



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**Seqüência parcial de DNA, caracterização bioquímica da lectina de
sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. e suas relações com a
filogenia de leguminosas**

Vânia Marilande Ceccatto

Fortaleza
2001

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Seqüência parcial de DNA, caracterização bioquímica da
lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. e suas
relações com a filogenia de leguminosas**

Vânia Marilande Ceccatto

Tese apresentada à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Bioquímica, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará

Fortaleza
2001

C383s

Ceccatto, Vânia Marilande

Seqüência parcial de DNA, caracterização bioquímica da lectina
de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. e suas relações com a
filogenia de leguminosas/ Vânia Marilande Ceccatto.- Fortaleza:2001.

120p.:il.-

Orientador: Benildo Sousa Cavada

Co-orientador: Thalles Barbosa Grangeiro

Tese (Doutorado) em Bioquímica

Universidade Federal do Ceará

1. Lectinas vegetais 2. Biologia Molecular.

3. *Canavalia grandiflora* Benth. I. Título

C.D.D. 574.192

iii

Seqüência parcial de DNA, caracterização bioquímica parcial da lectina de
- sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. e suas relações com a filogenia de
leguminosas

Aprovada em 21/02/2001

VANIA MARYLANDE CECCATTO

Dr. Benílio Sousa Cavada
Orientador
Presidente
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Conselheiro
Departamento de Biologia – UFC

Dr. Márcio Viana Ramos
Conselheiro
Pesquisador-Bolsista CNPq

Dra. Cláudia Ferreira Santos
Conselheiro
Departamento de Ciências Fisiológicas - UECE

Dr. Joaquim Albenisio Gomes da Silveira
Conselheiro
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

AGRADECIMENTOS

⌘ *Ao Senhor, Criador de coisas maravilhosas, que nos permitiu a busca do conhecimento.*

⌘ *Às pessoas*

À meu filho, *Ângelo* e meu marido *Rogério*, pelo amor, pela paciência e força para continuar este trabalho e por todas as dificuldades que enfrentamos juntos.

Ao Prof. Dr. *Benildo Sousa Cavada*, orientador desta tese, espero que este trabalho esteja à altura de toda a confiança que me têm depositado, nestes anos.

Ao Prof. Dr. *Thalles Barbosa Grangeiro*, co-orientador desta tese e um exemplo profissional de luta, trabalho e competência.

À Dra. *Nádia Accioly Nogueira*, pelo conhecimento, estímulo e amizade sempre presentes na condução deste trabalho.

À *Vivianne Graça Duarte*, grande parceira de trabalho, pelo apoio e amizade.

À Profa. *Maria Aparecida Oliveira Alves*, sempre com boa vontade, que nos recebeu com todo apoio e carinho em seu laboratório e pelos trabalhos de cariotipagem.

À Dra. *Cláudia Ferreira Santos*, pelo apoio, amizade e pela orientação com a metodologia de imunodifusão dupla.

Ao Dr. *Márcio Viana Ramos*, pela orientação com a ressonância plasmônica de superfície.

Ao Dr. *Juan J. Calvete*, pelos trabalhos de sequenciamento.

À Profa. *Marinetes Dantas de Aquino* pela amizade e companhia que nos brindou.

À amiga *Ana Maria Bitencourt*, sempre companheira, alegre e incentivadora.

Ao Dr. *Joaquim Albenílio Gomes da Silveira*, por tudo que nos ensinou, desde a iniciação científica.

Ao Dr. *Renato Azevedo Moreira*, pelo apoio e incentivo desde que chegamos à Fortaleza.

Ao Prof. *Edson Paula Nunes*, pelo apoio na parte botânica.

Ao Dr. *José Tadeu Abreu de Oliveira*, pelos ensinamentos e apoio à pesquisa.

À Dra. *Ilka Maria Vasconcelos*, pelos ensinamentos e apoio na parte final da tese.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Citogenética: *Rodrigo, Hélio, Delano, Alexandre, João Paulo, Juliana, Péricles, Flávia, Lia, Eduardo, Cristina, Batista, Cristina e Fábia*, pelo auxílio e apoio constantes.

Aos colegas *Luciano da Silva Pinto e Celso Shiniti Nagano*, pela ajuda com o sequenciamento de nucleotídeos.

Aos *estagiários e técnicos* do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia – UFC, agradecemos pelo apoio, em especial, à funcionária *Rivaldina*.

Aos colegas de trabalho do BioMol Lab: *Kátia, Beatriz, Fernanda, Renato, Éder, Nagano, Nylane, Creusa, Feitosa e Daiva*.

Ao colega *Petrônio* pelo incentivo.

Ao Dr. *Francisco A. P. Campos* por nos convidar à Fortaleza e apoio inicial.

Aos colegas do Laboratório de Fixação de Nitrogênio: *George, Isa* e em especial *Benedito*, pelo trabalho conjunto e mútua cooperação.

Aos funcionários da Coordenação de Pós-Graduação e em especial à funcionária **Marisa**, pela atenção e gentileza.

Aos meus irmãos **Valdire** e **Ângelo** e cunhada **Ana** pelo auxílio constante.

Aos **alunos, professores e funcionários** do Departamento de Geociências da Faculdade de Filosofia Dom Aureliano Matos – FAFIDAM – Limoeiro do Norte - CE

A **todos** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC

A **todos** do Departamento de Biologia – UFC

À memória do **Prof. Valdinar Custódio**.

⌘ As Instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através dos convênios com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará e por auxílios de pesquisa individuais ou integrados concedidos a pesquisadores do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) e do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia – UFC.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) por auxílios de pesquisa individuais ou integrados concedidos à pesquisadores do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) e do Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia – UFC.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), através de convênio com o Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) e com o Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia – UFC.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab) e com o Laboratório de Citogenética do Departamento de Biologia – UFC.

Faculdade de Filosofia Dom Aureliano Matos (FAFIDAM) – Universidade Estadual do Ceará (UECE), através da Coordenação do Curso de Licenciatura em Ciências, pela liberação para o Doutorado.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC, em cujos laboratórios foi executado este trabalho.

Aos meus amados
Ângelo e Rogério
E em memória de meus pais

“Nada faz sentido a não ser à luz da evolução”
Theodosius Dobzanski

LISTA DE FIGURAS

Figuras	pg	
01	Excicata nº 25.326 de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth. depositada no Herbário Prisco Bezerra – Departamento de Biologia - UFC.....	31
02	Esquema ilustrativo do protocolo de clonagem do gene <i>ConGF</i> e transformação da bactéria <i>E. coli</i>	40
03	Mapa circular do vetor de clonagem procariótico pGEM-T (Promega). No detalhe, possíveis locais de digestão com nucleases de restrição no sítio múltiplo de clonagem.....	44
04	Diagrama esquemático do mecanismo e local específico da inserção do gene <i>ConGF</i> no vetor de clonagem procariótico pGEM-T (Promega).....	45
04-A	Mecanismo de inserção do gene clonado no vetor, mostrando como o inserto é estabilizado através de duas adeninas aderidas durante a amplificação por PCR, pela enzima <i>Taq</i> polimerase e as extremidades ligadas pela enzima T4 DNA ligase.....	45
04-B	Local de inserção do gene <i>ConGF</i> na sequência nucleotídica do pGEM-T	45
05	Purificação da lectina de <i>C. grandiflora</i> Benth. por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl ₂ e MnCl ₂ 5 mM. A seta indica o momento da eluição, efetuada com o tampão de equilíbrio contendo Glicose 0,1 M. Total de amostra aplicado: 10 ml. Frações: 1ml/tubo. PI: Pico não retido; PII: Pico não retido.....	55
06	Eletroforese de purificação da lectina de <i>C. grandiflora</i> Benth. em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptopropano. 1 – Marcador molecular; 2 – Lectina de <i>C. brasiliensis</i> (ConBr) purificada; 3 – Farinha de sementes de <i>C. grandiflora</i> ; 4 – Extrato Total; 5 – PII (pico não retido); 6 – Lectina de <i>C. grandiflora</i> (ConGF) purificada. Marcadores: A – Albumina bovina (66 kDa); B- Ovoalbumina (45 kDa); C – Gliceraldeído-3-P (36 kDa); D – Anidrase carbônica bovina (29 kDa); E – Inibidor Tripsina Soja (20 kDa); F – Lactalbumina bovina (14,2 kDa). α , β e γ = bandas correspondentes aos fragmentos.....	56
07	Reação de imunodifusão dupla de Ouchterlony em gel de agarose 1,5% em NaCl 0,15 M contendo glicose 0,1 M. A – Anticorpo de <i>Vatairea macrocarpa</i> x Lectinas de <i>C. grandiflora</i> ; C. <i>brasiliensis</i> ; <i>Vatairea macrocarpa</i> e <i>Cratylia floribunda</i> . B – Anticorpo de <i>C. brasiliensis</i> x Lectinas de <i>C. grandiflora</i> ; C. <i>brasiliensis</i> ; <i>Dioclea rostrata</i> e <i>Dioclea guianensis</i>	61
08	Análise da interação em tempo real da lectina de sementes de <i>C. grandiflora</i> (ConGF) na concentração de 100 μ g/ml ⁻¹ com glicoproteínas imobilizadas, medidas através de ressonância plasmônica de superfície (RPS). As partes crescente e decrescente correspondem, respectivamente, às fases de associação (tampão circulante contendo a lectina) e dissociação (tampão não contendo lectina). RU = unidades de ressonância.....	66
09	Análise da interação em tempo real da lectina de sementes de <i>C. grandiflora</i> (ConGF) na concentração de 100 μ g/ml ⁻¹ com glicoproteínas imobilizadas, medidas através de ressonância plasmônica de superfície (RPS). As partes crescente e decrescente correspondem, respectivamente, às fases de associação (tampão circulante contendo a lectina) e dissociação (tampão não contendo lectina). RU = unidades de ressonância. Estruturas do trimanosídeo (1); análogos deoxi (2-11) e complexo oligossacarídico biantenário (12)	67
10	Cinética de interação em tempo real da lectina de sementes de <i>C. grandiflora</i> (ConGF) na concentração de 100 μ g/ml ⁻¹ com ribonuclease B imobilizada, medidas através de ressonância plasmônica de superfície (RPS). As partes superior e inferior correspondem, respectivamente, às fases de associação (tampão circulante contendo a lectina) e dissociação (tampão sem lectina). A	

seta indica o momento de adição de α -D-Metil-Manopiranosidio, nas concentrações indicadas. RU = unidades de ressonância. No sub-gráfico, a porcentagem de dissociação x concentração do eluidor α -D-Metil-Manopiranosidio.....	68
11 Estrutura de glicopeptideos oligomanosídicos.....	69
12 Estruturas do trimanosídeo (1); análogos deoxi (2-11) e complexo oligossacarídico biantenário (12).....	70
13-A Comparação da base protéica de sementes de espécies da subtribo <i>Diocleinae</i> , através de eletroforese em poliacrilamida, em presença de SDS e 2-mercaptopoetanol. 1 – Marcador molecular; 2 e 7 – ConBr purificada; 3 – Farinha de sementes de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth; 4 – Farinha de sementes de <i>Cratylia floribunda</i> ; 5 – Farinha de sementes de <i>Cymbosema</i> sp.; 6- Farinha de sementes de <i>Dioclea virgata</i> . Marcadores: A – Albumina bovina (66 kDa); B- Ovoalbumina (45 kDa); C – Gliceraldeído-3-P (36 kDa); D – Anidrase carbônica bovina (29 kDa); E – Inibidor Tripsina Soja (20 kDa); F – Lactalbumina bovina (14,2 kDa).....	73
13-B Comparação da base protéica de sementes de espécies da subtribo <i>Diocleinae</i> (gênero <i>Dioclea</i>), através de eletroforese em poliacrilamida, em presença de SDS e 2-mercaptopoetanol. 1 – Marcador molecular; 2 – Lectina de <i>C. grandiflora</i> purificada; 2 – Farinha de sementes de <i>C. grandiflora</i> ; 3 – Farinha de sementes de <i>Dioclea guianensis</i> ; 4 – Farinha de sementes de <i>Dioclea rostrata</i> ; 5 – Farinha de sementes de <i>Dioclea violaceae</i> ; 6 – Farinha de sementes de <i>Dioclea virgata</i> . Marcadores: A – Albumina bovina (66 kDa); B- Ovoalbumina (45 kDa); C – Gliceraldeído-3-P (36 kDa); D – Anidrase carbônica bovina (29 kDa); E – Inibidor Tripsina Soja (20 kDa); F – Lactalbumina bovina (14,2 kDa).....	74
14 Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das lectinas da subtribo <i>Diocleinae</i> . No destaque, a sequência de aminoácidos parcial obtida para a lectina de sementes de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.	78
15-A Cromossomos metafásicos de <i>C. grandiflora</i> Benth.	78
15-B Cromossomos metafásicos de <i>C. maritima</i> (Aubl.) Thouars.....	78
15-C Cromossomos metafásicos de <i>C. gladiata</i> (Jacq.) DC	78
15-D Cromossomos metafásicos de <i>C. boliviiana</i> Piper	78
15-E Cromossomos metafásicos de <i>C. brasiliensis</i> Mart.....	78
15-F Cromossomos metafásicos de <i>C. bonariensis</i> Lindl.....	78
16 Eletroforese em gel de agarose 0,8% apresentando a extração do DNA genômico utilizando o reagente CTAB. 1 e 4 – Marcadores de alto peso molecular (Lambda DNA/Hind III - Promega); 2 – DNA genômico de <i>Canavalia brasiliensis</i> ; 3 – DNA genômico de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.; Marcadores: A - 23.130 Kb; B – 9.416 Kb; C – 6.557 Kb.....	81
17 Eletroforese em gel de agarose 0,8% apresentando a amplificação por PCR dos plasmídeos recombinantes e DNA genômico. 1 – Marcador de baixo peso molecular (“Low DNA mass leader” – Pharmacia); 2 e 3 – Amplificação negativa para clones recombinantes; 4 – Amplificação positiva para clone recombinante; 5 – Controle negativo; 6 – Amplificação positiva em DNA genômico de <i>Canavalia brasiliensis</i> ; 7 – Amplificação positiva em DNA genômico de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.; 8 – Marcador de alto peso molecular (Lambda DNA/Hind III); Marcadores: A – 2000 pb; B – 1200 pb; C – 800 pb e D – 400 pb; E – 23.139 Kb, F – 9.416 Kb, G – 6.557 Kb; H – 4.361 Kb.....	82
18 Alinhamento múltiplo das sequências parciais de nucleotídeos obtidas para dois clones (Clone 1 e Clone 2) do gene ConGF, com a sequência de nucleotídeos da ConBr. ConBr: 870 pb; Clone1: 138 pb; Clone2: 126 pb.....	83
19 Alinhamento múltiplo de sequências parciais de aminoácidos obtidas, com a cadeia ConBr madura (237 aa). Em azul: sequência parcial de aminoácidos: 121 aa (FIGURA 14). Em vermelho: segmentos que foram deduzidos a partir das sequências de DNA dos clones 1 e 2: 78 aa (FIGURA 17).	84

– 20	Árvore filogenética obtida com o alinhamento de 70 sequências de aminoácidos de lectinas da subtribo Faboideae (=Papilionoideae). O traço representa a distância relativa entre espécies. B – Relações evolutivas definidas através de estudos quimiotaxonômicos (POLHIL & RAVEN, 1981).	88
21	Relações evolutivas entre tribos de Faboideae (=Papilionoideae) conforme estudo de POLHIL & RAVEN, 1981. As cores indicam relações obtidas com a árvore filogenética.	89
22	Representação de K_A/K_s , indicando todas as combinações binárias possíveis entre as espécies de leguminosas estudadas (listadas na Tabela 02). A linha pontilhada representa a função identidade (onde $R = 1$). O número representa o coeficiente angular.....	91
23	Representação de K_A e K_s , indicando todas as combinações binárias possíveis entre <i>Canavalia</i> (entre si e contra as demais espécies de leguminosas, listadas na Tabela 02). A linha pontilhada representa a função identidade (onde $R = 1$). Os números representam os coeficientes angulares.	92
24	Representação de K_A e K_s , indicando todas as combinações binárias possíveis entre os grupos de <i>Canavalia</i> x <i>Sophoreae</i> (listadas na Tabela 02). A linha pontilhada representa a função identidade (onde $R = 1$). Os números representam os coeficientes angulares.	93

LISTA DE TABELAS

	Tabela	pg
01	Lectinas de várias famílias vegetais (não leguminosas) com sequência primária (de aminoácidos) determinada, cujas sequências estão disponíveis no GenBank	9
02	Lectinas de várias famílias vegetais (incluindo leguminosas) com sequência primária (de nucleotídeos) determinada, cujas sequências estão disponíveis no GenBank	16
03	Taxonomia de <i>Canavalia</i> . No destaque, a espécie em estudo.....	19
04	Lectinas pertencentes à espécies da família Fabaceae com sequência primária (aminoácidos) já determinada (Faboideae = Papilionoideae).....	21
05	Algumas propriedades gerais, atividades biológicas, usos e aplicações de lectinas de leguminosas. Em destaque, participação do BioMol-Lab (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC)	28
06	Purificação da lectina de sementes de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.	54
07	Atividade hemaglutinante em extrato total de sementes de <i>C. grandiflora</i> Benth	59
08	Composição de aminoácidos da lectina de sementes de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.....	60
09	Inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas.....	65
10	Parâmetros termodinâmicos derivados de ITC para lectinas de Diocleinae em pH 7,2, com o trimanosídeo (1) e análogos deóxi (2-11) (DAM et al., 2000). Os parâmetros foram calculados segundo a equação: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT \ln K_a$ onde ΔG , ΔH e ΔS representam as mudanças na energia livre, entalpia e entropia de ligação. T = temperatura absoluta e R = 1,98 cal. Mol ⁻¹ . K ⁻¹ . Em destaque, a espécie em estudo.....	71
11	Substituições de nucleotídeos sinônimas (KS) e não-sinônimas (KA) de espécies vegetais, incluindo lectinas	90

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

%	Por cento
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
10X	Dez vezes
aa	aminoácido
A ₂₈₀	Absorbância lida a 280 nm
β -Gal	β -D-Galactosidase (EC 3.2.1.23)
bp	pares de bases
cDNA	DNA complementar
ConA	lectína de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	lectína de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConGF	lectína de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.
CTAB	celil trietil amonia brometo
DGL	lectína de <i>Dioclea grandiflora</i>
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTPs	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etíleno diamino tetracético
g	grama
g	unidade de centrifugação
GlcNac	N-acetil-D-glicosamina
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
ITC	Microcalorimetria de titulação isoterma
K _A	Taxa de substituição não-sinônima
K _S	Taxa de substituição sinônima
kDa	kiloDaltons
LB	Luria Bertani
M	molar
m/v	massa/volume
mA	milliamperes
mg	milígrama
mM	milimolar
mm	milímetro
Mr	Massa molecular relativa
°C	graus centígrados
OD ₆₀₀	densidade ótica lida a 600 nm
OTU	Unidades taxonómicas operacionais
PCR	reação da polimerase em cadeia
pGEM-T	Vetor de clonagem procariótico
P.M.	peso molecular
rpm	revoluções por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
Taq	enzima de <i>Termus aquaticus</i>
TBE	tampão TRIS – Borato – EDTA
TE	tampão TRIS – EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TRIS	tris-hidroxiaminometano
RNAm	RNA mensageiro
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos
RU	Unidades de Ressonância
UH	Unidade de hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma solução de eritrócitos a 2%
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosídeo

Resíduos de aminoácidos

1 letra	3 letras	Aminoácido
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
P	PRO	Prolina
Q	GLN	Glutamina
R	ARG	Arginina
S	SER	Serina
T	THR	Treonina
V	VAL	Valina
W	TRP	Triptofano
X	XXX	Desconhecido
Y	TYR	Tirosina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xii
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Gerais	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 Lectinas vegetais: A busca da identidade	5
3.2 Lectinas vegetais: Considerações gerais	8
3.3 Lectinas vegetais: Uma perspectiva filogenética	10
3.3.1 Considerações Gerais	10
3.3.2 Biologia Molecular de Lectinas Vegetais	11
3.3.3 Substituições sinônimas e não sinônimas em genes e a teoria Neutralista	13
3.4 Lectinas de Leguminosas – Uma visão Geral	17
3.4.1 O objeto de estudo – <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.	17
3.4.2 Estudos Estruturais	20
3.4.3 Especificidade a carboidratos e oligossacarídeos	24
3.4.3 Papel fisiológico	25
3.4.5 Biossíntese e Processamento	26
3.5 Lectinas Vegetais – Ferramenta Biotecnológica	27
3.5 Considerações Finais	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAL BOTÂNICO E IDENTIFICAÇÃO	30
4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO	30
4.2.1 Preparação do Extrato Total	30
4.2.2 Cromatografia de Afinidade	32
4.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptoetanol	32
4.2.4 Determinação de proteínas	33
4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL	33
4.3.1 Atividade Hemaglutinante	33
4.3.2 Análise de Aminoácidos	34
4.3.3 Imunodifusão dupla de Ouchterlony	34
4.4 ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS	36
4.4.1 Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares e Glicoproteínas	36
4.4.2 Cinética da Interação ConGF com glicoproteínas medida em tempo real por ressonância plasmônica de superfície (BIAcore)	36
4.4.2.1 Marcação de Glicoproteínas	36
4.4.2.2 Ressonância Plasmônica de Superfície em Biosensor BIAcore 3000 ^T	37
4.4.3 Termodinâmica de ligação para análogos deóxi do núcleo trímanosídico de oligossacarídeos ligados à asparagina	37
4.5 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS	38
4.6 CLONAGEM DO GENE ConGF EM <i>Escherichia coli</i>	39
4.6.1 Delineamento Experimental	39
4.6.1.1 Considerações Gerais	39
4.6.1.2 Otimização da Reação da Polimerase em Cadeia	41
4.6.1.3 Uso de Iniciadores Específicos	41
4.6.1.4 Extração do DNA genômico	41

4.6.1.5	Sistema de inserção do produto amplificado ao vetor	42
4.6.1.6	Transfecção gênica utilizando CaCl_2	42
4.6.1.7	Utilização do gene repórter.....	42
4.6.1.8	Isolamento de plasmídeo através de extração alcalina	42
4.6.2	Protocolo de Clonagem	43
4.6.2.1	Extração do DNA genômico.....	43
4.6.2.2	Amplificação do gene por PCR.....	46
4.6.2.3	Eletroforese em gel de agarose a pH neutro.....	46
4.6.2.4	Purificação da banda.....	47
4.6.2.5	Reação de Ligação	47
4.6.2.6	Meios de Cultura	48
4.6.2.7	Preparação de células competentes de <i>E. coli</i>	48
4.6.2.8	Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> com o vedor de clonagem.....	48
4.6.2.9	Seleção de colônias de bactérias transformadas	49
4.6.2.10	Isolamento de plasmídeos recombinantes	49
4.6.2.11	Amplificação do gene clonado por PCR.....	50
4.6.2.12	Eletroforese final dos plasmídeos recombinantes	50
4.7	SEQUENCIAMENTO	50
4.7.1	Sequenciamento de aminoácidos	50
4.7.2	Sequenciamento de nucleotídeos	50
4.8	ALINHAMENTO E PRODUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS.....	51
4.9	CÁLCULO DO NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS E NÃO-SINÔNIMAS.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO		52
PARTE 1. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA LECTINA DE SEMENTES DE <i>Canavalia grandiflora</i> Benth..... 52		
5.1	ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA	52
5.1.1	pH de extração.....	52
5.1.2	Extração das proteínas.....	52
5.1.3	Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-50	53
5.1.4	Eletroforese em Gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptopoetanol	53
5.2	CARACTERIZAÇÃO PARCIAL.....	57
5.2.1	Atividade Hemaglutinante	57
5.2.2	Análise de Aminoácidos	57
5.2.3	Imunodifusão dupla de Ouchterlony	58
5.3	ESPECIFICIDADE PARA AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS	62
5.3.1	Inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas.....	62
5.3.2	Cinética da Interção ConGF com glicoproteínas medida em tempo real por ressonância plasmônica de superfície	62
5.3.3	Termodinâmica de ligação para análogos deóxi do núcleo trimonosídico de oligossacarídeos ligados à asparagina	64
5.4	COMPARAÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS DE SEMENTES	72
5.5	SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DE AMINOÁCIDOS	75
PARTE 2. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DA LECTINA E ESTUDOS FILOGENÉTICOS EM LEGUMINOSAS 77		
5.6	CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE ESPÉCIES DE <i>Canavalia</i>	77
5.7	CLONAGEM DO GENE ConGF	79
5.7.1	Extração do DNA genômico.....	79
5.7.2	Amplificação do gene ConGF em DNA genômico.....	79
5.7.3	Amplificação do gene ConGF em clones recombinantes de <i>E. coli</i>	80
5.8	ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DE NUCLEOTÍDEOS DA ConGF.....	80
5.9	ESTUDOS FILOGENÉTICOS DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS.....	85

5.9.1	Árvore filogenética baseada em aminoácidos	85
5.9.2	Comparações entre substituições de nucleotideos sinônimas (K_s) e não sinônimas (K_A).....	86
5.10	RESUMO DOS RESULTADOS	94
6.	CONCLUSÕES	95
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
8.	ANEXO - Purification and Partial Characterization of a Lectin from <i>Canavalia grandiflora</i> Benth. Seeds, publicado em <i>Protein and Peptide Letters</i> , v.9,n.1, p. 67-73, 2002.	113

RESUMO

Este trabalho buscou caracterizar bioquimica e molecularmente uma nova lectina obtida de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. A lectina de sementes de *C. grandiflora* Benth. (ConGF) foi isolada através de cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, eluída com glicose 0,1 M. Apresentou três bandas em eletroforese de gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptopetanol: cadeia α e fragmentos β e γ , respectivamente, com 25, 50 e 100 kDa, análogos à outras lectinas da subtribo *Diocleinae*. A composição de aminoácidos da ConGF revelou alto teor de ácido áspartico serina e leucina. Não se detectou metionina nem cisteína. A ConGF mostrou identidade imunológica total com as Canavalias testadas, parcial com *Dioclea rostrata* e sem reação com *Dioclea guianensis* e *Vatairea macrocarpa*. A ConGF mostrou padrões de ligação termodinâmicos aos análogos deóxi semelhantes aos encontrados para outras lectinas de *Diocleinae*. Os perfis eletroforéticos em presença de SDS e 2-mercaptopetanol revelaram que a farinha de sementes de *C. grandiflora* Benth. apresentou mais bandas em comum com o gênero *Dioclea* do que com as espécies da tribo Phaseoleae *Cratylia floribunda* e *Cymbosema* sp. A atividade biológica da ConGF revelou alta atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho não tratados e eritrócitos humanos tipo A, tratados com tripsina. A hemaglutinação em eritrócitos de coelho foi inibida por manose, α -D-metil-piranosídeo, 1-o-Metil- α -D-glicopiranosídeo e as glicoproteínas: mucina suína e bovina e lactotransferrina bovina. A sequência parcial de aminoácidos e nucleotídeos mostrou alta homologia estrutural com as outras sequências de aminoácidos de *Diocleinae*.

O estudo genético revelou, na análise de cromossomos de espécies de *Canavalia* na metáfase, $2n = 22$, número de cromossomos encontrado na maioria das espécies da tribo Phaseoleae. Os cromossomos metafásicos são pequenos e extremamente homogêneos, o que dificultou a preparação de um cariótipo. Os estudos moleculares envolveram a clonagem do gene ConGF em *Escherichia coli*, o sequenciamento e a análise filogenética, incluindo outras lectinas de leguminosas sequenciadas. Para a clonagem, inicialmente, o reagente CTAB mostrou-se eficiente na extração do DNA genômico, apresentando uma banda única, em gel de agarose, de 23.000 pb, sem arrastes. A amplificação do gene ConGF em DNA genômico foi efetuada com iniciadores do gene homólogo ConBr de *Canavalia brasiliensis*, apresentando uma banda única formada por produtos de PCR, em gel de agarose, equivalentes à 870 pb. A mesma banda foi obtida na reação de PCR com plasmídeos extraídos por hidrólise alcalina em clones de *Escherichia coli*, atestando a ocorrência de transformação das bactérias. O estudo filogenético feito com 70 sequências de aminoácidos de lectinas do grupo Fabaceae (= Papilioideae), apesar de muitas incongruências, definiu claramente a subtribo *Diocleinae*, a tribo Vicieae e mostrou que alguns grupos evolutivamente afins, como Galegeae-Vicieae-Trifolieae, Phaseoleae e Sophoreae-Genisteae puderam ser definidos. O estudo evolutivo envolvendo o cálculo das taxas de K_s (taxas de mutações sinônimas) e K_A (taxas de mutações não sinônimas) em sequências de nucleotídeos de lectinas de leguminosas mostraram que estas apóiam a teoria neutralista de Kimura.

ABSTRACT

The aim of the present work was to obtain a biochemical and molecular profiles of a new lectin isolated from seeds of *Canavalia grandiflora* Benth. ConGF was isolated by affinity chromatography in Sephadex G-50 and eluted by 0.1M glucose. SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol of ConGF yielded three distinct bands: α - chain and β - and γ - fragments (25, 50 e 100 kDa, respectively). They are similar with others lectins from sub tribe *Diocleinae*. ConGF amino acid composition exhibited high amount of aspartic acid, serine and leucine. Methionine and cysteine were not present. The lectin showed immunological identities with lectins from *Canavalia* species and partial with *Dioclea rostrata* but not with *D. guianensis* and *Vatairea macrocarpa* lectins. The ConGF lectin showed thermodynamic bindings profiles to deoxy analogs as observed with *Dioclea* lectins. The binding kinetic with glycoproteins exhibited a lectin preference for oligomannosides, specially Man9. The seed flour PAGE-SDS with 2-mercaptoethanol showed a number of bands similar with the genus *Dioclea* but not with those from *Cratylia floribunda* and *Cymbosoma* sp seeds. The lectin present in *C. grandiflora* agglutinated strongly native rabbit erythrocytes and trypsin-treated human A erythrocytes. ConGF was inhibited by mannose, α -D-methyl-pyranoside, 1-o-Methyl- α -D-glucopyranoside and by the glycoproteins porcine and bovine mucin and bovine lactotransferrin.

The genetic studies showed by metaphysic chromosomes analysis on *Canavalia* species $2n = 22$, like the most Phaseoleae tribe. They are small and very homogeneous. The molecular studies were carried out with the cloning in *Escherichia coli*, the gene sequencing and the phylogenetic analysis, including others leguminous lectins. The CTBA was efficient for extraction of DNA, showing a single band, in agarose gel, with 23.000 bp. The PCR amplification in genomic DNA and recombinant plasmids was effected with homologous primers of ConBr (*Canavalia brasiliensis*) gene, presenting only a band with 870 bp. The same DNA band was obtained in the PCR with plasmids from alkaline hydrolysis in *E. coli* clones, which confirms the transformation by the bacteria. The phylogenetic studies upon 70 amino acid sequences of Fabaceae lectins, clearly defined the *Diocleinae* subtribe and the *Vicieae* tribe. Furthermore, the results showed a evolutionary affinities between *Galegeae*-*Vicieae*-*Trifolieae*, *Phaseoleae* and *Sophoreae*-*Genisteae* groups. The evolutive study use the K_s and K_A frequencies in nucleotide sequences of legume lectins, showed Kimura neutralist theory possibilities.

1. INTRODUÇÃO

O mundo vivo caracteriza-se por sua fantástica biodiversidade. No dicionário da língua portuguesa o verbete “diversidade” (do latim *diversitate*) reporta os seguintes significados: 1- diferença, dessemelhança, dissimilitude; 2- divergência, contradição, oposição (FERREIRA, 1986). Sendo um tema recorrente em nossos dias, para o biólogo, o termo biodiversidade¹ abriga muito mais do que fascínio, diante da existência de bactérias e elefantes, pinheiros e baleias, organismos capazes de sobreviver a -20 °C nas áreas polares do planeta e outros totalmente adaptados ao deserto de 70 °C. Através de um olhar mais atento sobre o mundo vivo percebe-se que, tanto quanto a diferença, ou diversidade; chama a atenção a semelhança, a unidade que permeia todos os organismos vivos. A primeira vista, os organismos apresentam projetos completamente diferentes. Por outro lado, do ponto de vista molecular, exibem um padrão característico referente às suas funções e estruturas químicas. Seus biopolímeros são similares: ácidos nucléicos e proteínas, sempre constituídos dos mesmos elementos, quatro bases nitrogenadas e 20 aminoácidos, respectivamente, desempenhando papéis correspondentes. Tanto o código genético quanto a sua correspondente tradução protéica mostram forte correlação entre todos os organismos vivos. As mesmas enzimas mediem as mesmas reações. Uma boa parte dos caminhos metabólicos permanecem essencialmente os mesmos, da bactéria ao homem. Portanto, à luz da bioquímica, “diversidade” da vida poderia também significar “universalidade” da mesma.

Um dos motivos para celebração científica no século XX foi a descoberta da natureza e função do DNA, o ácido desoxirribonucléico – a molécula chave responsável pela hereditariedade dos animais, plantas e de todos os organismos vivos. Com ela, todo um grande número de observações, teorização e experimentação em genética começou a fazer sentido e encontrou o seu cálice no trabalho de James D. Watson e Francis Crick. Sabia-se então que a molécula de DNA era longa e fina, composta de nucleotídeos de adenina, guanina, timina e citosina. Os estudos de difração de raios X, feitos por Maurice King revelaram marcas relativas à voltas de uma gigantesca hélice. Linus Pauling havia sugerido que as proteínas eram muito frequentemente dispostas como as voltas de uma hélice e que a estrutura do DNA poderia ser semelhante. Chargaff, por sua vez, analisando a composição do DNA de diferentes espécies, caracterizou a proporção entre os diferentes nucleotídeos. Matthew Meselson e Franklin Stahl em 1958, descobriram como a molécula se divide para criar duas hélices individuais nas células filhas. À medida que as provas se

¹Biodiversidade é o termo utilizado para definir a variabilidade de organismos vivos, flora, fauna, fungos macroscópicos e microrganismos, abrangendo a diversidade de genes e de populações de uma espécie, a diversidade de espécies, a diversidade de interações entre espécies e a diversidade de ecossistemas

– acumulavam e o entrelaçamento das diversas idéias se tornava mais firme, um corpo de conhecimento sobre o DNA se tornou universalmente aceito.

Desde o modelo de Watson-Crick, de 1953, os pesquisadores têm consciência da natureza fundamental da informação contida no genoma, e há uma década, a tecnologia que permite fazer o sequenciamento do DNA está disponível. Já no mesmo ano de 1953 obteve-se o sequenciamento da primeira proteína, a insulina, por Frederick Sanger. Desde então, numerosas bases de dados, contendo milhares de seqüências de proteínas e genes, estão disponíveis para o público. Com a virada do milênio a pedra de toque da biologia molecular tornou-se o sequenciamento completo do genoma de organismos. Atualmente conhece-se a seqüência completa de cerca de 800 organismos, desde aqueles completamente sequenciados quanto aqueles cuja seqüência está em progresso (SIMPSON *et al.*, 2000). Os três principais domínios da vida, *Bacteria*, *Archae* e *Eukaryota* estão representados. Na virada do milênio, o controvertido Projeto Genoma propôs-se a sequenciar os 3 bilhões de pares de bases do genoma humano e pretende mapear cerca de 8 mil genes contidos nos cromossomos humanos.

A moderna Biologia certamente não se iniciou com os projetos atuais de sequenciamento, mas é reconhecível que uma grande aceleração na acumulação do conhecimento biológico começou em nossa era. Para que este conhecimento faça sentido e se torne de fato uma mudança, torna-se necessário que reconsideremos nosso conhecimento das células e organismos. Uma parte deste trabalho consistiria simplesmente na organização, classificação e análise da imensa riqueza dos dados de seqüências. Assim, muitos genes com funções bioquímicas fundamentais encontrados em grande número de espécies seriam alinhados e analisados para o estudo de relações filogenéticas. A face oculta dessas informações seria reconhecer e discernir significativas similaridades entre seqüências que divergiram num passado mergulhado em um caos de mutações randômicas, seleção natural e deriva genética.

A natureza funciona antes como um reformador do que como um inventor (JACOB, 1977). Sabe-se que novas seqüências são obtidas sempre por rearranjo das seqüências pré-existentes ao invés de serem propostas *de novo*. Este aspecto torna-se de extrema vantagem para o biólogo, pois torna possível a análise computacional de seqüências. Os sistemas computacionais adicionam uma boa vantagem aos usuários na análise de dados de seqüências. Através destas análises torna-se possível reconhecer quando ocorre uma significativa similaridade entre uma seqüência em análise e uma seqüência sobre a qual algo já é conhecido; quando isso ocorre é possível transferir informações sobre a estrutura e/ou função para a nova seqüência. Pode-se inferir então, que duas seqüências são chamadas *homólogas* e que torna-se possível a transferência de informações por *homologia*. A imensa acumulação de seqüências de aminoácidos de milhares de proteínas diferentes e sua análise têm possibilitado reconstruir muitos dos eventos genéticos que originaram os táxons de sistemas vivos existentes atualmente.

A primeira seqüência de uma lectina foi obtida de sementes de *Canavalia ensiformis*, a Con A. (EDELMAN *et al.*, 1972; CUNNINGHAM *et al.*, 1975). A partir deste momento, alguns milhares de seqüências

de lectinas de plantas, animais e microorganismos², estão disponíveis para estudo. Na busca de uma perspectiva filogenética, vários trabalhos têm caracterizado as lectinas vegetais de leguminosas como marcadores taxonômicos (OLIVEIRA *et al.*, 1990; MOREIRA *et al.*, 1993), determinando famílias protéicas (CAVADA *et al.*, 1993; RAMOS *et al.*, 1996) e buscando relações evolucionárias (RAMOS, 1997; ROUGÉ *et al.*, 1987). De forma geral, a maioria destes trabalhos concordam com a hipótese de que, pela comparação estrutural das lectinas de leguminosas já estudadas, mais especificamente em *Diocleinae*, fortes similaridades estruturais vêm à tona, atestando tanto uma provável ancestralidade comum da proteína como um papel fisiológico similar nestas plantas.

Este trabalho propõe apresentar, entre outros resultados, a comparação de seqüências de lectinas de leguminosas, especialmente da sub-tribo *Diocleinae*, incluindo entre estas uma sequência inédita de nucleotídeos da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. Sabe-se que seqüências em evolução acumulariam inserções e deleções, portanto, antes da similaridade entre duas seqüências ser avaliada, o tratamento inicial típico é encontrar o melhor alinhamento possível entre elas. Este é capaz de produzir uma árvore que expressaria a relação filogenética entre os organismos estudados. Estes dados, em conjunto com uma caracterização bioquímica parcial desta lectina, buscarão estender um pouco mais o conhecimento sobre a caracterização bioquímica e as relações filogenéticas das lectinas da subtribo *Diocleinae*, propondo também, na medida do possível, um contraponto as lectinas de leguminosas em geral que já tiveram suas seqüências de aminoácidos e/ou nucleotídeos já determinadas.

Desta forma, este trabalho propõe-se a ampliar um pouco mais, sempre de forma não definitiva, o conjunto de conhecimentos relativos as lectinas de leguminosas, buscando algumas respostas a pertinentes perguntas acumuladas desde que Stiemark, em 1888, definiu o fator hemaglutinante.

² Cerca de 5110, incluindo seqüências de nucleotídeos e aminoácidos (Genbank, acesso em 06/02/01)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho são a caracterização bioquímica e genética de uma nova lectina da subtribo *Diocleinae*, doravante denominada ConGF, obtida de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⌘ Clonagem do gene da lectina de sementes de *C. grandiflora* Benth. (ConGF) homólogo ao gene da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* no vetor procariótico *Escherichia coli*.
- ⌘ Sequenciamento de nucleotídeos do gene da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. e estabelecimento de sua relação filogenética com outras lectinas.
- ⌘ Comparações evolutivas entre leguminosas com o uso de seqüências de lectinas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Lectinas vegetais: A BUSCA DA IDENTIDADE

(Definições – Classificações)

Desde a descoberta do fator hemaglutinante de *Ricinus communis* por Stillmark em 1888, as lectinas, ou aglutininas, de forma geral, são conhecidas como “classe de proteínas capazes de se ligar reversivelmente à mono ou oligossacarídeos”. A classificação da maioria das lectinas extraídas de plantas se refere somente à essa capacidade de se ligar e reconhecer especificamente determinado carboidrato, diferindo em maior ou menor grau com relação às especificidades aos carboidratos ligantes, às suas estruturas moleculares e propriedades bioquímicas e biológicas. Assim, e pelo fato do papel biológico das lectinas de plantas ser quase, ou ainda totalmente obscuro, a classificação dessas proteínas mostra-se inconclusiva e vêm sendo objeto de inúmeras controvérsias de seus estudiosos.

Esta indefinição remonta à própria história das lectinas. À medida que novas propriedades vêm sendo descobertas, novos termos e definições vêm sendo produzidos. O termo “hemaglutinina” proposto por Elfstrand em 1898, referia-se aos efeitos de proteínas de extratos vegetais testadas em animais. Recentemente, PEUMANS & VAN DAMME, 1995, revisando estes antigos termos, ressaltaram que sob o ponto de vista da capacidade de aglutinação e não no sentido de “selecionar” um determinado grupo sanguíneo, o termo “aglutinina” poderia ser mais adequado ao uso para as proteínas aglutinadoras do que o termo “lectina”.

Do latim, o verbo “*legere*” significa selecionar. Este termo foi utilizado inicialmente por Boyd para designar algumas proteínas capazes de se ligar a carboidratos, aglutinando eritrócitos específicos do sistema humano ABO. Com o envolvimento de açúcares nestas reações aglutinadoras, GOLDSTEIN *et al.*, (1980) consideraram lectinas como: proteínas ligantes à carboidratos, de origem não imune que aglutinam células ou precipitam polissacarídeos ou glicoconjungados.

