

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DA LECTINA
GALACTOSE-LIGANTE DE SEMENTES DE *Bauhinia pentandra***

EXPEDITO ROGILDO CORDEIRO CARLOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza – 2004

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DA LECTINA
GALACTOSE-LIGANTE DE SEMENTES DE *Bauhinia pentandra***

EXPEDITO ROGILDO CORDEIRO CARLOS

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Fortaleza – 2004

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Expedito Rogildo Cordeiro Carlos

Tese aprovada em 23 de julho de 2004.

Dra. Ana Cecília Goes Horta

Dpto de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientadora

Dra. Leila Maria Beltrami.

Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo
Co-Orientadora

Dr. Renato de Azevedo Moreira

Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará

Dra. Maria Angelina da Silva Medeiros

Curso de Ciências Farmacêuticas
Universidade de Fortaleza

Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira

Curso de Ciências Farmacêuticas
Universidade de Fortaleza

A Deus,
À minha esposa Márcia Moreira,
Ao meus filhos Pedro Luís e Clara Sofia,
Aos meus pais, Valdemar Carlos e De Jesus Cordeiro,
Às minhas irmãs, Lêda, Ma. José e Izalene e aos meus sobrinhos, dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional, pela força, discernimento, luz e presença viva em minha caminhada ajudando-me a transpor os obstáculos, e vencer os desafios.

De forma especial a minha orientadora Professora Ana Cecília Goes Horta, pelo inestimável empenho durante a execução e revisão desse trabalho, criando condições para o desenvolvimento do mesmo, nesta e em outras universidades. Pela habilidade nas relações interpessoais, amizade e carisma admiráveis, conduta ética e científica favorecendo-nos um ambiente harmônico, produtivo de crescimento científico e pessoal.

À Professora Leila Maria Beltramini do Instituto de Física de São Carlos (USP), de forma diferenciada, pela co-orientação na realização de parte desse trabalho (no Inst. Física - USP - São Carlos), pelo apoio material, técnico e científico, manifestado em sugestões pertinentes e incentivo a conquista dos objetivos, pela revisão dessa Tese bem como, pelo exemplo de profissional criteriosa, autêntica e humana.

De modo particular a Professora Maria Angelina da Silva Medeiros, co-orientadora desse trabalho, pela incomensurável contribuição, apresentada através de apoio técnico e científico, na realização de ensaios biológicos (na Universidade de Fortaleza); pelo profissionalismo e alegria constante.

Ao Professor Renato de Azevedo Moreira, de forma honrosa pelos ensinamentos que se fazem presentes na minha formação profissional desde a Iniciação Científica; pelas críticas, sugestões criteriosas durante o Mestrado, bem como pela grandiosa participação neste trabalho através de suporte material, técnico, científico e empenho na revisão desta Tese. Destaca-se ainda o companheirismo e amizade fortalecidos no decorrer da caminhada.

À Professora Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira pela revisão dessa Tese, pelo exemplo de profissional, altruísmo e competência demonstrados e compromisso com a formação científica de seus estudantes; pela amizade e consideração ao longo desses anos.

Ao Professor Vietla S. N. Rao pela disponibilidade de seu laboratório para o aprendizado de técnica empregada nesse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que contribuíram para minha formação profissional e me possibilitaram o acesso necessário a todos os laboratórios.

À minha esposa pelo amor, compreensão, paciência e dedicação, contribuindo de forma decisiva para a construção do meu conhecimento através do ambiente harmônico de nosso lar bem como pelos questionamentos pertinentes ao meu trabalho, pela fortaleza nos momentos de angústia e por ser a grande responsável pela minha felicidade, para quem jorra todo meu amor sublime.

Aos meus pais, Valdemar e De Jesus, que sempre apoiaram-me e incentivaram-me na busca de meus ideais. Pelo testemunho de vida que direcionou a minha formação e conduta moral. Pelo carinho, amor e amizade fortalecidos no seio de nossa família.

As minhas irmãs Lêda, Ma. José e Izalene, grandes guerreiras na solidificação de seus lares em busca de uma sociedade melhor, pelo incentivo, carinho e amor incondicional que fortalece nossos laços fraternais cotidianamente.

