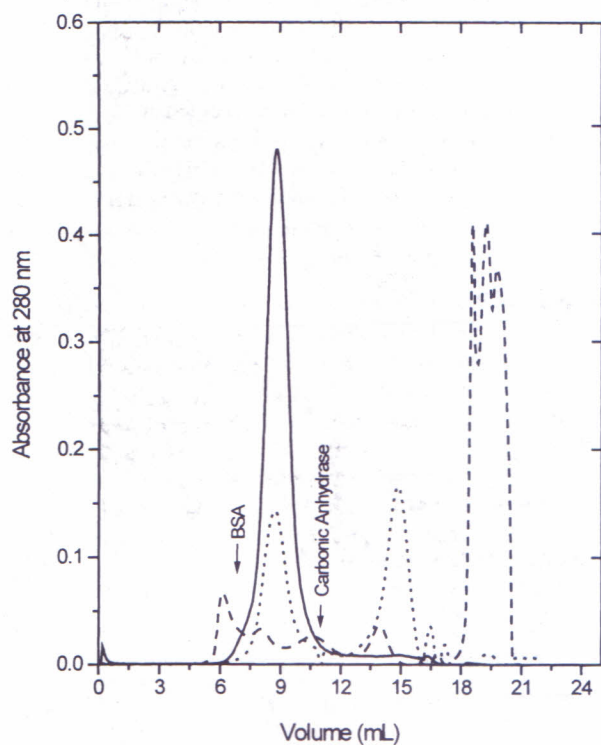


Fig. 2. SEC for dilution method. Size exclusion chromatography of the Nfrutalin (—), Ufrutalin (---) and Rfrutalin (---) forms of frutalin on Superdex-75 (HR 10/30 column) using an Äkta explorer-10 system as described in Materials and methods.

18–20 mL and Rfrutalin was separated in the two major fractions. One fraction was eluted at the same position as Nfrutalin and the other was eluted between Nfrutalin and Ufrutalin and denoted misfolded frutalin form, Mfrutalin. As can be observed in this figure, there was no significant material eluted from the Ufrutalin sample at the native position. The spectroscopic and biological activity determinations were made with fractions from SEC. The content of different forms in the Rfrutalin samples obtained by Th was not investigated because of low yields. The Rfrutalin-Ch yield was 20% for both dialysis and dilution, corresponding to 0.3 mg·mL⁻¹ protein. This amount can be considered quite satisfactory for a refolded protein. The data reported in the literature show a smaller, but equally efficient, yield compared to the one obtained in the present study, such as 0.01 mg·mL⁻¹ for recombinant snake venom metalloprotease [22] and 0.008 mg·mL⁻¹ for recombinant human promatrilysin [23].

Figure 3 shows the CD spectra for Th and Ch of the Nfrutalin, Ufrutalin, Rfrutalin and Mfrutalin forms. Nfrutalin had a minimum at 218 nm and a maximum at 203 nm. Ufrutalin had the typical spectrum of the proteins that have lost their secondary structure. Rfrutalin-Th showed the same minimum and maximum values as the native molecule (218 nm and 203 nm, respectively) (Fig. 3A). The lower intensity presented by this spectrum was probably due to nonseparation of the residual unfolding forms (or others) present in this sample. The CD spectrum of Rfrutalin-Ch,

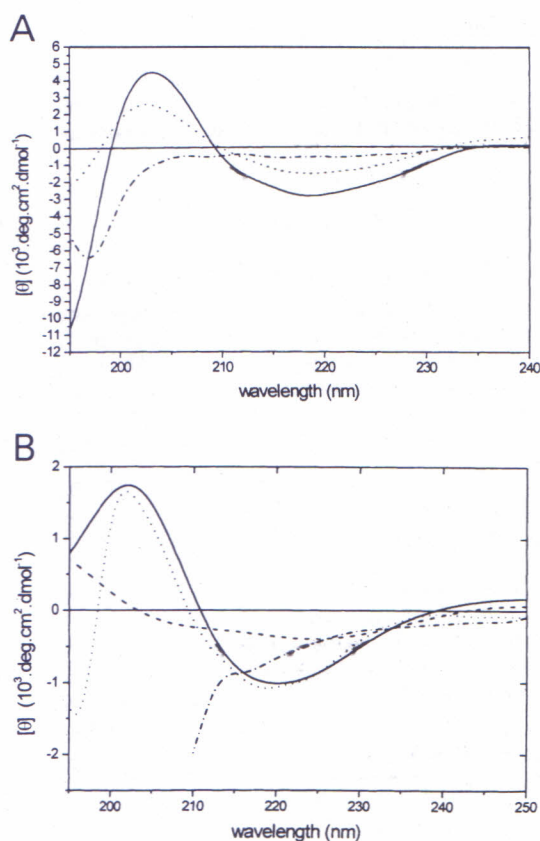


Fig. 3. Frutalin CD spectra. CD spectra of the Nfrutalin (—), Ufrutalin (---), Rfrutalin (---) and Mfrutalin (· · · ·) forms were recorded from 195 to 240 nm in a 1-nm path length cuvette as the average of 16 scans at 25 °C. (A) CD spectra from Th. (B) CD spectra from Ch.