Entretanto, o termo *aglutinina* excluiria toxinas bem conhecidas, como a abrina, ricina, modecina, etc, que são pouco aglutinantes e que contém subunidades estruturalmente reconhecidas como lectinas (KOCOUREK & HOREJSI, 1983). Estes autores sugeriram então, uma das definições mais gerais, em que as lectinas seriam: *proteínas (ou glicoproteínas) de natureza não-imunoglobulínica*, capazes de reconhecimento específico, e de ligação reversível, formando misturas de glicoconjungados sem alterar a estrutura covalente de qualquer dos ligantes glicosil reconhecidos. Assim, outras proteínas ligantes à açúcares, como enzimas, hormônios e proteínas de transporte seriam excluídas, porém as lectinas

monovalentes estariam inclusas. Entretanto, algumas lectinas atualmente são reagrupadas e tratadas como exceção. A ricina foi a primeira lectina, investigada na Rússia à mais de 100 anos atrás. Atualmente é tratada como RNA-N-glicosidase. A galectina-10 é conhecida como lisofosfolipase e lectinas do tipo I como as sialoadesinas agora são membros da superfamília das imunoglobulinas.

MAKELA (1957) classificou as lectinas em quatro grupos distintos, dependendo da especificidade por açúcares simples: *grupo I* (L-fucose), *grupo II* (D-galactose, N-acetil-galactosamina), *grupo III* (D-glicose, D-manoze) e *grupo IV* (D-idose, L-glicose e L-xilose). Lectinas que poderiam reagir com açúcares do grupo IV de MAKELA (1957) nunca foram relatadas (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986). Através da combinação de ensaios de inibição de atividade hemaglutinante e cromatografia de afinidade, observados nos trabalhos de DEBRAY & ROUGÉ (1984); WU *et al.*, (1992) e DEBRAY *et al.*, (1994); mostrou-se que é característico das lectinas que, apesar de se classificarem em determinado grupo, as lectinas de um mesmo grupo podem apresentar diferenças na afinidade quando oligossacarídeos mais complexos são testados. Esta observação sugere que outros aminoácidos, além do sítio de interação a monossacarídeos interagem com estes carboidratos acarretando a estas lectinas, diferenças na especificidade fina por açúcares. As lectinas de leguminosas, por exemplo, possuem uma região na estrutura tridimensional rica em aminoácidos hidrofóbicos (cavidade hidrofóbica) que se ligam a β -(O-iodofenil)-O-glicopiranósídeo (ROUGÉ *et al.*, 1987).

A definição atual e, provavelmente, mais utilizada (PEUMANS & VAN DAMME, 1995) considera que o pré-requisito para que uma proteína possa ser reconhecida como lectina seria a *presença de ao menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente à carboidrato específico*. Deste modo, derivaram três divisões baseados na estrutura geral da proteína: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As **merolectinas** seriam proteínas pequenas, de uma cadeia polipeptídica com um simples domínio ligante a carboidrato, portanto, são não aglutinadoras. As **hololectinas** contém dois ou mais sítios de ligação à carboidratos, idênticos ou muito homólogos, portanto, capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjungados. As **quimerolectinas**, proteínas de fusão, além do domínio carboidrato-ligante, possui um domínio com atividade catalítica bem reconhecida, ou outra atividade biológica, atuando independente do domínio carboidrato-ligante. Estas podem ser mais ou menos aglutinadoras, dependendo do número de sítios ligantes a carboidrato. Posteriormente, os autores citados introduziram uma quarta categoria, as **superlectinas**, que são as que possuem em sua estrutura, pelo menos dois sítios de ligação à carboidratos completamente diferentes quanto à sua especificidade.

Sendo uma molécula encontrada praticamente em todas as classes de organismos, algumas famílias representativas de lectinas já estão razoavelmente definidas, mais especificamente quanto à caracterização biológica:

- **Galectinas** são uma família de lectinas animais. Todas mostram especificidade à galactose;
- **Lectinas animais Ca-dependentes ("C-type")** formam uma família extensa, composta por membros com diferentes estruturas e funções;
- **Selectinas** formam uma subfamília das C-lectinas por possuírem uma função específica na adesão de leucócitos à células endoteliais através de reconhecimento da estrutura sialil-LewisX;
- **Colectinas**, outra subfamília das C-lectinas, é específica à manose, possui uma única estrutura consistindo de um domínio C-type e um domínio colágeno-like. Estão supostamente envolvidas na imunidade inata.
- **Anexinas**, são um grupo de proteínas com afinidade à lipídeos, mas recentemente foi demonstrado serem lectinas com afinidade para glicosaminoglicanas. São de origem animal, mas são encontradas também no reino vegetal.
- O grupo das **lectinas de leguminosas** contém um grande número de membros, estruturalmente bem definidos.

Sob o ponto de vista da biologia molecular, as lectinas poderiam ser congregadas sob o conceito de família protéica, desde que objetivamente se passe a conhecer as relações evolucionárias entre elas.

- **3.2 Lectinas vegetais: CONSIDERAÇÕES GERAIS**
(Estrutura molecular - Caracterização bioquímica)

A presença de lectinas na maioria das famílias do reino vegetal, conjuntamente com a manutenção da maioria de suas características principais é um indicativo seguro que estas moléculas desempenham uma papel de extrema importância na sobrevivência destas espécies. É importante salientar que a sua aparente ausência em algumas espécies têm sido considerada com muito cuidado, pois é sabido que os ensaios de reconhecimento de lectinas mostram-se pouco sensíveis e podem resultar em pouca ou nenhuma detecção, justamente por dificuldades na extração das lectinas ou uso de receptor não apropriado para o teste de atividade.

A maioria das lectinas purificadas e caracterizadas foram obtidas de plantas dicotiledôneas. Com a descoberta da aglutinina de trigo (WGA), a primeira lectina de uma monocotiledônea, no caso uma gramínea, por BURGER & GOLDBERG (1967); mais lectinas foram isoladas tanto desta, como de outras famílias, como da família Liliaceae (ODA *et al.*, 1987), Amaryllidaceae (OOI *et al.*, 2000), Alliaceae e Araceae (VAN DAMME *et al.*, 1991; HONQING *et al.*, 1993). Várias lectinas de gramíneas, tais como as de *Triticum aestivum*, *Secale cereale*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Brachypodium sylvaticum* e *Agropyrum repens* (CARRASCO *et al.*, 1985) foram purificadas e caracterizadas. Exceptuando-se a lectina de arroz (TABARY *et al.*, 1987), todas as lectinas de gramíneas possuem uma estrutura bastante similar, composta de dímeros de M_r 18000 cada subunidade e reconhecem GlcNAc (*N*-acetil-D-glicosamina), oligômeros de GlcNAc ou GalNAc (*N*-acetil-D-galactosamina). As lectinas de Amarilidaceae são dímeros ou tetrâmeros compostos de subunidades com M_r 13000, específicas para manose e oligômeros de manose e não aglutinam eritrócitos humanos. *Colocasia esculenta* e *Alocasia indica* são espécies cujas lectinas foram purificadas e mais estudadas (SINGH *et al.*, 1993). As espécies descritas no trabalho de SHANGARY *et al.*, (1995); *Arisaema consanguineum*, *A. curvatum*, *Gonatanthus pumilus* e *Sauromatum guttatum* pertencem à família Araceae.

A TABELA 01 relaciona lectinas vegetais (não incluindo leguminosas) com a seqüência primária de aminoácidos já obtida.

TABELA 01 - Lectinas de várias famílias vegetais (não leguminosas) com sequência primária (de aminoácidos) determinada, disponíveis no GeneBank.

Família	Nome	Referência básica
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i>	VAN DAMME et al., (1996)
Alliaceae	<i>Allium cepa</i>	VAN DAMME et al., (1993a)
	<i>Allium porrum</i>	VAN DAMME et al., (1993a)
	<i>Allium sativum</i>	VAN DAMME et al., (1992)
	<i>Allium ursinum</i>	VAN DAMME et al., (1993b)
Amaryllidaceae	<i>Clivia miniata</i>	VAN DAMME et al., (1994a)
	<i>Galanthus nivalis</i>	VAN DAMME et al., (1991)
Brassicaceae	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HERVE et al., (1996)
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i>	VAN DAMME et al., (2000)
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita argyrosperma</i>	BOSTWICK et al., (1994)
	<i>Cucurbita maxima</i>	BOSTWICK et al., (1992)
	<i>Cucurbita moschata</i>	BOSTWICK et al., (1992)
Iridaceae	<i>Crocus vernus</i>	VAN DAMME et al., (2000a)
Liliaceae	<i>Tulipa</i> sp.	VAN DAMME et al., (1996c)
Moraceae	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	DHANARAJ et al., (1988)
	<i>Artocarpus integer</i>	RUFFET et al., (1992)
	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	DHANARAJ et al., (1988)
Orchidaceae	<i>Cymbidium</i> sp.	VAN DAMME et al., (1994b)
	<i>Epipactis helleborine</i>	VAN DAMME et al., (1994b)
	<i>Gastrodia elata</i>	VAN DAMME et al., (1994b)
	<i>Listera ovata</i>	VAN DAMME et al., (1994b)
Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	WILKINS & RAIKHEL (1989)
	<i>Triticum aestivum</i>	WRIGHT & OLAFSDOTTIR (1986)
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i>	CHAPOT et al., (1986)

3.3 Lectinas vegetais: UMA PERSPECTIVA FILOGENÉTICA (Biologia molecular – Filogenia)

3.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os anos 80 foram alvo de uma rápida acumulação de dados advindos de seqüenciamento, tanto de proteínas como de fragmentos de DNA. A partir daí bancos de dados disponibilizam na rede mundial de computadores milhares destas seqüências. Como consequência, tanto programas computacionais como artigos reportando filogenias baseadas nestas seqüências vêm aumentando de uma maneira exponencial (PAGEL, 1999). O resultado é que uma nova era de estudos biológicos está emergindo, possibilitando novos meios de investigar a evolução da vida na Terra. Alguns destes estudos envolvem a possibilidade de se inferir quais seriam as características das espécies ancestrais (GOLDING & DEAN, 1998), a estimativa do tempo de aparecimento de eventos da história evolutiva (STRAUSS, 1999), teste de modelos evolutivos (pontuais ou graduais) (GOULD & ELDREDGE, 1993) e estudos comparativos entre organismos atuais (PAGEL 1993).

O alinhamento simultâneo entre muitas seqüências de nucleotídeos ou aminoácidos tornou-se atualmente uma ferramenta essencial em biologia. Alinhamentos múltiplos são utilizados para variados fins, como encontrar padrões que se tornarão diagnósticos para caracterizar famílias protéicas (DOOLITTLE, 1992; SHANKLIN, 2000); para detectar ou demonstrar a homologia entre novas seqüências em famílias de seqüências já conhecidas (BLOCH & RICHARDSON, 1991); para ajudar a predizer a estrutura secundária ou terciária de novas seqüências (RUSSEL *et al.*, 1997), para sugerir oligonucleotídeos iniciadores para PCR e como um prelúdio no estudo evolucionário molecular (CAVALCANTI & FERREIRA, 1998).

Com a introdução de novas técnicas de biologia molecular, as seqüências de aminoácidos têm sido a maior ferramenta para o estudo do processo de evolução molecular (DAYHOFF, 1978). Analisando as seqüências acumuladas de aminoácidos de espécies de organismos e de várias famílias protéicas, muito se conheceu sobre as características das substituições de aminoácidos ocorridas durante a evolução. O advento de seqüências nucleotídicas disponíveis propiciou um rápido aumento no conhecimento das estruturas primárias dos genes.

As proteínas são consideradas excelentes caracteres taxonômicos, já que as seqüências de aminoácidos são o resultado direto da transcrição e tradução da seqüência nucleotídica dos genes. O estudo de uma proteína, entretanto, pode ser mais útil em um determinado grupo do que em outro. Um dos motivos para isso seria a possibilidade de que as taxas de evolução de uma proteína podem não estar correlacionadas com taxas obtidas com outros caracteres taxonômicos (GRUNDY & NAYLOR, 1999). Ou

seja, determinadas proteínas possuem taxas de evolução diferentes, mais rápidas ou mais lentas do que outros caracteres taxonômicos. Como exemplo bem conhecido temos as histonas (WOLFE *et al.*, 1987).

A comparação de seqüências de aminoácidos de duas (ou mais) proteínas homólogas envolve também alguma cripticidade devido à degeneração do código genético. Assim temos que duas seqüências de aminoácidos aparentemente idênticas podem ter sua origem em genes que diferem entre si em maior ou menor grau de degenerescência. Juntando-se a isso a possibilidade que diferentes partes de uma seqüência de aminoácidos podem ser oriundas de diferentes partes do genoma e assim, outra informação genética que aquela proveniente de genes estruturais, geralmente lineares, pode ser inserida na determinação de uma seqüência de aminoácidos de uma proteína. As proteínas mostram também convergência ou paralelismo, além de mutações retroativas de aminoácidos que podem levar à conclusões erradas de homologia (BOULTER, 1981).

As leguminosas, como grupo, contém várias centenas de tipos diferentes de proteínas. Estas proteínas exibem variadas funções e através destas características são reunidas e classificadas. As proteínas mais utilizadas nos estudos taxonômicos com leguminosas são proteínas de armazenamento das sementes, lectinas, inibidores de proteases e proteínas do nódulo fixador de N₂ conhecidas como nodulinas. As nodulinas caracterizam um grupo genérico de proteínas específicas dos nódulos de leguminosas (VAN KAMMEN, 1984). Num trabalho sobre a domesticação de *Phaseolus*, o teor e a atividade de nodulinas (leghemoglobina, fosfoenolpiruvato carboxilase e glutamina sintetase) foram obtidos de cultivares de *P. vulgaris*, incluindo variedades selvagens, oriundas dos dois centros de domesticação (andino e mesoamericano). As variedades domesticadas mostraram um leve aumento nas atividades de nodulinas, porém a baixa variabilidade dentro deste material relativo aos centros de origem sugeriram que a diversidade para a fixação biológica de nitrogênio pode haver sido reduzida pela domesticação (CECCATTO, *et al.* 1998).

3.3.2 – BIOLOGIA MOLECULAR DE LECTINAS VEGETAIS

Uma das lectinas tóxicas mais estudadas é a ricina (lectina de *Ricinus communis*). A clonagem e a expressão da ricina foi obtida por CHANG *et al.*, (1987); RICHARDSON *et al.*, (1988) e O'HARE *et al.*, (1992); em células COS-M6, levedura e *E. coli*, respectivamente. O trabalho de VAN DAMME *et al.*, (2000) reportou a presença de RIPs tipo 2, cuja modelagem molecular mostrou uma estrutura similar à da ricina, na monocotiledônea *Polygonatum multiflorum* L. Os clones genômicos obtidos revelaram alto grau de similaridade com outras RIPs tipo 2. Esta proteína foi inicialmente identificada no trabalho de VAN DAMME *et al.*, (1996) como uma lectina de ligação à manose, com 4 subunidades formando um tetrâmero, a análise sequencial obtida pela clonagem de cDNA revelou alta similaridade com lectinas que apresentam ligações a

- manose, típicas da família Liliaceae, cujas espécies produzem uma superfamília de lectinas manose específicas.

Uma aglutinina encontrada em *Abrus precatorius* foi considerada como proteína de baixa toxicidade, mostrando-se menos letal que a abrina em ratos. A análise da sequência de nucleotídeos de um clone de cDNA desta mostrou alta homologia (77,8%) com a abrina. Um estudo de mutagênese dirigida mostrou que uma prolina (Pro-199) seria um dos fatores contribuintes pela baixa toxicidade desta aglutinina (LIU et al., 2000).

A sequência completa de aminoácidos da lectina de *Phaseolus vulgaris* (cv. Tandergreen) foi deduzida a partir da sequência de nucleotídeos de um cDNA plasmidial. A lectina mostrou-se ser sintetizada como um peptídio com uma seqüência sinal composta de 20 resíduos tornando-se uma proteína madura de 223 aminoácidos (HOFFMAN et al., 1982). Fisiologicamente, os transcritos de RNAm de lectina iniciam sua acumulação nos cotilédones da plântula no estágio de 9 mm aumentando em quantidade até o estágio de 16 mm, após o qual os níveis rapidamente diminuem. Em adição, grandes quantidades de transcritos de lectina são detectáveis nos cotilédones em fase de maturação. A unidade de transcrição da lectina é flanqueada por seqüências com um conteúdo excepcionalmente alto (72 a 75%) em nucleotídeos A e T e a região adjacente ao gene mostrou possuir elementos controladores da transcrição do gene em proteína (HOFFMAN, 1994).

Posteriormente, HOFFMAN & DONALDSON, (1985) observaram que ocorrem dois genes, responsáveis pela codificação de duas fitohemaglutininas (PHA-E e PHA-L) que codificam proteínas aglutinadoras de eritrócitos e leucócitos, respectivamente. Retirando-se seqüências anteriores ao gene PHA-L verificou-se que estas regiões anteriores ao gene modulam quantitativamente a expressão da proteína. Estas seqüências são altamente homólogas à domínios protéicos localizados anteriormente aos genes de lectina de sementes de soja e aos genes inibidores de tripsina de Kunitz (RIGGS et al., 1989). Os autores consideraram que as interações DNA/proteína sejam evolutivamente conservadas nestes genes de leguminosas.

Os estudos de mutação sítio-dirigida, aliada à clonagem e expressão da proteína, tem possibilitado entender porque algumas mutações pontuais são capazes de alterar completamente uma lectina e consequentemente sua ação biológica. Em sementes de *P. vulgaris* cultivar Pinto (VOLKER et al., 1990) foi encontrada deficiência na lectina PHA, não existindo o polipeptídeo PHA-E e ocorrendo somente traços do polipeptídeo PHA-L. O gene codificante para a PHA-E neste cultivar é um pseudogene resultante de uma simples deleção no códon 11, causando um erro de leitura e terminação prematura da tradução. O gene mutante fundido com partes do gene "normal" e o gene mutante "corrigido" foram montados em vetores e introduzidos em células de tabaco. Ambas as construções gênicas produziram acumulação de transcritos. A simples correção na troca de bases foi capaz de elevar os níveis do transcrito a um fator de 40, resultando na síntese de PHA-E em níveis normais.

Baseados nas seqüências de aminoácidos de lectinas de legumes e na estrutura tridimensional dos complexos lectina–carboidrato identificou-se a Asn-128 como um ótimo candidato para mutagênese sítio-dirigida para criar um mutante PHA-L que não se ligasse a carboidratos. O gene mutante obtido desta forma e o tipo "normal" foram clonados em células de tabaco e produziram suas respectivas lectinas. Tanto a leucoaglutinação quanto as atividades mitogênicas características da PHA-L foram eliminadas com a mutação, confirmando a premissa de que a ligação à carboidratos é essencial para a atividade biológica desta proteína. Os polipeptídeos mutantes formaram tetrâmeros normais e foram transportados aos vacúolos onde se acumularam. Observou-se que apesar do pouco distúrbio na estrutura tridimensional da proteína, a mutação pontual foi suficiente para alterar completamente o perfil catalítico da PHA-L (MIRKOV & CHRISPEELS, 1993).

Em *Arabidopsis thaliana*, WHITHAM *et al.*, (2000) estudando o possível gene da resistência ao potivírus TEV de tabaco, encontraram que o produto deduzido deste gene é similar à cadeia alfa da lectina de *Artocarpus integrifolia* (jacalina) e também à conjuntos de proteínas que contêm múltiplas repetições de seqüências jacalina-like. De acordo com o trabalho de CHISHOLM *et al.*, (2000) estas repetições de seqüências estariam implicadas na defesa vegetal contra vírus, fungos e insetos. HERVE *et al.*, (1996) em *A. thaliana*, caracterizaram um gene para um receptor de quinases. Este polipeptídeo previsto a partir do gene mostrou manter um domínio extracelular lectina-like, similar à lectinas de legumes.

O cDNA da aglutinina de soja (SBA), uma lectina glicoprotéica, obtida de RNAm de sementes na média-maturação, foi clonado por ADAR *et al.*, (1997), em um fago *lambda* gt 10 e subclonado em um plasmídeo pUC8 e expresso em *E. coli*. Os autores encontraram que a glicosilação não é necessária para o dobramento da proteína, nem para a reunião de suas subunidades para a formação de um tetrâmero protéico ativo.

3.3.3 SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS E NÃO SINÔNIMAS EM GENES E A TEORIA NEUTRALISTA

Um dos modos de medir os efeitos da seleção natural na evolução molecular é estimar separadamente as taxas de substituições sinônimas (K_S), ou que não levam a alterações nos aminoácidos e as não-sinônimas (K_A) ou que levam à alterações nos aminoácidos. Por exemplo, as diferenças entre dois códons GTC (Val) e GTT (Val) é sinônima, enquanto que diferenças entre dois códons GTC (Val) e GCC (Ala) é não-sinônima.

A taxa de substituições não-sinônimas é extremamente variável entre genes diferentes. Proteínas extremamente conservadas como alguns hormônios (somatostatina-28 e insulina) têm K_A

- extremamente baixo, chegando a zero nas histonas 3 e 4. Outras evoluem a taxas intermediárias como a eritropoetina, as hemoglobinas e mioglobina e outras em elevadas taxas (interleucina, apolipoproteínas e imunoglobulinas) (LI & GRAUR, 1991). As causas deste contraste em um gene, ou diferentes genes, são atribuídas a um bem conhecido e razoavelmente bem aceito princípio da evolução molecular, conhecido como “restrição funcional”. Acredita-se que proteínas, ou partes destas, que são funcionalmente menos importantes evoluem, em termos de taxas de substituição de nucleotídeos, mais rapidamente que aquelas consideradas como mais funcionais, as proteínas-chave do metabolismo e, nestas, os sítios ativos ou de ligação. Assim, as taxas de K_A e K_S seriam maiores em proteínas, ou partes destas não sujeitas à restrições funcionais.

As taxas de substituição de nucleotídeos estão sujeitas a dois fatores: a taxa de mutação e a probabilidade de fixação de uma mutação. A última vai depender se esta for vantajosa, neutra ou deletéria. Mutações que resultam em alterações em aminoácidos possuem uma chance maior de causar um efeito deletério na função da proteína, do que as mutações sínônimas ou silenciosas e seriam eliminadas da população, diminuindo a taxa K_A . Este fato é verificável mesmo em imunoglobulinas. A maioria das mutações não-sínônimas são desvantajosas e são eliminadas da população (TANAKA & NEI, 1989). HUGHES & NEI, (1989) reportaram uma situação similar em certas regiões dos genes do maior complexo de histocompatibilidade, onde a taxa $K_A > K_S$, foi atribuída à seleção sobredominante.

Em 1968, Kimura postulou que a maioria das mudanças moleculares na evolução são devidas à fixação randômica de mutações neutras (KIMURA, 1968). Esta hipótese, conhecida como *teoria neutra da evolução molecular*, postula que, ao nível molecular, a maioria das mudanças evolucionárias e muito da variabilidade entre espécies são causadas, não por seleção positiva de alelos vantajosos, como preconiza o selecionismo (ou neo-Darwinismo), mas pela deriva genética randômica. Assim, a teoria neutralista coloca que a frequência dos alelos gênicos é puramente estocástica. Enquanto os selecionistas mantém que poucas mutações são neutras e a maior fração delas é seletiva, os neutralistas mantém que a maioria das mutações não-deletérias são efetivamente neutras.

Entre as inúmeras metodologias antevistas para a problemática selecionista/neutralista, o uso de correlações K_A/K_S vêm sendo utilizado por diversos autores. OHTA & INA (1995) reportaram que um dos modos de medir os efeitos da seleção natural é a estimativa das taxas de substituições sínônimas e não sínônimas. Assim, a ocorrência de forte seleção adaptativa afetaria ambas as categorias de substituições, entretanto as substituições que acarretam alterações de aminoácidos estão mais expostas à seleção que as sínônimas. Genes onde $K_A > K_S$ ocorre, são considerados sob seleção Darwiniana positiva, resultado obtido em trabalhos como os de GARCIA-MAROTO *et al.*, (1991); com genes da α -amilase/inibidores de tripsina; MESSIER & STEWART (1997); com lisozimas de primatas; HUGHES & NEI (1989); com genes do complexo de histocompatibilidade classe II.

— A forte correlação entre taxas sinônimas e não sinônimas é observável não só entre genes como dentro de um gene. MOUCHIROUD *et al.* (1995) verificando genes de mamíferos encontraram que as frequências de substituições sinônimas são correlacionadas com as frequências de não-sinônimas em um mesmo gene, ou seja, para um determinado par de espécies são correlacionados com outro par de espécies para o mesmo gene.

TABELA 02 – Lectinas de várias lectinas vegetais (incluindo leguminosas) com sequência primária (de nucleotídeos) determinada, cujas seqüências estão disponíveis no GenBank.

Nome	Família	Acesso Genbank	Referência(s) básica(s)
<i>Abrus precatorius</i>	Faboideae	16084	WOOD et al., (1991)
<i>Allium cepa</i>	Alliaceae	404657	VAN DAMME et al., (1993a)
<i>Allium ascalonicum</i>	Alliaceae	404659	VAN DAMME et al., (1993a)
<i>Allium porrum</i>	Alliaceae	404661	VAN DAMME et al., (1993a)
<i>Allium ursinum</i>	Alliaceae	2570268	SMEETS et al., (1997)
<i>Arachis hipogaea</i>	Faboideae	951109	*
<i>Arum maculatum</i>	Araceae	606711	VAN DAMME et al., (1995)
<i>Bauhinia purpurea</i>	Caesalpinoideae	217872	KUSUI et al., (1991)
<i>Brassica napus</i>	Brassicaceae	1711295	*
<i>Calystegia sepium</i>	Convolvulaceae	1730285	VAN DAMME et al., (1996a)
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Faboideae	2225920	GRANGEIRO et al., (1997)
<i>Canavalia ensiformis</i>	Faboideae	312382	CARRINGTON et al., (1985)
<i>Canavalia gladiata</i>	Faboideae	18009	YAMAUCHI & MINAMIKAWA (1990)
<i>Cladrastis lutea</i>	Faboideae	1141754	VAN DAMME et al., (1995)
<i>Cucurbita maxima</i>	Cucurbitaceae	18068	BOSTWICK & THOMPSON, (1993)
<i>Clivia miniata</i>	Liliaceae	289870	VAN DAMME et al., (1994a)
<i>Cymbidium</i> sp.	Orchidaceae	436826	VAN DAMME et al., (1994b)
<i>Dolichos biflorus</i>	Faboideae	388102	SCHNELL & ETZLER (1988)
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Dictyosteliida	469198	FUKUZAWA & OCHIAI (1996)
<i>Epipactis helleborine</i>	Orchidaceae	436824	VAN DAMME et al., (1994a)
<i>Erythrina corallodendron</i>	Faboideae	288302	ARANGO et al., (1990)
<i>Galanthus nivalis</i>	Amaryllidaceae	168179	*
<i>Glycine max</i>	Faboideae	170005	VODKIN et al., (1983)
<i>Griffonia simplicifolia</i>	Faboideae	1336797	ZHU et al., (1996)
<i>Hedysarum alpinum</i>	Faboideae	1871523	*
<i>Hippeastrum</i> sp.	Amaryllidaceae	1688124	*
<i>Hordeum vulgare</i>	Poaceae	167070	LERNER & RAIKHEL (1989)
<i>Listera ovata</i>	Orchidaceae	431098	VAN DAMME et al., (1994)
<i>Maackia amurensis</i>	Faboideae	1755075	*
<i>Medicago truncatula</i>	Faboideae	19666	BAUCHROWITZ et al., (1992)
<i>Narcissus</i> sp.	Amaryllidaceae	168736	*
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	530789	WILKINS & RAIKHEL (1989)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Faboideae	169315	JOHN & LONG (1990)
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	251807	ROBERTS et al., (1992)
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Faboideae	538528	YOSHIDA et al., (1994)
<i>Sambucus nigra</i>	Adoxaceae	2331045	*
<i>Sophora japonica</i>	Faboideae	1755067	VAN DAMME et al., (1997)
<i>Trifolium pratense</i>	Faboideae	1872139	*
<i>Tulipa</i> sp.	Liliaceae	1141760	VAN DAMME et al., (1996b)
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	170561	LERNER & RAIKHEL (1992)

* Não apresentou trabalho publicado

3.4 Lectinas de Leguminosas – UMA VISÃO GERAL

(Estrutura molecular – Caracterização bioquímica)

3.4.1 O objeto de estudo - *Canavalia grandiflora* Benth.

A família Leguminosae compreende mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13.000 espécies, espalhadas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores das matas tropicais, arbustos, subarbustos, ervas anuais e perenes e trepadeiras. Vivem nos mais variados ambientes em diferentes latitudes e altitudes. O fruto é variado, geralmente legume. Todas são plantas com a possibilidade de fixar o nitrogênio atmosférico, através de simbiose com bactérias nas raízes, formando uma estrutura conhecida como nódulo radicular (JOLY, 1985).

O gênero *Canavalia*, não obstante a sua crescente importância econômica, para a nutrição animal, em regiões neotropicais é um gênero carente de informações taxonômicas e ecológicas. A bibliografia especializada é dispersa e pouco acessível. O gênero possui uma ampla distribuição nas regiões tropicais (pantropical). Ocorrem 30 espécies no Novo Mundo e 15 no Velho Mundo (D'ARCY, 1980). A Tabela 3 traz a taxonomia do gênero (SMARTT, 1990). Sua importância para a alimentação animal se concentra no alto conteúdo de proteínas assimiláveis (27 a 29%) que apresenta em folhas, flores, frutos e sementes e também, por diversos usos antigos (NAS, 1979). A espécie *C. ensiformis* tem sido a espécie mais utilizada em escala comercial com vistas à nutrição animal como fonte protéica e como adubação verde.

O gênero *Canavalia*, apesar de apresentar poucas espécies economicamente importantes e também por ser pouco explorado agronomicamente, provê um excelente material de estudo para os bioquímicos. Um grande número de compostos encontrados nas suas sementes têm sido extraídos e investigados. Estes trabalhos iniciaram-se há mais de 70 anos quando SUMNER (1926) extraiu e cristalizou a urease, uma proteína valorizada nos laboratórios clínicos. BOULTER & DERBYSHIRE (1971) encontraram que as características eletroforéticas das proteínas de *C. ensiformis* e *C. gladiata* eram extremamente similares. WOLFF & KWOLEK (1971) classificaram o gênero como grupo com baixo conteúdo de lipídeos (\pm 2,6%). O conteúdo de polissacarídeos (amido) é relativamente alto segundo o trabalho de BAILEY (1971). Foi reportada ainda a presença de alcalóides (MEARS & MABRY, 1971), saponinas (CHARAVANAPVAN, 1943) e giberelinas (HARBORNE, 1971).

LACKEY (1981) coloca o gênero *Canavalia* na subfamília Faboideae, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Diocleinae*. A tribo *Phaseoleae* é considerada, do ponto de vista econômico, como a mais importante

das Faboideae, pelo grande número de gêneros úteis que envolve. A tribo *Phaseoleae* é dividida em 8 subtribos: (*Cajaninae*, *Phaseolinae*, *Clitoriinae*, *Ophrestiinae*, *Kennediinae*, *Erythrioninae*, *Diocleinae* e *Glycininae*) incluindo aproximadamente 90 gêneros e 1471 espécies, muito relacionadas entre si por caracteres morfológicos e anatômicos (MARECHAL *et al.*, 1978), citológicos (LACKEY, 1980), palinológicos e fitoquímicos (LIENER, 1982). Uma das características mais importantes é a presença de um análogo de aminoácido canavanina, frequente em *Diocleinae* e *Kennediinae* e cujo interesse e importância metabólica reside na sua similaridade química com a arginina (BELL, 1971).

A subtribo *Diocleinae* apresenta caracteres morfológicos aparentemente primitivos dentro das Faboideae em geral (flores grandes, disco largo em volta do ovário, hilo grande e presença de cristais epidérmicos). A subtribo possui 13 gêneros, 11 no neotrópico (LACKEY, 1981).

O gênero *Canavalia* teve sua origem no continente americano (SAUER, 1964) separando-se de *Phaseoleae* ancestral durante o período Cretáceo, completando seu processo evolutivo nos finais do terciário, quando os grupos de leguminosas modernas eram muito grandes e diversos, de acordo com os fósseis do Mioceno de várias regiões (SAUER & KAPLAN, 1979). Os autores citados sugerem a presença do gênero no paleotrópico devido à presença de um grande processo de dispersão natural. O gênero apresenta características morfológicas únicas dentro da subtribo *Diocleinae* e dentre as Faboideae em geral. Modificações no cálice floral, frutos lenhosos quando maduros e presença de cristais epidérmicos pareados definem o gênero como entidade mais homogênea dentro de seu grupo.

A espécie *Canavalia grandiflora* Benth. é conhecida na Venezuela, Guiana, Perú, Bolívia e Brasil (Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Rondônia) nas matas macrotérmicas não inundáveis (DUCKE, 1925).

TABELA 03. Taxonomia do gênero *Canavalia*. No destaque, a espécie em estudo. Segundo SMARTT (1990).

Gênero <i>Canavalia</i> Adans.	
Sub gênero <i>Catadonia</i> Sauer	
1. <i>Canavalia nitida</i> (Cav.) Piper	24. <i>C. piperi</i> Killip & Macbride
2. <i>C. bonariensis</i> Lindl.	25. <i>C. plagiosperma</i> Piper
3. <i>C. mandibulata</i> Sauer	26. <i>C. ensiformis</i> (L.) DC.
4. <i>C. eurycarpa</i> Piper	27. <i>C. brasiliensis</i> Mart. ex Benth.
5. <i>C. parviflora</i> Benth.	28. <i>C. boliviiana</i> Piper
6. <i>C. macropleura</i> Piper	29. <i>C. dictyota</i> Piper
7. <i>C. sericophylla</i> Ducke	30. <i>C. gladiolata</i> Sauer
Sub gênero <i>Wenderothia</i> (Schlecht.) Sauer	31. <i>C. gladiata</i> (Jacq.) DC var. <i>gladiata</i> e var. <i>alba</i> (Makino) Hisauchi
8. <i>C. altipendula</i> (Piper) Standl.	32. <i>C. regalis</i> Dunn
9. <i>C. obidensis</i> Ducke	33. <i>C. virosa</i> Roxb.
10. <i>C. concina</i> Sauer	34. <i>C. madagascariensis</i> Sauer
11. <i>C. bicarinata</i> Standl.	35. <i>C. papuana</i> Merr. & Perry
12. <i>C. septentrionalis</i> Sauer	36. <i>C. aurita</i> Sauer
13. <i>C. oxyphylla</i> Standl. & L. O. Williams	37. <i>C. ramosii</i> Sauer
14. <i>C. dura</i> Sauer	38. <i>C. mollis</i> Wallich ex Wight & Arn.
15. <i>C. glabra</i> (Martens & Gal.) Sauer	39. <i>C. macrobotrys</i> Merr.
16. <i>C. picta</i> Mart. ex Benth.	40. <i>C. cathartica</i> Thouars
17. <i>C. grandiflora</i> Benth.	41. <i>C. lineata</i> (Thunb.) DC.
18. <i>C. mattogrossensis</i> (Rodr.) Malme	42. <i>C. maritima</i> (Aubl.) Thouars
19. <i>C. villosa</i> Benth.	43. <i>C. sericea</i> A. Gray
20. <i>C. hirsutissima</i> Sauer	44. <i>C. vitiensis</i> Sauer
21. <i>C. palmeri</i> (Piper) Standl.	45. <i>C. megalantha</i> Merr.
22. <i>C. matudae</i> Sauer	46. <i>C. raiateensis</i> Moore
23. <i>C. acuminata</i> Rose	
	Sub gênero <i>Maunaloa</i>
	47. <i>C. pubescens</i> Hook. & Arn.
	48. <i>C. kauaiensis</i> Sauer.
	49. <i>C. galeata</i> (Gaud.) Vogel
	50. <i>C. molokaiensis</i> Deg.
	51. <i>C. hawaiensis</i> Deg.

3.4.2 ESTUDOS ESTRUTURAIS

Um alto número de lectinas de leguminosas já possuem sua estrutura primária e tridimensional bem caracterizadas. A determinação da estrutura tridimensional permite uma caracterização detalhada, especialmente do sítio de ligação à carboidratos, sua localização na molécula e as diferentes conformações assumidas na estrutura em resposta às ligações a carboidratos. Neste aspecto, ressalta-se a importância do advento de técnicas acuradas nestes estudos. Entre elas, a difração de raios X (ROUGÉ *et al.*; 1991) e ressonância nuclear magnética (ASENSIO *et al.*, 1995) são técnicas muito utilizadas. Provavelmente a lectina mais bem estudada, em todos os aspectos apresentados, é a Con A, a lectina obtida de *C. ensiformis*. É composta por subunidades idênticas de 237 aminoácidos (P. M. = 26.000), sem ligação covalente com carboidratos ou outro grupo prostético (EDMUNDSON *et al.*, 1971). OLSON & LIENER (1967) reportaram a não ocorrência de resíduos de cisteína. Inicialmente foi cristalizada por SUMMER & HOWELL, (1936). Foi também a primeira lectina a ser estruturalmente resolvida por métodos cristalográficos (EDELMAN *et al.*, 1972). De acordo com MCKENZIE *et al.*, (1972), em pH 4,5 a 5,6; a Con A existe como um simples dímero (P. M. = 53.000); porém, em pH 7,0; aparece predominantemente como um tetrâmero, o que foi reportado por WANG *et al.*, (1975). A atividade ótima da Concanavalina A é em torno de pH = 7,0. A ConA liga dois íons metais por monômero, um metal de transição, geralmente Mn²⁺ no sítio S1 e Ca²⁺ no sítio S2 (BECKER *et al.*, 1975). Ambos devem estar presentes para a ligação com carboidratos. A ConA reage com os açúcares não-redutores α-D-glicose e α-D-manose, esta ligação envolve uma estrutura em anel que participa da reação (GRIMALDI & SYKES, 1975; BARBER *et al.*, 1975). A lectina de *C. brasiliensis* teve sua estrutura tridimensional e quaternária determinada por SANZ-APARÍCIO *et al.*, (1997).

A TABELA 04 apresenta uma relação de lectinas de leguminosas com sua estrutura primária definida. É possível notar que a grande maioria delas é da subtribo Faboideae (=Papilionoideae).

TABELA 04. – Lectinas pertencentes à espécies da família Fabaceae com sequência primária (aminoácidos) já determinada (Faboideae = Papilionoideae).