Aos meus filhos Pedro Luís e Clara Sofia, e meus sobrinhos: Júnior, Lara, Felipe, Beatriz e Izabelle pela grande alegria e felicidade que representam em minha vida.

Ao meus sogros, Moreira e Amélia, pelo entusiasmo que me favoreceram em todos os momentos, pela dedicação aos meus filhos durante horas em que estive

ausente para a realização desse trabalho, pela amizade e exemplo de espiritualidade em nossa família.

Aos meus cunhados: Valdo, José Filho, Moreira Filho, Antônia e Misael pela amizade e incentivo. De forma particular agradeço ao Moreira Filho que muito contribuiu para solução dos problemas deste trabalho inerentes ao recurso computacional.

A todos os meus familiares que sempre me incentivaram a persistir na concretização dos meus objetivos. Em particular meus tios Expedita Farias, Gracinha (*in memoriam*), Jaime (*in memoriam*) e Zacarias, e meus primos Geneci, Valdenir Carlos, Ribamar e Lúcia Rodrigues, Luís Carlos e Zilma Rozendo exemplos de solidariedade na minha caminhada.

A todos meus amigos neste Departamento, Admir, Alexandra, Álvaro, Ana Angélica, Ana Lúcia, Ângela Bartolomeu, Célio Silva, Cláudia, Cláudio, Cléberson, Clébia, Daniele, Danielle, Dárlio, Edcarlos, Edna, Elisângela, Fabia, Fabrício, Fernanda Maia, Fernanda, Gina, Glenda, Hélio Costa, Iza, Jane, Josemir, Júlio, Kátia, Kelton, Leise, Liezelot, Lucinha, Luís Aguiar, Marcus, Maria Nogueira, Maria Gonçalves, Mariza, Neilza, Noélia, Petrônio, Raimundo, Renata, Richrist, Rodrigo, Sâmia, Sarah, Silvinha, Sílvio, Simone, Sônia, Stélio, Vadjah e Wagner que através da amizade, compreensão, entusiasmo, companheirismo, contribuíram direto ou indiretamente para realização desse trabalho.

Aos meus amigos de forma bastante especial Álvaro, Andressa, Andrezão, Paulo Henrique, Bel, Célio Silva, Daniele, Fábria, Gelinho (*in memoriam*), Kelton, Oleandro, Regilane, Sarah, Wagner, que estiveram comigo durante a execução deste trabalho dividindo angústias e alegrias; pelo companheirismo e pela pronta ajuda sempre que necessitei.

De forma distinta aos meus amigos Ana Lúcia, Cléberson, Cristina Monteiro, Dárlio, Gina, Hélio Costa, Josemir, Luís Aguiar, Luiziete, Ricardo Tavares, Rúbia, Sâmia Neves Simone e Vadja pela amizade e solidariedade sempre demonstradas.

Aos meus amigos extra Departamento Ana Maciel, Andréa Bitu, Andréa Sales, Andreína, Antônio Rodrigues (*in memoriam*), Armênia, Carla Celedônio, Carlos Bruno, Clarissa, Creuza Farias, Daniele Teixeira, Danúbio, Eliana Romero, Eluciene Carvalho, Evaldo, Fátima Antunes, Fátima Vasconcelos, Fco. Cordeiro, Fred Beserra, Hermes, Ivonildo, Manuela Ramos, Marilene Almeida, Monalisa, Nirla Romero, Rita Cialdino, Robson Passos, Sandra Rocha, Vandi Brito, Vânia Matos, Vera Lúcia, que através da amizade contribuíram de forma decisiva para o meu aprimoramento pessoal.

A todos que de alguma forma colaboraram na execução deste trabalho.

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

Universidade Federal do Ceará, através do Centro de Ciências e do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que viabilizou a execução deste trabalho em seus laboratórios e contribuiu sobre maneira para formação do autor.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará e pela bolsa concedida ao autor.

Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP) por subsídios que favoreceram o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos convênios com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo que possibilitou a execução da caracterização físico-química deste trabalho em seus laboratórios.

Universidade de Fortaleza (UNIFOR) através do Centro de Ciências da Saúde cujos laboratórios sediaram a execução de parte deste trabalho.

“É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis.
A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra à aparência efêmera das coisas.”

Karl Marx

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DEFINIÇÕES E CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. DISTRIBUIÇÃO DAS LECTINAS EM FAMÍLIAS	3
1.3. DETECÇÃO E ISOLAMENTO	13
1.4. PROPRIEDADES ESTRUTURAIS, QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS	16
1.5. ATIVIDADES E APLICAÇÕES BIOLÓGICAS	19
1.6. TOXICIDADE DE LECTINAS	24
1.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>BAUHINIA</i>	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVO GERAL	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
2.3. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS	30
3. MATERIAIS	32
3.1. MATERIAL BOTÂNICO	32
3.2. ANIMAIS	32
3.3. EQUIPAMENTOS	32
3.4. REAGENTES E SOLUÇÕES	33
3.5. OUTROS MATERIAIS	33
4. MÉTODOS	34
4.1. ISOLAMENTO DA LECTINA GALACTOSE ESPECÍFICA DE <i>BAUHINIA PENTANDRA</i>	34
4.2. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM COLUNA SUPERDEX 75	36
4.3. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM COLUNA SUPERDEX 200	37
4.4. ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO	37
4.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	38
4.6. DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS	38
4.7. ESTRUTURA PRIMÁRIA E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR	39
4.8. DICROÍSMO CIRCULAR (CD)	39
4.9. CÁLCULO DO CONTEÚDO DE ESTRUTURA SECUNDÁRIA	40
4.10. CURVA DE TERMOESTABILIDADE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA	40
4.11. CURVA DE TERMOESTABILIDADE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA	40
4.12. MEDIDAS FLUORIMÉTRICAS	41
4.13. ENSAIO DE ATIVIDADE TÓXICA EM CAVIDADE PERITONEAL	41
4.14. MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO PARA A CAVIDADE PERITONEAL	42

4.15. EDEMA DE PATA EM RATOS.....	43
4.16. EFEITO DE CARBOIDRATOS SOBRE A ATIVIDADE DA LECTINA PRÓ-INFLAMATÓRIA ..	43
4.17. EFEITO DE MODULADORES FARMACOLÓGICOS SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILO INDUZIDO POR LBP.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5.1. PURIFICAÇÃO DA LBP.....	45
5.2. CONTEÚDO DE CARBOIDRATO DA LBP	48
5.3. DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA LBP.....	50
5.4. AÇÃO DE CÁTIONS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LBP	52
5.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA LECTINA GALACTOSE-LIGANTE DE SEMENTES DE BAUHINIA PENTANDRA	53
5.5.1. <i>Espectros de CD e Estimativa da Estrutura Secundária por Dicroísmo Circular.....</i>	53
5.5.2. <i>Curva de termoestabilidade</i>	56
5.6. FLUORESCÊNCIA ESTÁTICA	61
5.7. TOXICIDADE AGUDA.....	65
5.8. INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS IN VIVO PARA A CAVIDADE PERITONEAL ..	66
5.9. INDUÇÃO DE EDEMA DE PATA.....	78
6. RESUMO DOS RESULTADOS	82
7. CONCLUSÃO	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Pag
1. Diferentes modelos de interação célula-molécula e célula-célula mediado por lectinas.	14
2. Esquema do protocolo de isolamento da lectina de <i>Bauhinia pentandra</i> galactose específica em goma de Guar	35
3. Esquema do protocolo de purificação da lectina de <i>Bauhinia pentandra</i> galactose específica em Superdex – 75 (ÄKTA)	36
4. Cromatografia em superdex 75 da LBp, isolada em goma de guar.	46
5. PAGE-SDS da LBp purificada em superdex 75.	49
6. Cromatografia em superdex 75, em sistema ÄKTA da Pharmacia, dos padrões moleculares para determinação da massa molecular da LBp.	51
7. Curva dos padrões de massa molecular.	51
8. Espectro de dicroísmo circular da LBp (D.O.280 nm 0.320 a 0.360) diluída em PBS 0,15 M, pH 7,4.	55
9. Espectro de dicroísmo circular da LBp (D.O.280 nm 0.320 a 0.360) diluída em PBS 0,15 M, pH 7,4; em diferentes temperaturas.	58
10. Curva de termoestabilidade da estrutura baseada nos espectros de dicroísmo circular da LBp, monitorado em 221 nm.	59
11. Curva de termoestabilidade da atividade hemaglutinante	60
12. Espectros de emissão de fluorescência pico I em superdex 75 na presença e ausência de metais	63
13. Espectros de emissão de fluorescência pico II em superdex 75 na presença e ausência de metais.	64