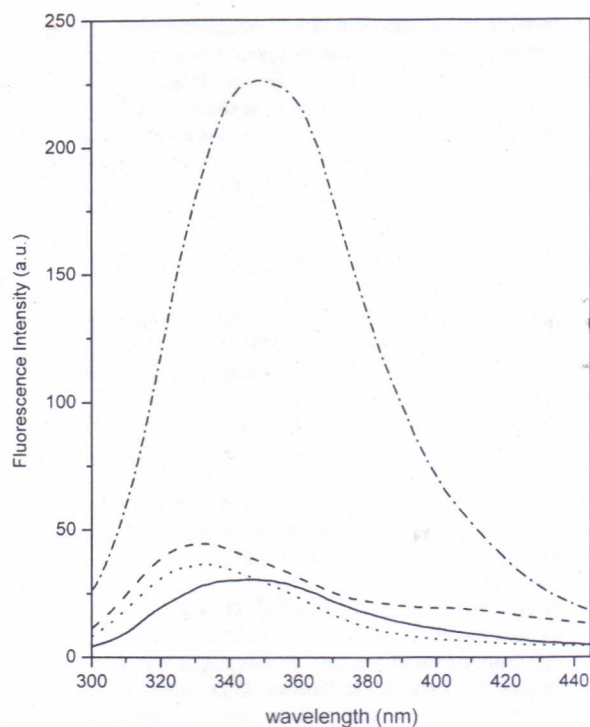


Fig. 4. Frutalin emission fluorescence spectra. Fluorescence spectra of Nfrutalin (···), Ufrutalin (- · - ·), Rfrutalin (- - -) and Mfrutalin (—). These samples were excited at 280 nm and were recorded from 300 to 450 nm.

separated from SEC, was the same as that of the native form (Fig. 3B). In contrast, the spectrum of Mfrutalin showed a very different form incompatible with β sheet structures. This form, denoted Mfrutalin, could be a partially misfolded form.

The spectra from Nfrutalin and Rfrutalin-Ch were deconvoluted by convex constraint analysis [19,20] as described in Materials and methods, and showed 86% of beta components (antiparallel and parallel β sheet, and β turns) and 16% of other contributions for both the native and refolded forms, with a rmsd of 1%. The deconvolution of Mfrutalin showed 13% of α helix and 12% of β components (antiparallel and parallel β sheet and β turns), 56% of other contributions, and 6% rmsd. Although the high rmsd, the latter results show that Mfrutalin is a different form, with a particular secondary structure.

The fluorescence emission spectra of the N, R, M and Ufrutalin forms from Ch were useful to confirm the CD data (Fig. 4). The maximum fluorescence emission spectra, $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$, were 333 nm for Nfrutalin and 348 nm for Ufrutalin,

and Rfrutalin was closely similar to Nfrutalin for both $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$ and intensity. The $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$ of Mfrutalin was 353 nm and the intensity was similar to that of the native form. There was a pronounced red shift for Ufrutalin and Mfrutalin $\lambda_{\text{max}}^{\text{emiss}}$, which is quite typical for exposed tryptophan residues in proteins. The fluorescence intensity observed for Mfrutalin contrasted with that of Ufrutalin, possibly due to the fact that Trp is buried in the particular folding of the Mfrutalin structure, or is inserted into a different chemical environment, such as a salt bridge between acid and basic residues that may act as a quencher of its emission.

Rfrutalin showed the same intensity of heamagglutination activity as the native form (Table 2). Ufrutalin showed no agglutination activity, except at the initial dilution where the concentration of the sample was high and viscosity impaired analysis. These experiments were carried out after the samples were thawed and Mfrutalin became totally aggregated.

Mfrutalin may be either an intermediate species formed during the refolding process that has become trapped, or alternatively may represent a dead-end species that is formed along a non-native refolding pathway. Experiments regarding GndHCl-induced equilibrium refolding curves indicated the presence of two transitions showing one population of non-native species, which are being investigated (P. T. Campana & L. M. Beltramini, unpublished results).