Nome	Família/ Subfamília	Tribo/ Subtribo	Nº de aminoá- cidos/Ref. Genebank	Referência Básica
<i>Abrus precatorius</i>	Fabaceae/ Faboideae	Abreae	268 aa 265720	TAHIROV <i>et al.</i> , (1995)
<i>Amorpha fruticosa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Psoraliinae	88 aa 93819109	*
<i>Arachis hypogaea</i>	Fabaceae/ Faboideae	Aeschynomeneae/ Stylosanthinae	254 aa 951116	LAW (2000)
<i>Astragalus falcatus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Astragalinae	89 aa 3819113	*
<i>Bauhinia purpurea</i>	Fabaceae/ Caesalpinioidae	Bauhinieae	290 aa 217873	KUSUI <i>et al.</i> , (1991)
<i>Bowringia mildbraedii</i>	Fabaceae/ Faboideae	Sophoreae	240 aa 1170749	CHAWLA <i>et al.</i> , (1993)
<i>Butea frondosa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Erythrininae	25 aa 260214	PADMANABHAN <i>et al.</i> , (1991)
<i>Canavalia boliviiana</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa ND	**
<i>Canavalia brasiliensis</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 2497661	GRANGEIRO <i>et al.</i> , (1997)
<i>Canavalia ensiformis</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 1942282	BOUCKAERT <i>et al.</i> , (1995)
<i>Canavalia gladiata</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	290 aa 116912	YAMAGUCHI & MINAMIKAWA (1990)
<i>Canavalia lineata</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 3913293	FUJIMURA <i>et al.</i> , (1993)
<i>Canavalia maritima</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	236 aa 3913294	PEREZ <i>et al.</i> , (1991)
<i>Canavalia virosa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 3913294	FUJIMURA <i>et al.</i> , (1993)
<i>Caragana arborescens</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Astragalinae	87 aa 3819115	*
<i>Caragana frutex</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Astragalinae	106 aa 93819147	*
<i>Cicer arietinum</i>	Fabaceae/ Faboideae	Viciae	168 aa 6850934	*
<i>Cladrastis kentukea</i>	Fabaceae/ Faboideae	Sophoreae	293 1141757	VAN DAMME <i>et al.</i> , (1995)
<i>Cladrastis lutea</i>	Fabaceae/ Faboideae	Sophoreae	290 2147661	VAN DAMME <i>et al.</i> , (1995)
<i>Cratylia floribunda</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	236 aa 6166562	CAVADA <i>et al.</i> , (1999)
<i>Crotalaria juncea</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Crotalariinae	24 aa 16352	KHANG <i>et al.</i> , (1990)
<i>Crotalaria pallida</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Crotalariinae	24 aa 16351	KHANG <i>et al.</i> , (1990)
<i>Cytisus scoparius</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Cytisinae	248 aa 260046	KONAMI <i>et al.</i> , (1992)

<i>Cytisus sessilifolius</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Cytisinae	243 aa 999997	KONAMI et al., (1995)
<i>Dioclea guianensis</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 6016492	*
<i>Dioclea grandiflora</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 81748	RICHARDSON et al., (1984)
<i>Dioclea lehmanni</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Diocleinae	237 aa 348482	PEREZ et al., (1991)
<i>Dolichos biflorus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Phaseolinae		SCHNELL & ETZLER, (1988)
<i>Dolichos lablab</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Phaseolinae	237 aa 585387	GOWDA et al., (1994)
<i>Erythrina corallodendron</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Erythrininae	239 aa 3212466	ELGAVISH & SHAANAN (1998)
<i>Erythrina variegata</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Erythrininae	241 aa 478433	YAMAGUCHI et al., (1993)
<i>Galega orientalis</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Tephrosiinae	103 aa 3819170	*
<i>Genista tinctoria</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Spartiinae	90 aa 3819172	*
<i>Glycine max</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Glycininae	163 aa 4995205	WYCOFF et al., (1997)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Astragalinae	122 aa 3819168	*
<i>Griffonia simpliciflora</i>	Fabaceae/ Caesalpinioidae	Bauhinieae	243 aa 494244	ZHU et al., (1996)
<i>Hedysarum alpinum</i>	Fabaceae/ Faboideae	Hedysareae Euhedysarinae	74 aa 1871524	*
<i>Laburnum alpinum</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Spartiinae	250 aa 99963	KONAMI et al., (1991)
<i>Lathyrus aphaca</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	53 aa 225313	SOUSA-CAVADA et al., (1986)
<i>Lathyrus cicera</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	54 aa 72341	SOUSA-CAVADA et al., (1986)
<i>Lathyrus clymenum</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	53 aa 72344	SOUSA-CAVADA et al., (1986)
<i>Lathyrus hirsutus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	54 aa 126116	YARWOOD et al., (1986)
<i>Lathyrus ochrus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	53 aa 81831	BOURNE et al., (1990)
<i>Lathyrus sphaericus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	244 aa 72334	RICHARDSON et al., (1987)
<i>Lathyrus tingitanus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	54 aa 72342	YARWOOD et al., (1986)
<i>Lens culinaris</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	233 aa 7428789	*
<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Loteae	240 aa 99966	KONAMI et al., (1990)
<i>Maackia amurensis</i>	Fabaceae/ Faboideae	Sophoreae	286 aa 1755080	KONAMI et al., (1994)
<i>Macrotyloma axillare</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Phaseolinae	32 aa 81845	*
<i>Medicago sativa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Trifolieae	279 aa 2951684	BRILL et al., (1995)
<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae/ Faboideae	Trifolieae	265 aa 666078	BAUCHROWITZ et al., (1992)
<i>Melilotus alba</i>	Fabaceae/ Faboideae	Trifolieae	88 aa 3819678	*

	Fabaceae/ Faboideae	Trifolieae	89 aa 3819680	*
<i>Melilotus officinalis</i>				
<i>Mucuna deeringiana</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Erythrininae	56 947120	MO & GOLDSTEIN (1994)
<i>Onobrychis arenaria</i>	Fabaceae/ Faboideae	Hedysareae/ Euhedysarinae	87 aa 3819691	*
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Fabaceae/ Faboideae	Hedysareae/ Euhedysarinae	236 aa 26147	KOUCHALAKOS <i>et al.</i> , (1984)
<i>Oxytropis pilosa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Galegeae/ Astragalinae	89 aa 3819693	*
<i>Phaseolus lunatus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Phaseolinae	278 aa 98920387	IMBRIE-MILLIGAN <i>et al.</i> , (1989)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Phaseolinae	279 aa 6822274	JOHN & LONG (1990)
<i>Pisum sativum</i>	Fabaceae	Vicieae	265 aa 100052	RUZHEINIKOV <i>et al.</i> , (1998)
<i>Pisum arvense</i>	Fabaceae	Vicieae	245 aa ND	SILVA (1997)
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Phaseoleae/ Phaseolinae	240 aa 6018681	SHARMA <i>et al.</i> , (1996)
<i>Robinia pseudoacacia</i>	Fabaceae/ Faboideae	Robinieae	285 aa 4115547	VAN DAMME <i>et al.</i> , (1995)
<i>Sophora flavescens</i>	Fabaceae/ Faboideae	Sophoreae	284 aa 99837276	YAN <i>et al.</i> , (2000)
<i>Sophora japonica</i>	Fabaceae/ Faboideae	Sophoreae	293 aa 1755068	VAN DAMME <i>et al.</i> , (1997)
<i>Thermopsis schischkinii</i>	Fabaceae/ Faboideae	Podalyrieae	88 aa 3819721	*
<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae/ Faboideae	Trifolieae	74 aa 1872140	*
<i>Ulex europaeus</i>	Fabaceae/ Faboideae	Genisteae/ Cytisinae	249 aa 81985	LORIS <i>et al.</i> , (1998)
<i>Vatairea macrocarpa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Dalbergieae	240 aa 3287874	SANTOS, (1998)
<i>Vicia cracca</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	96 aa 3819723	BAUMANN <i>et al.</i> , (1982)
<i>Vicia faba</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	233 aa 126152	HEMPERLY <i>et al.</i> , (1979)
<i>Vicia sativa</i>	Fabaceae/ Faboideae	Vicieae	52 aa 100112	GEBAUER <i>et al.</i> , (1981)

ND = não depositado no Genebank * Sem referência publicada

** CAVADA, B.S. 2000, comunicação pessoal

3.4.3. ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS E OLIGOSSACARÍDEOS

Os experimentos para a verificação da especificidade a carboidratos para as lectinas, de modo geral, compreendem um fundamental, porém complexo, capítulo no estudo da caracterização bioquímica das lectinas vegetais. Estes experimentos consistem no emprego de diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos e/ou glicopeptídeos como inibidores da reação de hemaglutinação ou a precipitação de polissacarídeos (ou glicoconjugados) pela lectina (DEBRAY *et al.*, 1981). Outras metodologias possibilitam calcular a constante de associação e outros parâmetros termodinâmicos e cinéticos da reação de ligação da lectina e seus substratos. Estas incluem o uso de métodos físico-químicos, tais como microcalorimetria, equilíbrio de diálise, espectrofotometria, fluorimetria e ressonância nuclear magnética. DEBRAY *et al.*, (1981) reportam que a constante de associação (K_a) entre lectinas e monossacarídeos variam de 10^3 a 5×10^4 M⁻¹. Já entre lectinas e oligossacarídeos varia de 10^4 a 10^7 M⁻¹.

A especificidade por carboidratos definida por MAKELA (1957), conforme foi citado (ítem 3.2), foi complementada por MOREIRA *et al.*, (1991); através da inclusão de dois novos grupos, as lectinas que reagem a N-acetil-glicosamina ou ácido N-acetil-neuramínico (ácido siálico).

As lectinas de leguminosas formam uma grande família de proteínas homólogas que exibem uma grande variedade de especificidades a carboidratos e estas, frequentemente são utilizadas como modelo para o estudo dos princípios estruturais do reconhecimento proteína-carboidrato, que mediam as interações inter-celulares. Para LORIS *et al.*, (2000) estes princípios se encontram razoavelmente bem documentados para as duas famílias específicas a manose/glicose e galactose/N-acetil-D-galactosamina. Os autores reportaram a base estrutural do reconhecimento a carboidratos da lectina de *Ulex europaeus* (UEA-II) como a primeira lectina de legumes pertencente a um grupo com especificidade a quitobiose, capaz de acomodar tanto N-acetilglicosamina ou galactose em seu sítio de ligação à carboidratos.

Numa série de estudos sobre a especificidade a carboidratos de lectinas da subtribo *Diocleinae*, GUPTA *et al.*, (1996) reportaram a alta afinidade das lectinas de *Dioclea grandiflora* (DGL) e *C. brasiliensis* (Con A) para o núcleo trimanosídeo, 3,6-di-O-(alfa-D-manopiranosil)-alfa-D-manopiranosídeo, o qual está presente em carboidratos ligados à asparagina em proteínas. Neste trabalho, estudos de inibição de hemaglutinação sugeriram que a DGL e a Con A reconheceriam epítópos similares dos trissacarídeos, porém, estas possuiriam diferentes ligações para carboidratos complexos. No trabalho de GUPTA *et al.*, (1997) os dados obtidos para DGL mostraram a ligação de grupos hidroxila específicos em todos os três resíduos de trimanosídeo, similares aos observados para a Con A. A estrutura cristalina da DGL, obtida por raios-X, complexada ao núcleo trimanosídeo apresentada por ROZWARSKI *et al.*, (1998) mostrou que a estrutura geral do complexo é similar à encontrada no complexo ConA-trimanosídeo. Entretanto, DAM *et al.*, (1998) salientaram que existem diferenças na termodinâmica de ligação à análogos monodeoxi do resíduo do trimanosídeo alfa(1-6)-man para as duas lectinas, observada através da técnica de microcalorimetria de

titulação – (ITC). Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as diferenças na termodinâmica da ligação aos análogos monodeóxi alfa(1-6) pela DGL e ConA não se correlacionaram com as diferenças na solvatação dos complexos trimanosídicos, ou seja, os parâmetros termodinâmicos para certos análogos deoxi, não puderam ser explicados com base na solvatação diferencial dos complexos com seus respectivos sítios de ligação.

DAM *et al.*, (2000) encontraram a mesma especificidade para resíduos de glicose e manose para as lectinas de *C. brasiliensis*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea rostrata*, *D. virgata*, *D. violacea* e *D. guianensis*. A afinidade foi muito maior, entretanto, para o trimanosídeo metil-3,6-di-O-(alfa-D-manopiranosil)-D-manose. A microcalorimetria isotérmica foi usada para determinar a termodinâmica de ligação destas lectinas, incluindo a lectina isolada de *C. grandiflora* Benth.; para uma série completa de análogos monodeóxi para o núcleo trimanosídico citado.

A aglutinina de sementes de *Abrus precatorius* foi submetida à várias modificações químicas para detectar os resíduos de aminoácidos envolvidos na sua atividade de ligação à galactose. A modificação nos resíduos de triptofano levou a completa perda da atividade de ligação à carboidratos (PATANJALI *et al.*, 1984).

As lectinas de monocotiledôneas *Crocus vernus* e *Polygonatum multiflorum* mostraram ser manose-específicas. A lectina de *C. vernus* reagiu especificamente com motivos alfa-1,3-dimanosil; a segunda possui sítios de ligação a galactose/N-acetilglicosamina. Os trabalhos de caracterização destas proteínas foram obtidos através de uma mistura de análise protéica e clonagem (VAN DAMME *et al.*, 2000a; VAN DAMME *et al.*, 2000b; respectivamente).

3.4.3 PAPEL FISIOLÓGICO

A despeito do enorme esforço dos especialistas para isolar e caracterizar estas proteínas é particularmente frustrante a falta de informações básicas sobre a funcionalidade das lectinas em plantas. Inúmeros pressupostos já foram colocados na tentativa de caracterizar o(s) provável(is) papel(is) fisiológico(s) das lectinas em plantas. Observamos, então, que autores fornecem explicações para casos particularizados, de difícil generalização para outros gêneros ou até mesmo para outras espécies relacionadas (CAVADA *et al.*, 2000).

Existem evidências moleculares, bioquímicas, celulares, fisiológicas e evolucionárias que caracterizam o papel fisiológico de defesa vegetal das lectinas. Um dos melhores argumentos para esta premissa é o fato de que as lectinas vegetais são capazes de se ligar a glicoconjungados de outros organismos. As lectinas vegetais, normalmente podem se ligar à açúcares simples como glicose, manose ou

galactose, porém estas exibem alta afinidade por oligossacarídeos, os quais são relativamente incomuns ou totalmente ausente nas plantas. (SHARON & LIS, 1990). A maioria das lectinas é estável em uma larga faixa de pH, são resistentes ao calor e às proteases de insetos e animais. Outro fato revelador é a acumulação de lectinas em partes da planta mais susceptíveis aos ataques, como as sementes (SENGUPTA *et al.*, 1997).

O mecanismo de toxicidade aos insetos se baseia na ligação específica dos glicoconjugados no intestino dos insetos. Entretanto, a razão específica ainda não está claramente elucidada. Três interações são possíveis: 1) ligação das lectinas à quitina na membrana peritrófica (nas lectinas ligantes à quitina); 2) ligação à glicoconjugados expostos nas células epiteliais ao longo do trato digestivo e 3) ligação das lectinas à enzimas digestivas glicosiladas. Estas ligações podem interferir então, com a entrada de nutrientes (SENGUPTA *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997).

3.4.5 Biossíntese e Processamento

Pouco se sabe sobre a sequência na qual as proteínas são sintetizadas durante a maturação da semente. Já foi demonstrado por KHAN *et al.*, (1980) que a síntese de albuminas precede a síntese de globulinas e que entre as globulinas, a vicilina é sintetizada antes da legumina. As lectinas, usualmente, pertencem às albuminas. Desta forma, como primeiro passo, as lectinas seriam sintetizadas e subsequentemente depositadas nos corpos protéicos em desenvolvimento (WILDEN *et al.*, 1980). Uma camada de lectina se forma na parede interna do corpo protéico. Esta camada é subsequentemente, fortificada por novas moléculas de lectinas adicionais que se ligam por auto associação, uma propriedade comum à muitas lectinas (SCHURZ & RÜDIGER, 1985). Após a formação desta parede de lectinas, proteínas de estoque recém sintetizadas, pode se reunir a esta, graças à sua viscosidade. Em todo o processo, é comum ocorrer mudanças de pH especialmente nas organelas durante seu desenvolvimento (CASEY, 1979; GALLOWAY *et al.*, 1983).

Tanto as lectinas como as proteínas de estoque (e também glicosidases) são conhecidas por residir nos corpos protéicos das Leguminosae. Os estudos de EINHOFF *et al.*, (1986), confirmam esta premissa, porém demonstram que, algumas proteínas de estoque e algumas glicosidases são capazes de interagir com lectinas. A localização comum destas proteínas e as interações *in vitro* entre elas poderiam ter importante significado biológico. As lectinas, desta forma, estariam engajadas no empacotamento de proteínas de estoque.

Na germinação, os conteúdos dos corpos protéicos são esvaziados de uma maneira ordenada. Trabalhos como os de SMITH *et al.*, (1982) e CROY *et al.*, (1984), reportam que as proteínas de estoque são degradadas primeiro, enquanto as lectinas resistem ao ataque proteolítico por longos períodos. Esta

- propriedade corresponde à conhecida estabilidade das lectinas à proteólise. De qualquer forma, as lectinas contribuem para uma construção ordenada, bem como de uma degradação ordenada dos corpos protéicos, em ambos os estágios de desenvolvimento: maturação e germinação.

3.5 - Lectinas Vegetais – FERRAMENTA BIOTECNOLÓGICA

(Usos – aplicações)

A configuração química das lectinas, as quais possuem a propriedade de reconhecimento de diferentes misturas de carboidratos, vem sendo intensamente explorada pelos bioquímicos e biólogos celulares em suas explorações sobre as interações inter e intracelulares que revelam as complexidades da maquinaria celular (SENGUPTA *et al.*, 1997). Cálculos teóricos revelam que os oligossacarídeos não perdem para qualquer classe de oligomeros bioquímicos em termos de capacidade para armazenamento de informação. Assim, os glicoconjugados celulares podem servir como unidades reconhecíveis para receptores, no caso, lectinas (RUDIGER *et al.*, 2000).

Lectinas imobilizadas mostram-se excelentes ferramentas para o isolamento e separação de glicoproteínas, glicolipídios, polissacarídeos, partículas subcelulares e células e também para a purificação de componentes solubilizados da membrana celular. São utilizadas para reconhecer mudanças em nível e/ou composição das glicoproteínas superficiais da célula quando estas se tornam malignas ou viralmente transformadas durante o seu desenvolvimento.

As lectinas têm sido extensamente utilizadas pelos biomédicos na medicina clínica, para reconhecer deficiências congênitas ou imunologicamente adquiridas, para detectar a sensibilização por doenças infecciosas, monitorar efeitos de manipulações imunossupressivas e imunoterapêuticas, no diagnóstico de defeitos genéticos com manifestações cromossômicas anormais, identificação de grupos sanguíneos e classificação de células (SENGUPTA *et al.*, 2000).

A maioria das propriedades biológicas mais comuns das lectinas já são bem conhecidas e analisadas, especialmente aquelas referentes à ConA. As lectinas são proteínas que reagem com resíduos terminais específicos de carboidratos e por esta forma são úteis no estudo de carboidratos nas superfícies celulares. A Con A aglutina células sanguíneas e outras substâncias complexadas com células sanguíneas (CLARK & DENBOROUGH, 1971); glicoproteínas envolvidos no sistema imunológico (KORNFELD & FERRIS, 1975); com抗ígenos carcinogênicos (BOENISCH & NORGAARD-PEDERSEN, 1975; BRATTAIN *et al.*, 1975) e com lipoproteínas de baixa densidade do plasma humano (HARMONY & CORDES, 1975). MILLER & NWOKEDI, (1975) reportaram propriedades luminescentes similares à proteínas que contêm tirosina e triptofano.

TABELA 05 - Algumas propriedades gerais, atividades biológicas, usos e aplicações de lectinas de leguminosas. Em destaque, participação do BioMol-Lab (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC)

Ano	Tipo ou Característica	Descrição suscinta	Referência (s) básicas
2001	ConA e outras lectinas	Estimativa do número e peso molecular de glicoconjugados em grânulos corticais	HOODBHOY & TALBOT (2001)
2001	Lectina de <i>Sophora japonica</i> e <i>Erythrina cristagalli</i>	Identificação de células nucleadas em urina (diagnóstico do câncer)	GRUPP <i>et al.</i> , (2001)
2000	ConA, lectina de <i>Lens culinaris</i> , <i>Pisum sativum</i> e <i>Vicia faba</i>	Interação (precipitação) com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> α-mananas e glicoenzimas	MISLOVICOVA <i>et al.</i> , (2000)
2000	Fagos mutantes para lectina de <i>Bauhinia purpurea</i> (BPA)	Produção de lectinas artificiais com mutações randômicas ("cyborg lectins") com especificidades distintas e/ou desejáveis	YAMAMOTO <i>et al.</i> , (2000)
2000	Lectina de <i>Parkia discolor</i> (Mimosoideae)	Purificação, propriedades químicas e imunológicas de uma nova lectina de Mimosoideae	CAVADA <i>et al.</i> , (2000)
2000	Lectina químérica de <i>Bauhinia purpurea</i> e <i>Lens culinaris</i>	Construção de lectina com uma única especificidade	YAMAMOTO <i>et al.</i> , (2000)
2000	Gene da lectina de ervilha	Transformação do trevo com o gene para lectina de ervilha	DIAZ <i>et al.</i> , (2000)
2000	ConA	Efeito mortal sobre <i>Trypanosoma brucei</i>	ACOSTA-SERRANO <i>et al.</i> , (2000)
2000	Aglutinina de soja	Controle de nematóides <i>Strongyloides ratti</i>	TOBADA-KUDO <i>et al.</i> , (2000)
1999	Lectinas gli/man	Prevenção da cistite hemorrágica	ASSREUY <i>et al.</i> , (1999)
1999	Lectina de <i>Sambucus nigra</i> (SNA) e <i>Ricinus communis</i> (RCA)	Ocorrência, ligação e distribuição da imunoglobulina G siálica	DALZIEL <i>et al.</i> , (1999)
1999	Lectinas de <i>L. sericeus</i> ; <i>Dioclea virgata</i> e <i>Vatairea macrocarpa</i>	Estudo do papel de carboidratos no recrutamento de leucócitos	ALENCAR <i>et al.</i> , (1999)
1999	Genes de leguminosas-filogenia	Homologia de genes de lectinas de leguminosas e apirases	ROBERTS <i>et al.</i> , (1999)
1998	Interação rizóbio-leguminosa	Construção de gene repórter para reconhecimento da sinalização lectina-bactéria	BLADERGROEN & SAINK (1998)
1998	Isolamento, caracterização e sequenciamento da lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i> (VML)	Proteína homotetramérica pH-independente, com fragmentos similares a outras lectinas	CAVADA <i>et al.</i> , (1998) CALVETE <i>et al.</i> , (1998)
1997	ConBr	Clonagem e caracterização da ConBr	GRANGEIRO <i>et al.</i> , (1997)

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pequena amostra apresentada nesta revisão buscou caracterizar quatro momentos relevantes do estudo das lectinas vegetais. Inicialmente, um pouco mais recuado no tempo, uma nova proteína é descoberta, aglutinadora de eritrócitos, apresentando diferentes características e funções, de difícil classificação, em vista de sua diversidade. A corrida, quase frenética, de caracterização e definição de suas estruturas primária, terciária e quaternária, das especificidades a carboidratos e outras propriedades importantes, revelaram a possibilidade de um extraordinário potencial em biotecnologia, possibilitando um novo momento. Este momento foi precipitado pela necessidade de valiosas informações (em sentido literal), do ponto de vista da aplicação prática como ferramenta biológica. Entretanto, neste meio tempo, ocorreu o advento da Biologia Molecular, enriquecendo e transformando o contexto científico da química de proteínas, em pouco mais de uma década, revelando novas possibilidades para o estudo das lectinas.

Este extraordinário crescimento e acúmulo de informações relativas à seqüências primárias de proteínas e genes revelaram novas possibilidades para o estudo da evolução dos seres vivos. Torna-se necessário, portanto, revelar e discutir estes potenciais para o estudo das lectinas. Novas abordagens poderiam ser úteis no esclarecimento das centenas de dúvidas que pairam sobre estas proteínas e caracterizar sua importância na evolução dos organismos.



FIGURA 01 – Excicata nº 25.326 de *Canavalia grandiflora* Benth. depositada no Herbário Prisco Bezerra – Departamento de Biologia - UFC

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BOTÂNICO E IDENTIFICAÇÃO

Sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. foram obtidas no Sítio São Vicente, município de São Benedito – CE, em Novembro de 1997. O material vegetal coletado foi identificado pelo Prof. Edson P. Nunes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará – UFC. Este material encontra-se depositado no Herbário Prisco Bezerra (EAC), pertencente ao mesmo Departamento, excicata nº 25.326 (FIGURA 01).

Sementes de outras espécies da subtribo *Diocleinae* e outras leguminosas foram obtidas junto ao Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza – CE.

4.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO

4.2.1 PREPARAÇÃO DO EXTRATO TOTAL

Sementes maduras, inteiras, de *C. grandiflora* Benth. foram moídas para a produção de farinha fina. A farinha foi misturada à solução de extração composta de NaCl 0,15 M; na proporção de 1:10 (m/v), por três horas, à temperatura ambiente, sob agitação lenta e constante. A mistura foi então centrifugada a 15.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O precipitado obtido foi descartado e utilizou-se o sobrenadante (“extrato total”).

4.2.2 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

O extrato total (cerca de 10 mL) foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-50 course previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM e mantido na mesma por uma noite, para que o extrato total mantivesse o máximo de contato com a coluna. A coluna foi então, lavada extensivamente com a solução de equilíbrio citada, até que todo o material não retido fosse retirado ("pico não retido ou I"). Esta condição foi obtida quando alíquotas da coluna mostraram $A_{280} < 0,05$. A proteína aderida à coluna ("pico retido") foi eluída com a mesma solução de equilíbrio, acrescida de glicose 0,1 M. As frações obtidas (1 mL por tubo) apresentando $A_{280} > 0,1$ foram dialisadas em solução de ácido acético 0,1M por uma hora e depois, exaustivamente contra água destilada. Procedeu-se à lyophilização dos picos e estocagem à temperatura ambiente.

4.2.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E 2-MERCAPTOETANOL

As frações obtidas durante a purificação e amostras de farinhas de leguminosas foram submetidas à eletroforese para se verificar a pureza da lectina. Utilizou-se o protocolo modificado de LAEMMLI (1970) formado por placas de vidro contendo os géis, em sistema vertical. As soluções utilizadas na montagem dos géis estão listadas abaixo:

Reagentes	Gel principal (15% m/v)	Gel de empacotado (3,5% m/v)
Acrilamida:Bisacrilamida (30:08%)	5 mL	625 µL
TRIS-HCl 3M pH 8,8	1,25 mL	1,25 mL
SDS 10% (m/v)	100 µL	50 µL
Persulfato de amônio 1,5% (m/v)	500 µL	250 µL
H ₂ O destilada	3,15 mL	2,82 mL
TEMED	5 µL	5 µL

O tratamento das amostras para a corrida eletroforética constou da dissolução da mesma em tampão contendo TRIS-HCl 0,0625M pH 6,8 contendo SDS 2% (m/v) e 2-mercaptopetanol 5% (v/v) e tratadas

a 100 °C por 10 minutos (1 mg de amostra de lectina ou 10 mg de farinha/1 mL de tampão). Após resfriadas, alguns mililitros de azul de bromofenol 0,1% (m/v) e cristais de sacarose foram adicionados às amostras.

A corrida eletroforética operou-se à uma amperagem constante de 20 mA usando-se, como tampão de corrida, TRIS 0,025M pH 8,3 contendo glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v). O tempo de corrida decorreu ao redor de 2,5 – 3,0 horas.

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel, mergulhando-se o gel em ácido tricloroacético 10% por 30 minutos. As bandas protéicas foram visualizadas por coloração com Coomassie Brilliant Blue R250 0,2% (m/v) em metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v). O gel foi descorado com metanol 50% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) e seco com celofane e lido por scanner para o computador.

4.2.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a determinação da concentração de proteínas nas diferentes amostras, utilizou-se o método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão. A 100 µL de amostra foi adicionado 2,5 mL do reagente de Bradford e após 10 minutos de reação, foram feitas leituras de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Nos eluatos das colunas cromatográficas, utilizou-se absorbância de 280 nm, direto na amostra, sem a reação de Bradford, apenas para a detecção de proteínas.

4.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

4.3.1 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A atividade hemaglutinante foi determinada com o uso de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200 µL de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo adicionou-se 200 µL de amostra e uma série de diluições duplas efetuadas (1:2; 1:4; 1:16; 1:32, etc), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 200 µL de eritrócitos a 2% (v/v) lavados exaustivamente com NaCl 0,15 M e a reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C, em seguida, foi centrifugado a 2000 g por 30 segundos. Os resultados foram interpretados macroscópicamente e o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra que

apresentou aglutinação nítida. As hemácias foram também tratadas com enzima proteolítica (tripsina). Todas as amostras de sangue foram coletadas em recipiente contendo heparina, lavadas três vezes com NaCl 0,15 M, centrifugadas a 2000 g e calculou-se a concentração de células vermelhas em relação ao volume total (hematócrito). As células foram suspensas em solução contendo (ou não) a enzima (0,1 mg de enzima por 10 mL de NaCl 0,15 M) em uma concentração final de 2% de eritrócitos. Estes foram então incubadas por 1 hora e lavadas seis vezes com solução salina gelada. Após uma última centrifugação a 2000 g, as células foram ressuspensas em solução em uma concentração final de 2% de eritrócitos.

Os eritrócitos humanos, do sistema ABO foram obtidos de doadores sadios através do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Os eritrócitos de coelho foram obtidos de animais adultos e saudáveis mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

4.3.2 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A composição de aminoácidos da lectina de *C. grandiflora* Benth. foi determinada em uma analisador de aminoácidos Pharmacia Alpha Plus após hidrólise das amostras com HCl 6N, a 110 °C, por aproximadamente 15 horas em ampolas seladas e sob vácuo.

4.3.3 IMUNODIFUSÃO DUPLA DE OUCHTERLONY

Produção e purificação de IgG de coelho contra a lectina nativa de *C. brasiliensis*: Para os ensaios de imunodifusão dupla de Ouchterlony, produziu-se anticorpos de coelho contra a lectina nativa de *C. brasiliensis*, baseado na metodologia descrita em CAVADA (1980) e MOREIRA & CAVADA (1984). A sensibilização com a lectina purificada de *C. brasiliensis* ou *Vatairea macrocarpa* foi efetuada através da injeção por via intramuscular, de 10 mg de lectina liofilizada dissolvida em 0,5 mL de NaCl 0,15 M e 0,5 mL de adjuvante completo de Freund em um coelho albino adulto em boa saúde. Decorridos 7 dias, foi efetuado o primeiro reforço (1 mg de lectina dissolvido em 1 mL de NaCl 0,15 M) aplicado em via subcutânea. Após 15 dias deste primeiro reforço foi feita a primeira sangria na orelha do animal e um reforço igual ao anteriormente aplicado, repetindo-se esse protocolo em intervalos de 7 dias, até a obtenção de quantidade suficiente de antissoro.

Em cada sangria, o sangue coletado permaneceu sob temperatura de 37 °C por uma hora, sendo então centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga de bancada. Os soros assim obtidos foram guardados em freezer até sua utilização.

As alíquotas de soro reunidas foram precipitadas com sulfato de amônio a 33% de saturação, e após um repouso de 24 horas em refrigeração, foram centrifugadas em 17.600 x g por 20 minutos a 4 °C, em centrífuga Sorvall RC5B Plus, rotor SS34. O precipitado foi ressuspenso em água destilada e dialisado exaustivamente e alternadamente contra ácido acético 0,05 M pH 5,0 e água destilada. Após esta última diálise contra o tampão acetato foi realizada uma centrifugação a 19.960 x g, por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante obtido aplicado em coluna de DEAE-Sepharose (30 x 5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato. O pico não retido, eluído com o mesmo tampão foi coletado, dialisado contra água, lyophilizado e acondicionado em frasco herméticamente fechado, à temperatura ambiente.

Os anticorpos foram obtidos de coelhos adultos e saudáveis mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Reação de Imunodifusão dupla de Ouchterlony: A lectina purificada de *C. grandiflora* Benth. foi testada para imunoprecipitação com anticorpos IgG de *C. brasiliensis* e IgG de *V. macrocarpa*. A metodologia foi baseada em CLAUSEN (1969). Uma solução de agarose 1,5% (p/v) em NaCl 0,15 M, glicose 0,1 M e azida sódica 0,02% foi fundida e montada sobre lâminas de microscopia, contendo orifícios central e periféricos equidistantes, feito com furador de 2,5 mm de diâmetro. Nestes orifícios aplicou-se 5 µL de diluições 1:2; 1:4; 1:8; 1:16 e 1:32. da solução de lectina (1 mg/mL) ou do anticorpo (10 mg/mL) em solução de NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM e cloridrato de guanidina 1 M. Um dos orifícios recebeu 5 µL das soluções iniciais de lectina ou de anticorpos. Procedeu-se então à incubação em câmara úmida à temperatura ambiente (25 °C) por 48 horas para a formação dos arcos de precipitação. As lâminas foram lavadas em solução de NaCl 0,15 M com azida sódica a 0,02% por 48 horas com diversas trocas. O NaCl foi eliminado pela imersão das lâminas em água destilada, trocada diversas vezes durante 24 horas. O gel de agarose, após seco em papel de filtro, foi colocado em estufa a 37 °C, por aproximadamente 2 horas, retirando-se toda a água do gel. O gel foi então corado com solução de Coomassie Brilliant Blue 0,1% em mistura de metanol, ácido acético e água (4,0:7,5:0,1 v/v/v) por alguns segundos. O excesso de corante foi removido e o gel foi descorado com a solução descorante utilizada nos géis de PAGE-SDS.

4.4 ESPECIFICIDADE A CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS

4.4.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS

A especificidade de ligação à carboidratos e glicoproteínas da lectina purificada de *C. grandiflora* Benth. foi estimada pela capacidade desta para inibir a atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho, de acordo com RAMOS *et al.* (1996). A inibição da atividade hemaglutinante foi feita, utilizando-se placas de microtitulação, através de duplas diluições seriadas (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32) do açúcar ou glicoproteína a ser testada, em solução de NaCl 0,15M, contendo CaCl₂ 5mM. Em seguida, uma solução de lectina de *C. grandiflora* contendo 4 UH foi adicionada a cada poço. Após 30 minutos de interação a 37 °C foram adicionados a cada poço, 25 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2%. O ensaio foi incubado novamente a 37 °C por 30 minutos e depois deixado em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Paralelamente foi feito um ensaio da atividade hemaglutinante na mesma solução de lectina (4UH) na ausência de açúcar (branco). O grau de inibição de cada açúcar ou glicoproteína foi determinado por comparação com o branco. Os títulos de hemaglutinação foram determinados como descrito no item 4.3.1.

4.4.2 CINÉTICA DA INTERAÇÃO DE CONGF COM GLICOPROTEÍNAS MEDIDA EM TEMPO REAL POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE (BIACORE)

4.4.2.1 Marcação de Glicoproteínas: a) com Biotina: As análises cinéticas no BIACore foram realizadas com glicoproteínas marcadas com biotina para posterior uso como ligantes fixados sobre o sensor chip SA (estreptavidina). As glicoproteínas orosomucóide, mucina de estômago de porco, taka diastase e ribonuclease B (RNase B) foram marcadas desta maneira. Assim, 5 mg de cada foram adicionadas em 1 mL de tampão NaHCO₃/Na₂CO₃ 0,1 M pH 8,5. Após a dissolução, foram adicionados 10 µL de reativo de biotinilização (50 mg.mL⁻¹ em água Milli-Q) preparado imediatamente no momento da utilização. O meio de reação permaneceu em temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. A reação foi paralisada pela adição de 10 mg de glicina. Cada amostra foi então submetida a cromatografia em coluna P-10 “read-to-use” (Pharmacia) em meio aquoso, de acordo com as instruções do fabricante, para que o reativo de biotinilização

não acoplado covalentemente às proteínas fosse eliminado. Após este procedimento, as amostras foram dializadas em água MilliQ e lyophilizadas. Em solução de tampão HBS-P cada uma delas foi passada sobre o sensor e a elevadíssima constante de associação entre a estreptoavidina e biotina fixa as proteínas sobre o sensor de modo irreversível, estando o mesmo pronto para utilização.

b) com N-hidroxisuccimida + N-etyl, N'-etyl N'-dimetilaminopropil carboximida. Para a fixação de algumas glicoproteínas no sensor CM-5, utilizou-se um kit reativo fornecido pelo fabricante, composto por N-hidroxisuccimida + N-etyl, N' - etil N'- dimetilaminopropil carboximida como ligante fixados sobre o chip sensor CM-5, designando a matriz de carboximetil-celulose (CM-Celulose) para a fixação. As glicoproteínas lactotransferina bovina, lactotransferina humana (LTF), sorotransferina humana, glicolectina de jaca (jacalina), asialofetuína, orosomucoide e lectina de soja (SBA) foram fixadas desta maneira.

4.4.2.2 Ressonância Plasmônica de Superfície em Biosensor BIACore 3000™ ("Biological Interaction Analysis Core") (Pharmacia Biosensor, Suécia). A cinética de interação da lectina de sementes de *C. grandiflora* solúvel e diferentes glicoproteínas imobilizadas foi estudada através do processo de ressonância plasmônica de superfície. O aparelho citado carrega chips sensores de camada de ouro contendo uma camada específica capaz de fixação irreversível com diferentes ligantes (no caso de glicoproteínas). A resposta RPS (Ressonância Plasmônica de Superfície) baseia-se na relação da variação do ângulo de ressonância de um feixe de luz monocromática dirigido à superfície metálica (ouro) do chip, geradora de ressonância e a quantidade de proteína fixada na matriz, permitindo quantificar a interação proteína-ligante. A resposta RPS é monitorada por diodos fixos, sensíveis ao ângulo de luz refletida pelo processo.

Para a medida da interação, a solução de lectina foi preparada como $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram injetados $25 \text{ }\mu\text{L}$ de solução em um fluxo de $5 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ (300 segundos de interação), seguidos de 300 segundos de lavagem com o tampão HBS-P.

A inibição de interação da lectina com a glicoproteína ribonuclease B foi determinada pela adição de $25 \text{ }\mu\text{L}$ de α -Metil-Manosídeo imediatamente ao final da injeção de lectina, nas mesmas condições.

4.4.3 TERMODINÂMICA DE LIGAÇÃO PARA ANÁLOGOS DEÓXI DO NÚCLEO TRIMANOSÍDICO DE OLIGOSSACARÍDEOS LIGADOS À ASPARAGINA

Os experimentos de microcalorimetria de titulação isotérmica foram conduzidos em calorímetro de titulação isotérmica utilizando sistema MCS de Microcal Inc. Nas titulações individuais, injeções de $4 \text{ }\mu\text{L}$

de carboidrato foram aplicadas por microseringa controlada por computador a intervalos de 4 minutos junto à solução de lectina (volume celular = 1,358 mL) dissolvida no mesmo tampão do carboidrato utilizado, enquanto é centrifugado a 350 rpm. O tampão utilizado foi HEPES 0,1 M contendo NaCl 1,0 M, CaCl₂ e MnCl₂, 5 mM cada, pH 7,2. O experimento controle foi efetuado por injeções idênticas de carboidrato junto à célula de reação, contendo tampão sem proteína, a qual mostrou valores insignificantes de calor por diluição.

Os dados obtidos foram plotados em curva de titulação em software próprio, com ΔH (entalpia em Kcal mol⁻¹), K_a (constante de associação em M⁻¹) e n (número de sítios ligantes por monômero) como parâmetros ajustáveis. O instrumento foi calibrado utilizando o kit de calibração contendo ribonuclease (Rnase A) e citidina 2-monofosfato fornecida pelo fabricante. Os parâmetros termodinâmicos foram calculados através da equação:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = RT \ln K_a$$

onde ΔG , ΔH e ΔS representam as mudanças na energia livre, entalpia e entropia de ligação. T = temperatura absoluta e R = 1,98 cal. Mol⁻¹.K⁻¹.

4.5 OBTENÇÃO DE CROMOSSOMOS METAFÁSICOS

Sementes de *C. grandiflora* Benth. foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 10%, lavadas com água destilada e postas para germinar no escuro sobre papel de filtro úmido, em placas de petri. As raízes foram coletadas ao 5º dia de germinação e pré-tratadas com 8-hidroxiquinoléina 0,1% por 2 horas e fixadas em Carnoy 3:1 água por 5 a 18 horas. A preparação das lâminas foi feita segundo GUERRA (1983), utilizando o corante Giemsa. As fotografias foram feitas em filme Plus X Pan (Kodak).

4.6 CLONAGEM DO GENE *ConGF* EM *Escherichia coli*

4.6.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.6.1.1 Considerações Gerais: A estratégia para a inserção do gene *ConGF* em vetor de clonagem procariótico (pGEM-T) com posterior transformação de *E. coli* foi fundamentada em SAMBROOK *et al.*, (1989) e também em outras referências, citadas ao longo deste trabalho. Apresentaremos aqui alguns poucos esclarecimentos necessários sobre alguns procedimentos de clonagem, visando tanto o entendimento como a justificativa para o seu uso. Um esquema geral para a compreensão da clonagem do gene *ConGF* utilizado neste trabalho é visualizado na FIGURA 02.

Uma das bases que permitiram este trabalho foi a metodologia PCR. Com o advento da técnica PCR ("Polymerase chain reaction" ou reação da polimerase em cadeia) (MULLIS & FALOONA, 1987) criou-se uma revolução na pesquisa em biologia molecular e suas aplicações. A técnica PCR é um método *in vitro* que enzimaticamente amplifica sequências específicas de DNA usando iniciadores oligonucleotídicos que flanqueiam a região de interesse. Seu princípio envolve uma série de ciclos repetitivos, os quais consistem de desnaturação do DNA molde, anelamento dos iniciadores e extensão dos mesmos através de uma DNA polimerase para criar uma acumulação exponencial do fragmento cujas extremidades são determinadas pela terminação 5' dos primers. O método foi revolucionado pela introdução de termocicladores automáticos e de uma DNA polimerase termoestável (*Taq* DNA polimerase) (EELES *et al.*, 1993). A enzima *Taq* DNA polimerase promove a adição de nucleotídeos ao molde de DNA genômico, tendo já anelados os iniciadores. A enzima é isolada de *Thermus aquaticus* YT1. Esta consiste de um simples polipeptídeo com um peso molecular de aproximadamente 94 kDa, é estável ao calor e polimeriza o DNA em altas temperaturas, sendo portanto, indispensável à reação de PCR (INNIS *et al.*, 1990).

ESQUEMA DE CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO

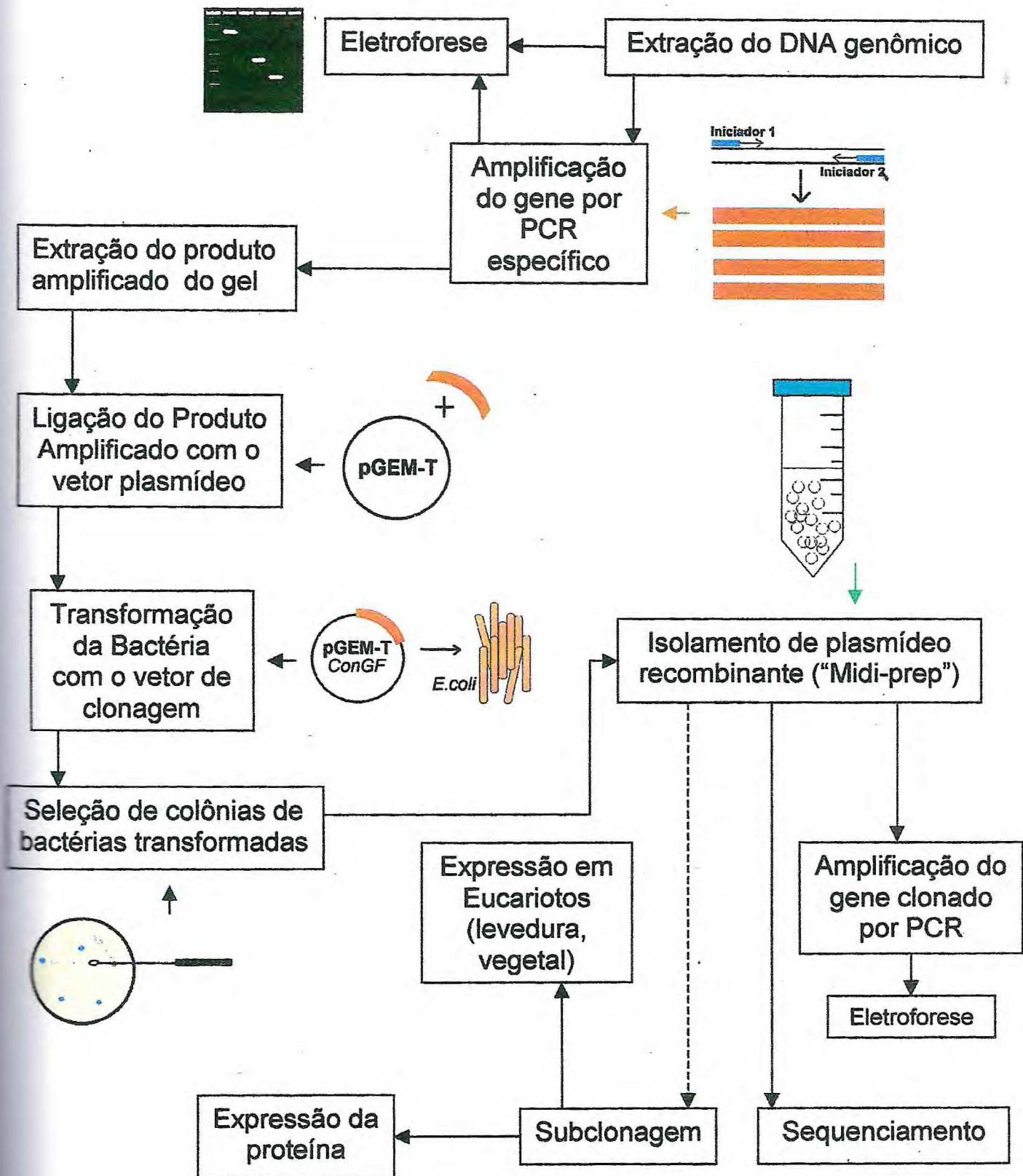


FIGURA 02 – Esquema ilustrativo do protocolo de clonagem do gene *ConGF* e transformação da bactéria *E. coli*. As linhas pontilhadas são passos não realizados.