14. Indução da migração de células totais, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i> .	72
15. Indução da migração de neutrófilos, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i> .	73
16. Indução da migração de células totais, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i> , em presença de galactose.	74
17. Indução da migração de neutrófilos, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i> , em presença de galactose.	75
18. Efeito de moduladores farmacológicos sobre indução da migração de células totais, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos machos	76
19. Efeito de moduladores farmacológicos sobre indução da migração de neutrófilos, <i>in vivo</i> , para a cavidade peritoneal de ratos machos	77
20. Indução de edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i> .	80
21. Indução de edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i>	81

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Å	Anguistron
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
C	Cisteína
CCA	programa convex constraint analysis
CD	Dicroísmo circular
Con A	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>)
Con Br	<i>Canavalia brasiliensis</i>
D.O.	Densidade ótica
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido tetracético – N,N, N',N'- etileno glicol-bis (beta-amino-etil éter)
GalNAc	N-acetil galactosamina
Gal	Galactose
Gal	galactose
GlcNAc	N-acetil Glucosamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
IL	interleucina
kDa	Kilo Daltons
KJ	Kilo Joule
KM ⁺	Lectina de jaca com especificidade para manose
LBp	Lectina galactose-ligante de sementes de <i>Bauhinia pentandra</i>
Leu	Leucina
man	manose
N	Asparagina

nm	nanômetro
NMR	Ressonância magnética nuclear
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
PBS	Tampão fosfato de sódio
PHA	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Phe	fenilalanina
RIP	Proteína inibidora de ribossoma
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SBA	Lectina de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TEL	lectina isolada de sementes de <i>Talisia esculenta</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
Trp	triptofano
Tyr	Tirosina
UH	Unidade Hemaglutinante. Definido como o inverso da maior diluição de uma dada solução protéica que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemáceas a 2%.
WGA	Lectina de germe de trigo

RESUMO

A maioria das lectinas já isoladas e caracterizadas são de sementes de *Leguminosae*, principalmente das sub-famílias *Papilionoideae* e poucas são da sub-família *Caesalpinioideae*. No presente trabalho foram investigadas propriedades físico-químicas e biológicas da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*, LBp. Esta lectina isolada por cromatografia de afinidade em coluna de goma de guar, foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em superdex 75, eluída com tampão PBS 0,15M pH 7,4 e D-Galactose 0,1M + D-Manose 0,1 M. Duas frações (P1 e P2) foram obtidas. Foi observado que o P1 apresentou atividade hemaglutinante e P2 não aglutinou hemáceas de coelho. Também foi demonstrado que esta fração pode bloquear a hemaglutinação observada para P1, este dado sugere que esta fração poderia ser um monômero da lectina. A LBp possui Ca^{2+} e Mn^{2+} intrínsecos e estes são fundamentais para manter a atividade hemaglutinante. Embora, por tratamento com EDTA, a lectina tenha perdido a atividade hemaglutinante, a lectina nativa não necessita de cálcio e manganês para obter-se a atividade hemaglutinante máxima. A massa molecular aparente das frações protéicas, por exclusão molecular em superdex 75, foram 52 e 28 kDa, respectivamente para P1 e P2. As estruturas secundárias foram avaliadas por dicroísmo circular. Os espectros de P1 e P2 foram similares, apresentando uma predominância de β -folha (55 %), 8% de α -helix, 30 % de volta- β (β -turn) e 7 % de outras contribuições. Os espectros de emissão de fluorescência apresentaram perfil diferenciado quanto a presença e ausência de cátions divalentes para ambas frações protéicas. Na presença de metais foi obtida uma menor intensidade na emissão de fluorescência em ambos os casos. A diálise do pico II contra EGTA deslocou significativamente o máximo de emissão da fluorescência. Estes dados sugerem a necessidade dos metais intrínsecos para as estruturas nativas dos dímeros (PI) e dos monômeros (PII) pois na ausência dos metais eles tornam-se mais vulneráveis a mudanças conformacionais. A análise das massas moleculares, CD, fluorescência sugerem a presença de uma proteína polimérica. A forma dimérica mostrou atividade hemaglutinante e o monômero foi desprovido desta atividade além de bloquear a atividade da forma dimerica. A estabilidade térmica do P1 foi também