The present results concerning biological activity, spectroscopy (CD and fluorescence) and chromatographic studies suggest that this tetrameric lectin was refolded to its native form and that an intermediate species was formed in the refolding process. As this process was effective in the presence of sugar binding, we may suggest that the sugar-binding site serves as a nucleus in the refolding process at the monomer level. This is compatible with the nucleation-condensation model proposed for protein folding [15,16]. The fact that refolded monomers were not detected in the SEC experiments indicates that, once the individual chains have adopted their native three-dimensional structures, they spontaneously assemble to form tetramers, suggesting a cooperative mechanism induced by hydrophobic regions at one of the sites from each monomer.

Unlike the refolding results, the unfolding curves for frutalin have not shown any intermediate stable forms, suggesting that those forms either do not exist or are not present in a concentration detectable by this experimental procedure. Therefore, as the unfolding curves showed a first order reaction with one transition step, they were analyzed as a two state process. The same behavior was observed in the presence and in the absence of sugar. However, frutalin has more stability during the unfolding process in the presence of sugar binding.

Table 2. Heamagglutination activity.

	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
Nfrutalin ^a	+	+	+	+	+	-
Ufrutalin ^b	+	-	-	-	-	-
Rfrutalin ^c	+	+	+	+	+	-

^a Initial concentration, 0.1 mg·mL⁻¹. ^b Initial concentration, 0.09 mg·mL⁻¹. ^c Initial concentration, 0.1 mg·mL⁻¹.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. Dr. Richard Charles Garrat for helpful illuminating comments. This work was supported by CNPq, FAPESP, CAPES and FINEP Brazilian agencies. P. T. Campana has as PhD fellowship from FAPESP and A. C. Oliveira Monteiro-Moreira has as PhD fellowship from CAPES.

REFERENCES

- Bryngelson, J.D., Onuchi, J.N., Socci, N.D. & Wolynes, P.G. (1995) Funnels, pathways and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* **21**, 167–195.
- Dill, K.A. & Chan, H.S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10–19.
- Dobson, C.M. & Karplus, M. (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 92–101.
- Wang, Z.X. (1996) How many fold types are there in nature? *Proteins: Structure, Function Genet* **26**, 186–191.
- Capaldi, A.P. & Radford, S.E. (1998) Kinetic studies of β -sheet protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 86–92.
- Carrel, R.W. & Lomas, D.A. (1997) Conformational diseases. *Lancet* **350**, 134–138.
- Sharon, N. & Lis, H. (1990) Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB J.* **4**, 3198–3207.
- Rüdiger, H. (1998) Plant lectins – more than just for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* **161**, 130–152.
- Lis, H. & Sharon, N. (1998) Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637–674.
- Santos-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M.O., Beltramini, L.M. & Roque-Barreira, M.A. (1994) A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.* **153**, 1798–1807.
- Moreira, R.A., Castelo-Branco, C.C., Monteiro, A.C.O., Tavares, R.O. & Beltramini, L.M. (1998) Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry* **46** (1), 139–144.
- Silva-Lucca, R.A., Tabak, M., Nascimento, O.R., Roque-Barreira, M.C. & Beltramini, L.M. (1999) Structural and thermodynamics studies of KM+, a D-mannose binding lectin from *Artocarpus integrifolia* seeds. *Biophys. Chem* **79**, 81–93.
- Rosa, J.C., Oliveira, P.S.L., Garrat, R.C., Beltramini, L.M., Resing, K., Roque-Barreira, M.C. & Greene, L.J. (1999) KM+: a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. *Protein Sci.* **8**, 13–24.
- Sankaranarayanan, R., Sekar, K., Banerjee, R., Sharma, V., Suroliya, A. & Vijayan, M. (1996) A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moraceae* plant lectin with a β -prism fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 596–602.
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181** (4096), 181–223.
- Fersht, A.R. (1997) Nucleation mechanisms in protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 3–9.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function: Spectroscopic Analysis of Biopolymers*. W. H. Freeman, New York, USA.
- Perczel, A., Hollósi, M., Tusnády, G. & Fasman, G.D. (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng.* **4**, 669–679.
- Perczel, A., Park, K. & Fasman, G.D. (1992) Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. *Anal. Biochem.* **203**, 83–93.
- Pace, C.N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 267–280.
- Selistre-d., e-Araújo, H.S., de Souza, E.L., Beltramini, L.M., Ownby, C.L. & Souza, D.H.F. (2000) Expression, refolding, and activity of a recombinant nonhemorrhagic snake venom metalloprotease. *Prot. Expr. Purif.* **19**, 41–47.
- Itoh, M., Masuda, K., Ito, Y., Akizawa, T., Yoshioka, M., Imai, K., Okada, Y., Sato, H. & Seiki, M. (1996) Purification and refolding of human proMMP-7 (por-Matrilysin) expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *J. Biochem.* **119**, 667–673.