4.6.1.2 Otimização da reação da polimerase em cadeia: A despeito da aparente simplicidade da técnica de PCR, esta possui uma quantidade relativamente alta de variáveis associadas. O PCR necessita, portanto, ser otimizado tanto com relação à eficiência quanto à especificidade. Portanto, antes da reação final ser obtida (ítem 4.5.2.2), algumas variáveis foram testadas buscando obter a melhor amplificação possível, pela obtenção de uma banda mais brilhante na eletroforese de gel de agarose. As variáveis otimizadas foram:

- quantidade de DNA genômico: foram testados os seguintes volumes 2,5; 5,0; 7,5 e 10 μL de DNA genômico.
- temperatura de anelamento: foram testadas as temperaturas de 45 °C e 50 °C.
- tempo de anelamento: foram testados os tempos de 1 e 2 minutos.
- volume de reação: foram testados os volumes de 5 e 10 μL .

As variáveis otimizadas foram inseridas no protocolo descrito no ítem 4.5.2.2.

4.6.1.3 Uso de iniciadores específicos: Foram utilizados iniciadores (ou "primers") desenhados e testados especificamente para o gene *ConBr* de *C. brasiliensis* (GRANGEIRO et al., 1997). O iniciador 1 e o iniciador 2 são oligonucleotídeos cujas sequências são complementares, respectivamente, para o início e término do gene citado. As sequências dos iniciadores estão relacionadas abaixo:

iniciador 3' (fita anti-senso)

CAT ATG GCC ATC TCA AAG AAA ATC

iniciador 5' (fita senso)

GGA TCC TCA AAC CAC GGT AGC AAT

4.6.1.4 Extração do DNA genômico: A maioria dos protocolos básicos de extração de DNA genômico utiliza a metodologia CTAB, a qual explora a habilidade do detergente CTAB (cetil trietil amônio brometo) de formar complexos solúveis estáveis com ácidos nucléicos em altas concentrações salinas que podem ser precipitadas pela diminuição da mesma (MURRAY & THOMPSON, 1980). Esta técnica se presta mais especificamente no caso de plantas, cuja célula contém altas concentrações de carboidratos e polifenóis que tornam o extrato de DNA escuro e tem a vantagem de não requerer grandes volumes de fenol para a extração de proteínas. Alguns protocolos incorporam o uso de detergente SDS (dodecil sulfato de sódio) em conjunto com proteinase K e outros componentes como antioxidantes e agentes quelantes (WATSON & THOMPSON, 1986).

4.6.1.5 Sistema de inserção do produto amplificado ao vetor: Os sistemas de vetores de clonagem pGEM-T (Promega) (FIGURA 03) são sistemas desenhados objetivando a inserção de produtos de PCR. O local de inserção possui uma timina 3' adicionada à ambas às extremidades (FIGURA 04-A). Este sítio de inserção aumenta a eficiência de inserção de produtos de PCR por impedir a recircularização do vetor. A *Taq* DNA polimerase adiciona uma adenina às extremidades do produto de PCR, providenciando uma ligação eficiente do vetor ao produto de PCR, auxiliado pela enzima T4 DNA ligase. O local específico está representado na FIGURA 04-B (pGEM-T PROMEGA TECHNICAL MANUAL, 2000).

4.6.1.6 Transfecção gênica utilizando CaCl_2 : Um dos passos mais limitantes é a transformação da bactéria com o plasmídeo recombinante. O método mais comumente utilizado para transfecção envolve os íons Cálcio, como um facilitador para a adsorção à superfície celular e subsequente entrada do DNA transfetado. A maioria do DNA transfetado para dentro do núcleo é retido como DNA extracromossômico por um curto período de tempo ("expressão transiente") e é gradualmente degradado e subsequente perido do nucleoplasma das células hospedeiras em proliferação. Entretanto, algum DNA se integra ao cromossomo hospedeiro, por recombinação não específica, levando a uma transformação estável das células para o novo fenótipo (OKAYAMA & CHEN, 1991).

4.6.1.7 Utilização do gene repórter: Idealmente, um gene repórter deve codificar um produto que seja estável, inócuo para a célula ou microorganismo e ser facilmente detectável, mesmo presente em pequenas quantidades. O gene *LacZ* proveniente de *E. coli* codifica a hidrolase de glicosídeos, a enzima β -D-galactosidase (β -Gal) (E. C. 3.2.1.23). O substrato, X-Gal (aplicado sobre a superfície da placa de cultura) é hidrolisado pelas β -galactosidases para gerar galactose e moléculas indoxil solúveis, que por sua vez são oxidadas tornando-se insolúveis, apresentando uma cor azul escura, plenamente visível, mesmo em colônias minúsculas. A cor azul profundo gerada pela hidrólise de X-Gal por β -Gal facilitou a localização de colônias não recombinantes (CASADABAN *et al.*, 1983).

4.6.1.8 Isolamento de plasmídeo através de extração alcalina: Plasmídeos são moléculas de DNA de fita dupla, circulares, com propriedade de auto-replicação e independentes do DNA cromossômico (FIGURA 03). Algumas metodologias de sequenciamentos exigem que se obtenha uma alta concentração de plasmídeos recombinantes. O isolamento do DNA plasmidial de *E. coli* requer que este seja separado do DNA cromossômico da bactéria e também de outros componentes macromoleculares. A extração alcalina explora a natureza circular covalentemente fechada ("CCC – covalently closed circular") e o peso molecular especialmente alto do DNA cromossômico. Quando o extrato celular é exposto em condições

de pH alcalino em torno de 12,0 a 12,6, o DNA linear (cromossômico) é desnaturado, mas o plasmídeo não. Com a neutralização do extrato, na presença de alta concentração salina, a precipitação do DNA cromossômico ocorre, mas o DNA CCC continua em suspensão. O RNA celular e proteínas são precipitados nestas condições, especialmente se as proteínas forem primeiro complexadas com um detergente aniónico, SDS (dodecil sulfato de sódio). A combinação apropriada de reagentes e centrifugações, a precipitação da maioria do DNA cromossômico, RNA e proteínas pode ser feita em um só passo (BIRNBOIM, 1989).

4.6.2 PROTOCOLO DE CLONAGEM

4.6.2.1 Extração do DNA genômico: A extração do DNA genômico foi baseada nos protocolos descritos em WARNER (1996). Utilizando-se 0,5 g de folhas recém expandidas de *C. grandiflora*, macerou-se em almofariz em contato com nitrogênio líquido. O material pulverizado foi colocado em tubo Falcon e adicionados 6 mL de tampão de extração CTAB 2x em adição a 12 µL de mercaptoetanol, pré aquecidos a 60 °C.

A mistura foi incubada a 60 °C, invertendo-se o tubo várias vezes, por uma noite. Foram adicionados 6 mL de mistura de clorofórmio-álcool isoamílico 25:1 (v/v). O tubo Falcon foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa obtida (fase superior) foi transferida para um tubo limpo e foi adicionado 8 mL de isopropanol 100%, invertendo-se o tubo, verificando a ocorrência de precipitado. Foi centrifugado novamente por 2 minutos, retirando-se o sobrenadante. Foi adicionado 3 mL de NaCl 1 M para a lavagem das impurezas. Foi adicionado 7,5 mL de etanol 100% para reprecipitação do DNA. Após 30 minutos em repouso à temperatura ambiente, a mistura foi novamente centrifugada 2 minutos a 1500 rpm para a coleta do precipitado. Foi adicionado 2 mL de etanol 70% e foi centrifugado novamente da mesma maneira anterior. O sobrenadante foi retirado e o precipitado de DNA foi deixado secando ao ar. Por fim, foi adicionado 2 mL de TE pH 8,0. Uma alíquota foi retirada para a medida de Absorbância e cálculo do rendimento do DNA na amostra.

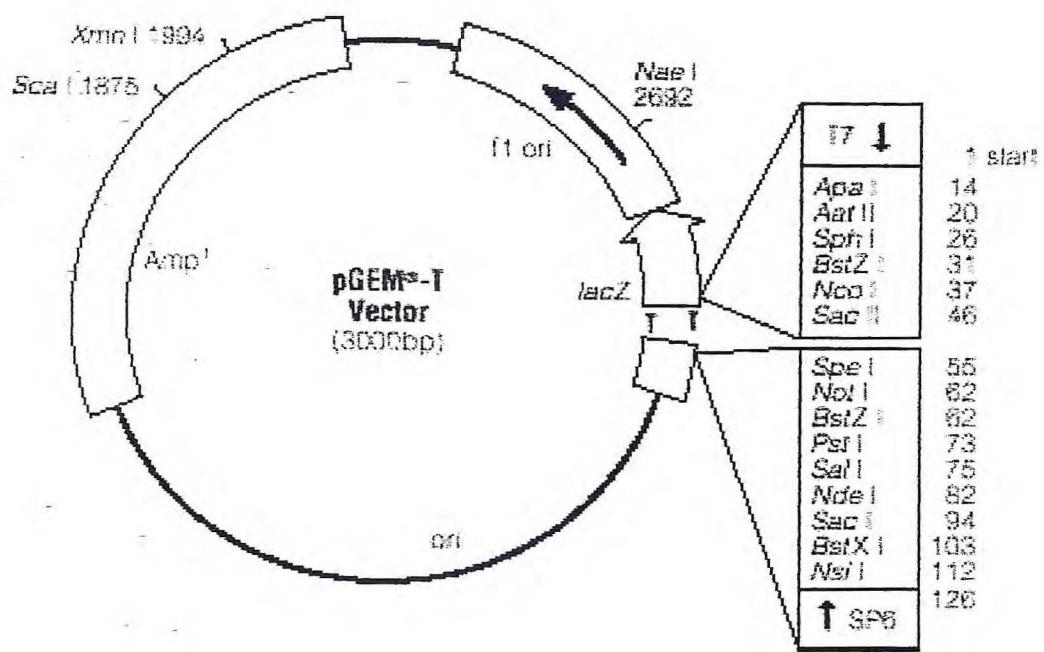
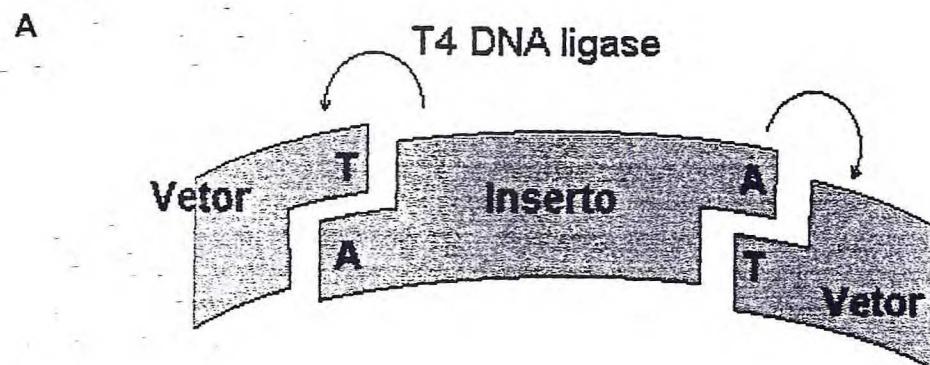


FIGURA 03 – Mapa circular do vetor de clonagem procariótico pGEM-T (Promega). No detalhe, possíveis locais de digestão com nucleases de restrição no sítio múltiplo de clonagem.



B

5' TGTAA TACGA CTCAC TATAG GGCGA ATTGG GCCCG ACGTC GCATG CTCCC GCCG
 3' ACATT ATGCT GAGTG ATATC CCGCT TAACC CGGGC TGCAG CGTAC GAGGG CGGC

3'
 CCATTG GCCGC GGGAT T [] ATCAC TAGTG CGGCC GCCTG CAGGT CGACC ATATG
 GGTAAC CGGC CGCTTA [] T TAGTG ATCAC GCCGG CGGAC GTCCA GCTGG TATAC
 3'

GGAGA GCTCC CAACG CGTTG GATGC ATAGC TTGAG TATTC TATAG TGTCA CCTAA AT 3'
 CCTCT CGAGG GTTGC GCAAC CTACG TATCG AACTC ATAAG ATATC ACAGT GGATT TA 5'

FIGURA 04 – Diagrama esquemático do mecanismo e local específico da inserção do gene *ConGF* no vetor de clonagem procariótico pGEM-T (Promega). A – Mecanismo de inserção do gene clonado no vetor, mostrando como o inserto é estabilizado através de duas adeninas aderidas, durante a amplificação por PCR, pela enzima *Taq* polimerase e as extremidades ligadas pela enzima T4 DNA ligase. B – Local de inserção do gene *ConGF* na sequência nucleotídica do pGEM-T.

4.6.2.2 Amplificação do gene por PCR: O fragmento de DNA correspondente ao gene da lectina de sementes de *C. grandiflora* Benth. foi amplificado pela metodologia PCR. O substrato utilizado foi o DNA genômico. A reação de PCR foi obtida a partir da mistura dos reagentes abaixo em um microtubo de PCR estéril:

Tampão 10X	2,5 μ L
(TRIS-HCl 100 mM pH 9,0; MgCl ₂ 15 mM e KCl 500 mM)	
dNTPs (1,25 mM cada)	5,0 μ L
iniciador 1 (estoque 5 μ L em TE)	2,5 μ L
iniciador 2 (estoque 5 μ L em TE)	2,5 μ L
<i>taq</i> DNA polimerase	0,5 μ L
H ₂ O	7,0 μ L
DNA genômico	5,0 μ L

Os componentes da reação foram adicionados, acrescentando-se por último, a *Taq* DNA polimerase. A reação foi colocada em termociclador programado da seguinte forma:

1º ao 34º Ciclo	
Desnaturação.....	94
Anelamento.....	45
Extensão.....	72

Após o último ciclo, as amostras foram estocadas a 4 °C quando não foram imediatamente utilizadas. O controle negativo da reação foi feito utilizando-se água ao invés de DNA.

4.6.2.3 Eletroforese em gel de agarose a pH neutro: A eletroforese de DNA em gel de agarose foi baseada nos protocolos obtidos em SAMBROOK *et al.* (1989). A quantidade de agarose apropriada para se obter a concentração final de agarose desejada, expressa em percentagem (%) (m/v) foi adicionada a um volume determinado de TBE 0,5 X. Após o aquecimento, onde ocorre a dissolução da mistura, foi resfriada a 60 °C, adicionando-se EtBr (a partir de uma solução estoque de 10 mg/mL) de maneira a deixar a concentração final em 0,5 μ g/mL. O gel foi deixado em repouso na placa, para solidificação.

As amostras de DNA a serem analisadas foram previamente preparadas, diluindo-se 1/5 de seu volume com uma solução de azul de bromofenol 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v), preparada com TE. O tampão de corrida consistiu de TBE 0,5X contendo EtBr 0,5 μ g/mL.

Após as amplificações do gene da lectina, foi efetuada a eletroforese em gel de agarose 1%. A corrida foi efetuada sob V=150, durando em média, cerca de 15 minutos, até que a a linha do bromofenol

correspondente às amostras percorressem cerca de 2/3 do gel. Após a corrida, as bandas de DNA mostraram-se com coloração branca brilhante, em contraste com a luz ultravioleta de 302 nm. Foram efetuadas então, as fotos do gel. Marcadores moleculares de baixo peso ("Low Mass DNA Gibco") permitiram a identificação da banda.

4.6.2.4 Purificação da banda: A banda amplificada obtida na reação de PCR foi purificada através do kit "Concert" Gibco. A banda amplificada foi cortada com bisturi esterilizado, sob luz ultravioleta. Adicionou-se 30 µL do tampão L1 (TRIS-HCl 100mM, pH 7,5, contendo EDTA 10 mM) para cada 10 mg de gel de agarose. Foi adicionado então, resina de sílica na proporção de 1 mL para cada 10 mg de gel de agarose. Após rápida agitação do eppendorf em vórtex, foi incubado a 50 °C em banho-maria por, no mínimo, 15 minutos. Durante este período, foi feita agitação esporádica para completa dissolução do gel. O eppendorf foi centrifugado em centrifuga de mesa para tubos eppendorf a 12.000 g por um minuto. Foi removido e descartado o sobrenadante com pipeta. Foi adicionado então, mais 30 µL do tampão L1 para cada 10 mg de gel de agarose. Com a ressuspensão da resina, pela agitação do tubo, foi centrifugado novamente a 12.000 g, um minuto. O sobrenadante foi novamente removido e descartado com pipeta. Foi adicionado então, 30 µL do tampão L2 (NaOH 1M, SDS 5,3% p/v) para cada 10 mg de gel de agarose utilizado. Com a ressuspensão da resina, por agitação do tubo eppendorf, foi centrifugado novamente, a 12.000 g, um minuto. O sobrenadante foi novamente removido e descartado com pipeta. Este último passo, com adição do tampão L2 foi repetido mais uma vez. Ao retirar o sobrenadante, desta vez, o tubo eppendorf foi deixado aberto ao ambiente para secar, apoiado em papel de filtro. Foi adicionado então, 50 µL de TE e ressuspendeu-se a resina. Incubou-se por 5 minutos em banho-maria a 50 °C. Foi feita agitação uma vez durante a incubação. Foi centrifugado mais uma vez a 12.000 g, um minuto e por último, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo de 1,5 mL estéril e guardado em freezer para posterior utilização.

4.6.2.5 Reação de Ligação: A reação de ligação foi realizada de acordo com a mistura de reagentes abaixo:

Tampão 2x	10,0 µl
pGEM – T (50 ng/µL)	2,0 µl
DNA	7,0 µl
T4 DNA ligase	1,0 µl

Dois controles foram incluídos, uma reação sem o produto de PCR e uma outra sem o vetor. A reação de ligação foi feita a 4 °C, por uma noite.

4.6.2.6 Meios de Cultura: O cultivo de *E. coli* foi efetuado no seguinte meio:

Meio LB (Luria-Bertani)

Reagentes	Volume
Bacto Triptona.....	10 g
Extrato de Levedura	5 g
NaCl.....	10 g

Os reagentes foram dissolvidos em cerca de 900 mL de água destilada e após o pH ser ajustado para 7,0 com NaOH 5N, o volume foi completado para 1000 mL. Procedeu-se então à esterilização por meio de autoclave a 127 °C por 20 minutos a 15 lb/pol³.

Para a preparação de meio sólido, o meio líquido acima recebeu, antes da autoclavagem, bacto agar na concentração de 15 g/l. O meio foi então autoclavado e derramado (cerca de 30 mL) em placas de Petri autoclavadas, deixado solidificar à temperatura ambiente. Após isto, as placas foram fechadas, invertidas e guardadas a 4 °C, até sua posterior utilização.

Para o uso de placas, ou meio líquido contendo antibiótico (Ampicilina), esta foi adicionada, a partir de uma solução estoque de 50 mg/mL, sendo a concentração final de 200 µg/mL. A obtenção do estoque estéril foi feita com uso de ultrafiltração. A diluição também foi feita sob total esterilidade. A solução diluída foi aplicada ao meio antes da solidificação (em torno dos 30 °C), ou no caso de meio líquido, quando este esfriasse até esta temperatura. Os materiais contendo o antibiótico foram resguardados da luz.

No caso de placas contendo X-Gal, utilizadas na seleção de colônias recombinantes, após a solidificação, foram colocados 50 µL de X-Gal 20 mg/mL (em N,N-dimetilformamida) sobre a placa. A solução era então espalhada igualmente com o auxílio de alça de vidro sobre toda a superfície da placa.

4.6.2.7 Preparação de células competentes de *E. coli*: Uma única colônia de *E. coli* DH5 α foi incubada em 5 mL de meio LB à temperatura ambiente, sob agitação vigorosa por uma noite. Foi verificado o crescimento de bactérias, visualmente, através de turvação do meio, e foi utilizado estes 5 mL como inóculo para 100 mL de meio LB, sendo incubado então sob agitação vigorosa por aproximadamente 3 horas quando foi verificado que a OD₆₀₀ se situava na faixa de 0,2 a 0,3. As células foram obtidas do meio a partir de centrifugação (3000g por 15 minutos), pela retirada do sobrenadante. O precipitado de células com 50 mL de CaCl₂ 50 mM gelado foi ressuspensido, procedendo-se novamente a centrifugação, desta feita, em 2 mL. A suspensão de células foi mantida em gelo até ser utilizada na transformação com o plasmídeo.

4.6.2.8 Transformação de células competentes de *E. coli* com o vetor de clonagem: A partir das células competentes de *E. coli*, procedeu-se à transformação. Da reação de ligação (item 4.6.2.5) foi tomada uma alíquota de 10 µL e foi adicionada à 200 µL da suspensão de células competentes recém

preparadas. O controle da transformação foi feito utilizando-se água ao invés da ligação. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, três minutos a 42 °C e novamente no gelo por 2 minutos. Foram adicionados 800 μ L de meio LB e foi incubado em banho-maria a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. Após a incubação, as bactérias foram plaqueadas, pela distribuição de 200 μ L de mistura em placas contendo meio LB agar com Ampicilina 200 μ g/mL e 50 μ L de X-Gal 20 mg/mL em N,N-dimetilformamida. O meio contendo as bactérias em transformação foi pipetado sobre as placas e espalhado com o auxílio de uma alça de vidro.

4.6.2.9 Seleção de colônias de bactérias transformadas: As placas foram incubadas a 37 °C, no escuro, por aproximadamente 12 horas até o aparecimento de colônias com 1-2 mm de diâmetro. Nestas condições, as colônias contendo o plasmídeo não recombinante (sem inserte) são azuis e as colônias contendo o plasmídeo recombinante mostram-se brancas (item 4.6.1.7). As placas que mostraram a presença de ambos os tipos de colônias foram utilizadas.

Verificado o crescimento, algumas colônias de cor branca, mostrando serem aparentemente recombinantes, foram repicadas em 5 mL de meio LB para a recuperação do plasmídeo.

4.6.2.10. Isolamento de plasmídeos recombinantes: O protocolo de lise alcalina descrito em SAMBROOK *et al.*, (1989) foi utilizado para o teste da presença de plasmídeo nas bactérias. As colônias brancas, escolhidas ao acaso, foram retiradas da placa de petri com uma alça de inoculação e postas a crescer em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina 200 μ g/mL, em tubos Falcon estéreis. O crescimento foi efetuado durante toda uma noite, sob agitação rápida, à temperatura ambiente. Nos tubos onde foi observado crescimento de bactérias, por visualização de turvação do meio LB, foi procedido ao isolamento do plasmídeo, pela retirada de uma alíquota de 1,5 mL de cultura de *E. coli* para utilização no kit *Miniprep Flexiprep Pharmacia*. A alíquota foi transferida para tubo de eppendorf estéril e centrifugado em microcentrifuga de mesa à velocidade máxima (\pm 12.000 x g) por um minuto, para a formação de precipitado de células. O sobrenadante foi descartado, por aspiração com pipeta. O precipitado foi dissolvido em 200 μ L de Solução I (TRIS-HCl 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM, RNase I 400 μ g/mL) sob vigorosa agitação com vórtex. Foi adicionado 200 μ L de Solução II (NaOH 1,0 M, SDS 1%), agitando o tubo várias vezes. Com a lise das células, a suspensão bacteriana mostrou-se clara e límpida. Foi adicionado então 200 mL de Solução III (acetato de potássio 3 M), misturando-se o conteúdo por inversão várias vezes. Foi centrifugado à velocidade máxima por cinco minutos, à temperatura ambiente. Foi adicionado 420 μ L (cerca de 0,7 do volume) de isopropanol à temperatura ambiente ao sobrenadante, agitando-se para misturar. A mistura foi deixada por uma noite para precipitação do plasmídeo, quando foi centrifugada, então, à velocidade máxima em microcentrifuga por 10 minutos, à temperatura ambiente, obtendo-se o centrifugado de DNA do

plasmídeo. O sobrenadante foi descartado por aspiração com pipeta. O precipitado foi ressuspensido em 40 μL de Tee guardado o eppendorf em freezer para posterior utilização.

4.6.2.11 Amplificação do gene clonado por PCR: A verificação final de que os clones selecionados procediam de colônias recombinantes foi feito através de PCR. A reação de PCR foi efetuada utilizando-se uma alíquota de 5 μL de DNA plasmídial de cada colônia para amplificação do inserte no plasmídeo pGEM – T. A reação foi efetuada de acordo com o item 4.6.2.2.

4.6.2.12 Eletroforese final dos plasmídeos recombinantes: Após a reação de PCR, a eletroforese em gel de agarose (item 4.6.2.3) revelou ou não a banda referente à presença de plasmídeo recombinante nos clones (colônias brancas) selecionados.

4.7 SEQUENCIAMENTO

4.7.1 Sequenciamento de aminoácidos

A sequência de nucleotídeos do inserto foi determinada pelo método enzimático de terminação da cadeia nucleotídica por didesoxi, descrito inicialmente por SANGER *et al.*, (1977).

4.7.2 Sequenciamento de Nucleotídeos

O sequenciamento de nucleotídeos foi efetuado no sequenciador automático *MegaBACE DNA Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech) instalado no Laboratório de Citogenética e Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Reação de sequenciamento: Para a reação de sequenciamento (amplificação do inserto) utilizou se a metodologia descrita no protocolo *DYEnamic ET Dye Terminator Kit MegaBACE* específico para o sequenciamento utilizando o sequenciador automático *MegaBACE 1000*. A mistura foi preparada da seguinte forma: Ø Premix – 8,0 μL ; Ø Primer – 2,0 μL ; Ø DNA template – 10,0 μL .

Para cada poço da placa adicionou-se 5 μL da mistura e 5 μL do DNA template. As placas então eram levadas ao termociclador para a amplificação utilizando-se o programa indicado no *Dye ET Terminator MegaBACE Kit* como segue:

Temperatura	Tempo
95 °C	20 segundos
50 °C	15 segundos
60 °C	60 segundos

retorno ao início (durante 34 ciclos), permanecendo a 4°C indefinidamente.

Reação de precipitação: Na reação de precipitação adicionou-se 1 μ L (volume de 10 μ L de reação, equivalente a 1/10 do volume da reação) de acetato de amônia 7,5 M em cada tubo (poço) e 2,5 volumes (27,5 μ L) de etanol 100% ou 60 μ L de etanol 95%. As placas foram deixadas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro e centrifugadas por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 μ L de etanol 70% gelado, centrifugando-se novamente por 10 minutos para lavagem do precipitado. O sobrenadante foi retirado por inversão e o precipitado deixado para secar por 20 minutos para ser ressuspenso em 10 μ L de tampão de amostra ("loading solution"). Após este procedimento, o material foi levado para a geladeira, permanecendo por uma noite, para posterior sequenciamento.

Os parâmetros para a corrida foram: Injeção da amostra – 4 kV por 50 segundos. Tempo e voltagem de corrida – 103 minutos com 9 kV constante.

4.8 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E PRODUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS

O programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) foi utilizado, o qual, como a maioria dos programas de alinhamento múltiplo baseia-se numa "dinâmica de alinhamento progressivo" (FENG & DOOLITTLE, 1987), onde, a partir de uma matriz de distâncias, utiliza-se uma rotina onde se agrupam as sequências par a par ("pairwise alignment"). A construção de uma árvore guia foi baseada no algoritmo Neighbor-Joining (SAITOU & NEY, 1987). As árvores foram visualizadas com o programa TREEVIEW (<http://taxonomy.zoology.gla.uk/rod/rod.html>). As sequências (tanto de aminoácidos como de nucleotídeos) foram obtidas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.9 CÁLCULO DO NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS E NÃO-SINÔNIMAS

As sequências de nucleotídeos, obtidas no GenBank foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W. O cálculo utilizado para obtenção do número de substituições sinônimas e não-sinônimas foi obtido em LI & GRAUR, (1991). O alinhamento foi utilizado como entrada de dados para os programas *K-estimator* (COMERON, 1995; COMERON, 1999) e *DNAsp* (*DNA sequence polymorphism*) (ROZAS & ROZAS, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 1

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DA LECTINA DE SEMENTES DE *CANAVALIA GRANDIFLORA* BENTH.

5.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA

5.1.1 pH DE EXTRAÇÃO

Para se estabelecer qual o melhor valor de pH no tampão, para extração de proteínas solúveis de sementes de *C. grandiflora*, foram testados três valores de pH: 2,6; 7,6 e 9,0 obtendo-se os valores seguintes, numa média de 3 extrações (em mgP/gF): 179, 245 e 234, respectivamente. O aumento do pH possibilitou uma solubilidade maior das proteínas e melhorou a extração. Assim, a extração a pH ácido (2,6) mostrou uma quantidade menor de proteínas, em comparação aos outros dois valores de pH (7,6 e 9,0). Entre estes dois valores de pH não ficou caracterizada uma diferença significativa. Portanto, em vista destes resultados, para a solução salina utilizada na extração e purificação, não se impôs alteração no pH (neutro) da solução.

5.1.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A TABELA 06 apresenta a purificação obtida para a extração da lectina de *C. grandiflora* a partir da farinha de sementes. Nesta, foi observado que a quantidade de proteínas solúveis totais diminuiu para cerca de 2% do teor inicial. Com a purificação, entretanto, a atividade hemaglutinante concentrou-se no pico retido, indicando que ocorreu um aumento significativo na concentração de lectina.

5.1.3 CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM SEPHADEX G-50

O extrato total de sementes de *C. grandiflora* quando submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (FIGURA 05) apresentou dois picos cromatográficos. O primeiro pico, não adsorvido ao polímero, mostrou-se destituído de atividade hemaglutinante, enquanto o segundo pico, eluído com glicose, apresentou a máxima atividade hemaglutinante, conforme discutido no item 5.1.2. A utilização de Sephadex, um polímero de D-glicose é um procedimento quase unânime de purificação para as lectinas que interagem especificamente com D-glicose, D-manoze e estruturas derivadas. Para as espécies de *Diocleinae*, inúmeros trabalhos têm explorado esta particularidade (MOREIRA & CAVADA, 1984; OLIVEIRA et al., 1991; VASCONCELOS et al., 1991). Outros trabalhos reportam outras matrizes, como Sephacril (para *D. lehmanii* – PEREZ et al., 1991) e maltamil-Sepharose (para *C. gladiata* – KOJIMA et al., 1991).

5.1.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS E 2-MERCAPTOETANOL

O perfil eletroforético da lectina purificada de *C. grandiflora* em conjunto com outros passos de extração e purificação é apresentado na FIGURA 06. No poço 3, farinha de sementes de *C. grandiflora*, observa-se a presença de várias bandas eletroforéticas que desaparecem após a extração (poço 4 – extrato total). O pico não retido (poço 5 - PII) apresentou alguns poucos sinais de bandas, devido à extrema diluição. O perfil eletroforético do poço 4 (extrato total) e poço 6 (lectina purificada) são bastante semelhantes, entretanto, a atividade hemaglutinante específica (item 5.1.2, TABELA 06), contra eritrócitos de coelho, atestou a presença da lectina purificada. A lectina purificada (poço 6), comparada à lectina purificada de *C. brasiliensis* (ConBr) (poço 2) mostrou um padrão eletroforético bastante parecido. O padrão eletroforético apresentado pelas lectinas da subtribo *Diocleinae*, tanto dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* quando analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes apresentam um determinado padrão característico. Este padrão corresponde a três grupos de bandas protéicas, com massas moleculares aparentes próximas de 29-30 kDa (cadeia α), 16-18 kDa (fragmento β) e 12-13 kDa (fragmento γ) (ABE, 1971). Na figura, observou-se que o fragmento γ é pouco visível. Os fragmentos β e γ correspondem às metades N- e C- terminais da cadeia α . Esta mesma relação foi obtida para *Dioclea grandiflora* (RICHARDSON et al., 1984; AINUZ et al., 1987) e *Cratylia floribunda* através de comparação das seqüências de aminoácidos de seus fragmentos (CAVADA et al., 1999).

TABELA 06 – Purificação da lectina de sementes de *C. grandiflora* Benth.

Fração	Proteína total (mgP/ml)	Atividade Total (UH/ml)	Atividade Específica UH/mgP	Purificação
Extrato Total	1,76	2048	1163,6	1
Pico Não Retido (PI)	0,25	8	32	0,03
Pico Retido (PII)	0,035	64	1828,6	1,6

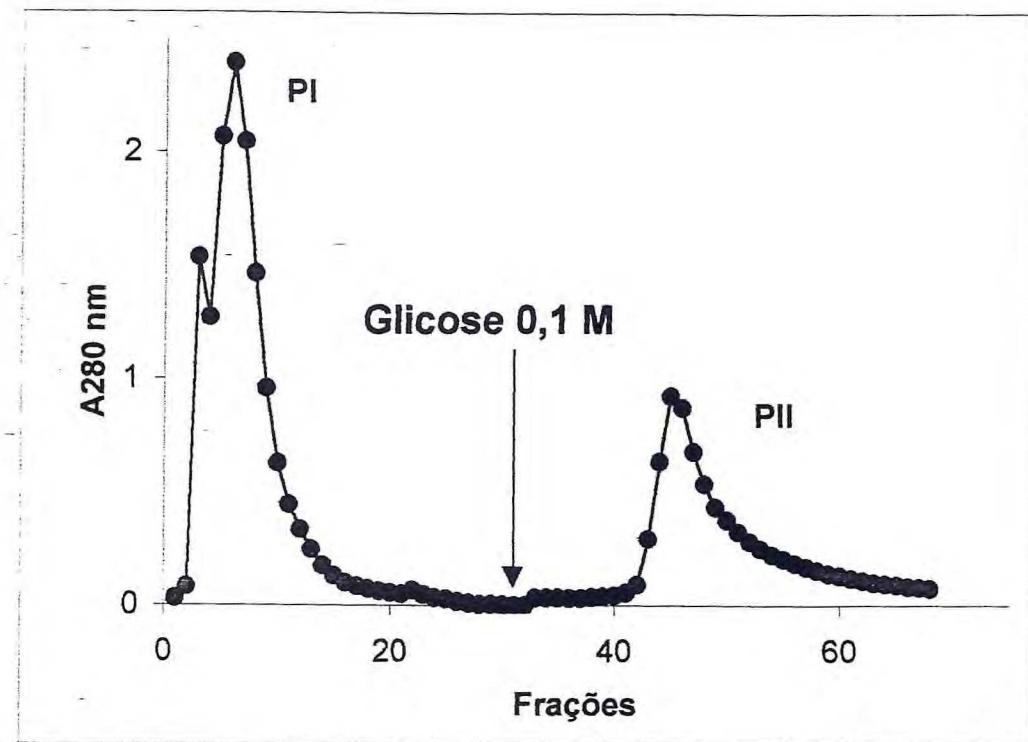


FIGURA 05 – Purificação da lectina de *C. grandiflora* Benth. por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ e MnCl₂ 5 mM. A seta indica o momento da eluição, efetuada com o tampão de equilíbrio contendo Glicose 0,1 M. Total de amostra aplicado: 10 ml. Frações: 1 ml/tubo. PI: Pico não retido; PII: Pico não retido.

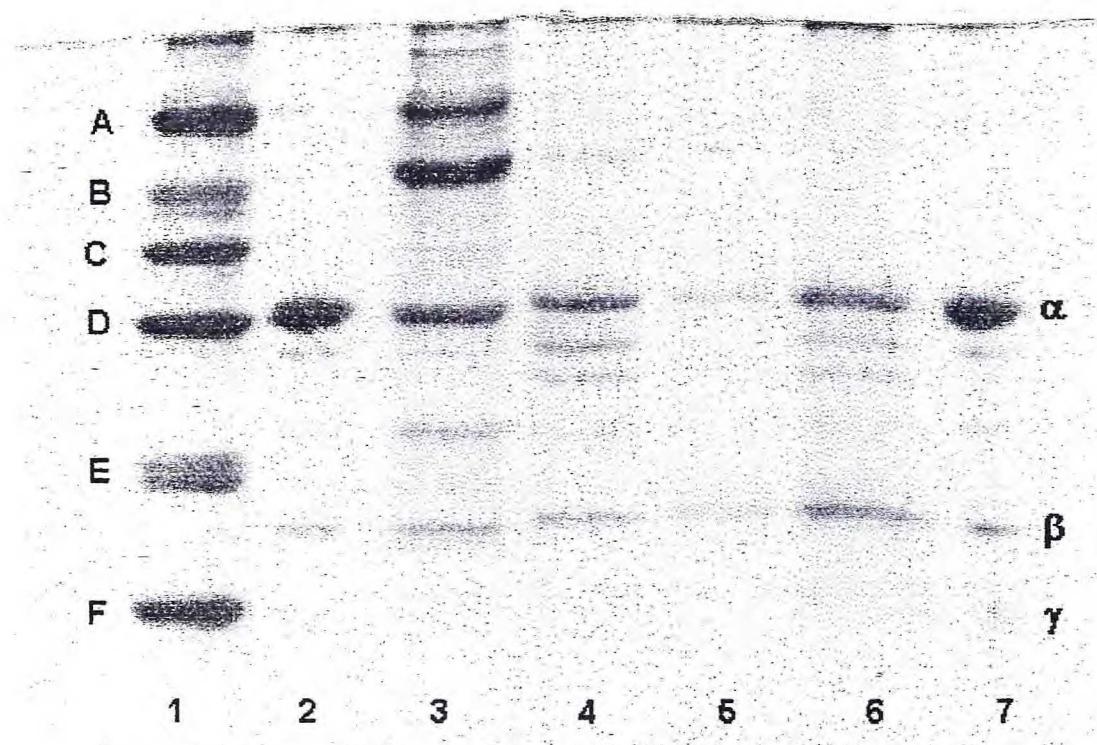


FIGURA 06 – Eletroforese de purificação da lectina de *C. grandiflora* Benth. em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptopetanol. 1 – Marcador molecular; 2 e 7 – Lectina de *C. brasiliensis* (ConBr) purificada; 3 – Farinha de sementes de *C. grandiflora*; 4 – Extrato Total; 5 – PII (pico não retido); 6 – Lectina de *C. grandiflora* (ConGF) purificada. Marcadores: A – Albumina bovina (66 kDa); B – Ovoalbumina (45 kDa); C – Gliceraldeído-3-P (36 kDa); D – Anidrase carbônica bovina (29 kDa); E – Inibidor Tripsina Soja (20 kDa); F – Lactalbumina bovina (14,2 kDa). α , β e γ = bandas correspondentes aos fragmentos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

5.2.1 ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

Nos dados apresentados de atividade hemaglutinante (TABELA 07), foi verificado uma forte hemaglutinação em coelho, com coágulos mais visíveis e duráveis que no ensaio com eritrócitos humanos do sistema ABO. Obteve-se, entretanto, uma atividade maior com o sangue humano tipo A tratado. Os coágulos obtidos mostravam pouca durabilidade, o que pode sugerir uma interessante propriedade da lectina testada. As lectinas de *Diocleinae* aglutinam fortemente hemácias de coelho nativas. Essa capacidade de aglutinar células advém do reconhecimento, pela proteína, de estruturas glicanas que podem ocupar o sítio de interação com carboidratos. As associações diméricas, triméricas, tetraméricas ou oligoméricas, freqüentemente promovidas, tornam possíveis a presença de dois ou mais sítios ativos para carboidratos, interagindo com duas superfícies celulares, aproximando as células e promovendo o fenômeno da aglutinação.

5.2.2 ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

A exemplo de outras proteínas de reserva, as lectinas de vegetais superiores mostram alto teor de aminoácidos ácidos, tais como ácido aspártico e ácido glutâmico e aminoácidos hidroxilados tais como serina e treonina, os quais podem fazer parte até mais de 30% do conteúdo de aminoácidos das sementes. Em compensação, são pobres ou destituídas de aminoácidos sulfurados (LIS & SHARON, 1981). A lectina de *C. grandiflora* também apresentou este padrão como mostra sua composição de aminoácidos (TABELA 08). Os aminoácidos encontrados com valores mais elevados foram o ácido aspártico, seguido de serina e iuicina. Para arginina e histidina foram observados os menores valores percentuais. Não foram detectados metionina e cisteína.

5.2.3 IMUNODIFUSÃO DUPLA DE OUCHTERLONY

As proteínas são consideradas excelentes抗ígenos. Cada proteína possui distintos sítios em sua superfície conhecidos como determinantes抗ígenicos, contra os quais, anticorpos são produzidos. A exata natureza destes determinantes e sua relação com a sequência de aminoácidos da proteína é desconhecida. Entretanto, mudanças na sequência de aminoácidos de uma proteína é capaz de alterar a natureza dos determinantes抗ígenicos. A reação抗ígeno-anticorpo ocorre quando sítios complementares aos sítios de determinação抗ígenica e do抗ígeno se combinam, formando agregados que se precipitam, formando uma massa que se prende ao gel, retendo assim a coloração. A FIGURA 07 apresenta dois conjuntos de reações de imunoprecipitação dupla de Ouchterlony, em gel de agarose. No primeiro conjunto, (FIGURA 07-A), verificamos a reação de quatro lectinas com o anticorpo de *Vatairea macrocarpa*. Apenas a própria lectina de *V. macrocarpa* caracterizou uma reação imunológica total, com seu anticorpo, visualizada por uma faixa escura de precipitação. No segundo conjunto (FIGURA 07-B), temos a reação de quatro lectinas com o anticorpo de *C. brasiliensis*. Ocorreu reação imunológica total do anticorpo com as *Canavalia* e parcial com *D. rostrata* e surpreendentemente, sem faixa de reação com *D. guianensis*.