avaliado por dicroísmo circular, a estrutura secundária foi estável até 40 °C onde predomina a estrutura nativa e a temperatura de transição foi em torno de 60 °C. A estabilidade térmica da LBp quando avaliada por atividade hemaglutinante mostrou que a 55 °C foi perdida em mais de 80 %, sendo completamente inativada a partir de 70 °C. O conteúdo de carboidratos neutros encontrado para LBp foi de 13% (m/m). A LBp não apresentou toxicidade aguda para ratos, todavia capaz de induzir edema de pata e migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos. Há indícios de que o efeito pro-inflamatório da LBp seja mediado pelo seu sítio ligante a carboidrato, pois quando a lectina estava na presença de um ligante monossacarídeo (galactose 0,1M) ocorreu uma redução do edema de pata e da migração de neutrófilos.

ABSTRACT

Most of the lectins, already isolated and characterized, are from the *Leguminosae* seed, mainly from the sub-family *Papilionoideae* and very few from the sub-family *Caesalpinioideae*. In the present work, the physicochemical and biological characteristics of the D-galactose-binding *Bauhinia pentandra* seed lectin, LBp, were investigated. This lectin, isolated by affinity chromatography on guar gum column, was submitted to molecular sieving chromatography on Superdex 75, eluted with 0.15 M PBS buffer pH 7.4 containing 0.1M D-galactose and 0.1 M D-mannose. Two fractions (P1 and P2) were obtained. It was observed that P1 presented hemagglutinating activity against rabbit red blood cells while P2 did not agglutinate these cells. Moreover, the P2, also blocked the hemagglutination observed for P1. This result suggests that this fraction could be a lectin monomer. LBp contains intrinsic Ca^{2+} and Mn^{2+} ions and these are fundamental to maintain the hemagglutinating activity. Although, by treatment with EDTA, the lectin loose the hemagglutinating activity, the native lectin does not need the addition of calcium and manganese to obtain the maximum activity. The apparent molecular mass of the protein fractions, determined by molecular sieving on Superdex 75, were 52 and 28 kDa, respectively for P1 and P2. The secondary structures were evaluated by circular dichroism. The spectra of P1 and P2 were similar, they showed a predominance of β -sheet (55 %) with 8% of α -helix, 30% of β -turn and 7% of other contributions. The fluorescence emission spectra of the two proteins show different profile, both in the presence and absence of the divalent cations. In the presence of these metals it was obtained a smaller intensity in the fluorescence emission in both cases. After dialysis of the P2 against EGTA, the fluorescence emission maximum shift significantly. These data suggest the need of the intrinsic metals for the native structures of the dimers (PI) and of the monomers (PII) because in the absence of the metals they become more vulnerable to conformation changes. The analysis of the molecular masses, CD and fluorescence measurements suggest the presence of a polymeric protein with two protein forms; the dimeric form showing hemagglutinating activity and the monomer showing no activity, although being able to block the hemagglutinating activity of dimeric form. The heat stability of the P1 was, also, evaluated by CD; the secondary structure of the fraction was unchanged up to 40 °C

where predominates the native structure and the transition temperature is around 60 °C. The heat stability of the LBp, when evaluated by the hemagglutinating activity, showed that at 55 °C a decrease of 80 %, being completely inactivated at 70 °C. The content of neutral carbohydrates of the LBp was determined to be 13% (w/w). The LBp showed no acute toxicity for rats. LBp was capable to induce paw oedema in mice and neutrophil migration to rat peritoneal cavities. Pro-inflammatory effect of LBp seems to be mediated by its carbohydrate-binding site, as D-galactose, a potent inhibitor of the hemagglutinating activity, reduced the paw oedema and neutrophil migration.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definições e considerações gerais

No decorrer de mais de cem anos de documentação histórica das lectinas, a definição destas proteínas tem sido re-escrita no compasso das novas descobertas sobre a atividade de ligação a carboidratos, estrutura, evolução e função desse grupo heterogêneo de proteínas.

As lectinas foram inicialmente definidas com base na sua especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação, como proteínas de origem não imunológica que interagem especificamente com carboidratos provocando a aglutinação de hemácias ou outras células (GOLDSTEIN *et al.*, 1980). Esta definição tornou-se limitada ao excluir toxinas que aglutinavam fracamente (ricina, abrina, modicina dentre outras). Então esta definição foi ampliada passando as lectinas a serem compreendidas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que possuem um ou mais sítios de reconhecimento a carboidratos e/ou glicoconjugados capazes de se ligar especificamente e reversivelmente a terminais carboidratos sem alterar a estrutura química dos mesmos, podendo aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados (KOCOUREK & HOREJSI, 1981). Todavia, esta definição exclui outras proteínas ligantes de açúcar, tais como as várias enzimas específicas por açúcares, hormônios e proteínas transportadoras, mas inclui as lectinas monovalentes, como as de orquídeas e bulbos (RUSSEL *et al.*, 1983).

KENNEDY *et al.*, (1995) conceituaram lectinas como proteínas de origem não imune que reconhecem carboidratos livres ou conjugados da superfície celular através de sítios de ligações hidrofóbicas (reconhecidos por BARONDES, 1988) e os sítios ligantes a carboidratos. Mais recentemente, PEUMANS & VAN DAMME, (1995) apresentaram uma definição bem mais geral quando consideraram condição básica para uma proteína vegetal ser classificada como lectina é que esta apresente pelo menos, um domínio não catalítico que se liga específica e reversivelmente a mono ou oligossarídeo. Esta definição é a mais ampla pois inclui um grande número de proteínas

de comportamento diverso relacionado as suas propriedades aglutinantes e/ou de precipitação de glicoconjugados.

Em 1998 as lectinas vegetais foram classificadas em quatro tipos principais de lectinas levando-se em consideração sua estrutura protéica (mais precisamente nos produtos da tradução dos gens das lectinas) (VAN DAMME *et al.* 1998). Essa divisão incluiu uma gama de proteínas que possuíssem um sítio ligante para carboidratos. Assim, as **merolectinas**, proteínas que apresentam exclusivamente um único sítio ligante a carboidratos, como a heveína, proteína ligante a quitina, isolada a partir do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) e as proteínas monoméricas ligantes a manose isoladas de orquídeas e liliáceas, incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados em função de sua natureza monovalente; as **hololectinas**, proteínas que também apresentam apenas domínio de ligação a carboidratos, porém contêm dois ou mais sítios de ligação (idênticos ou homólogos) para essas moléculas, estando aptos a aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Fazem parte deste grupo a lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* e a maioria das lectinas conhecidas de plantas; as **quimerolectinas**, proteínas que possuem, além do domínio ligante a carboidratos, outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica que age independentemente do domínio ligante de açúcar. Neste grupo estão incluídas as quitinases tipo 1 e as RIPs tipo 2. Estas lectinas podem também agir como merolectinas ou hololectinas dependendo do número de domínios ligantes a carboidratos; e, finalmente as **superlectinas**, que podem ser consideradas como um grupo especial de quimerolectinas. Elas seriam proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos, as quais são estruturalmente diferentes e reconhecem carboidratos distintos. A natureza quimérica das superlectinas é ilustrada pela lectina de bulbo de tulipa, com dois domínios, um específico para N-acetilgalactosamina e outro para manose (VAN DAMME *et al.* 1998). Recentemente, foi sugerido por MONTEIRO-MOREIRA (2002) mais uma classe de lectinas, denominada de **multilectinas** – definida como proteínas constituídas exclusivamente de domínios ligantes a carboidratos que são idênticos ou homólogos, entretanto reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados, ou seja, são lectinas de especificidade múltipla.