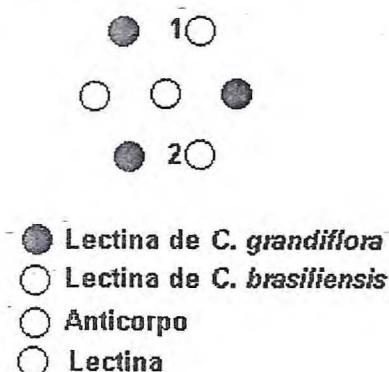
TABELA 07 – Atividade hemaglutinante em extrato total de sementes de *C. grandiflora* Benth.

Eritrócito (Sistema ABO e coelho)	Tratamento	Atividade Total (UH/gF)	Atividade Específica (UH/mg/mgP)
A	N	2565	19
	T	81925	382
B	N	2565	19
	T	5125	23
O	N	85	1
Coelho	N	165	1

TABELA 08 – Composição de aminoácidos da lectina de sementes *C. grandiflora* Benth.

Aminoácido	pmol/μl	%
Acido aspártico	32,03	16,20
Serina	21,40	10,83
Leucina	17,45	8,83
Glicina	16,83	8,51
Alanina	15,05	7,62
Acido glutâmico	14,54	7,36
Lisina	14,06	7,12
Treonina	13,53	6,85
Fenilalanina	13,53	6,85
Valina	12,28	6,21
Isoleucina	9,84	4,98
Prolina	8,94	4,52
Tirosina	3,97	2,01
Arginina	2,43	1,23
Histidina	1,72	0,87
Metionina	0	0
Cisteina	0	0
TOTAL	197,67	100,00

Diagrama dos Poços



- A** IgG *Vataarea macrocarpa*
 1 - Lectina de *Vataarea macrocarpa*
 2 - Lectina de *Cratylia floribunda*
B IgG *C. brasiliensis*
 1 - Lectina de *Dioclea rostrata*
 2 - Lectina de *Dioclea guianensis*

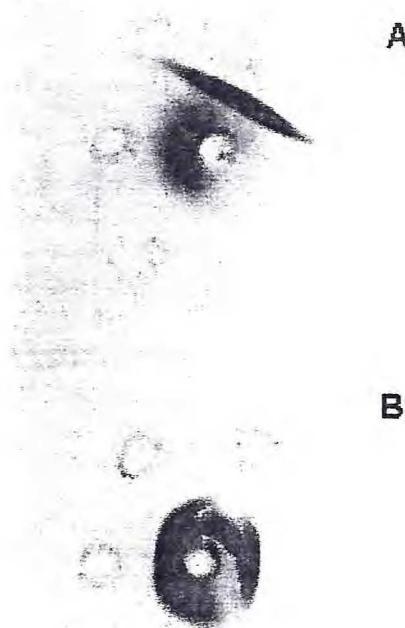


FIGURA 07 – Reação de imunoprecipitação dupla de Ouchterlony em gel de agarose 1,5 % em NaCl 0,15 M contendo glicose 0,1 M. A – Anticorpo de *Vataarea macrocarpa* x Lectinas de *C. grandiflora*; *C. brasiliensis*; *Vataarea macrocarpa* e *Cratylia floribunda*. B – Anticorpo de *C. brasiliensis* x Lectinas de *C. grandiflora*; *C. brasiliensis*; *Dioclea rostrata* e *Dioclea guianensis*.

5.3 ESPECIFICIDADE PARA AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS

5.3.1 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR AÇÚCARES E GLICOPROTEÍNAS

A TABELA 09 apresenta os dados relativos à inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas. Entre os açúcares testados, a manose mostrou ser um monossacarídeo capaz de inibir a reação. Além desta, os açúcares α -D-Metil-Manopiranosídio e α -Metil-D-Glicopiranosídeo, apresentando o mesmo valor de inibição (8,3 mM). Quanto às glicoproteínas, a tiroglobulina bovina foi a mais potente, inibindo a reação na concentração mínima de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, seguida pela tiroglobulina bovina, 21 e por último a Lactotransferrina Bovina, com concentração mínima de 167 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Lectinas de duas cadeias são inibidas por glicose, manose e seus derivados. Apesar de apresentarem somente uma cadeia, a lectina de sementes de *C. ensiformis* (Con A) e outras lectinas dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea* são inibidas por glicose, manose e derivados (RUDIGER, 1977). O fato da glicose não ter inibido a atividade hemaglutinante pode ser acarretado à concentração utilizada.

Existem casos onde duas lectinas da mesma planta são totalmente diferentes na especificidade por carboidratos, como em *Vicia cracca*, que contém uma série de isolectinas ligantes a GalNac e uma lectina que é específica por glicose/manose (BAUMANN et al., 1982).

5.3.2 CINÉTICA DA INTERAÇÃO CONGF COM GLICOPROTEÍNAS MEDIDA EM TEMPO REAL POR RESSONÂNCIA PLASMÔNICA DE SUPERFÍCIE

No intuito de avaliar com precisão a afinidade da lectina de sementes de *C. grandiflora* por várias glicoproteínas, utilizou-se a metodologia de ressonância plasmônica de superfície. Esta técnica permite medir a cinética de associação e dissociação entre duas moléculas em tempo real. Deste modo, comparativamente, é possível observar a cinética de reconhecimento desta lectina com estruturas glicanas complexas ligadas covalentemente a diferentes glicoproteínas.

Na FIGURA 08, observamos o teste da lectina solúvel sobre quatro glicoproteínas: ribonuclease B, taka diastase, orosomucóide e mucina suína. Neste teste foi utilizado o sensor chip SA. A mais reativa mostrou ser a ribonuclease B, com RU em torno de 800. As outras três mostraram pouca ou nenhuma reação com a lectina. A ribonuclease B possui todos os oligomanosídeos em sua estrutura (FIGURA 11, números 1 a 5). Este

dado é confirmado pelos dados apresentados para a inibição da atividade hemaglutinante por glicoproteínas discutido acima (ítem 5.3.1). A taka diastase, descrita contendo apenas o oligossacárido Man5 (FIGURA 11, número 5), revela que a lectina não deve interagir com esta receptor, ou que o faça muito fracamente. A orosomucóide, considerada uma glicoproteína menos reativa, possui principalmente glicanos do tipo N-acetillactosamina multiantenados. A falta de interação com a mucina bovina não concordou com os dados de inibição da atividade hemaglutinante (ítem 5.3.1).

Utilizando o chip sensor CM-Celulose, foram testadas outras glicoproteínas: lactotransferina bovina (LTB), asialofetuína, lectina de soja (SBA), sorotransferina humana (STF), lactotransferina humana (LTf) e a jacalina (FIGURA 09). O gráfico mostra uma alta interação (equivalente a 2000 RU) com a lactotransferina bovina, seguida pela lectina de soja (em torno de 500 RU). As outras glicoproteínas citadas não mostraram interação com a lectina. A alta interação com a LTB e a não interação com a asialofetuína já haviam sido observados no ensaio de inibição da atividade hemaglutinante. A LTB caracteriza-se por possuir heterogeneidade de N-glicanos em sua estrutura. A alta afinidade a esta glicoproteína sugere que a lectina pode reconhecer glicanos dos tipos N-acetillactosamina e oligomanosídeos.

A SBA é um tetrâmero com quatro subunidades idênticas que apresenta como carboidrato uma cadeia N-glicana Man9GlcNAc2 (FIGURA 11, número 1), conhecida por ser essencial para a regeneração da sua estrutura tetramérica funcional. Esta cadeia N-glicana é extensamente exposta, conforme foi proposto por MASAOKA et al., 1999, cujo trabalho demonstrou que ocorre uma forte afinidade da SBA com a ConA. A ConGF, por sua vez, mostrou uma interação intermediária com a SBA (em torno de 500 RU), sugerindo uma interação de intensidade intermediária com esta cadeia glicana.

A magnitude da interação da lectina com a glicoproteína ribonuclease B fixada no sensor chip foi testada através de eluições com três concentrações do açúcar α -D-Metil-Manopiranosídeo (25, 50 e 100 mM) (FIGURA 10). Observa-se que, a partir da concentração 25 mM, ocorre um substancial aumento da dissociação, que aumenta progressivamente com o aumento da concentração. O subgráfico apresentado no canto direito da FIGURA 10 mostra uma relação linear positiva de dissociação do eluidor utilizado com a lectina. Para este cálculo considerou-se que 100 mM de eluidor α -D-Metil-Manopiranosídeo propiciou 100% de dissociação da lectina com a ribonuclease. A afinidade da lectina pelo eluidor α -D-Metil-Manopiranosídeo foi, portanto, mais forte que a representada pela ribonuclease B da matriz.

Desta forma, através dos resultados dos três testes apresentados, a lectina ConGF mostrou alta afinidade específica com oligomanosídeos, especialmente pelo Man9, (alta afinidade por LTB e SBA) e não preferência pelo Man5 (baixa afinidade por Taka Diastase). Os resultados sugerem também que as interações entre lectinas e glicoproteínas são melhor definidas quando são utilizadas metodologias de cinética em tempo real.

5.3.3 – TERMODINÂMICA DE LIGAÇÃO PARA ANÁLOGOS DEÓXI DO NÚCLEO TRIMANOSÍDICO DE OLIGOSSACARÍDEOS LIGADOS À ASPARAGINA

As lectinas de *Diocleinae* exibem especificidade tanto à manose quanto à glicose, porém apresentam afinidades muito maiores para a cadeia ramificada trimanosídica 3,6-di-O-(α -D-manopiranosil)-D-manose, o qual é encontrado na região central de todos os carboidratos ligados à asparagina. Este fato também foi comprovado para a ConGF (item 5.3.1 - TABELA 09).

A microcalorimetria de titulação isotermal foi usada para avaliar a termodinâmica de algumas lectinas desta subtribo, incluindo a ConGF, para uma completa série de análogos monodeóxi do núcleo trimanosídico (DAM *et al.*, 2000).

A FIGURA 12 apresenta as estruturas do trimanosídeo, dos análogos deóxi e de um complexo oligossacarídico biantenário utilizados neste estudo. Os resultados indicaram que todas as lectinas estudadas possuem epítopenos conservados de reconhecimento para o trimanosídeo (1), similares àqueles observados para ConA e DGL, como foi sugerido por prévios estudos de inibição de hemaglutinação efetuados por DAM *et al.*, 1998. Entretanto, a magnitude dos dados termodinâmicos diferiram para todas as lectinas estudadas. Estes dados podem ser comparados na TABELA 10. A explicação para estas diferenças nos parâmetros termodinâmicos para as lectinas de *Diocleinae* esbarra na extrema conservação de suas estruturas. Esta dificuldade é enfatizada quando comparou-se os dados da ConA (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997) com os da DGL. Duas mudanças de aminoácidos resultaram em significativas diferenças nos parâmetros analisados para os análogos 7, 8 e 9, sugerindo que mudanças sutis na hidratação das duas proteínas ou diferenças em suas energias para transições conformacionais podem ser responsáveis por estas diferenças. Estas observações pontuam as dificuldades em se analizar as diferenças nos parâmetros termodinâmicos em termos de diferenças estruturais.

Os dados da TABELA 10 também demonstraram que a lectina de *C. grandiflora* possui um extensivo sítio de ligação para o trimanosídeo 1 ($K_a = 47,0 \text{ M}^{-1} \cdot 10^{-4}$) com um epítopo de reconhecimento similar ao complexo carboidrato biantenário 12 (FIGURA 12), uma glicana N-ligada que ocorre naturalmente (DAM *et al.*, 1998). As atividades das lectinas de *Diocleinae* para este complexo foram diretamente correlacionadas com a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos (DAM *et al.*, 1998).

A lectina de *C. grandiflora* mostrou dispor de um padrão similar de ligação para os análogos 2 a 11 similar aos encontrados para outras lectinas de *Diocleinae*.

TABELA 09 – Inibição da atividade hemaglutinante por açúcares e glicoproteínas

Açúcares	Concentração Mínima (mM) ¹
Glicose	NI
Manose	16,7
D-Glicose-6-P	NI
α -D-Metil-Manopiranosídeo	8,3
1-o-Metil- α -D-Glicopiranosídeo	8,3
ρ -Nitrofenil- β -D-Glicopiranosídeo	NI
N-Acetil-D-Glicosamina	NI
N-Acetil-D-Manosamina	NI
Ácido Glicurônico	NI
Glicoproteínas	($\mu\text{g. ml}^{-1}$)
Fetuína tipo III	NI
Asialofetuína tipo I	NI
Mucina suína	21
Mucina bovina	10
Tiroglobulina suína	NI
Tiroglobulina bovina	NI
Ovomucoide	NI
Albumina humana	NI
σ -globulina bovina	NI
Glicoproteína humana	NI
Apotransferina	NI
Inibidor de Tripsina	NI
Lactotransferina Férrica	NI
Lactotransferina Bovina	167
Outros	($\mu\text{g. ml}^{-1}$)
Ribonuclease	NI

¹ Concentração mínima de açúcar para inibição de 1 UH

² Não inibiu.

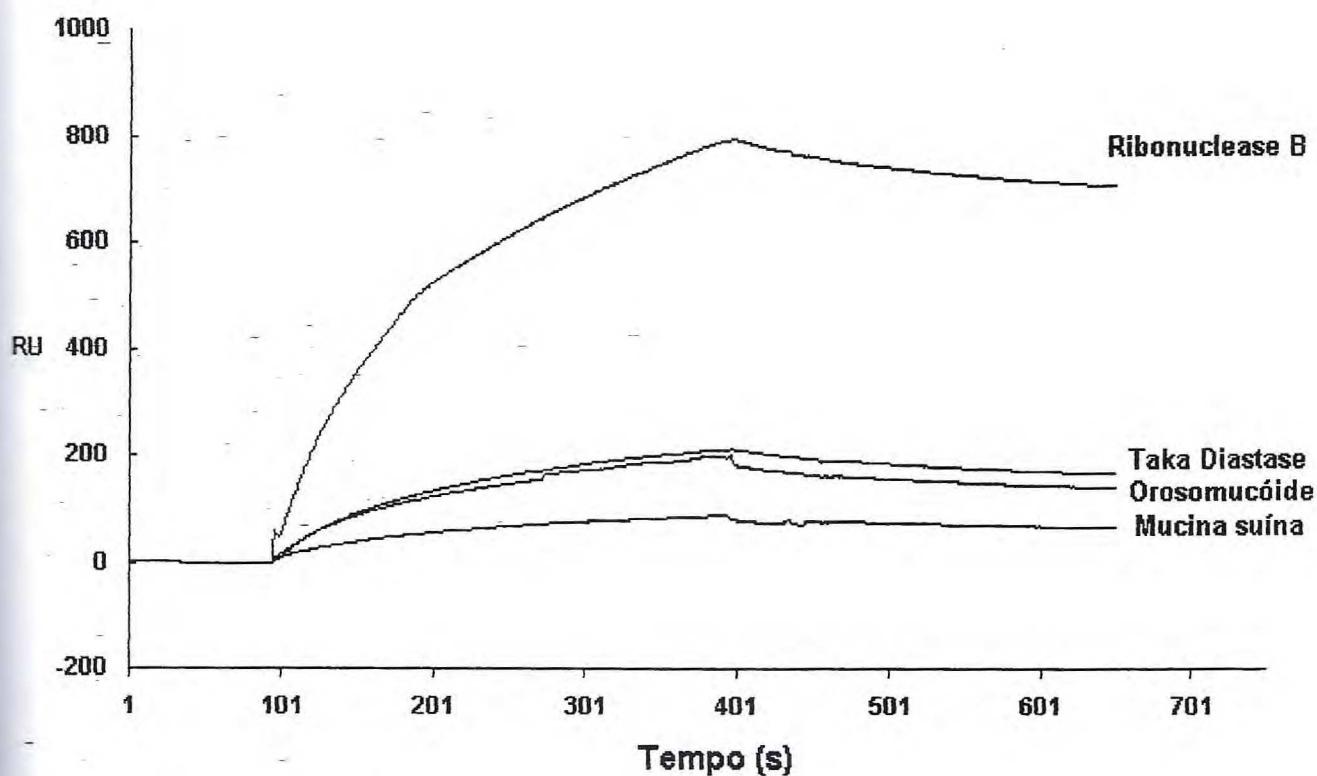


FIGURA 08 – Análise da interação em tempo real da lectina de sementes de *C. grandiflora* (ConGF) na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}^1$ com glicoproteínas immobilizadas, medidas através de ressonância plasmônica de superfície (RPS). As partes superior e inferior correspondem, respectivamente, às fases de associação (tampão circulante contendo a lectina) e dissociação (tampão sem lectina). RU = unidades de ressonância, injeção de 25 μl , fluxo de 5 $\mu\text{l}\cdot\text{m}^{-1}$.

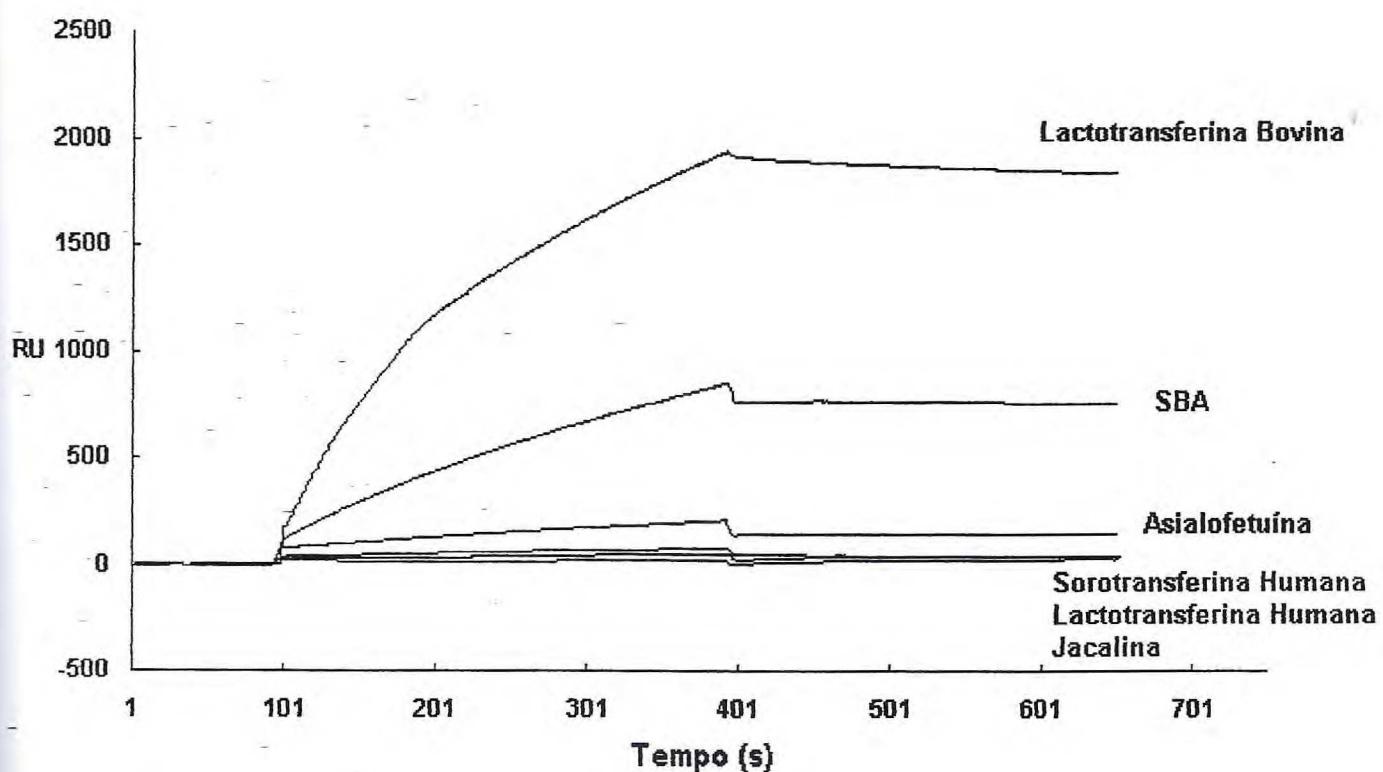


FIGURA 09 - Análise da interação em tempo real da lectina de sementes de *C. grandiflora* (ConGF) na concentração de $100 \mu\text{g/ml}^{-1}$ com glicoproteínas imobilizadas, medidas através de ressonância plasmônica de superfície (RPS). As partes superior e inferior correspondem, respectivamente, às fases de associação (tampão circulante contendo a lectina) e dissociação (tampão sem lectina). RU = unidades de ressonância, injeção de $25 \mu\text{l}$, fluxo de $5 \mu\text{l.m}^{-1}$.

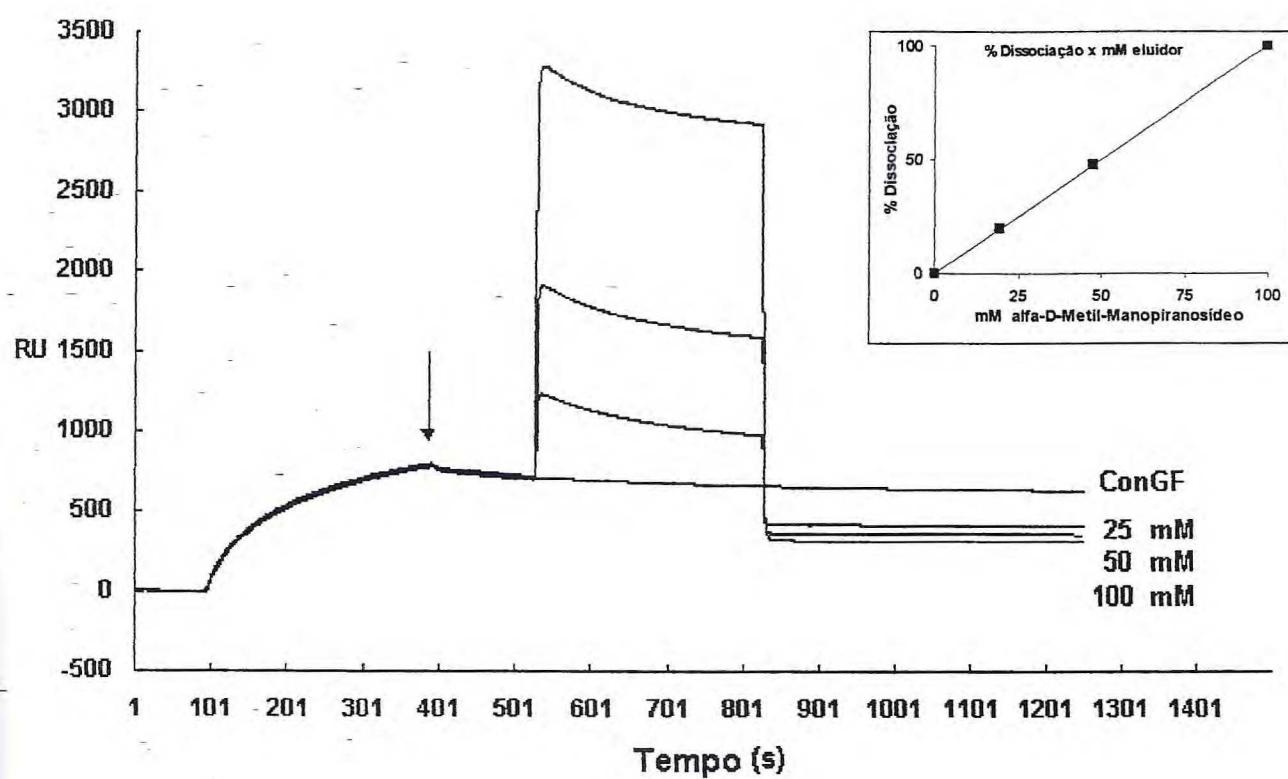


FIGURA 10 – Cinética de interação em tempo real da lectina de sementes de *C. grandiflora* (ConGF) na concentração de $100 \mu\text{g/ml}^1$ com ribonuclease B immobilizada, medidas através de ressonância plasmônica de superfície (RPS). As partes superior e inferior correspondem, respectivamente, às fases de associação (tampão circulante contendo a lectina) e dissociação (tampão sem lectina). A seta indica o momento de adição de α -D-Metil-Manopiranosídeo, nas concentrações indicadas. RU = unidades de ressonância, injeção de $25 \mu\text{l}$ de lectina e açúcar, fluxo de $5 \mu\text{l.m}^{-1}$. No sub-gráfico, a porcentagem de dissociação x concentração do eluidor α -D-Metil-Manopiranosídeo.

Estrutura do Glicopeptídeo

Número

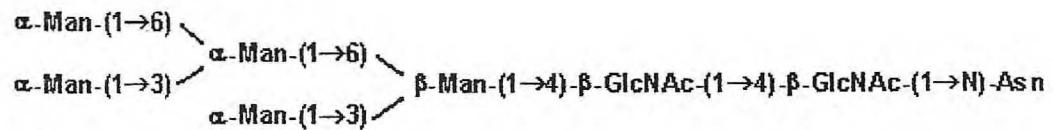
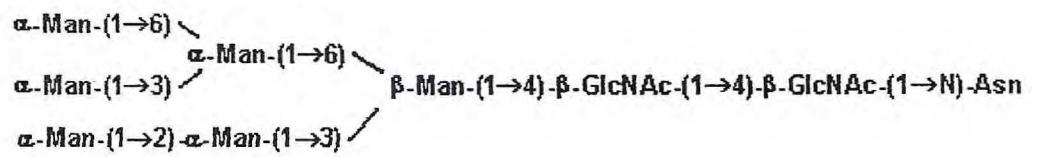
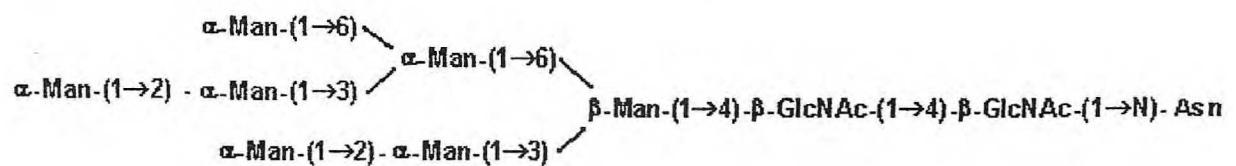
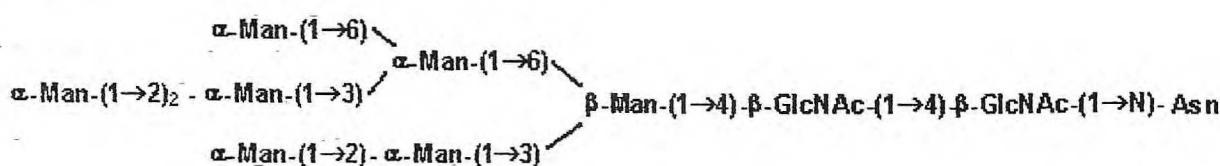
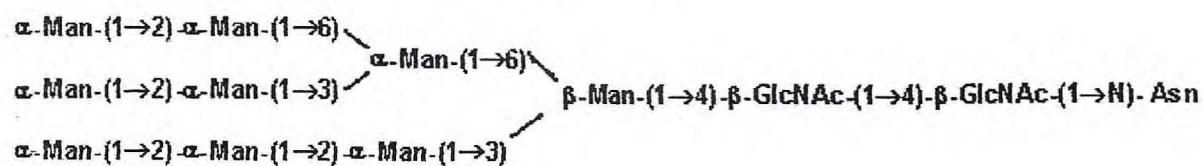


FIGURA 11 – Estrutura de glicopeptídeos oligomanosídicos.

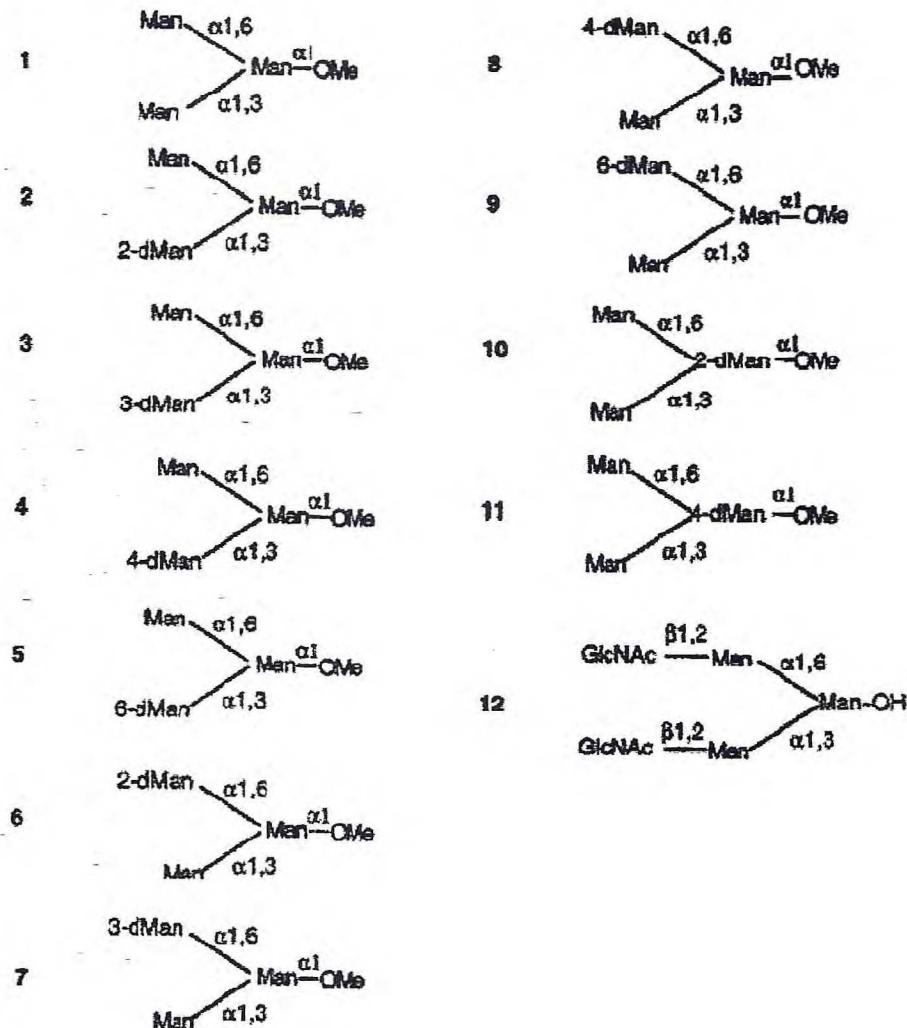


FIGURA 12 – Estruturas do trimanosídeo (1); análogos deoxi (2-11) e complexo oligossacarídico biantenário (12).

- 1) metil-3,6-di-O-(α -D-manopiranoil)- α -D-manopiranosídeo;
- 2) metil-6-O-(α -D-manopiranosil)-3-O-(2-deoxi- α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosil;
- 3) metil-6-O-(α -D-manopiranosil)-3-O-(3-deoxy- α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 4) metil-6-O-(α -D-manopiranosil)-3-O-(4-deoxy- α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 5) metil-6-O-(α -D-manopiranosil)-3-O-(6-deoxi- α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 6) metil-6-O-(2-deoxi- α -D-manopiranosil)-3-O-(α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 7) metil-6-O-(3-deoxy- α -D-manopiranosil)-3-O-(α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 8) metil-6-O-(4-deoxi- α -D-manopiranosil)-3-O-(α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 9) metil-6-O-(6-deoxi- α -D-manopiranosil)-3-O-(α -D-manopiranosil)- α -D-manopiranosídeo;
- 10) metil-6-O-(α -D-manopiranosil)-3-O-(α -D-manopiranosil)-2-deoxi- α -D-manopiranosídeo;
- 11) metil-6-O-(α -D-manopiranosil)-3-O-(α -D-manopiranosil)-4-deoxi- α -D-manopiranosídeo;
- 12) complexo oligossacarídico biantenário com resíduos GlcNAc terminais.

TABELA 10 - Parâmetros termodinâmicos derivados de ITC para lectinas de *Diocleinae* em pH 7,2, com o trimanosídeo (1) e análogos deóxi (2-11) (DAM *et al.*, 2000). Os parâmetros foram calculados segundo a equação: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \bar{R}T \ln K_a$ onde ΔG , ΔH e ΔS representam as mudanças na energia livre, entalpia e entropia de ligação. T = temperatura absoluta e R = 1,98 cal. Mol⁻¹.K⁻¹. No destaque, a lectina em estudo.

	K_a (M ⁻¹ .10 ⁻⁴)	$-\Delta G$ (kcal.mol ⁻¹)	$-\Delta H$ (kcal.mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)
<i>C. brasiliensis</i>				
1 trimanosídeo	36,6	7,6	12,4	4,8
2 α (1-3)2d	17,0	7,1	11,6	4,5
3 α (1-3)3d	6,0	6,6	9,9	3,3
4 α (1-3)4d	35,0	7,6	11,2	3,6
5 α (1-3)6d	21,0	7,3	11,6	4,3
6 α (1-6)2d	14,4	7,1	11,8	4,7
7 α (1-6)3d	2,7	6,1	6,9	0,8
8 α (1-6)4d	3,6	6,2	7,1	0,9
9 α (1-6)6d	3,9	6,3	8,3	2,0
10 Núcleo 2d	11,0	6,9	11,5	4,6
11 Núcleo 4d	5,1	6,4	11,1	3,7
<i>C. grandiflora</i>				
1 trimanosídeo	47,0	7,7	13,3	5,6
2 α (1-3)2d	27,0	7,4	11,9	4,5
3 α (1-3)3d	3,9	6,3	9,5	3,2
4 α (1-3)4d	43,0	7,7	11,7	4,0
5 α (1-3)6d	37,0	7,6	12,1	4,5
6 α (1-6)2d	20,0	7,2	12,0	4,8
7 α (1-6)3d	1,8	5,8	8,8	3,0
8 α (1-6)4d	1,5	5,7	8,4	2,7
9 α (1-6)6d	1,4	5,7	8,3	2,6
10 Núcleo 2d	13,4	7,0	11,5	4,5
11 Núcleo 4d	8,0	6,7	10,4	3,7
<i>D. rostrata</i>				
1 trimanosídeo	34,7	7,5	12,8	5,3
<i>D. guianensis</i>				
1 trimanosídeo	36,0	7,6	12,0	4,4
<i>D. violaceae</i>				
1 trimanosídeo	93,0	8,2	13,7	5,5
<i>D. virgata</i>				
1 trimanosídeo	35,5	7,6	12,4	4,8

5.4 COMPARAÇÃO DE PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PROTEÍNAS DE SEMENTES

A obtenção de perfis protéicos através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptopetanol foi efetuada buscando a comparação da base protéica de farinhas de sementes de várias espécies, em contraste com *C. grandiflora* (FIGURA 13). Duas observações formam a base do estudo comparativo de proteínas por meios eletroforéticos. Uma delas é a constatação de que os caracteres protéicos eletroforéticos podem ser usados na delimitação de espécies. Ou seja, podemos dizer que um perfil eletroforético de proteínas é “específico” para a espécie. Outra observação é que as espécies mais fortemente relacionadas apresentam perfis eletroforéticos mais parecidos, possibilitando que relações filogenéticas sejam inferidas (KIMURA & OTA, 1971). Numa comparação eletroforética envolvendo a farinha de sementes de *C. grandiflora* com algumas espécies da subtribo *Diocleinae* (*Cratylia floribunda* e *Dioclea virgata*) e incluindo *Cymbosema* sp. (tribo *Phaseoleae*) – FIGURA 13-A – e em comparação mais específica, na mesma subtribo *Diocleinae*, com o gênero *Dioclea* (*D. guianensis*; *D. rostrata*; *D. violaceae* e *D. virgata*) – FIGURA 13-B, tornam-se visível estas afirmações. Na FIGURA 13-A, das 18 bandas possíveis nas 4 espécies, *C. grandiflora* apresentou 16 (Poço 03); *Cratylia floribunda* apresentou 09 (Poço 04); *Cymbosema* sp. apresentou 09 (Poço 05) e *Dioclea virgata* apresentou 10 (Poço 06). *C. grandiflora* apresentou mais bandas em comum com *D. virgata* (10 bandas em comum), seguido por *Cymbosema* (08 bandas em comum) e *C. floribunda* (07 bandas em comum). Nota-se bandas relativas à presença de lectina (cadeias α , β e γ) na mesma altura da lectina purificada de *C. brasiliensis* (poços 02 e 07). Na FIGURA 13-B, apesar da pouca definição do gel, as semelhanças entre os perfis eletroforéticos das *Dioclea* estudadas é facilmente visível.

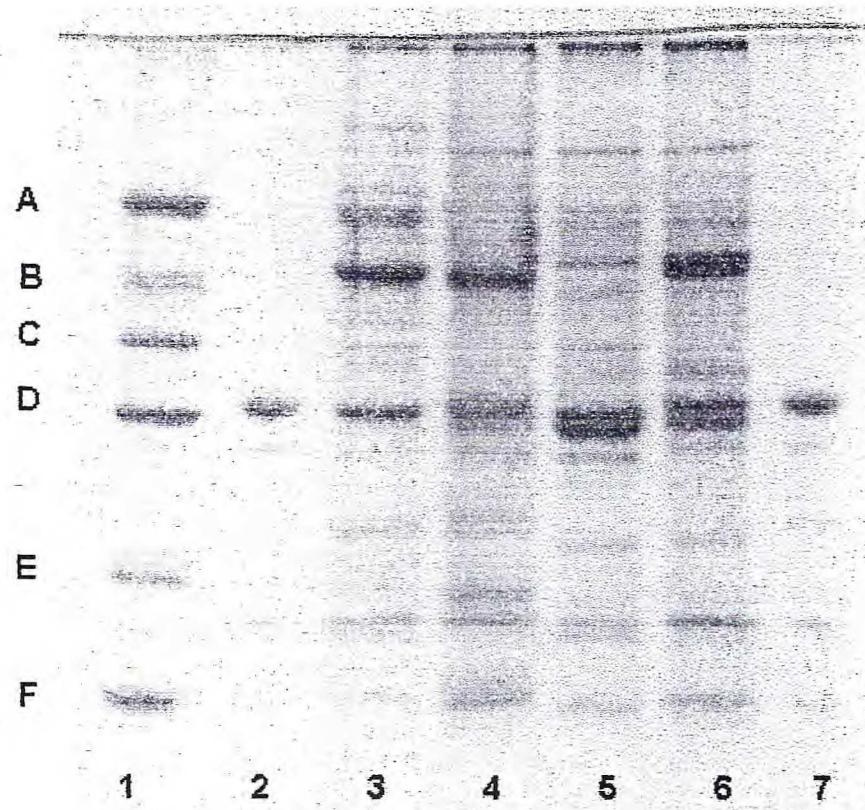


FIGURA 13-A – Comparação da base protéica de sementes de espécies da subtribo *Diocleinae*, através de eletroforese em poliacrilamida, em presença de SDS e 2-mercaptopetanol. 1 – Marcador molecular; 2 e 7 – ConBr purificada; 3 – Farinha de sementes de *Canavalia grandiflora*; 4 – Farinha de sementes de *Cratylia floribunda*; 5 – Farinha de sementes de *Cymbosema* sp.; 6 – Farinha de sementes de *Dioclea virgata*. Marcadores: A – Albumina bovina (66 kDa); B- Ovoalbumina (45 kDa); C – Gliceraldeído-3-P (36 kDa); D – Anidrase carbônica bovina (29 kDa); E – Inibidor Tripsina Soja (20 kDa); F – Lactalbumina bovina (14,2 kDa).

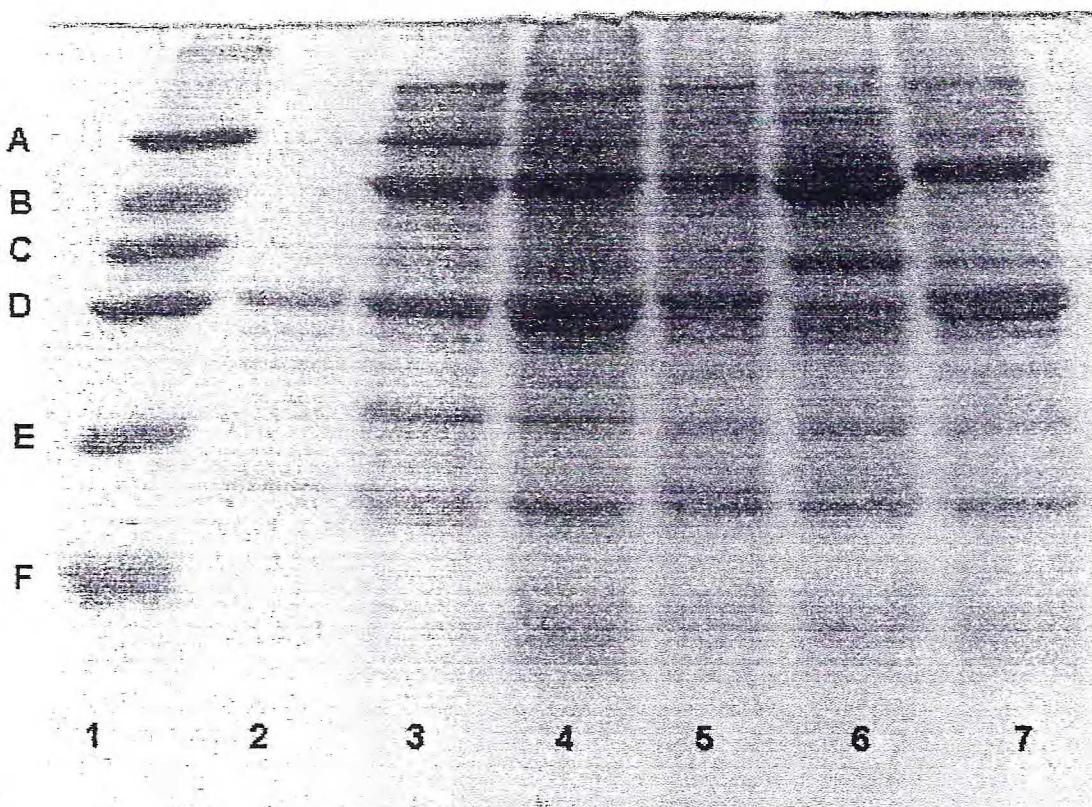


FIGURA 13-B – Comparação da base protéica de sementes de espécies da subtribo *Diocleinae* (gênero *Dioclea*), através de eletroforese em poliacrilamida, em presença de SDS e 2-mercaptopetanol. 1 – Marcador molecular; 2 – Lectina de *C. grandiflora* purificada; 2 – Farinha de sementes de *C. grandiflora*; 3 – Farinha de sementes de *Dioclea guianensis*; 4 – Farinha de sementes de *Dioclea rostrata*; 5 – Farinha de sementes de *Dioclea violaceae*; 6 – Farinha de sementes de *Dioclea virgata*. Marcadores: A – Albumina bovina (66 kDa); B- Ovoalbumina (45 kDa); C – Gliceraldeído-3-P (36 kDa); D – Anidrase carbônica bovina (29 kDa); E – Inibidor Tripsina Soja (20 kDa); F – Lactalbumina bovina (14,2 kDa).