As lectinas estão amplamente distribuídas na biosfera e ocorrem em quase todos os organismos vivos: vírus, bactérias, protozoários, invertebrados e vertebrados, incluindo mamíferos, algas e plantas (LIENER *et al.*, 1986; SHARON & LIS, 1989; RÜDIGER, 1998). Entretanto, o maior número de lectinas já estudado e parcialmente caracterizado pertencem ao Reino **Plantae**. Segundo VAN DAMME *et al.*, (1998b) as lectinas são frequentemente consideradas um grupo de proteínas muito extenso porque, à primeira vista, a lista de espécies de lectinas é quase infinita. Todavia, pesquisas revelam que até agora têm sido encontradas em menos de quinhentas espécies, indicando que somente um número limitado de plantas superiores contém lectinas em níveis detectáveis. Deve ser enfatizado que este quadro só contempla as lectinas aglutinantes clássicas (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

A grande maioria das lectinas vegetais conhecidas, muitas das quais já isoladas, é encontrada predominantemente nas sementes maduras, em particular das Leguminosas. Embora a semente seja, normalmente, o órgão mais rico em lectinas (SHARON & LIS, 1989), elas também estão presentes em outras partes da planta, como raízes, folhas, cascas, bulbos e frutos (PEUMANS *et al.*, 1985). Muitas dessas plantas contêm apenas uma lectina, mas existem casos em que o mesmo tecido ou órgão apresenta duas ou mais lectinas diferentes, tanto na especificidade por açúcar como em outras propriedades (DAS *et al.*, 1993).

1.2. Distribuição das lectinas em famílias

Aproximadamente 300 lectinas diferentes de plantas foram isoladas e caracterizadas em relação a sua estrutura molecular, propriedades bioquímicas e especificidades a carboidratos (VAN DAMME *et al.*, 1998). Devido a diferenças óbvias nas propriedades bioquímicas e físico-químicas, na estrutura molecular, na especificidade de ligação a carboidratos e nas atividades biológicas dessas lectinas, concluiu-se tratar de um grupo muito heterogêneo de proteínas. Um exame mais acurado permitiu traçar relações evolutivas entre as lectinas de plantas conhecidas atualmente. Baseado nestas relações as lectinas de plantas

são divididas em sete famílias de proteínas relacionadas evolutivamente e estruturalmente (VAN DAMME *et al*, 1998). Concomitantemente com o progresso realizado no sequenciamento e clonagem de lectinas de plantas, avanços têm sido realizados na análise estrutural de lectinas de plantas usando difração de raios X e análise por ressonância magnética nuclear (NMR). Numerosas estruturas de lectinas têm sido determinadas e a resolução de novas estruturas é cada vez mais freqüente. Como resultado, os dobramentos gerais e as estruturas tridimensionais dos sítios de ligação a carboidratos de lectinas representativas das sete famílias foram conhecidas a nível atômico, permitindo não somente um estudo das interações lectina-carboidrato em nível molecular, mas também demonstrando que cada família de lectina tem sua estrutura funcional própria e estruturas repetitivas que se ligam a açúcares complementares.