5.5 SEQUÊNCIA PRIMÁRIA DE AMINOÁCIDOS

A sequência parcial de aminoácidos obtida para a lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. é apresentada na FIGURA 14, junto às estruturas de algumas lectinas da subtribo *Diocleinae*. O alinhamento obtido, em si, já demonstra a alta homologia entre suas sequências primárias de aminoácidos. Percebe-se, também que, apesar de parcial, a sequência primária da ConGF também é extremamente homóloga às outras lectinas desta subtribo. Muitos trabalhos, já citados, demonstram que estas proteínas provavelmente são divergentes de um ancestral comum. Outro ponto a favor desta hipótese é o fato dos resíduos da ConA que formam os sítios de ligação a metais, o sítio de ligação a carboidratos e os sítios para ligantes hidrofóbicos serem completamente conservados nas estruturas das lectinas de *Diocleinae* já conservadas.

<i>Dioclea grandiflora</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTGKVGTWHISYNSVAKR
<i>Dioclea guianensis</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHISYNSVAKR
<i>Dioclea lehmanni</i>	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHISYNSVAKR
<i>Cratylia floribunda</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYQHIGINIKSIRSKKTAWRVNQDGKVGTAHISYNSVAKR
ConBr	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
ConA	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
<i>Canavalia boliviiana</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
<i>Canavalia gladiata</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
<i>Canavalia viridis</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
<i>Canavalia lineata</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
<i>Canavalia maritima</i>	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
ConGF	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR
	*****:*****:****.* * .: * .: .: :****. : ****. : **** *
<i>Dioclea grandiflora</i>	LSAVVSYSGSSSTTVSYDVLDNNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI
<i>Dioclea guianensis</i>	LSAVVSYSGSSSTTVSYDVLDNNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI
<i>Dioclea lehmanni</i>	LSAVVSYTGSTSTTVSYDVLDNNVLPEWVRVGLSATTGLYKQTNTVCPRSFTXXLKTNSI
<i>Cratylia floribunda</i>	LSAIVSYPGGSSATVSYDVLDNNILPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
ConBr	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
ConA	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
<i>Canavalia boliviiana</i>	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
<i>Canavalia gladiata</i>	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
<i>Canavalia viridis</i>	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
<i>Canavalia lineata</i>	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
<i>Canavalia maritima</i>	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLDNNLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
ConGF	LSAIVTYPNGDFATVSHGVLDNVLPFWVRVGLSGATGLHSQNTNTILSWSFTSKLKSNEI
	:. . :***:.*:*****:*****. :***: :***: . *** ***:*
<i>Dioclea grandiflora</i>	ADANSLHFSFNQFSQNPKDILILQGDAFTSDGNLELTKVSSGDPQGSNSVGRALFYAPVH
<i>Dioclea guianensis</i>	ADANSLHFSFNQFSQNPKDILILQSDATTSDGNLELTKVSSGDPQGSNSVGRALFYAPVH
<i>Dioclea lehmanni</i>	ADANDLHFSFSQFSQNPKDILILQGDAATTSDGNLSLTRVSSDGSQGSSVGRALFYAPVH
<i>Cratylia floribunda</i>	ADAQSLHFTFNQFSQNPKDILILQGDASTSDGNLQLTRVS-NGSPQNSNSVGRALYYAPVH
ConBr	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
ConA	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
<i>Canavalia boliviiana</i>	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
<i>Canavalia gladiata</i>	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
<i>Canavalia viridis</i>	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
<i>Canavalia lineata</i>	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
<i>Canavalia maritima</i>	HETNALHFMFNQFSKDQKDILILQGDAATTGTDGNLELTTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
ConGF	P-----
<i>Dioclea grandiflora</i>	IWESSAVVASFDATFIFLIKSPDHPADGITFFIANTDTSIPSGSGRRLLGLFPDAN
<i>Dioclea guianensis</i>	IWEKSAVVAGFDATFTFLIKSPDHPADGITFFIANTDTSIPSGSGRRLLGLFPDAN
<i>Dioclea lehmanni</i>	IWEKSAVVSSFDATFIFLIKSPDHPADGITFFIANTDTSIPSGSGRRLLGLFPDAN
<i>Cratylia floribunda</i>	VWDKSAVVASFDATFTFLIKSTDSDTIAIDGIAFWFIANTDSSIPHSGGRRLLGLFPDAN
ConBr	IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
ConA	IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
<i>Canavalia boliviiana</i>	IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
<i>Canavalia gladiata</i>	IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
<i>Canavalia viridis</i>	IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPACGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
<i>Canavalia lineata</i>	IWESSAVVASFEATFTFLIKSSDSDHPADGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
<i>Canavalia maritima</i>	IWESSATVAGFDATFXLIKSPDHPADGIAFFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
ConGF	-----

FIGURA 14 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos das lectinas da subtribo *Diocleinae*. No destaque, a sequência de aminoácidos parcial obtida para a lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth.

PARTE 2
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MOLECULAR DA
LECTINA E ESTUDOS FILOGENÉTICOS DE LEGUMINOSAS

5.6 CROMOSSOMOS METAFÁSICOS DE ESPÉCIES DE *CANAVALIA*

A análise citogenética oferece uma grande contribuição à estudos evolutivos já que os cromossomos constituem o próprio material genético e suas alterações são quase sempre significativas para o rumo evolutivo da espécie (GUERRA, 1988). A FIGURA 15 apresenta um estudo citogenético referente à visualização da metáfase no ciclo mitótico de algumas espécies do gênero *Canavalia*, (*C. grandiflora*, *C. maritima*, *C. gladiata*, *C. boliviiana*, *C. brasiliensis* e *C. bonariensis*) incluindo a espécie em estudo. Observa-se que os cromossomos são pequenos e bastante semelhantes morfologicamente, dificultando a elaboração de cariótipos. O número de cromossomos é $2n=22$ em todas as espécies estudadas.

A tribo Phaseoleae, com exceção da subtribo Erythrininae e de alguns outros gêneros, é considerada uma entidade uniforme citologicamente, sendo $n = 11$, quase que certamente o número cromossômico básico de todas suas subtribos. A grande maioria das citações reportam $2n = 22$. As espécies de Faboideae tropicais apresentam número cromossômico $n = 12$, 11 e 10 (GOLDBLATT, 1981).

Os estudos citogenéticos voltados exclusivamente para as leguminosas nativas brasileiras, além dos trabalhos de TURNER & IRWIN, 1961 e BANDEL, 1974 são raros. Os pesquisadores ALVES & CUSTÓDIO, 1989, realizaram a contagem do número cromossômico de 16 espécies de leguminosas coletadas no Estado do Ceará, Brasil. Das espécies de Fabaceae estudadas, *C. brasiliensis* Mart. e *C. gladiata* (Jacq) DC mostraram o número de cromossomos $2n = 22$.

De acordo com SINHA & ROY, 1979; a especiação das leguminosas deve ter ocorrido principalmente através de alterações estruturais nos cromossomos, como inversões e mutações gênicas. A constância observada ($2n = 22$) sugerem que a poliploidia e aneuploidia parecem ter desempenhado papel pouco importante na evolução de gêneros específicos.

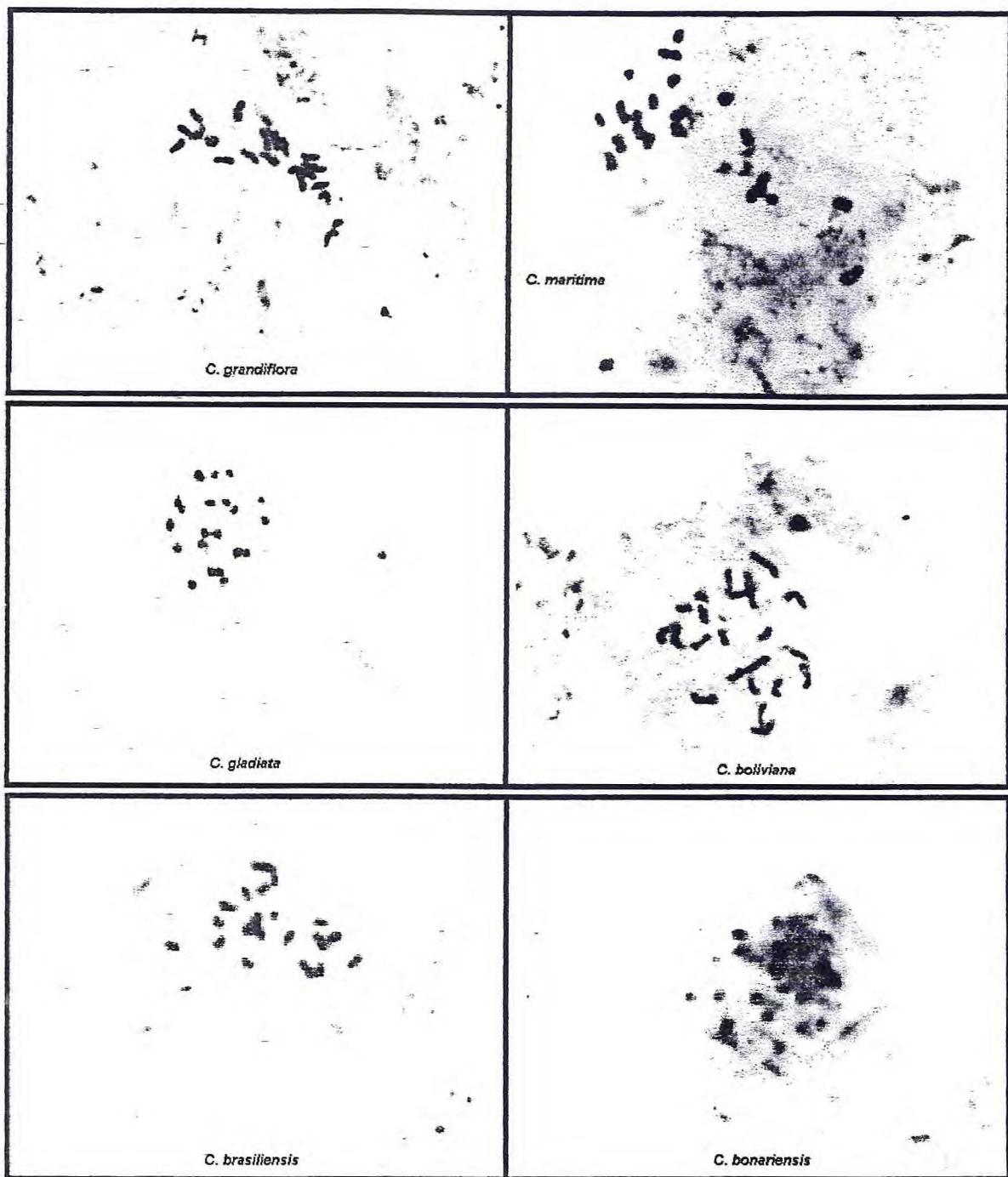


FIGURA 15 – Cromossomos metafásicos de espécies do gênero *Canavalia*: *C. grandiflora* Benth.; *C. maritima* (Aubl.) Thouars; *C. gladiata* (Jacq.) DC; *C. boliviensis* Piper; *C. brasiliensis* Mart. e *C. bonariensis* Lindl.

5.7 CLONAGEM DO GENE CONGF

5.7.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O reagente CTAB foi testado para a extração do DNA genômico de *C. grandiflora*. MURRAY & THOMPSON, 1980 reportaram que altas concentrações de sal (NaCl acima de 0,7 M) os ácidos nucléicos formam um complexo solúvel com o detergente brometo de cetil trietil amônio (CTAB). Ao seguir-se uma redução da concentração de sal (abaixo de 0,4 M de NaCl) ocorre então a precipitação do complexo CTAB-ácidos nucléicos, deixando a maioria dos polissacarídeos em solução. De acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989; a amostra de DNA genômico considerada livre de impurezas e proteínas deve mostrar uma razão entre as leituras de absorbância A_{260}/A_{280} superior a 1,75. A razão obtida para *C. grandiflora* foi de $2,771/1,730 = 1,60$. Esta taxa equivale a 138,5 $\mu\text{g DNA/ml}$.

O resultado obtido para esta extração foi demonstrado em eletroforese em gel de agarose apresentada na FIGURA 16. Apesar da razão de absorbância obtida, a eletroforese em gel de agarose a 0,8 % mostrou uma banda única de 23.000 pb. Pelos resultados apresentados na FIGURA 16, não se observa arrastado de polissacarídeos e RNA, o que demonstra que o método foi efetuado com sucesso para o genoma de *C. grandiflora*, sem aparentes degradações do DNA genômico.

5.7.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE CONGF EM DNA GENÔMICO

Utilizando-se iniciadores específicos para o gene *ConBr* de *Canavalia brasiliensis* foi possível obter a amplificação do gene homólogo em *C. grandiflora*, através da metodologia PCR. Na FIGURA 17, nos poços 6 e 7 observa-se uma banda correspondente a 870 kB correspondente ao gene da lectina de *C. brasiliensis* (*ConBr*) e ao gene da lectina de *C. grandiflora* (*ConGF*), respectivamente. As bandas são resultado do produto amplificado por PCR, utilizando-se os iniciadores citados, no DNA genômico correspondente. O controle negativo (poço 5) corresponde a reação de amplificação utilizando-se água ao invés de DNA; sem bandas, o que atesta a qualidade da reação. Portanto, ocorre a possibilidade de utilização de iniciadores do gene *ConBr* para a obtenção de produtos de PCR de genes homólogos de lectinas em outras espécies da subtribo *Diocleinae*, devido à alta

homologia encontrada nestes genes. Esta possibilidade de utilização de um par de iniciadores comuns, por si só, representa uma das características moleculares dos genes de lectinas desta subtribo, com a possibilidade de se tornar tanto um caráter taxonômico utilizável para esta subtribo e possivelmente, extensível para outras subtribos de Phaseoleae (possivelmente Vicieae e Erythrininae (DUARTE, 2001), ou ser viabilizado como uma ferramenta útil no estudo molecular de lectinas de leguminosas.

5.7.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *ConGF* EM CLONES RECOMBINANTES DE *E. COLI*

A amplificação do gene *ConGF*, através da metodologia PCR, em clones recombinantes, ocorreu com sucesso, da forma idêntica do ocorrido no DNA genômico, apresentando banda única correspondente a 870 pb, no gel de agarose 0,8%. A FIGURA 17, apresenta a reação de amplificação de três clones (poços 2, 3 e 4), sendo que deles foi extraído o plasmídeo “recombinante” para a reação. Dos três clones testados, aparentemente positivos, (retirados de colônias de *E. coli* brancas) somente um (poço 4) mostrou amplificação positiva, caracterizando a presença do inserto no plasmídeo.

O rendimento médio obtido na extração de plasmídeos foi de 1,014 mg DNA/ml, cerca de 7,3 vezes a quantidade obtida na extração de DNA genômico.

5.8 ESTRUTURA PRIMÁRIA PARCIAL DE NUCLEOTÍDEOS DA CONGF

A sequencia primária parcial do gene *ConGF* está apresentada na FIGURA 18. A sequência nucleotídica da *ConBr*, foi utilizada no alinhamento junto a dois clones sequenciados, chamados *ConGF 1* e *2*, cada um com 138 e 126 pb, respectivamente.

Traduzindo-se estes segmentos de DNA e alinhando-os com a *ConBR* madura, obteve-se a parte final da cadeia (FIGURA 19, em vermelho). Em azul, no início da cadeia, a sequencia parcial de aminoácidos.

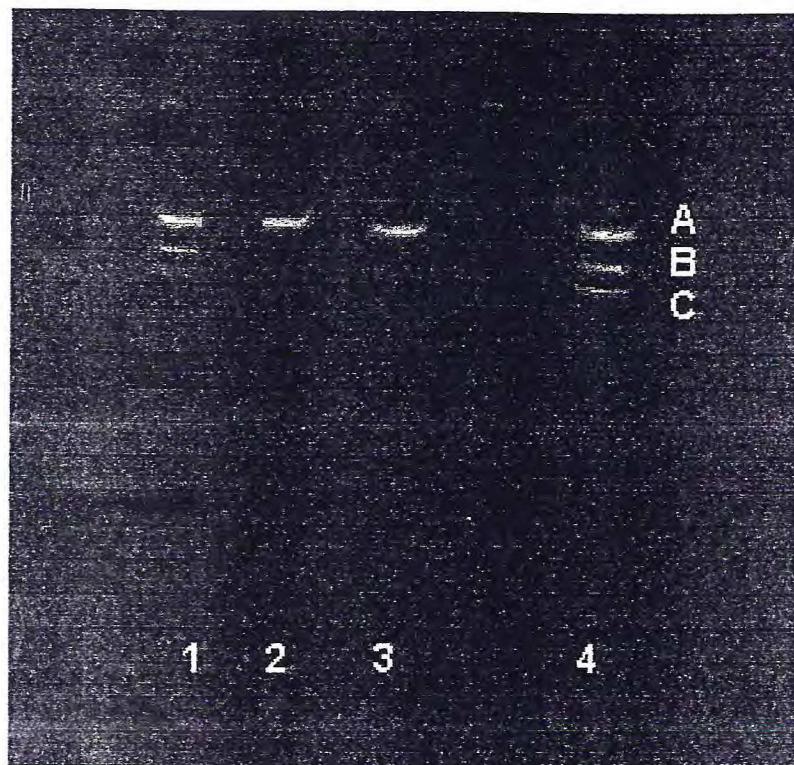


FIGURA 16 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% apresentando a extração do DNA genômico utilizando o reagente CTAB. 1 e 4 - Marcadores de alto peso molecular (Lambda DNA/Hind III - Promega); 2 - DNA genômico de *Canavalia brasiliensis*; 3 - DNA genômico de *Canavalia grandiflora* ; Marcadores: A - 23.130 Kb; B - 9416 Kb; C - 6.557 Kb.



FIGURA 17 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% apresentando a amplificação por PCR dos plasmídeos recombinantes e DNA genômico. 1 – Marcador de baixo peso molecular (“Low DNA mass leader” – Pharmacia); 2 e 3 – Amplificação negativa para clones recombinantes; 4 – Amplificação positiva para clone recombinante; 5 – Controle negativo; 6 – Amplificação positiva em DNA genômico de *Canavalia brasiliensis*; 7 – Amplificação positiva em DNA genômico de *Canavalia grandiflora*; 8 – Marcador de alto peso molecular (Lambda DNA/Hind III); Marcadores: A – 2000 pb; B – 1200 pb; C – 800 pb e D – 400 pb; E – 23.139 Kb, F – 9.416 Kb, G – 6.557 Kb; H – 4.361 Kb.

ConBr	ATGGCCATCTCAAAGAAATCCTCCCTGTTCCCTATATTACGTTCATCACCATGTT
Clone0	-----
CloneL	-----
ConBr	CTAATGGTAGTGAACAAGGTGAGTCATCAACACATGAGACAAATGCACTCCATTCATG
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	TTCAACCAATTAGCAAAGATCAGAAGGATTGATCCTCAAGGTGACGCCACAACAGGA
Clone1	-----CAAAGACCAAAAGGATT-GATCCTCCAAGGTGACGCCACAGCTGAT
Clone2	-----TCTCATAAAGTCACCCAACAGATGGT *** *** *** *** *** *** *
ConBr	ACAGATGGTAACTTGGAACTCACAAGGGTGTCAAGTA---ATGGGAGTCCACAGGGAAGC
Clone1	TCAGATGGTAACCTACAACTCACAAGGGTGTCAAGTA---ATGGGACTCCACAGGGANAC
Clone2	CCAGCTGATGGAC-ATGACCTTCTATCTTCAAATGTGGACAGTACCATCCCTAGAGGT *** *** *** *** *** *** *** *
ConBr	AGTGTGGGCCGGGCTTGTCTATGCCAG-TCCACATTGGAAAGTTCTGCTGTGGT
Clone1	AGTGTGGGCCGGGCTTGTATCTACGCCAGATCCA-----
Clone2	TCCAATGGAAGGCTTCTGGACTCTCCCTGATGCAAATAT----- *** *** *** *** *** *** *
ConBr	GGCAAGCTTGAAGCTACCTTACATTCTCATAAAATCACCGACTCTCACCCAGCTGA
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	TGGTATTGCCTCTTCATTCAAATATTGACAGTCCATCCCTAGTGGTCCACTGGAAG
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	ACTCCTGGACTCTCCCTGATGCAAATGTTATCAGAAATTCCACTACTATTGATTCAA
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	CGCTGCTTACAATGCCGATACTATTGTTGCTGTTGAATTGGATAACCTATCCAATACTGA
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	TATTGGAGATCCAAGTTATCCACACATCGGTATCGATATTAAATCTGTCGCTCCAAGAA
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	GACCGCAAAGTGGAACATGCAAAATGGAAAGGTAGGCACACTCATCTATAACTC
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	TGTTGGTAAGAGACTAAGTGCTGTTCTTATCCTAACGGTACTCTGCCACTGTCTC
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	TTACGACGTTGACCTCGACAATGTCCTCCTGAATGGTTAGAGTTGGCCTTCGCTTC
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	AACCGGACTTTACAAAGAAACCAATACCATTCTCATGGTCTTACTCTAAGTTGAA
Clone1	-----
Clone2	-----
ConBr	GAGCAATGAGATCCCGACATTGCTACCGTGGTT
Clone1	-----
Clone2	-----

FIGURA 18 - Alinhamento múltiplo das sequências parciais de nucleotídeos obtidas para dois clones (Clone 1 e Clone 2) do gene ConGF, com a sequência de nucleotídeos da ConBr. ConBr: 870 pb; Clone1: 138 pb; Clone2: 126 pb.

ConBr	ADTIVAVELDTYPNTDIGPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWQMNGKVGTAHIIYNSVGKR
ConGF	SDTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIINSIRSIKTAEWKGNEQVGTARXIYNSVGKI
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
ConBr	LSAVVSYPNGDSATVSYDVLVDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
ConGF	LSAIVTYPNGDFATVSHGVLDNVLPEWVRVGLSGATGLHSQTNTILSWSFTSKLKSNT
::***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
ConBr	HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
ConGF	-----EIPKDQKDXILQGDATADSDGNLQLTRVSSNGTPQGKSVGRACIYAP-----
:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
ConBr	IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
ConGF	-----DP---LIKSPPS-----IFSNVDSTIPRGSNGRLLGLFPDAN
***** * :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

FIGURA 19 - Alinhamento múltiplo de sequências parciais de aminoácidos obtidas com a cadeia madura da ConBr (237 aminoácidos). **Em azul**: sequência parcial de aminoácidos: 121 aa (FIGURA 14). **Em vermelho**: segmentos que foram deduzidos a partir das sequências de DNA dos clones 1 e 2: 78 aa (FIGURA 17). Os asteriscos (*) representam identidade total. Os pontos representam identidade parcial - (-) alterações de aminoácidos conservativas e (.) semi-conservativas (de acordo com a matriz de substituições utilizada pelo CLUSTAL 1.8).

5.9 ESTUDOS FILOGENÉTICOS DE LECTINAS DE LEGUMINOSAS

5.9.1 ÁRVORE FILOGENÉTICA BASEADA EM AMINOÁCIDOS

Um estudo baseado na construção de árvore filogenética foi efetuado com 70 sequências de aminoácidos de lectinas obtidas no GenBank (TABELA 04), incluindo a sequência parcial de aminoácidos obtida para a ConGF. A árvore filogenética (Neighbor-joining) é apresentada na FIGURA 20. Para interpretá-la, foi utilizado um estudo realizado por POLHIL & RAVEN, 1981; o qual demonstra as relações tribais da sub família Faboideae (= Papilionoideae) baseado em estudos quimiotaxonômicos, apresentado na FIGURA 21.

O traço na parte inferior da árvore (0,1) mostra a divergência estimada entre as espécies. Quanto maior a linha definida para cada OTU, maior a divergência estimada. Algumas espécies mostraram uma alta divergência, a maior delas foi *Abrus precatorius*, seguida de *Mucuna deeringeana*.

Alguns grupos mostram-se bem caracterizados, em parte devido à alta conservação das sequências em determinados grupos, em parte também devido à abundância de sequências em certos grupos do que em outros. O grupo das *Diocleinae*, na extremidade superior da árvore, é um dos mais definidos (ver FIGURA 20-B, em cor vermelho escuro). O grupo maior (em cor rosa) que o envolve, foi considerado como Phaseoleae (contém 17 espécies, apesar de abrigar também uma espécie da tribo Genisteae, uma Vicieae e uma Abreae).

Na outra extremidade da árvore, poderíamos definir um grande grupo formado pelo conjunto de três tribos: Galegeae – Viciae – Trifolieae (FIGURA 20, cor azul). Dentro deste grupo, a tribo Vicieae apresenta-se num subgrupo bem definido, talvez por apresentar um maior número de sequências; destacando-se o gênero *Lathyrus*. As tribos Trifolieae e Galegeae estão um pouco menos definidas, porém também se encontram separadas. O trinômio obtido Galegeae-Vicieae-Trifolieae confere com as relações evolutivas obtidas por POLHIL & RAVEN, 1981; (FIGURA 21, cor azul).

O grupo intermediário, no centro da árvore (FIGURA 20-B, em amarelo) foi delimitado pelas tribos Sophoreae e Genisteae, que no estudo quimiotaxonômico, são as mais primitivas Fabaceae.

A árvore filogenética de lectinas de leguminosas apresentou muitas incongruências, especialmente com as espécies de Phaseoleae. Porém, estas ocorrem também na maioria dos estudos taxonômicos. Apesar disso, a árvore filogenética localizou algumas relações evolutivas desta sub família. Foi possível caracterizar grupos evolutivamente afins como Galegeae-Vicieae-Trifolieae, Phaseoleae (contendo a sub tribo *Diocleinae*) e

Sophoreae-Genisteae. A grosso modo as lectinas poderiam ser chamadas de marcadores taxonômicos de leguminosas, ou pelo menos, por enquanto, de algumas tribos ou grupos de tribos.

Quanto maior o número de sequências para um determinado grupo, melhor este se define na árvore filogenética. Com a crescente acumulação de sequências de lectinas, não seria inviável esperar que, pelo menos em alguns anos, seja possível agrupar quase perfeitamente as leguminosas utilizando-se estas sequências.

5.9.2 COMPARAÇÕES ENTRE SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS SINÔNIMAS (K_s) E NÃO SINÔNIMAS (K_A)

Com o advento de milhares de sequências de aminoácidos e nucleotídeos disponíveis para os pesquisadores, os estudos evolutivos de proteínas têm sido estimulados. No intuito de melhor caracterizar a evolução das lectinas de leguminosas foi efetuado um estudo de comparações entre substituições sinônimas (K_s) e não sinônimas (K_A).

A TABELA 11 apresenta alguns dados obtidos de K_s (taxa de substituições de nucleotídeos sinônimas) e de K_A (taxa de substituições de nucleotídeos não-sinônimas) obtidas para os genes de lectinas de algumas leguminosas. Para efeito comparativo, adicionou-se alguns dados da literatura (WOLFE *et al.*, 1987) de taxas para alguns genes obtidos em vegetais. Observa-se que os valores K_s são maiores que K_A . Os menores valores de K_s e K_A ocorreram entre as espécies de *Canavalia*, cujas variações na estrutura primária de nucleotídeos são, conhecidamente, poucas. Os maiores valores de K_s e K_A ocorreram quando as espécies estão mais distanciadas.

Para observar a tendência filogenética das mutações de nucleotídeos sinônimas e não sinônimas, todas as combinações binárias possíveis de K_s e K_A foram plotadas em gráficos. Os resultados foram interpretados de acordo com a literatura. Caso a maioria dos pontos se situem acima da função identidade (linha pontilhada) onde $R = 1$, ou seja, "buscando" o eixo K_A , isto significaria uma tendência evolutiva de maior número de mutações pontuais de nucleotídeos que levam a alteração de aminoácidos. Caso a maioria dos pontos se situe abaixo dessa função, ($R < 1$), temos uma tendência evolutiva de alto número de mutações sinônimas, que não levam a alterações de aminoácidos. Com base nestes dados, é possível comparar a tendência evolutiva entre espécies e entre grupos.

No gráfico da FIGURA 22, cada ponto representa K_A/K_s obtido para cada combinação binária de espécies de leguminosas citadas na TABELA 02. Observa-se que a tendência evolutiva, considerando as

sequências de leguminosas disponíveis no presente momento no GenBank, que o valor de K_s supera o de K_A na maioria dos pontos obtidos. O coeficiente angular obtido na reta de regressão é menor que 1, (0,74). Portanto, temos uma tendência evolutiva para as lectinas de leguminosas, de maior número de substituições de nucleotídeos sinônimos do que as que levam a alterações de aminoácidos. Analisando o gráfico percebe-se que a maioria dos pontos se situam "no interior" do gráfico, variando de 0 a aproximadamente 1,5 (ver TABELA 11); a partir daí, começa uma situação de maior dispersão dos pontos. Os pontos mais internos mostram as combinações de espécies mais relacionadas entre si, como se segue: as *Canavalia* entre si, depois entre as espécies mais próximas, e entre as mais distantes, aumentando a dispersão dos pontos.

O gráfico da FIGURA 23 representa os valores de $K_A \times K_s$ sobre o grupo *Canavalia* (*C. ensiformis*, *C. brasiliensis* e *C. gladiata*) (entre si e contra as demais espécies). Ve-se que o valor de coeficiente angular de K_A/K_s foi levemente inferior ao obtido para leguminosas (FIGURA 20). A tendência é então, ainda maior para mutações sinônimas do que para as não sinônimas.

Buscando ilustrar esta situação entre dois grupos distintos, o gráfico da FIGURA 24 traz os dados relativos à comparação evolutiva de dois conjuntos de dados: *Canavalia* (*C. ensiformis*, *C. brasiliensis* e *C. gladiata*) (entre si e contra todas as demais espécies) e *Sophoreae* (*Sophora flavescens*, *Sophora japonica* e *Cladrastis lutea*) (entre si e contra todas as demais espécies). Percebe-se que, entre estes grupos ocorreu um valor de coeficiente angular levemente maior para K_A (0,77) do que para K_s (0,58). Isso equivale dizer que os valores de K_A entre estes grupos aumentaram em relação a K_s , ou seja, na evolução de *Canavalia* x evolução das *Sophoreae* ocorreram mais alterações que levaram a novos aminoácidos, do que alterações neutras.

Baseado nas definições observadas em diversos trabalhos, onde $K_A < K_s$ significa neutralidade e $K_A > K_s$ significa pressão de seleção (KIMURA, 1978), poderíamos interpretar os dados obtidos para as lectinas de leguminosas como coerentes com a **teoria neutralista de Kimura**.

Comparações dentro de um mesmo gene podem ser efetuadas. Um exemplo interessante seria comparar as taxas de mutações sinônimas e não sinônimas da cadeia α com os fragmentos β e γ , buscando estimar a evolução dentro da molécula.

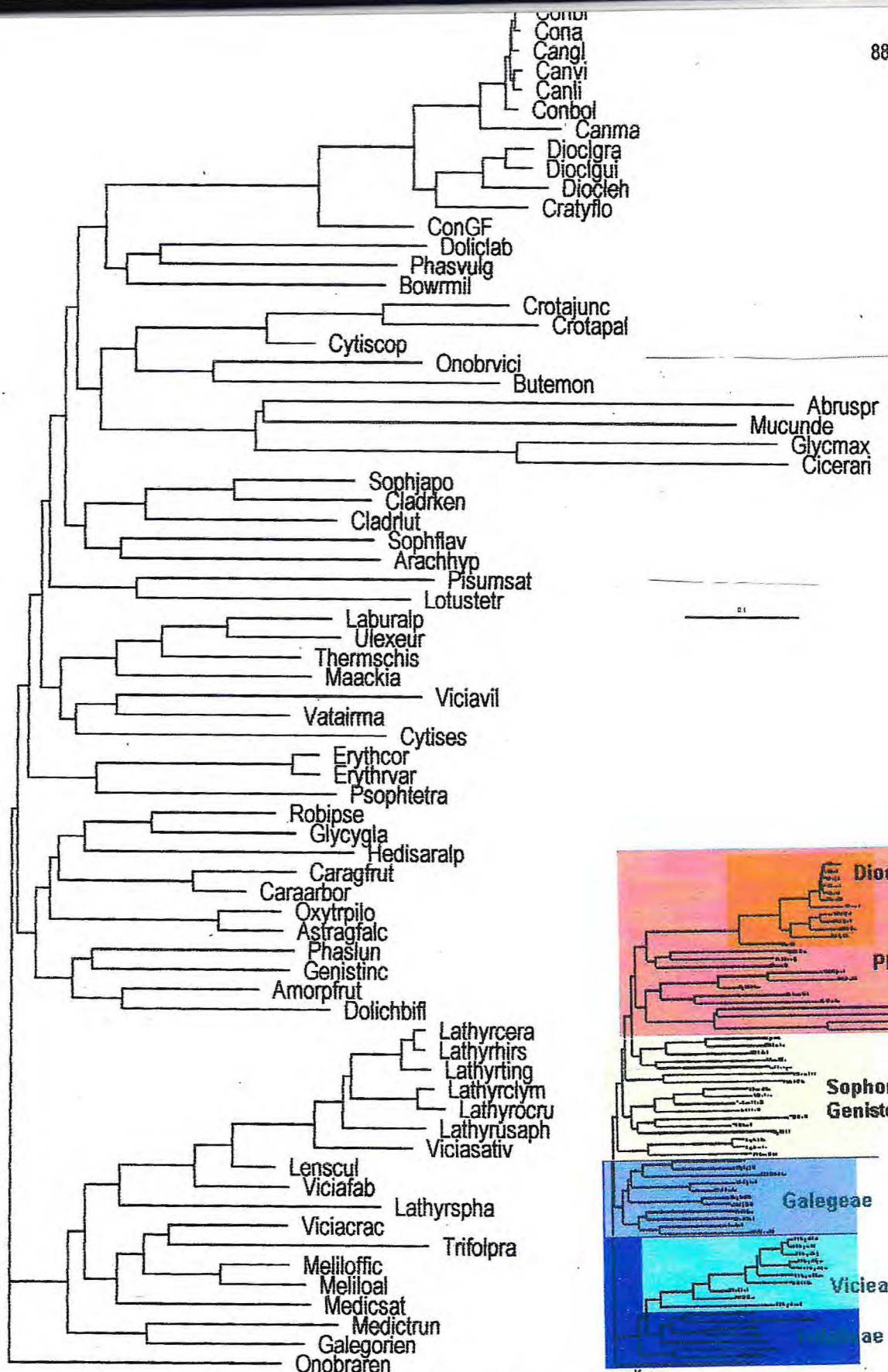


FIGURA 20 – A – Árvore filogenética obtida com o alinhamento de 70 sequências de aminoácidos de lectinas da subtribo Faboideae (=Papilionoideae). O traço representa a distância relativa entre espécies. B – Relações evolutivas definidas através de estudos quimiotaxonômicos (POLHIL & RAVEN, 1981).

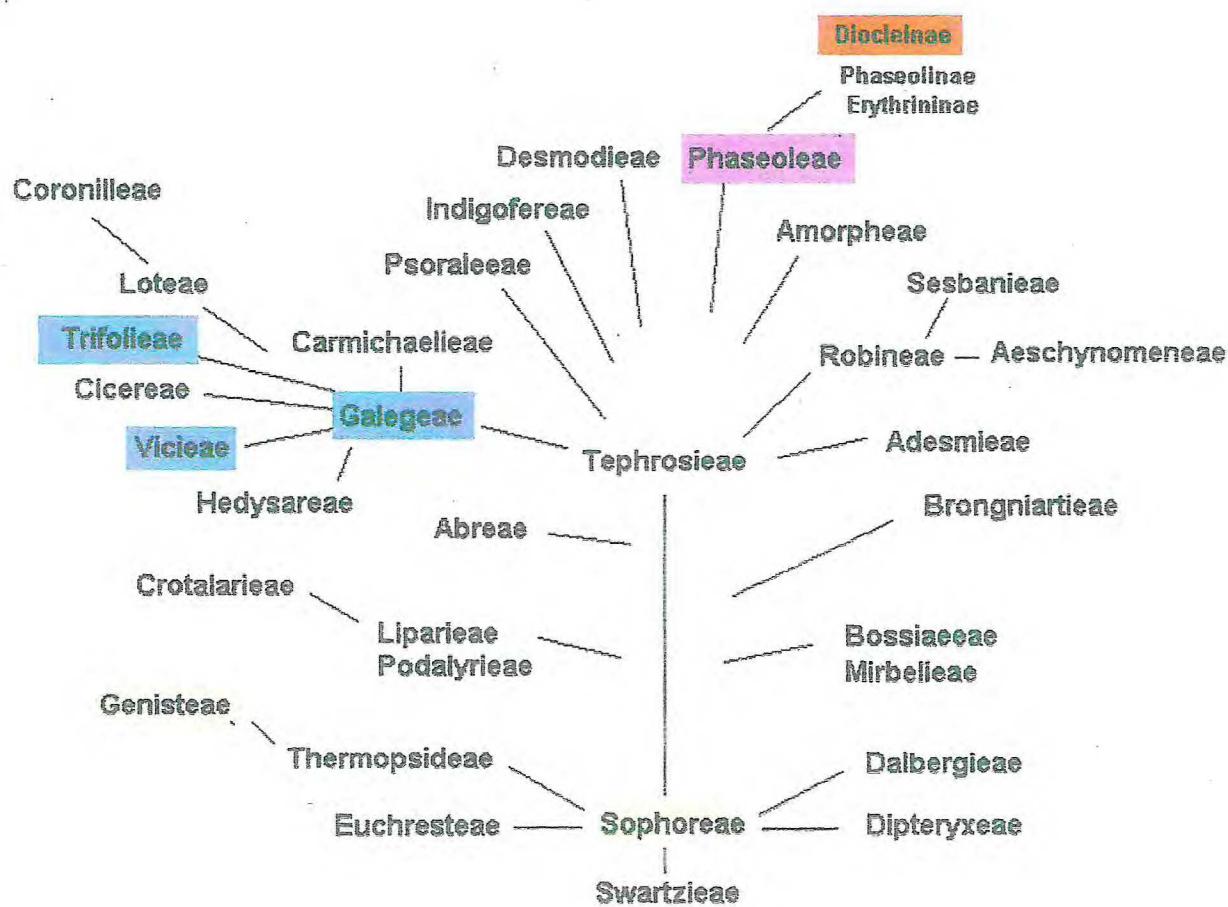


FIGURA 21 – Relações evolutivas entre tribos de Faboideae (=Papilionoideae) conforme estudo de POLHIL & RAVEN, 1981. As cores indicam relações obtidas com a árvore filogenética.

TABELA 11 - Substituição de nucleotídeos sinônimas (K_S) e não-sinônimas (K_A) de espécies vegetais, incluindo lectinas.

Gene	Espécies	KA x 100	KS x 100
AtpA	<i>Zea mays</i> x <i>Triticum aestivum</i>	1	15,0
	Ervilha x <i>Triticum aestivum</i>	8,0	59,0
psbH	<i>Zea mays</i> x <i>Triticum aestivum</i>	1,0	20,0
gapC	Amendoim x tabaco	10	110,0
rbcL	Tabaco x petunia	1	8,0
psbA	Tabaco x petunia	0	5,0
lectina	<i>C. ensiformis</i> x <i>C. gladiata</i>	2	1,0
	<i>C. ensiformis</i> x <i>C. brasiliensis</i>	0	2
	<i>C. ensiformis</i> x <i>S. japonica</i>	49	84
	<i>C. ensiformis</i> x <i>Cladrastis lutea</i>	57	40
	<i>C. gladiata</i> x <i>C. brasiliensis</i>	0	0
	<i>C. gladiata</i> x <i>Sophora japonica</i>	48	84
	<i>C. gladiata</i> x <i>C. lutea</i>	38	57
	<i>C. brasiliensis</i> x <i>C. lutea</i>	39	57
	<i>C. brasiliensis</i> x <i>S. japonica</i>	49	84
	<i>C. lutea</i> x <i>S. japonica</i>	39	75

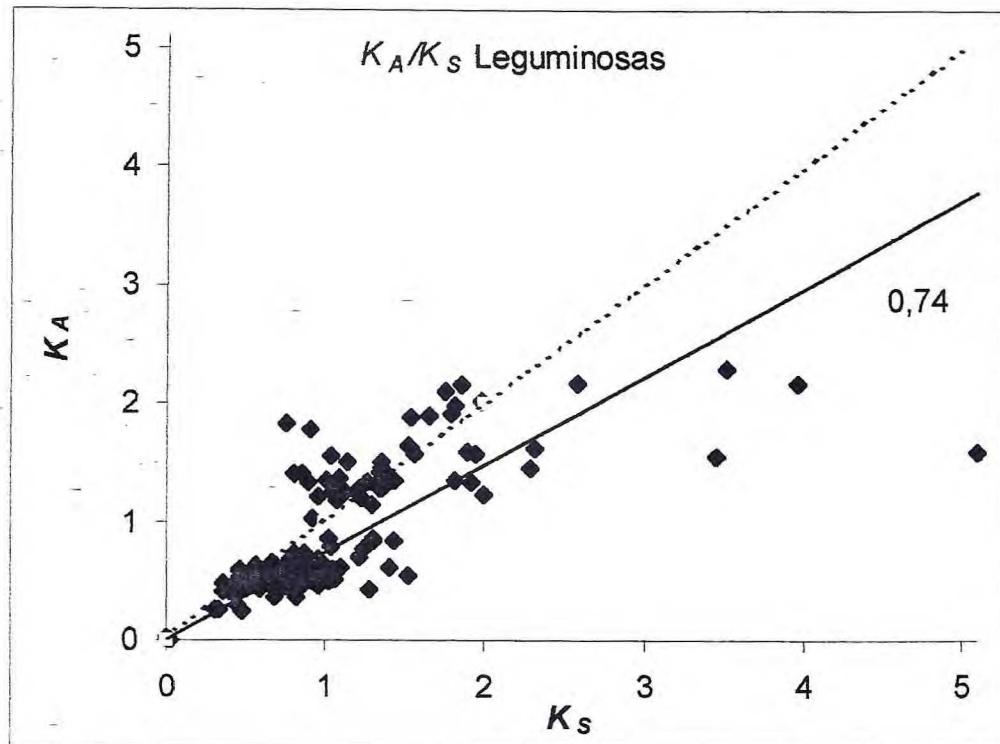


FIGURA 22 - Representação de K_A/K_s , indicando todas as combinações binárias possíveis entre as espécies de leguminosas estudadas (listadas na Tabela 02). A linha pontilhada representa a função identidade (onde $R = 1$). O número representa o coeficiente angular.

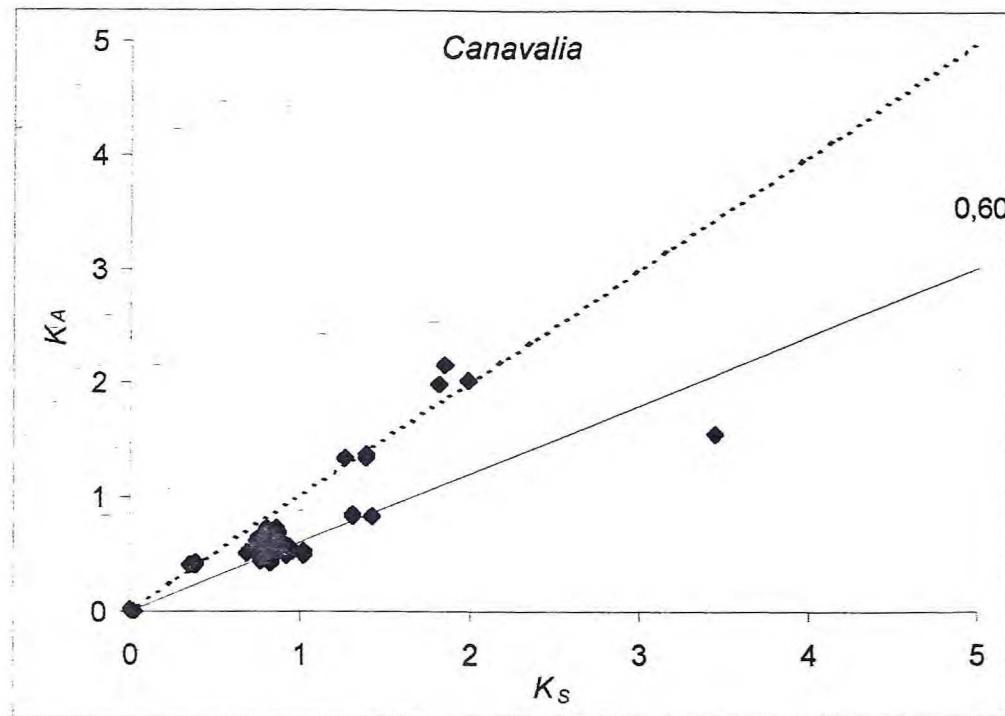


FIGURA 23 - Representação de K_A e K_s , indicando todas as combinações binárias possíveis entre *Canavalia* (entre si e contra as demais espécies de leguminosas, listadas na Tabela 02). A linha pontilhada representa a função identidade (onde $R = 1$). Os números representam os coeficientes angulares.

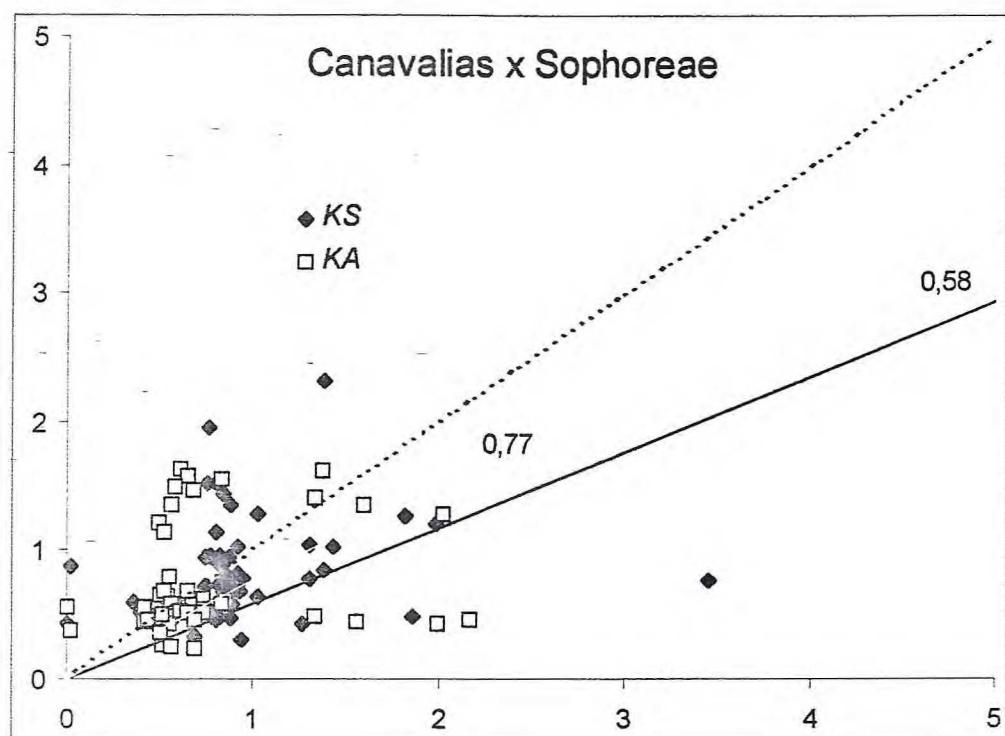


FIGURA 24 - Representação de K_A e K_S , indicando todas as combinações binárias possíveis entre os grupos de *Canavalia* x *Sophoreae* (listadas na Tabela 02). A linha pontilhada representa a função identidade (onde $R = 1$). Os números representam os coeficientes angulares.

5.10 RESUMO DOS RESULTADOS

Caracterização bioquímica parcial da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora*

- A ConGF foi isolada através de coluna de afinidade de Sephadex G-50, eluída com glicose 0,1 M. Mostrou três bandas em eletroforese de gel de poliacrilamida em presença de SDS e 2-mercaptopetanol: cadeia α e fragmentos β e γ , análogos à ConBr.
- A ConGF mostrou atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho não tratados e humano tipo A, tratado com tripsina. A hemaglutinação em eritrócitos de coelho foi inibida por manose, α -D-metil-manopiranósideo, 1-o-Metil- α -D-glicopiranósideo e as glicoproteínas: mucina suína e bovina e lactotransferina bovina.
- A cinética de ligação a glicoproteínas mostrou que ocorre preferência da lectina por oligomanosídeos, especialmente por Man9 (alta afinidade por SBA e LTA) e não preferência por Man5 (baixa afinidade para taka diastase).
- A composição de aminoácidos revelou alto teor de ácido aspártico, serina e leucina. Não se detectou metionina e cisteína.
- A ConGF mostrou identidade imunológica total com as Canavalias testadas, parcial com *Dioclea rostrata* e sem reação com *Dioclea guianensis* e *Vatairea macrocarpa*.
- A ConGF mostrou padrões de ligação termodinâmicos aos análogos monodesóxi do núcleo trimanosídico de oligossacarídeos ligados à asparagina semelhantes aos encontrados para outras lectinas de *Diocleinae*.
- Perfil eletroforético em presença de SDS e 2-mercaptopetanol revelaram que a farinha de sementes de *Canavalia grandiflora* apresentou mais bandas em comum com o gênero *Dioclea* do que com *Cratylia floribunda* e *Cymbosema* sp.
- A sequência parcial de aminoácidos e nucleotídeos mostrou alta homologia estrutural com as outras sequências de aminoácidos de *Diocleinae*.

Caracterização Genética e Molecular da Lectina e Estudos Filogenéticos de Leguminosas

- Dados citogenéticos não puderam demonstrar diferenças moleculares a nível cromossômico entre espécies de *Canavalia*. O número cromossômico obtido foi $2n = 22$, similar à maioria das leguminosas.
- O reagente CTAB mostrou-se eficiente na extração do DNA genômico apresentando uma banda única, em gel de agarose, de 23.000 pb, sem arrastes.
- A amplificação do gene *ConGF* em DNA genômico foi efetuada com iniciadores do gene homólogo *ConBr* de *Canavalia brasiliensis*, apresentando uma banda única formada por produtos de PCR, em gel de agarose, equivalentes à 870 pb.
- A mesma banda foi obtida na reação de PCR com plasmídeos extraídos por hidrólise alcalina em clones de *Escherichia coli*, atestando que ocorreu transformação das bactérias.
- O estudo filogenético feito com 70 sequências de aminoácidos de lectinas do grupo Fabaceae (= Papilionoideae), apesar de muitas incongruências, definiu claramente a subtribo *Diocleinae*, a tribo Vicieae e mostrou que alguns grupos evolutivamente afins, como Galegeae-Vicieae-Trifolieae, Phaseoleae e Sophoreae-Genisteae puderam ser definidos.
- O estudo evolutivo envolvendo o cálculo das taxas de K_s (taxas de mutações sinônimas) e K_A (taxas de mutações não sinônimas) em sequências de nucleotídeos de lectinas de leguminosas mostraram que estas apoiaram a teoria neutralista de Kimura.

6. Conclusões

Este trabalho procurou caracterizar uma nova lectina (ConGF) da subtribo *Diocleinae*, isolada de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth.

- Os dados obtidos para caracterização bioquímica parcial puderam provar uma alta similaridade, tanto bioquímica (termodinâmica de ligação com análogos deóxi, cinética de interação com glicoproteínas e outros dados), quanto estrutural (sequência primária de aminoácidos) com as lectinas do seu referido grupo.
- Dados citogenéticos não puderam demonstrar diferenças moleculares sob o ponto de vista citogenético entre espécies de *Canavalia*.
- O gene ConGF foi clonado em *Escherichia coli*, com sucesso.
- O estudo filogenético de lectinas do grupo Fabaceae, definiu claramente a subtribo *Diocleinae*, a tribo *Vicieae* e alguns grupos evolutivamente afins, como *Galegeae*-*Vicieae-Trifolieae*, *Phaseoleae* e *Sophoreae-Genisteae*, corroborando estudos químiotaxonômicos citados.
- O estudo evolutivo envolvendo o cálculo das taxas de K_S (taxas de mutações sinônimas) e K_A (taxas de mutações não sinônimas) em sequências de nucleotídeos de lectinas de leguminosas mostraram apoio à teoria neutralista de Kimura, ou seja, não é possível notar pressão de seleção sobre a molécula, como um todo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y.; IWABUCHI, M.; ISHIL, S. Multiple forms in the subunit structure of concanavalin A. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 45, n. 5, p. 1271-1278, 1971.
- ACOSTA-SERRANO, A.; COLE, R. N.; ENGLUND, P. T. Killing of *Trypanosoma brucei* by concanavalin A: structural basis of resistance in glycosylation mutants. **The Journal of Molecular Biology**, v. 304, n. 4, p. 633-644, 2000.
- ADAR, R.; STREICHER, H.; ROZENBLATT, S.; SHARON, S. Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. **The European Journal of Biochemistry**, v. 249, n. 3, p. 684-689, 1997.
- AINOUZ, I. L.; MOREIRA, R. A.; CAMPOS, F. D. A P.; RICHARDSON, M.; BEGBIE, R.; STEWART, J. C.; WATT, W. P.; PUSZTAI, A. The isolation and aminoacid sequence of the β - and γ - subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1435-1440, 1987.
- ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.
- ALVES, M. A. O.; CUSTÓDIO, A. V. de C. Citogenética de leguminosas coletadas no Estado do Ceará. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 12, n. 1, p. 81-92, 1989.
- ASENSIO, J. L.; CANADA, F. J.; BRUIX, M.; ROMERO, A. R.; BARBERO, J. J. The interaction of hevein with N-acetylglucosamine-containing oligosaccharides. Solution of hevein complexed to chitobiose. **The European Journal of Biochemistry**, v. 230, p. 621-633, 1995.
- ASSREUY, A. M.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E.; BRITO, G. A; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 6, p. 1988-1993, 1999.
- BAILEY, R. W. Polyssacharides in the Leguminosae. In: **Chemotaxonomy of the Leguminosae** (J. B. Harborne; D. Boulter; B. L. Turner, eds.). London: Academic Press, p. 485-502. 1971.
- BANDEL, G. Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. **Cariologia**, v. 27, p. 17-32, 1974.
- BARBER, B.; FUHR, B.; CARVER, J. A magnetic resonance study of concanavalin A. Identification of a lanthanide binding site. **Biochemistry**, v. 14, p. 4075-4078, 1975.
- BAUCHROWITZ, M. A.; BARKER, D. G.; NADAUD, I.; ROUGÉ, P.; LESCURE, B. Lectin genes from the legume *Medicago truncatula*. **Plant Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 1011-1017, 1992.
- BAUMANN, C. M.; STROSBERG, A. D.; RUDIGER, H. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Vicia craca*. **The European Journal of Biochemistry**, v. 122, n. 1, p.105-110, 1982.
- BECKER, J.; REEKE, G.; CUNNINGHAM, B. ; EDELMAN, G. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interaction with metals and saccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 1513-1516, 1975.

- BELL, E. A. Comparative biochemistry of non-protein amino acids. In: **Chemotaxonomy of the Leguminosae** (J. B. Harborne; D. Boulter ; B. L. Turner, eds.). London: Academic Press, p. 179-206. 1971.
- BIRNBOIM, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. In: **Recombinant DNA methodology**. Wu, R.; Grossman, L.; Moldave, K. (eds.) Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. San Diego, California. Selected Methods in enzymology. pp175-188. 1989.
- BLADERGROEN, M. R.; SPAINK, H. P. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. **Current Opinion of Plant Biology**, v. 1, n. 4, p. 353-359, 1998.
- BLOCH Jr, C. ; RICHARDSON, M. A new family of small (5kDa) protein inhibitors of insect α -amylases from seeds or sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat γ -purothionins. **FEBS Letters**, v. 279, n. 1, p. 101-104, 1991.
- BOENISCH, T. ; NORGAARD-PEDERSEN, B. Carcinoembryonic antigen (CEA) of human extracts: partial characterization of two variants separated by affinity chromatography on concanavalin A. **Clinica Chimica Acta**, v. 60, p. 51-56, 1975.
- BOSTWICK, D. E.; DANNENHOFFER, J. M.; SKAGGS, M. I.; LISTER, R. M.; LARKINS, B. A ; THOMPSN, G. A. Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. **Plant Cell**, v. 4, n. 12, p. 1539-1548, 1992.
- BOSTWICK, D. E.; SKAGGS, M. I. ; THOMPSON, G. A. Organization and characterization of *Cucurbita* phloem lectin genes. **Plant Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 887-897, 1994.
- BOSTWICK, D. E. ; THOMPSON, G. A. Nucleotide sequence of a pumpkin phloem lectin cDNA. **Plant Physiology**, v. 102, n. 2, p. 693-694, 1993.
- BOUCKAERT, T. J.; LOUIS, R.; POORMANS, F. E. ; WINS, L. Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. **Proteins**, v. 23, n. 4, p. 510-524, 1995.
- BOULTER, D. Proteins of legumes. In: **Advances in Legume Systematics**. Polhill, R. M.; Raven, P. H. 1981.
- BOULTER, D. ; DERBYSHIRE, E. Taxonomic aspects of the structure of legume proteins. In: **Chemotaxonomy of the Leguminosae** (J. B. Harborne; D. Boulter ; B. L. Turner, eds.). London: Academic Press, p. 285-308. 1971.
- BOURNE, Y.; ABERGEL, C.; CAMBILLAU, C.; FREY, M.; ROUGÉ, P. ; FONTECILLA-CAMPS, J. C. X-ray crystal structure determination and refinement at 1.9 Å resolution of isolectin I from seeds of *Lathyrus ochrus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 214, n. 2, p. 571-584, 1990.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, v. 2, p. 248-254, 1976.
- BRATTAIN, M.; JONES, C.; PITTMAN, J. ; PRETLOW, T. The purification of carcinoembryonic antigen by glutaraldehyde cross-linked concanavalin A. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 65, p. 63-71, 1975.
- BRILL, L. M.; KONYALIAN, V. R.; HIRSCH, A. M. A 1.7-kilobase genomic fragment of alfalfa DNA contains the lectin gene Ms Lec 1. **Plant Physiology**, v. 108, n. 3, p. 1311-1312, 1995.
- BURGER, M. M. ; GOLDBERG, A. R. Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surface. **Proceedings of National Academy of Sciences. USA**, v. 57, n. 2, p. 359-366, 1967.

- CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K.; GRANGEIRO, T. B.; NIMTZ, M.; URBANKE, C.; SOUSA-CAVADA, B. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Letters**, v. 425, n. 2, p. 286-292, 1998.
- CAMMUE, B. P. A; STINISSE, H. M. ; PEUMANS, W. J. A new type of cereal lectin from a couch grass (*Agropyrum repens*) **European Journal of Biochemistry**, v. 148, p. 315-322, 1985.
- CARRINGTON, D. M.; AUFRRET, A. ; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, n. 5997, p. 64-67, 1985.
- CASADABAN, M. J.; MARTINEZ-ARIAS, A.; SHAPIRA, S. K. ; CHOU, J. β -galactosidase genes fusions for analysing gene expression in *E. coli* and yeast. **Methods in Enzymology**, v. 100, p. 293-308, 1983.
- CASEY, R. Immunoaffinity chromatography as a means of purifying legumin from *Pisum* (pea) seeds. **Biochemical Journal**, v. 177, p. 509-520, 1979.
- CAVADA, B. S. **Lectinas de *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação**. Fortaleza, Dissertação (Mestrado). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, UFC, 87 p, 1980.
- CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 193-202, 1993.
- CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F. GRANGEIRO, T.B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V.; RAMOS, R. L.; DE SOUSA, F. A.; CRISOSTOMO, C. V. ; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.
- CAVADA, B. S.; NOGUEIRA, N. A.; FREITAS, C. M. S. A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; THOLE, H. H.; ROUGÉ, P. ; CALVETE, J. J. Primary structure and kinetic interaction with glycoproteins of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. **Protein Peptide Letters**, v. 6, n. 1, p. 27-34, 1999.
- CAVADA, B. S.; MADEIRA, S. V. F.; CALVETE, J. J.; SOUZA, L. A.; BOMFIM, L. R.; DANTAS, A. R.; LOPES, M. C.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, B. T.; PINTO, V. P.; LEITE, K. B. ; RAMOS, M. V. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 271-280, 2000.
- CAVALCANTI, A. R. O. ; FERREIRA, R. The relative content of C,G bases in codons corresponding to the two classes of aminoacyl-tRNA synthetases as a tracer for molecular evolution. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 70, n. 4, p. 899-904, 1998.
- CECCATTO, V. M.; GOMES, J. E.; SARRIÉS, G. A.; MOON, D. H. ; TSAI, S. M. Effects of host plant origin on nodulin activities and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v. 204, p. 79-87, 1998.
- CHANG, M. M.; HOROVITZ, D.; CULLEY, D. ; HADWINGER, L. A. Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding, fungal infection and elicitor chitosan. **Plant Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 105-111, 1995.
- CHAPOT, M. P.; PEUMANS, W. J. ; STROSBERG, A. D. Extensive homologies between lectins from non-leguminous plants. **FEBS Letters**, v. 195, p. 231-234, 1986.
- CHARAVANAPVAN, C. The utilization of sword bean and jack bean as food. **Tropical Agriculture**, v. 99, p. 157-159, 1943.

- CHAWLA, D.; ANIMASHAUN, T.; HUGHES, R. C.; HARRIS, E. *Bowringia mildbraedii* agglutinin: polypeptide composition, primary structure and homologies with other legumes lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1202, n. 1, p. 38-43, 1993.
- CHISHOLM, S. T.; MAHAJAN, S. K.; WHITHAM, S.A; YAMAMOTO, M. L. ; CARRINGTON, J. C. Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA*, v. 97, n. 1, p. 489-494, 2000.
- CLARK, A. ; DENBOROUGH, M. The interaction of concanavalin A with blood-group-substances glycoproteins from human secretions, *Biochemistry Journal*, v. 121, p. 811-816, 1971.
- CLAUSEN, J. Immunochemical techniques for the identification of macromolecules. In: **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. Work, T. S. ; Work, e. (Eds.). Amsterdam: North-Holland, v. 1, 572 p. 1969.
- COMERON, J. M. A method for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous substitutions per site. *Journal of Molecular Evolution*, v. 41, p. 1152-1159, 1995.
- COMERON, J. M. K-estimator: Calculation of the number of nucleotide substitutions per site and the confidence intervals. *Bioinformatics*, v. 15, p. 763-764, 1999.
- CROY, R. R. D.; HOQUE, M. S.; GATEHOUSE, J. A. ; BOULTER, D. The major albumin proteins from pea (*Pisum sativum* L.). Purification and some properties *Biochemical Journal*, v. 218, p. 795-803, 1984.
- CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F3. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, n. 4, p. 1503-1512, 1975.
- DALZIEL, M.; McFARLANE, I. ; AXFORD J. S. Lectin analysis of human immunoglobulin G N-glycan sialylation. *Glycoconjugate Journal*, v. 16, n. 12, p. 801-807, 1999.
- DAM, T. K.; OSCARSON, S.; SACCHETTINI, J. C. ; BREWER, C. F. Differential solvation of "core" trimannoside complexes of the *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A detected by primary solvent isotope effects in isothermal titration microcalorimetry. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 49, p. 32826-32832, 1998.
- DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; CECCATTO, V. M.; DE SOUSA F. A.; OSCARSON, S. ; BREWER, C. F. Thermodynamic binding studies of lectins from the *Diocleinae* subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 21, p. 16119-16126, 2000.
- DAYHOFF, M. O. (Ed.) *Atlas of protein sequence and structure*, vol. 5, suppl. 2 National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, 1978.
- DEBRAY, H.; DECOUT, D.; STRECKER, G.; SPIK, G. ; MONTREUIL, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycoproteins related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry*, v. 117, p. 41-55, 1981.
- DEBRAY, H ; ROUGÉ, P. The fine sugar specificity of the *Lathyrus ochrus* seed lectin and isolectins. *FEBS Letters*, v. 176, n. 1, p. 120-123, 1984.
- DEBRAY, H.; MONTREUIL, J. ; FRANZ, H. Fine sugar specificity of the mistletoe (*Viscum album*) lectin. I. *Glycoconjugate Journal*, v. 11, p. 550-557, 1994.

- DHANARAJ, V.; PATANJALI, S. R.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Preparation and preliminary X-ray studies of two crystal forms of jacalin, a lectin from jackfruit. **Journal of Molecular Biology**, v. 203, n. 4, p. 1135-1136, 1988.
- DIAZ, C. L.; SPAINK, H. P. ; KIJNE, J. W. Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell division in red clover roots transformed with the pea lectin gene. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 13, n. 3, p. 268-276, 2000.
- DOOLITTLE, R. F. Reconstructing history with amino acid sequences. **Protein Science**, v. 1, p. 191-200, 1992.
- DUCKE, A. As leguminosas do Estado do Pará. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 4, p. 330-350, 1925.
- EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A; REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. J.; WANG, J. L. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. **Proceedings of National of Academy of Sciences**, U.S.A., v. 69, n. 9, p. 2580-2584, 1972.
- EDMUNDSON, A; ELY, K.; SLY, D.; WESTHOLM, F.; POWERS, D. ; LIENER, I. Isolation and characterization of Concanavalin A polypeptide chains. **Biochemical Journal**, v. 10, p. 3554-3557, 1971.
- EELES, R. A; STAMPS, A. C. **Molecular Biology Intelligence Unit: Polymerase chain reaction (PCR): The technique and its applications**. R.G. Landes Company. Austin. 107p. 1993.
- EINHOFF, W.; FLEISCHMANN, G.; FREIER, G.; KUMMER, H. ; RÜDIGER, H. Interaction between lectins and other components of leguminous protein bodies. **Biological Chemistry**, v. 367, p. 15-27, 1986.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Structures of the *Erythrina corallodendron* lectin and of its complexes with mono- and disaccharides. **Journal of Molecular Biology**, v. 277, n. 4, p. 917-932, 1998.
- FENG, D. F. ; DOOLITTLE R. F. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. **Journal of Molecular Evolution**, v. 13, p. 93-104, 1987.
- FERREIRA, A. B. DE H. **Novo dicionário da Língua Portuguesa**. 2^a Ed. 25^a impressão. Editora Nova Fronteira. 1986.
- FUJIMURA, S.; TERADA, S.; JAYAVARDHANAN, K. K.; PANIKKAR, K. R. ; KIMOTO, E. Primary structures of concanavalin A-like lectins from seeds of two species of *Canavalia*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 985-987, 1993.
- FUKUZAWA, M. ; OCHIAI, H. Molecular cloning and characterization of the cDNA for discoidin II of *Dictyostelium discoideum*. **Plant Cell Physiology**, v. 37, n. 4, p. 505-514, 1996.
- GALLOWAY, C. J.; DEAN G. E.; MARSH, M.; RUDNICK, G. ; MELLMAN, J. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. **Proceedings of National Academy of Science**. U.S.A., v. 80, p. 3334-3338, 1983.
- GARCIA-MAROTO, F; CASTAGNARO, A.; HOZ, P. S.; MARANA, C.; CARBONERO, P.; GARCIA-OLMEDO, F. Extreme variations in the ratios of non-synonymous to synonymous nucleotide substitution rates in signal peptide evolution. **FEBS Letters**, v. 287, n. 1,2, p. 67-70. 1991.
- GEBAUER, G.; SCHILTZ, E. ; RUEDIGER, H. The amino-acid sequence of the alpha subunit of the mitogenic lectin from *Vicia sativa*. **European Journal of Biochemistry**, v. 113, n. 2, p. 319-325, 1981.

- GOULD, S. J. ; ELDREDGE, N. Punctuated equilibria comes of age. *Nature*, v. 366, p. 223-227, 1993.
- GOLDBLATT, P. Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: Polhill, R. M; Raven, P. H. (ed.). *Advances in Legume Systematics. Part. 2*. Kew, Royal Botanic Garden, p. 427-463, 1981.
- GOLDING, G. B. ; DEAN, A. M. The structural basis of molecular adaptation. *Molecular Biological Evolution*, v. 15, p. 355-369, 1998.
- GOLDSTEIN, I. J. ; PORETZ, R. D. Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In: Liener, I. E; Sharon, N. ; Goldstein, I. J. (Eds.). *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. 600 pp. Academic Press, New York. 1986.
- GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T. ; SHARON, N. What should be called a lectin. *Nature*, v. 285, p. 66, 1980.
- GOWDA, L.R.; SAVITHRI, H. S.; RAO, D. R. The complete primary structure of a unique mannose/glucose-specific lectin from field bean (*Dolichos lab lab*). *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n. 29, p. 18789-18783, 1994.
- GRANGEIRO, T. B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J. J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETO, M. ; CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *European Journal of Biochemistry*, v. 248, p. 4348, 1997.
- GRIMALDI, J. ; SYKES, B. Concanavalin A: a stopped flow nuclear magnetic resonance study of conformation changes induced by Mn²⁺, Ca²⁺ and [(alpha)]-methyl-D-mannoside. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 8614-8617, 1975.
- GRUNDY, W. N. ; NAYLOR, G. J. P. Phylogenetical inference from conserved sites alignments. *Journal of Experimental Zoology*, v. 285, p. 128-139, 1999.
- GRUPP, C.; JOHN, H.; HEMPRICH, U.; SINGER, A.; MUNZEL, U ; MULLER, G. A. Identification of nucleated cells in urine using lectin staining. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 37, n. 1, p. 84-93, 2001.
- GUERRA, M. S. O uso do corante Giemsa na citogenética vegetal – comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, v. 35, p. 190-193, 1983.
- GUERRA, M. S. *Introdução à citogenética geral*. Rio de Janeiro. Editora Guanabara. AS. 1988.
- GUPTA, D.; OSCARSON, S.; RAJU, T. S.; STANLEY, P.; TOONE, E. J. ; BREWER, C. F. A comparison of the fine saccharide-binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A. *European Journal of Biochemistry*, v. 242, n. 2, p. 320-326, 1996.
- GUPTA, D.; DAM, T. H.; OSCARSON, S. ; BREWER, C. F. Thermodynamics of lectin-carbohydrate interactions. Binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to concanavalin A. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 6388-6392, 1997.
- HARBORNE, J. B. Terpenoids and other low molecular weight substances of systematic interest in the Leguminosae. In: *Chemotaxonomy of the Leguminosae* (J. B. Harborne; D. Boulter ; B. L. Turner, eds.). London: Academic Press, p. 257-283. 1971.
- HARMONY, J. ; CORDES, E. Interaction of human plasma low density lipoprotein with concanavalin A and with ricin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 8614-8619, 1975.

- HEMPERLY, J. J.; HOPP, T.P.; BECKER, J. W. ; CUNNINGHAM, B. A. The chemical characterization of a favin, a lectin isolated from *Vicia faba*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 254, n. 14, p. 6803-6810, 1979.
- HERVE, C.; DABOS, P.; GALAUD, J. P.; ROUGE, P. ; LESCURE, B. Characterization of a *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with a extracellular lectin-like domain. *The Journal of Molecular Biology*, v. 258, n. 5, p. 778-788, 1996.
- HOFFMAN, L. M. Structure of a chromosomal *Phaseolus vulgaris* lectin gene and its transcript. *The Journal of Molecular Applied Genetics*, v. 2, n. 5, p. 447-453, 1994.
- HOFFMAN, L. M. ; DONALDSON, D. D. Characterization of two *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome. *The EMBO Journal*, v. 4, n. 4, p. 883-889, 1985.
- HOFFMAN, L. M.; MA, Y ; BARKER, R. F. Molecular cloning of *Phaseolus vulgaris* lectin mRNA and use of cDNA as a probe to estimate lectin transcript levels in various tissues. *Nucleic Acid Research*, v. 10, n. 23, p. 7819-28, 1982.
- HONQING, M.; VAN DAMME, E. J. ; PEUMANS, W. J. ; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonium*) bulbs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 306, n. 1, p. 431-438, 1993.
- HOODBHOY, T ; TALBOT, P. Characterization, fate, and function of hamster cortical granule components. *Molecular Reproduction Development*, v. 58, n. 2, p. 223-235, 2001.
- HUGHES, A. L.; NEI, M. Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: Evidence for overdominant selection. *Proceedings of National Academy of Sciences, U.S.A.*, v. 86, p. 958-962, 1989.
- IMBRIE-MILLIGAN, C.; DATTA, P. ; GOLDSTEIN, I. J. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the lima bean lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 28, p. 16793-16797, 1989.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. ; WHITE, T. J. EDS. *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA. 1990.
- JACOB, F. Evolution and thinking. *Science*, v. 196, n. 4295, p. 1161-1166, 1977.
- JOHN, M. E.; LONG, C. M. Sequence analysis of arcelin-2: a lectin-like plant protein. *Gene*, v. 86, p. 171-176, 1990.
- JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 7a Edição – São Paulo: Editora Nacional. 1985.
- KASS, E. ; WINK, M. Phylogenetic relationships in the Papilioideae (family Leguminosae) based on nucleotide sequences of cpDNA (rbcL) and nc DNA (ITS 1 and 2). *Molecular and Phylogenetical Evolution*, v. 8, n. 1, p. 65-88, 1997.
- KASUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. *The Journal of Biochemistry*, v. 109, n. 6, p. 899-903 1991.
- KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G.; HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1033, n. 2, p. 210-213, 1990.
- KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, v. 217, p. 624-626, 1968.
- KIMURA, M ; OHTA, T. Protein polymorphism as a phase of molecular evolution. *Nature*, v. 229, p. 467-469, 1971.

- KING, R. C.; STANSFIELD, W. D. *A Dictionary of Genetics*. Oxford University Press, Inc., 5th edition. 1997.
- KOCOUREK, J. ; HOREJSI, V. Note on the recent discussion on definition of the term lectin. In: *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (Bog-Hansen, T. c.; Spengler, G. A. eds.), pp. 3-6. Walter de Gruyter, Berlin and New York. 1983.
- KOJIMA, K.; OGAWA, H.; SENO, N.; MATSUMOTO, I. Purification and characterization of *Canavalia gladiata* agglutinin. *Carbohydrate Research*, v. 213, p. 275-282, 1991.
- KONAMI, Y.; ISHIDA, C.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. A unique amino acid sequence involved in the putative carbohydrate-binding domain of a legume lectin specific for sialylated carbohydrate chains: primary sequence determination of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH). *The Journal of Biochemistry*, v. 115, n. 4, p. 767-777, 1994.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K. ; OSAWA, T. The primary structure of the *Lotus tetragonolobus* seed lectin. *FEBS Letters*, v. 268, n. 1, p. 281-286, 1990.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. A putative carbohydrate-binding domain of the lactose-binding *Cytisus sessilifolius* anti-H(O) lectin has a similar amino acid sequence to that of the L-fucose-binding *Ulex europaeus* anti-H(O)lectin. *Glycoconjugate Journal*, v. 12, n. 2, p. 128-134, 1995.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. The primary structure of the *Cytisus scoparius* seed lectin and a carbohydrate-binding lectin. *Journal of Biochemistry*, v. 113, n. 3, p. 366-375, 1992.
- KONAMI, Y.; YAMAMOTO, K.; TOYOSHIMA, S. ; OSAWA, T. The primary structure of the *Laburnum alpinum* seed lectin. *FEBS Letters*, v. 286, n. 1-2, p. 33-38, 1991.
- KORNFELD, R ; FERRIS, C. Interaction of immunoglobulin glycopeptides with concanavalin A . *The Journal of Biological Chemistry*, v. 250, p. 2614-2619, 1975.
- KOUCHALAKOS, R. N.; BATES, O. J.; BRADSHAW, R. A. ; HARPER, K. D. Lectin from sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). Complete amino acid sequence. *Biochemistry*, v. 23, n. 8, p. 1824-1830, 1984.
- KUSUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y. ; OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. *The Journal of Biochemistry*, v. 109, n. 6, p. 899-903, 1991.
- LACKEY, J. A. A revised classification of the tribe Phaseoleae (Leguminosae, Papilioideae) and its relation to canavanine distribution. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 74, p. 163-178, 1980.
- LACKEY, J. A. *Phaseoleae*. In: *Advances in Legume Systematics*. Polhill, R. M ; P. H. Raven (Eds.). Part. 1. Roy. Bot. Gard. Kew, p. 301-327. 1981.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAW, I. J. Comparison of putative nodule and seed lectin gene promoters of peanut and in situ localization of nodule lectin gene expression. *Plant Science*, v. 153, n. 1, p. 43-54, 2000.
- LERNER, D. R. ; RAIKHEL, N. V. Cloning and characterization of root-specific barley lectin. *Plant Physiology*, v. 91, p. 124-129, 1989.
- LERNER, D. R. ; RAIKHEL, N. V. The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica*) agglutinin encodes both a lectin and a chitinase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 11085-11091, 1992.

LI, W-H.; GRAUR, D. **Fundamentals of Molecular Evolution**. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland Massachusetts, 284p, 1991.

LIENER, I. E. Toxic constituents in Legumes. In: **Chemistry and Biochemistry of Legumes**, Arora, S. K (ed.). New Delhi: Oxford and IBH Publishing Co. 1982.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: STUMPF, P. F. & CONN, E. E. **The Biochemistry of Plants**. Vol. 6, 371-447. Academic Press Inc. New York, 1981.

LIU, C. I.; TSAI, C. C.; LIN, S.C.; WANG, L.I.; HSU, C. I.; HWANG, M. J. ; LIN, J. Y. Primary structure and function analysis of the *Abrus precatorius* agglutinin A chain by site-directed mutagenesis. Pro(199) of amphiphilic alpha-helix H impairs protein synthesis inhibitory activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 3, p. 1897-1901, 2000.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T. W.; BOUCKAERT, J. ; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 383, p. 1998.

LORIS, R.; DE GREVE, H.; DAO-THI, M. H.; MESSENS, J.; IMBERTY, A. ; WYNS, L. Structural basis of carbohydrate recognition by lectin II from *Ulex europaeus*, a protein with a promiscuous carbohydrate-binding site. **The Journal of Molecular Biology**, v. 301, n. 4, p. 987-1002, 2000.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. **Annals of Medical Experimental Biology Fennomenogy**, v. 35, n. 11, p. 1-156, 1957.

MARECHAL, R., MASCHERPA, J. M. ; STAINIER, F. Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, Genève, v. 28, p. 1-273, 1978.

MASAOKA, H.; SHIBATA, K.; YAMAGUCHI, H. Topological and functional characterization of the N-glycans of soybean (*Glycine max*) agglutinin. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v. 126, n. 1, p. 212-217.

MCKENZIE, G.; SAWYER, W ; NICHOL, L. The molecular weight and stability of concanavalin A. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 263, p. 283-287, 1972.

MEARS, J. A. ; MABRY, T. J. Alkaloids in the Leguminosae. In: **Chemotaxonomy of the Leguminosae**, J. B. Harborne; D. Boulter ; B. L. Turner, (eds.). London: Academic Press, p. 73-178. 1971.

MESSIER, W.; STEWART, C-B. Episodic adaptive evolution of primate lysozymes. **Nature**, v. 385, p. 151-154, 1997.

MILLER, J. NWOKEDI, G. The luminescence properties of concanavalin A. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 393, p. 496-500, 1975.

MIRKOV, T. E. ; CHRISPEELS, M. J. Mutation of Asn128 to Asp of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) eliminates carbohydrate-binding and biological activity. **Glycobiology**, v. 3, n. 6, p. 581-7, 1993.

MISLOVICOVA , D.; GEMEINER, P.; SANDULA, J.; MASAROVA, J.; VIKARTOVSKA, A.; DOCOLOMANSKY, P. **Biotechnological Applied Biochemistry**, v. 31 (Pt2), p.153-159, 2000.

MO, H. ; GOLDSTEIN, I. J. Isolation and characterization of a Forssman antigen-binding lectin from a velvet bean (*Mucuna derrigiana*) seeds. **Glyconconjugate Journal** v. 11, n. 5, p. 424-431, 1994.

MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

- MOREIRA, R. A.; AINOZ, I. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, Supp. II, p. 211-218, 1991.
- MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; FERNANDES, A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 5, n. 2, p. 127-132, 1993.
- MOUCHIROUD, D.; GAUTIER, C.; BERNARDI, G. Frequencies of synonymous substitutions in mammals are gene-specific and correlated with frequencies of nonsynonymous substitutions. *Journal of Molecular Evolution*, v. 40, n. 107-113, 1995.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, v. 8, p. 4321-4325, 1980.
- NAS, T. *Tropical legumes: Resources for the future*. National Academy of Science. Washington DC. 660p. 19879
- ODA, Y.; MINAMI, K.; AONUMA, S. A new agglutin from the *Tulipa gesneriana* bulbs *European Journal of Biochemistry*, v. 165, n. 2, p. 297-302, 1987.
- O'HARE, M.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M. Biological activity of recombinant *Ricinus communis* agglutin A chain produced in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, v. 299, n. 3, p. 209-12, 1992.
- OHTA, T.; INA, Y. Variation in synonymous substitutions rates among mammalian genes and correlation between synonymous and nonsynonymous divergences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 41, p. 717-720, 1995.
- OKAYAMA, H.; CHEN, C. Calcium phosphate mediated gene transfer into established cell lines. In: *Gene Transfer and Expression Protocols*. Murray, E. J. (ed.) Humana Press, Clifton, New Jersey. Methods in Molecular Biology, pp. 15-21. 1991.
- OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. seeds. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 14, p. 61-66, 1991.
- OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MARTINS, J. L.; JARENKOW, J. A.; VASCONCELOS, I. M.; MOREIRA, R. A. Lectinas de sementes como marcadores taxonômicos da tribo Diocleae. *Acta Botanica Brasilica*, v. 4, n. 2, p. 159-163, 1990.
- OLSON, M.; LIENER, I. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin of jack bean. *Biochemistry*, v. 6, p. 105-108, 1967.
- OOI, L. S. M.; NG, T. B.; GENG, Y. Q.; OOI, V. E. C. Lectins from bulbs of the chinese daffodil *Narcissus tazetta* (family Amaryllidaceae). *Biochemistry and Cell Biology*, v. 78, n. 4, p. 463-468, 2000.
- PADMANABHAN, S.; DEMIN, V. V.; TELEZHINSKAYA, I. N.; ZAITSEVA, E. V.; GOLUBEVA, T. B.; CHERTOV, O. Y. Studies on the N-terminal sequences of lectins isolated from the seeds of *Butea frondosa*. *Biomedical Science*, v. 2, n. 6, p. 646-650, 1991.
- PAGEL, M. Seeking the evolutionary regression coefficient: an analysis of what comparative methods measure. *The Journal of Theoretical Biology*, v. 164, p. 191-205, 1993.

- PAGEL, M. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*, v. 401, p. 877-884, 1999.
- PATANJALI, S. R.; SWAMY, M. J.; ANANTHARAM, V.; KHAN, M. I. ; SUROLIA, A. Chemical modification studies on *Abrus* agglutinin. Involvement of tryptophan residues in sugar binding. *Biochemical Journal*, v. 217, n. 3, p. 773-781, 1984.
- PEREZ, G.; PEREZ, C.; SOUZA-CAVADA, B. MOREIRA, R. ; RICHARDSON, M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 8, p. 2619-2621, 1991.
- PEUMANS, W. J. ; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352, 1995.
- pGEM-T and pGEM-T EASY VECTORS SYSTEMS TECHNICAL MANUAL. Instructions for use of products A1360, A1380, A3600 and A3610 Disponível em <<http://www.promega.com/tbs/tm042/tm042.html>>. Acesso em 10/12/99.
- POHILL, R. M.; RAVEN, P. H. (eds.) *Advances in legume systematics*. Part 2. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, England. 1981.
- RAMOS, M. V. Biosynthesis and structural lectin features of the Phaseoleae Diocleinae and the Vicieae (Leguminoae = Fabaceae) under a phylogenetic perspective. *The Journal of Comparative Biology*, v. 2, n. 2, p. 129-136, 1997.
- RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A. & ROUGÉ, É. P. Interaction of lectins from the sub-tribe Diocleinae with specific ligands. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 8, n. 3, p. 193-199, 1996.
- RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. ; ROUGÉ, P. Structural similarities among *Diocleae lectins*. In: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol 11. E. Van Driessche, P. Rougé, S. Beeckmans, T. C. Bøg-Hansen – (Eds), pp 44-49. 1996.
- RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. D. A. P ; MOREIRA, R. A.; AINOZ, I. L.; BEGBIE, R.; WATT, W. B. ; PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major α subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *The European Journal of Biochemistry*, v. 114, p. 101-111, 1984.
- RICHARDSON, M.; YARWOOD, A. ; ROUGÉ, P. The amino acid sequence of an atypical single-chain lectin from seeds of *Lathyrus sphaericus* (Retz.). *FEBS Letters* 216, n. 1, p. 145-150, 1987.
- RICHARDSON, P. T.; ROBERTS, L. M.; GOULD, J. H. ; LORD, J. M. The expression of functional ricin-B-chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 950, n. 3, p. 385-394, 1988.
- ROBERTS, N. J.; BRIGHAM, J.; WU, B.; MURPHY, J. B.; VOLPIN, H. PHILLIPS, D. A ; ETZLER, M. E. A Nod factor-binding lectin is a member of a distinct class of apyrases that maybe unique to the legumes. *Molecular and General Genetics*, v. 262, n. 2, p. 261-267, 1999.
- RIGGS, C. D.; VOELKER, T. A.; CHRISPEELS, M . J. Cotyledon nuclear proteins bind to DNA fragments harboring regulatory elements of phytohemagglutinin genes. *Plant Cell*, v. 1, n. 6, p. 609-21, 1989.
- ROBERTS, L. M.; TREGERAR, J. W. ; LORD, J. M. Molecular cloning of ricin. *Targeted Diagnostic Therapy*, v. 7, p. 81-97, 1992.
- ROUGÉ, P.; CABILLAU, C.; BOURNE, Y. The three-dimensional structure of legume lectins. In: *Lectin Reviews*. Kilpatrick, D. C.; Van Driessche, E.; Bog-Hansen, T. C. (Eds.), Sigma Chemical, v. 1, p.143-160. 1991.

ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A. ; CAVADA, B. S. Single- and two- chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemical and Systematic Ecology**, v. 15, n. 3, p. 341-348, 1987.

ROZAS, J. & ROZAS, R. DNAsp version 3.0: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**, v. 15, p. 174-175, 1999.

ROZWARSKI, D. A.; SWAMI, B. M.; BREWER, C. F. ; SACCHETTINI, J. C. Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. **The Journal of Biological Chemistry**, 273, n. 49, p. 32818-32825, 1998.

RUDIGER, H. Purification and properties of blood group especific lectins from *Vicia craca*. **The European Journal of Biochemistry**, v. 72, p. 317-322, 1977.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMENEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C. W. DIAZ-MAURINO, T. ; GABIUS, H. J. Medical chemistry based on the sugar code: Fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medical Science**, v. 7, n. 4, p. 389-416, 2000.

RUFFET, E. PAQUET, N.; FRUTIGER, S.; HUGHES, G. J. ; JATON, J. C. Structural and electron-microscope studies of jacalin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) show that this lectin is a 65 kDa tetramer. **The Biochemical Journal**, v. 286, n. 2, p. 382-384, 1992.

RUSSELL, R. B.; SAQI, M. A. S.; SAYLE, R. A.; BATES, P. A. ; STERNBERG, M. J. E. Recognition of analogous and homologous protein folds: analysis of sequence and structure conservation. **The Journal of Molecular Biology**, v. 269, p. 423-439, 1997.

RUZHEINIKOV, S. N.; MIKHAILOVA, I. Y.; TSYGANNIK, I. N.; PANGBORN, W.; DUAX, W. ; PLETNEV, V. Z. The structure of the pea lectin-D-mannopyranose complex at a 2.1 Å resolution. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 24, p. 277-282, 1998.

SAITOU, N. ; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular an Biological Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987..

SAMBROOK, J.; FRUTSCH, E. F. ; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**, 2º Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York. 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of National Academy of Sciences**, U.S.A., vol. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, C. F. Caracterização bioquímica e sequência primária de uma lectina galactose-específica (VML) de sementes de *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae, Dalbergieae). Tese de Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Ceará – UFC – Fortaleza-CE. 118f:il. 1998.

SANZ-APARÍCIO, J; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J. ; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties comparing with Con A, **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118, 1997.

SAUER, J. Revision of *Canavalia*. **Brittonia**, v. 16, p. 108-181, 1964.

SAUER, J. ; KAPLAN, Canavalia beans in American prehistory. **American Antiquity**, v. 34, p. 417-424, 1979.

- SCHNELL, D. J. ; ETZLER, M. E. cDNA cloning, primary structure and its in vitro biosynthesis of the DB58 lectin from *Dolichos biflorus*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 29, p. 14648-14656, 1988.
- SCHURZ, J. ; RÜDIGER, H. The lectin-binding protein from the pea (*Pisum sativum*); properties and interactions. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, v. 366, n. 4, p. 367-373, 1985.
- SENGUPTA, S.; SINGH, S.; SENGUPTA, L. K. ; BISEN, P. S. Phytolectins: natural molecules with immense biotechnological potential. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 35:103-110. 1997.
- SHANGARY, S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; KAUR, K. ; SANDHU, R. S. Purification and properties of four monocot lectins from the family araceae. *Phytochemistry*, v. 40, n. 2, p. 449-455, 1995.
- SHANKLIN, J. Exploring the possibilities presented by protein engineering. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 3, p. 243-248, 2000.
- SHARMA, V. SRINIVAS, V. R. ; SUROLA, A. Cloning and sequencing of winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) basic agglutinin (NBA1): presence of second glycosylation site and its implications in quaternary structure. *FEBS Letters*, v. 389, n. 3, p. 289-292, 1996.
- SHARON, N. ; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *Faseb Journal*, v. 4, p. 3198-3208, 1990.
- SILVA, L. I. M. M. da. Caracterização bioquímica e estrutura primária da lectina de sementes de *Pisum avense* L. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – Universidade Federal do Ceará – UFC – Fortaleza-CE. 102f:il. 1997.
- SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L. M. C.; ARAYA, J. E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVE, J. M.; BRIONES, M. R. S.; BUENO, M. R. P.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E. A.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C. R.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, V. C. A.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANCA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAÉ, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C. C.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MADEIRA, H. M. F.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A. L.; MARTINS, E. M. F.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F. M.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; NETTO, L. E. S.; NHANI, J. R. A.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; DE OLIVEIRA, M. C.; DE OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A. G.; PEREIRA, J. R. ,H. A.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V.; DE M. ROSA, A. J.; DE ROSA JR., V. E.; DE SA, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H. E.; DA SILVA, A. C. R.; DA SILVA, F. R.; DA SILVA, A. M.; SILVA JR., W. A.; DA SILVEIRA, J. F.; SILVESTRI, M. L. Z.; SIQUEIRA, W. J.; DE SOUZA, A. A.; DE SOUZA, A. P.; TERENZI, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J. AND SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, v. 406, p. 151-157, 2000.
- SINGH, J.; KAMBOJ, K. K.; SANDHU, R. S.; SHANGARY, S. ; KANBOJ, K. K. Purification and characterization of a tuber lectin from *Alocasia indica*. *Phytochemistry*, v. 33, n. 5, p. 979-983, 1993.
- SMARTT, J. 1990. *Grain legumes: evolution and genetic resources*. University Press, Cambridge, pp. 333. 1990.

- SMEETS, K.; VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J. Comparative study of the post-translational processing of the mannose-binding lectins in the bulbs of garlic (*Allium sativum* L.) and ramsons (*Allium ursinum* L.). *Glicoconjugate Journal*, v. 11, n. 4, p. 309-320, 1994.
- SMEETS, K.; VAN DAMME, E. J. M.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of lectins and lectin-alliinase complexes from bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*). *Glicoconjugate Journal*, v. 14, n. 3, p. 331-343, 1997.
- SMITH, S. C.; JOHNSON, S.; ANDREWS, J.; MCPHERSON, A. Biochemical characterization of canavalin, the major storage protein of jack bean. *Plant Physiology*, v. 70, p. 1199-1209, 1982.
- SOUSA-CAVADA, B.; RICHARDSON, M.; YARWOOD, A.; PERE, D.; ROUGÉ, P. The amino acid sequences of the alpha subunits of the lectins from *Lathyrus cicera*, *L. aphaca* and *L. articulatus*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 1, p. 115-118, 1986.
- SUMNER, J. B. The recrystallization of urease. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 70: 97-98, 1926.
- SUMNER, J. B.; HOWELL, S. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *The Journal of Bacteriology*, v. 32:227, 1936.
- STRAUSS, E. Can mitochondrial clocks keep time? *Science*, v. 283:1435-1438, 1999.
- TABARY, F.; FONT, J.; BOURILLON, R. Isolation, molecular and biological properties of a lectin from rice embryo: relationship with germ agglutin properties. *Archives of Biochemical Biophysics*, v. 259, n. 1, p. 79-88, 1987.
- TAHIROV, T. H.; LU, T. H.; LIAW, Y. C.; CHOW, L. P.; TSUGITA, A.; LIN, J. Y. Crystal structure of abrin-a. *The Journal of Molecular Biology*, v. 250, n. 3, p. 354-367, 1995.
- TANAKA, T.; NEI, M. Positive Darwinian selection observed at the variable region genes of immunoglobulins. *Molecular Biological Evolution*, v. 6, p. 447-459, 1989.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TOBATA-KUDO, H.; HIGO, H.; KOGA, M.; TADA, I. Effects of various treatments on the chemokinetic behavior of third-stage of larvae of *Strongyloides ratti* on a sodium chloride gradient. *Parasitological Research*, v. 86, n. 11, p. 865-869, 2000.
- TURNER, B. L.; IRWIN, H. S. Chromosome number of some Brazilian Leguminosae. *Rhodora*, v. 63:16-19, 1961.
- VAN DAMME, E. J.; ASTOUL, C. H.; BARRE, A.; ROUGE, P.; PEUMANS, W. J. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus*. *The European Journal of Biochemistry*, v. 267, n. 16, p. 5067-5077, 2000a.
- VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). *Plant Molecular Biology*, v. 29, n. 3, p. 579-589, 1995.
- VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The NeuAc (alpha-2,6)-Gal/GalNAc-binding lectin from elderberry (*Sambucus nigra*) bark, a type-2 ribosome-inactivating protein with an unusual specificity and structure. *The European Journal of Biochemistry*, v. 235, n. 1-2, p. 128-137, 1996a.

- VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; VERHAERT, P.; ROUGE, P. ; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of the mitogenic mannose/maltose-specific rhizome lectin from *Calystegia sepium*. **FEBS Letters**, v. 397, p. 352-356, 1996b.
- VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; BALZARINI, J ; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of the lectin and a lectin-related protein from common Solomon's seal (*Polygonatum multiflorum*). **Plant Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 657-672, 1996.
- VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. ; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 523-536, 1997.
- VAN DAMME, E. J.; BRIKE, F.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J. ; PEUMANS, W. Molecular cloning of the two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **The European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.
- VAN DAMME, E. J.; GOLDSTEIN, I. J. ; PEUMANS W. J. A comparative study of mannose-binding lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 509-514, 1991.
- VAN DAMME, E. J. M.; GOOSSENS, K.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; VERHAERT, P.; PEUMANS, W. J. The major tuber storage protein of Araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1147-1158, 1995.
- VAN DAMME, E. J.; KAKU, H.; PERINI, F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEETERS, B.; YAGI, F.; DECOCK, B. ; PEUMANS, W. J. Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin. **The European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 23-30, 1991.
- VAN DAMME, E. J.; SMEETS, K.; ENGELBORGHHS, I.; AELBERS, H.; BALZARINI, J.; PUSZTAI, A.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J. ; PEUMANS, W. J. Cloning and characterization of the lectin cDNA clones from onion, shallot and leek. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 365-376, 1993a.
- VAN DAMME, E. J.; HAO, Q.; CHARELS, D.; BARRE, A.; ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F. ; PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. **The European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 9, p. 2746-2759, 2000b
- VAN DAMME, E. J.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F. ; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of mannose-binding lectins from *Clivia miniata*. **Plant Molecular Biology**, v. 24, n. 5, p. 825-830, 1994.
- VAN DAMME, E. J.; SMEETS, K.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEINS, I. J. ; PEUMANS, W. J. The closely related homomeric and heterodimeric mannose-binding lectins from garlic are encoded by one-domain and two-domain lectin genes, respectively. **The European Journal of Biochemistry**, v. 206, n. 2, p. 413-420, 1992.
- VAN DAMME, E. J.; SMEETS, K.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F. ; PEUMANS, W. Characterization and molecular cloning of mannose-binding lectins from Orchidaceae species *Listera ovata*, *Epipactis helleborine* and *Cymbidium hybridum*. **The European Journal of Biochemical**, v. 221, p. 769-777, 1994.
- VAN DAMME, E. J.; SMEETS, K.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F. ; PEUMANS, W. J. The manose-specific lectins from ramsons (*Allium ursinum* L.) are encoded by three sets of genes. **The European Journal of Biochemistry**, v. 217, n. 1, p. 123-129, 1993b.

VAN KAMMEN, A. Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. **Plant Mol Biological Reports**, v. 2, 43-45, 1984.

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

VODKIN, L.O., RHODES, P. R. ; GOLDBERG, R. B. Ca lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. **The Cell**, v. 34, p. 1023-1031, 1983.

VOLKER, T. A.; MORENO, J. ; CHRISPEELS, M. J. Expression analysis of a pseudogene in transgenic tobacco: a frameshift mutation prevents mRNA accumulation. **The Plant Cell**, v. 2, n. 3, p. 255-61, 1990.

WANG, J.; CUNNINGHAM, B.; WAXDAL, M. ; EDELMAN, G. The covalent and three dimensional structure of Concanavalin A. I. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F1 and F2. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. USA. V. 68, p.1130-1136, 1975.

WARNER, S. A. J. Genomic DNA isolation and lambda library construction. In: **Plant Gene Isolation**. Edited by Gary D. Foster ; David Twell. John Wiley ; Sons, England. 1996.

WATSON, J. C. ; THOMPSON, W. F. Purification and restriction of plant nuclear DNA. **Methods in Enzymology**, v. 118, p. 57-75, 1986.

WILDEN, W.; HERMAN, E ; CHRISPEELS, M. J. Protein bodies of mung bean cotyledons as autophagic organelles. **Proceedings of National Academy of Sciences**, U.S.A., v. 77, n. 1, p. 428-432, 1980.

WHITHAM, S. A; ANDERBERG, R. J.; CHISHOLM, S. T. ; CARRINGTON, J. C. *Arabidopsis RTM2* gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. **The Plant Cell**, v. 12, n. 4, p. 569-582, 2000a.

WILKINS, T. A. ; RAIKHEL, N. V. Expression of rice lectin is governed by two temporally and spatially regulated mRNAs in developing embryos. **The Plant Cell**, v. 1, n. 5, p. 541-549, 1989.

WRIGHT, C. S. ; OLAFSDOTTIR, S. Structural differences in the two major wheat germ agglutinin isolectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 16, p. 7191-7195, 1986.

WOLFE, K. H.; LI, W. H. ; SHARP, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. **Proceedings of National Academy of Sciences**. USA, v. 84, p. 9054-9058, 1987.

WOLFF, J. A.; KWOLEK, W. F. Lipids of the Leguminosae. In: **Chemotaxonomy of the Leguminosae**, pp. 231-255 (eds. J.B Harborne, D. Boulter and B. L. Turner). London Academic Press., 1971.

WOOD, K. A.; LORD, J. M.; WAWRZYNCZAK, E. J. ; PIATAK, M. Preproabrin: genomic cloning, characterisation and the expression of the A-chain in *Escherichia coli*. **The European Journal of Biochemistry**, v. 198, n. 3, p. 723-732, 1991.

WU, A. M.; CHIN, L-K.; FRANZ, H.; PFULLER, U. ; HERP, A. Carbohydrate specificity of the receptor sites of mistletoe toxic lectin-I. **Biochymica et Biophysica Acta**, v. 1117, p. 232-234, 1992.

WYCOFF, K. L.; VAN RHIJN, P. ; HIRSCH, A. M. The ribosomal protein PO of soybean (*Glycine max* L. Merr.) has antigenic cross-reactivity to soybean seed lectin. **Plant Molecular Biology**, v. 34, n. 2, p. 295-306, 1997.

- YAMAGUCHI, O.; KIMURA, M.; ARAKI, M.; YAMASAKI, N. KIMURA, Y.; NAKAIMA, S. ; TAKAGI, S. Chemical structures of two subunits, A-subunit and B-subunit of galactose-specific isolectins from *Erythrina variegata* seeds. *The Journal of Biochemistry*, v. 114, n. 4, p. 560-566, 1993.
- YAMAGUCHI, D. ; MINAMIKAWA, T. Structure of the gene encoding concanavalin A from *Canavalia gladiata* and its expression in *Escherichia coli* cells. *FEBS Letters*, v. 260, n. 1, p. 127-130, 1990.
- YAMAMOTO, K; KONAMI, Y. ; OSAWA, T. A chimeric lectin formed from *Bauhinia purpurea* lectin and *Lens culinaris* lectin recognizes a unique carbohydrate structures. *The Journal of Biochemistry*, Tokyo, v. 127, n. 1, p. 129-135, 2000.
- YAMAMOTO, K.; MARUYAMA, I. N. ; OSAWA, T. Cyborg lectins: novel leguminous lectins with unique specificities. *The Journal of Biochemistry*, (Tokyo), v. 127, n. 1, p. 137-42, 2000.
- YARWOOD, A.; RICHARDSON, M.; PERE, D.; SOUSA-CAVADA, B. ; ROUGÉ, P. The amino acid sequence of the alpha subunits of the lectins from the seeds of *Lathyrus hirsutus* and *Lathyrus tingitanus*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 9, p. 2109-2112, 1986.
- YOSHIDA, K.; BABA, K.; YAMAMOTO, N. ; TAZAKI, K. Cloning of a lectin cDNA and seasonal changes in levels of the lectin and its mRNA in the inner bark of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Molecular Biology*, v. 25, n. 5, p. 845-853, 1994.
- ZHU, K., HUESING, J. E.; SHADE, R. E.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. ; MURDOCK, L. L. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). *Plant Physiology*, v. 110, n. 1, p. 195-202, 1996.

8. ANEXO

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM
Canavalia grandiflora Benth. SEEDS. Ceccatto, V. M.; Cavada, B.S.; Nunes, E. P.;
Nogueira, N. A. P.; Grangeiro, M. B.; Moreno, F. B. M. B.; Teixeira, E. H.; Sampaio, A. H.;
Alves, M. A. O.; Ramos, M. V.; Calvete, J. J. & Grangeiro, T. B. **Protein and Peptide**
Letters, v. 9, n. 1, p. 67-73, 2002.

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM *Canavalia grandiflora* Benth. SEEDS

V. M. Ceccatto¹; B. S. Cavada^{2*}, E. P. Nunes³; N. A. P. Nogueira²; M. B. Grangeiro³; F. B. M. B. Moreno²; E. H. Teixeira², A. H. Sampaio⁴; M. A. O. Alves³; M. V. Ramos³; J. J. Calvete⁵ and T. B. Grangeiro^{3*}

¹Depto de Geociências/Universidade Estadual do Ceará (UECE); ²BioMol-Lab, Universidade Federal do Ceará (UFC); Caixa Postal 6033, CEP 60451-970. Fortaleza-Ceará, Brasil; ³Depto de Biologia/UFC; ⁴Laboratório de Bioquímica Marinha/UFC; ⁵Instituto de Biomedicina de Valencia, Espanha, * authors for correspondence (bscavada@ufc.br; thalles@ufc.br).

A D-glucose/D-mannose specific lectin from seeds of *Canavalia grandiflora* (ConGF) was purified by affinity chromatography on Sephadex G-50. By SDS-PAGE ConGF yielded three protein bands with apparent molecular masses of 29-30 kDa (α chain), 16-18 kDa (β fragment) and 12-13 kDa (γ fragment), like other related lectins from the genus *Canavalia* (Leguminosae). ConGF strongly agglutinates rabbit erythrocytes, has a high content of ASP and SER, and its N-terminal sequence (30 residues) is highly similar to the sequences of other related lectins from subtribe Diocleinae.

INTRODUCTION

Lectins are carbohydrate-binding proteins of non-immune origin containing at least one carbohydrate-binding site. Lectins are widely distributed in Nature and have been found in viruses, microorganisms, plants and animals. In the plant Kingdom, seeds of legumes such as beans and peas (Leguminosae family) have long been known to be a rich source of these proteins. Legume lectins constitute the best-studied group of plant lectins and hundreds of them have been isolated and characterized in relation to their chemical, physicochemical, structural and biological properties. Increasing experimental evidences suggest that seed lectins in legumes are defense proteins that may protect mature seeds against the attack of predators such as insects and mammals [1-4]. Indeed, many legume lectins exhibiting different carbohydrate specificities are insecticidal against important pests of crops. This specific biological activity is of great economic potential because lectin genes are good candidates to confer insect resistance to genetic engineered transgenic crops. Therefore, the purification and characterization of lectins from new sources may reveal novel genes with potentiality to be used in the genetic improvement of crops. The genus *Canavalia* (Leguminosae; Papilioideae; Phaseoleae; Diocleinae) comprises 51 species of leguminous vines, which are widespread in Brazil, Guiana, and the Atlantic coastal regions of tropical Central America and Mexico [5]. In this paper we

report the purification and some properties of a new lectin from seeds of *Canavalia grandiflora*, a leguminous vine found in the Northeast of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Plant material. Seeds of *Canavalia grandiflora* were collected from plants growing in São Benedito, state of Ceará, Brazil. The botanic identification of the species was carried out by Dr. Edson Paula Nunes (Dept. de Biologia, Herbarium Prisco Bezerra-UFC, number 25,326).

Other materials. Human blood was obtained from healthy donors at the Hematology Center of Universidade Federal do Ceará. Rabbit blood was obtained by puncture of the marginal ear vein from healthy animals. Sugars, acrylamide, bis-acrylamide and other reagents were purchased from Sigma Chemical Company. Sephadex G-50 was purchased from Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden. The other reagents were of analytical grade.

Lectin purification. The whole mature seeds of *Canavalia grandiflora* were ground to a fine powder in a coffee grinder and the flour was stirred with 0.15M NaCl (1:10, m/v) for 3 hours at room temperature. The mixture was centrifuged at 16,000 g for 20 min at 4 °C and the clear supernatant obtained was applied to a Sephadex G-50 column (30 x 3 cm) equilibrated and eluted (60 mL·h⁻¹) with 0.15 M NaCl containing 5 mM CaCl₂ and 5 mM MnCl₂. After elution of the unbound material in the equilibrium solution, the column was extensively washed with distilled water and then the lectin was eluted from the gel with 0.1M glucose, pooled, exhaustively dialysed against distilled water, freeze-dried and stored at -20 °C until required.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The structural studies of the lectin polypeptides was initially carried out by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by [5] and adapted for the use of slab gels, consisting of a stacking gel of 3.5 % total acrylamide, pH 6.8, and a main resolving gel of 15 % total acrylamide. Samples were dissolved in 0.0625M Tris-HCl, pH 6.8 containing 2 % SDS and 5 % 2-mercaptoethanol and incubated at 100 °C for 5 min. Electrophoresis was carried out at constant voltage (50 V) and the protein bands were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue R-250.

Hemagglutination and hapten-inhibition assays. Lectin-mediated agglutination of red blood cells from humans or animals was determined as described previously [6]. Samples to be tested (200 µL) were assayed in small test tubes using 2-fold serial dilution in 0.1M Tris-HCl, pH 7.6 containing 0.15M NaCl. A 2 % suspension of erythrocytes was added to each tube for a final volume of 400 µL and the mixture incubated at 37°C for 30 min followed by another 30 min interval at room temperature. The hemagglutination titer (HU mL⁻¹) was recorded as the reciprocal of the highest dilution giving visible agglutination. This concentration was denoted as containing one hemagglutinating unit (HU) per ml. The carbohydrate-binding specificity of the purified lectin was assessed by the ability of a series of sugars (D-glucose, D-mannose, D-glucose-6-phosphate, α-methyl-D-mannopyranoside, α-methyl-D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-mannosamine and D-glucuronic acid) and glycoproteins (fetuin type III, asialofetuin type I, porcine stomach mucin, bovine submaxillary mucin, porcine and bovine thyroglobulins, ovomucoid, human albumin, σ-

bovine globulin, human glycoproteins mixture, apo-transferrin, trypsin inhibitor, human lactotransferrin, bovine lactotransferrin) to inhibit its hemagglutination activity against rabbit erythrocytes. The hapten inhibition tests were conducted by making 2-fold serial dilutions of sugars (1M) or glycoprotein (1mg.ml⁻¹) solutions in 0.15M NaCl to a final volume of 200 µL. An equal volume of the lectin solution containing 4 HU was added to each tube and allowed to equilibrate for 30 min. A 2 % suspension of rabbit erythrocytes (400 µL to each tube) was then added and the mixture incubated for 30 min at 37 °C followed by another 30 min interval at room temperature. The lowest concentration that inhibited hemagglutination (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) was recorded and used to define the inhibitory potency.

Protein determination. Estimation of protein concentration was carried out by the method of Bradford [8] using bovine serum albumin (BSA) as standard. The absorbance at 280 nm was also used to determine the protein content of chromatographic fractions.

Amino acid composition. Amino acid and amino sugar composition of *C.grandiflora* lectin were carried out with an AlphaPlus (Pharmacia) after sample hydrolysis in sealed, evacuated ampoules at 106°C with 4N HCl for 4 h (determination of amino sugars) and with 6N HCl for 18 h for amino acid composition.

N-terminal amino acid sequence determination The N-terminal amino acid sequence was determined by automated Edman degradation [9].

RESULTS AND DISCUSSION

The total saline extract of *Cunavalia grandiflora* seeds, when submitted to affinity chromatography on Sephadex G-50 column showed two peaks (Figure 1). Peak I was not retained on the column and did not show any hemagglutinating activity against rabbit red blood cells. The second one, peak II, was eluted with the equilibrium solution containing 0.1M D-glucose and exhibited the total hemagglutinating activity. These results show that binding of the lectin present in the crude seed extract to the chromatographic matrix was very efficient and the column was not saturated by the amount of protein applied to it. Actually, the cross-linked dextran Sephadex has been widely used as an affinity gel in the purification of glucose/mannose-specific lectins, especially those from Diocleinae subtribe such as those from the genera *Canavalia*, *Dioclea* and *Cratylia* [10].

The lectin from *C.grandiflora* seeds strongly agglutinated native rabbit erythrocytes (specific activity = 1.828.6 HU.mgP⁻¹). Human red blood cells (groups A, B and O) were unspecifically agglutinated by the lectin, but the specific titres were lower than that obtained with rabbit erythrocytes. The hemagglutinating activity of ConGF against rabbit erythrocytes was specifically inhibited by the simple sugars D-mannose (MIC = 16.7 mM), α-methyl-D-mannopyranoside (MIC = 8.3 mM) and α-methyl-D-glucopyranoside (MIC = 8.3 mM). The glycoproteins porcine stomach mucin (MIC = 21.0 µg.ml⁻¹), bovine submaxillary mucin (MIC = 10.0 µg.ml⁻¹) and bovine lactotransferrin (MIC = 167 µg.ml⁻¹) also inhibited the hemagglutination of rabbit erythrocytes caused by ConGF. These findings are in agreement with those reported previously [11] which have

showed that *C.grandiflora* and other related Diocleinae lectins are glucose/mannose specific lectins showing a much higher affinity for the branched chain trimannoside, 3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)-D-mannose, which is found in the core region of all asparagine-linked carbohydrates [12].

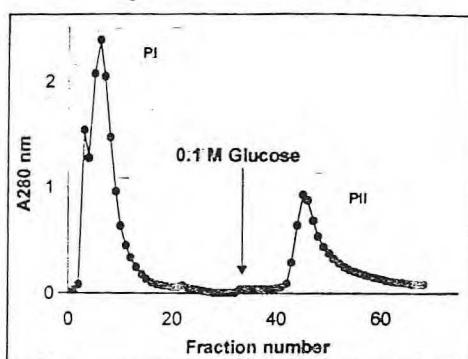


Figure 1 - Affinity chromatography on Sephadex G-50 of the crude seed extract from *Canavalia grandiflora* seeds. Saline extract prepared with 0.15M NaCl was applied to the column equilibrated and eluted with 0.15M NaCl containing 5 mM CaCl₂ and MnCl₂ at a flow rate of 50 mL·h⁻¹. The adsorbed lectin was eluted with 0.1M D-glucose in the equilibrium solution. Fractions of 1mL were collected and assayed for hemagglutinating activity using rabbit erythrocytes

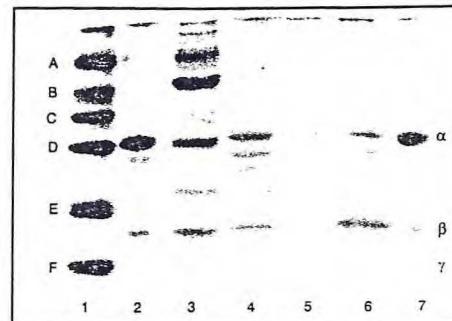


Figure 2 - SDS-PAGE in the presence of 2-mercaptoethanol. Lane 1: Molecular mass standards: A - BSA (66 kDa); B - ovoalbumin (45 kDa); C - glyceraldehyde -3-phosphate-dehydrogenase (36 kDa); D - carbonic anhydrase (29 kDa); E - trypsin inhibitor (20 kDa); F - α -lactalbumin (14.2 kDa); Lanes 2 and 7: purified lectin from *C.brasiliensis* (ConBr); Lane 3: seed flour of *C.grandiflora*; Lane 4: total extract; Lane 5: Peak II; Lane 6 - purified lectin from *C. grandiflora* (ConGF). α , β , γ = fragments.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of 2-mercaptoethanol of the purified lectin from *C.grandiflora* seeds is shown in Figure 2. The electrophoretic pattern exhibited by the lectin (Figure 2, lanes 5 and 6) was very similar to that showed by ConBr, the lectin from the related species *C.brasiliensis* (Figure 2, lanes 2 and 7). Therefore, the affinity chromatography on Sephadex G-50 of the crude saline extract from *C.grandiflora* seeds yielded a high purity preparation of ConGF. The SDS-PAGE profile of ConBr subunit is constituted of three polypeptide bands with apparent molecular masses of 29-30 kDa (α chain), 16-18 kDa (β fragment) and 12-13 kDa (γ fragment) [13]. This SDS-PAGE pattern has been found in all glucose/mannose specific lectins from Diocleinae legumes (genera *Canavalia*, *Dioclea* and *Cratylia*) purified so far such as those from *Dioclea grandiflora* (DGL) [14], *D.rostrata* (DRL) [15], *D.virgata* (DvirL) [16], *D.guianensis* (DguiL) [17] and *Cratylia floribunda* (CFL) [18]. However, in our experimental conditions, we were not able to observe a separate band for the γ fragment of *C.grandiflora* lectin preparations, as reported for other related Diocleinae lectins cited above. It is likely that β and γ fragments of ConGF ran as a single band in our medium-crosslinked gels. This electrophoretic behavior has also been observed for the fragments of

Dioclea lehmanni lectin [19]. Actually, these naturally occurring fragments found in Diocleinae lectins are the N- (β fragment) and C-terminal (γ fragment) halves (residues 1-118 and 119-237, respectively) of the intact, α chain (residues 1-237). They result from the post-translational processing that occurs upon the lectin biosynthesis during the seed development [10, 20-21].

Table 1. Amino acid composition of *Canavalia grandiflora* lectin (Con GF) compared with the amino acid compositions of other Diocleinae lectins

Amino acid	ConGF		DGL	CFL
	nmol%	residues/mol	residues/mol	residues/mol
Lys	7.12	17.9	12	10
His	0.87	2.1	4	3
Arg	1.23	2.9	7	8
Asx	16.20	38.4	31	25
Thr	6.85	16.2	18	16
Ser	10.83	24.6	33	28
Glx	7.36	17.4	13	13
Pro	4.52	10.7	11	7
Gly	8.51	20.2	17	30
Ala	7.62	18.1	18	22
Val	6.21	14.7	16	17
Met	-	-	1	-
Ile	4.98	11.8	14	13
Leu	8.83	20.9	18	16
Tyr	2.01	4.8	7	16
Phe	6.85	16.2	11	8
Trp	ND	ND	5	5
Cys	-	-	-	-

The amino acid composition analysis of *C.grandiflora* seed lectin showed that the protein is rich in aspartic acid and serine (Table 1). Methionine and cysteine residues were not detected. This profile is very similar to the amino acid composition showed by other Diocleinae lectins [10] and it is characteristic of most plant stored seed proteins.

The N-terminal sequence (the first 30 amino acid residues) of *C.grandiflora* lectin subunit was determined by automated Edman degradation and showed a high similarity with those from other Diocleinae lectins (Figure 3). In ConA [22-23], ConBr [24-25], DGL [26] and DguiL [27], whose three-dimensional structures have been solved by X-ray crystallography, the carbohydrate-binding site is a shallow depression on the monomer surface and all of them have the same set of residues that make contact with the sugar: Y12, N14, L99, Y100, D208 and R228. In addition, the amino acid residues that constitute the metal binding site (E8, D10, Y12, N14, D19, H24, V32, S34, D208 and R228) are also completely conserved in ConA, ConBr, DGL and

DguiL [10]. Although the divalent metal ions (Ca^{2+} and Mn^{2+}) do not interact directly with the carbohydrate, they help to place the amino acid residues of the sugar-binding site in the right position [22-23]. Thus, the comparative analysis of the first 30 residues at the N-terminal portion of *C.grandiflora* lectin reported in the present work as well as sequence information for the rest of its polypeptide chain obtained by deduction from the sequence of cDNA clones coding for this lectin (Grangeiro et al, unpublished results) reveals that all the amino acid residues that in other Diocleinae lectins (ConA, ConBr, DGL and DguiL) constitute the metal and the sugar binding sites are completely conserved in ConGF primary structure. Therefore, the complete conservation of these functional sites explains the recognition of the same set of simple sugars (glucose, mannose and derivatives) by ConGF, ConA, ConBr, DGL and DguiL. However, it has been showed by isothermal microcalorimetry that ConGF and related Diocleinae lectins differ in their fine carbohydrate binding specificities. i.e. they have differential binding specificities for complex type carbohydrates [10, 21]. For instance, ConA, ConBr, DguiL and DvirL have relatively high affinities for a biantennary complex carbohydrate with terminal GlcNAc residues (GlcNAc₂Mans) while ConGF, DGL and CFL have significantly lower affinity values for this complex biantennary carbohydrate. Therefore, the differences observed in the magnitude of the thermodynamic binding parameters of ConGF and other Diocleinae lectins to complex carbohydrates appear to be due to differences in non-contact residues.

Structural studies are in progress in our laboratories to elucidate the molecular basis underlying the mechanisms by which certain mutations along the structure of well conserved Diocleinae lectins cause long range effects on their thermodynamic binding parameters to complex carbohydrates.

The results presented in this work show that the seeds of *Canavalia grandiflora* posses a mannose-specific lectin with physico-chemical and structural properties similar to lectins from *Canavalia* and related genera from subtribe Diocleinae. Our results support the hypothesis that plants belonging to subtribe Diocleinae are a monophyletic group and the presence of homologous lectins could be used as a genetic marker for this taxon. Furthermore, it seems that during the evolution of these proteins from a common ancestor gene, the unique and complex post-translational processing has been conserved in the Diocleinae species.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), and Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP). T.B. Grangeiro, A. H. Sampaio and B.S. Cavada are senior investigators from CNPq.

REFERENCES

- [1] Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A. and Rougé, P. (1998) *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17, 575-692.
- [2] Chrispeels, M. J. and Raikhel, N. V. (1991) *The Plant Cell*, 3, 1-9.
- [3] Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. M. (1995) *Plant Physiol.*, 109, 347-352.
- [4] Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. M. (1995) *Histochem. J.* 27, 253-71.
- [5] Lackey, J. A. *Phaseoleae*. In: Advances in Legume Systematics. Polhill, R. M ; P. H. Raven (Eds.). (1981) Part. 1. Roy. Bot. Gard. Kew, p. 301-327.
- [6] Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.

- [7] Moreira, R.A and Perrone, J.C. (1977) *Pl. Phys.* 59, 783-787.
- [8] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- [9] Edman, P. (1950) *Acta Chemica Scandinavica*, 4, 277-282.
- [10] Cavada, B. S., Barbosa, T., Arruda, S., Grangeiro, T. B. and Barral-Netto, M. (2001) *Cur. Prot. and Pep. Sci*, 2, 123-135.
- [11] Dam, T. K., Cavada, B. S., Grangeiro, T. B., Santos, C. F., Ceccatto, V. M., Sousa, F. A.M., Oscarson, S. and Brewer, C. F. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 16119-16126.
- [12] Dam, T. K., Cavada, B. S., Grangeiro, T. B., Santos, C. F., Sousa, F. A.M., Oscarson, S. and Brewer, C. F. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 12082-12088.
- [13] Moreira, R.A. and Cavada, B.S. (1984) *Biol. Plantarum (Praha)*, 26 (2), 113-120.
- [14] Moreira, R. A., Barros, A. C. H., Stewart, J. C. and Pusztai, A. (1983) *Planta*, 158, 63-69.
- [15] Cavada, B.S.; Grangeiro, T.B.; Ramos, M.V.; Cordeiro, E.F.; Oliveira, J.T.A. and Moreira, R.A. (1996) *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 8 (1), 31-36.
- [16] Cavada, B.S.; Ramos, M.V.; Cordeiro, E.F.; Grangeiro, T.B.; Oliveira, J.T.A.; Carvalho, A. F.F.U. and Moreira, R.A. (1996) *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 8 (1), 37-42.
- [17] Vasconcelos, I. M.; Cavada, B. S.; Moreira, R. A and Oliveira, J. T. A. (1991) *J. Food Bio.* 15, 137-154.
- [18] Oliveira, J. T. A.; Cavada, B. S.; Moreira, R. A. (1991) *Rev. Bras. Bot.*, 14, 61-66.
- [19] Perez, G., Hernandez, M. and Mora, E. (1990) *Phytochem.* 29, 1745-1749.
- [20] Cavada, B. S., Grangeiro, T. B., Ramos, M. V., Cordeiro, E. F., Oliveira, J. T. A. and Moreira, R. A. (1996) *Rev. Bras. Fisiol. Veg.*, 8 (1), 31-36.
- [21] Grangeiro, T. B., Gatehouse, J. A., Pereira, M. N. and Cavada, B. S. (1997) *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 9(1), 9-13.
- [22] Hardman, K. D. and Ainsworth, C. F. (1972) *Biochemistry*, 11, 1120-28.
- [23] Becker, J. W., Reeke, G. N., Wang, J. L., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 1513-24.
- [24] Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Grangeiro, T. B., Calvete, J. J. and Cavada, B. S. (1997) *FEBS Lett.*, 405, 114-118.
- [25] Grangeiro, T. B., Schriefer, A., Calvete, J. J., Raïda, M., Urbanke, C., Barral-Netto, M. and Cavada, B. S. (1997) *Eur. J. Biochem.*, 248, 43-8.
- [26] Rozwarski, D. A., Swami, B. M., Brewer, C. F. and Sacchettini, J. C. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 328818-25.
- [27] Wah, D. A., Romero, A., Gallego del Sol F., Cavada, B. S., Ramos, M. V., Grangeiro, T. B., Sampaio, A. H. and Calvete, J. J. (2001) *J. Mol. Biol.* 310(4), 885-94.
- [28] Richardson, M., Campos, F. D., Moreira, R. A., Ainouz, I. L., Begbie, R., Watt, W. B. and Pusztai, A. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 144 (1), 101-111.
- [29] Cavada, B.S., Nogueira, N.A.P., Farias, C.M.S.A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Thole, H.H., Raïda, M., Rougé, P. and Calvete, J.J. (1999) *Protein and Peptide Letters*, 6, 27-34.
- [30] Cunningham, B.A., Wang, J.L., Waxdal, M.J. and Edelman, G.M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 1503-1512.
- [31] Wang, J.L., Cunningham, B.A., Waxdal, M.J. and Edelman, G.M. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 1490-1502.
- [32] Fujimura, S., Terada, S., Jayavardhanan, K. K., Panikkar, K. R. and Kimoto, E. (1993) *Phytochemistry*, 33(5), 985-7.
- [33] Yamauchi, D. and Minamikawa, T. (1990) *FEBS Lett.*, 260(1), 127-30
- [34] Perez, G., Perez, C., Sousa-Cavada, B., Moreira, R., and Richardson, M. (1991) *Phytochemistry*, 30(8), 2619-21.

Received on August 17, 2001, accepted on December 1, 2001