- Família de lectinas de Amarantina

As Amarantinas são uma pequena família de lectinas que foram identificadas exclusivamente em sementes de espécies do gênero *Amaranthus*, que foram chamadas depois de Amarantinas, o nome trivial dado à lectina de *Amaranthus caudatos*. Todas as lectinas de *Amaranthus* são proteínas homodiméricas consistindo de subunidades não glicosiladas idênticas de aproximadamente 33kDa. A estrutura tridimensional de Amarantina foi resolvida a 2,2 Å (TRANSUE *et al*, 1997). Basicamente os protômeros consistem de dois domínios homólogos (chamados C e N) ligados por uma hélice curta. Ambos os domínios tem uma estrutura em β -folha tripla consistindo de seis segmentos antiparalelos em folha β com três grampos β no topo, formando uma estrutura que lembra um barril comumente chamado de β -barril (barrel- β). Os domínios C e N são ligados por uma hélice 3_{10} e formam um protômero oval com o coroamento de grampo β de cada domínio localizado em ambas as terminações do monômero. Dímeros são formados por uma associação frente e costa de dois monômeros, dos quais, o domínio N da face de um monômero com o domínio C do outro monômero. Contatos extensivos não covalentes estabilizam a proteína, que possui duas superfícies expostas de sítios que se ligam a carboidratos que

aparecem como depressões rasas na interface entre os domínios C e N de dois monômeros frontais. Estudos da especificidade detalhada demonstraram que Amarantinas são inibidas por GalNAc (N-acetil galactosamina) mas exibem uma grande afinidade pelo dissacarídeo antígeno T Gal $\beta(1,3)$ GalNAc (RINDERLE *et al*, 1989).

- *Lectinas ligantes a quitina*

A família de lectinas que se ligam a quitina compreende por definição todas as proteínas de plantas que possuem pelo menos um domínio de Heveína. Assim, um domínio de Heveína é definido como uma unidade estrutural de cerca de 40 resíduos de aminoácidos, que exhibe similaridade de seqüência a Heveína, a proteína de 43 aminoácidos isolada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Lectinas que se ligam a quitina que não possuem o domínio de Heveína são classificadas em outra família de lectinas (em geral, lectinas com estrutura tipo a ConA e lectinas de floema de Cucurbitaceae). Lectinas que se ligam a quitina contendo domínio de Heveína são muito comuns em plantas superiores. Dependendo da estrutura da proteína nativa, estas lectinas que se ligam a quitina são classificadas como Merolectinas, Hololectinas ou Quimerolectinas. A maioria das lectinas que se ligam a quitina conhecidas comumente, são Hololectinas compostas de peptídeos contendo 2, 3, 4 ou 7 domínios de Heveína arranjados seqüencialmente. Lectinas compostas de protômeros com duas Heveínas repetidas foram identificadas em *Urtica dioica* (ferrão de urtiga) (PEUMANS *et al*, 1984, BEINTEMA & PEUMANS, 1992) "mistletoe" (*Viscum album*), e umbú (*Phytolacca americana* lectina Pa-5/PL-D) (YAMAGUCHI *et al*, 1995; YAMAGUCHI *et al*, 1996; YAMAGUCHI *et al*, 1997). O umbú também contém lectinas com subunidade consistindo de três e sete domínios de Heveína (Pa-4/PL-C e PL-B respectivamente). A aglutinina de gérmen de trigo (WGA) e lectinas relacionadas são constituídas de dois protômeros consistindo de quatro domínios de Heveína (RAIKHEL *et al*, 1993). Juntas as Merolectinas e Hololectinas, as lectinas que se ligam a quitina também abrangem as lectinas quiméricas de Solonaceae [em geral, a batata (*Solanum tuberosum*), lectinas de tomate e lectinas de zabumba (*Datura*

stramonium]). Os protômeros destas lectinas consistem de um domínio N-terminal que se liga a quitina de três Heveínas repetidas ligado a um domínio O-glicosilado rico em serina e hidroxiprolina, semelhante à proteína extensiva de parede celular. A estrutura tridimensional de diversas lectinas que se ligam em quitina foram obtidas por espectrometria de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) (ANDERSEN *et al*, 1993) ou cristalografia de raios X. A Heveína contém estruturas secundárias pequenas, com um trecho de resíduos de aminoácidos localizados na extremidade N-terminal da cadeia polipeptídica formando duas cadeias antiparalelas de folha β seguida por uma α -hélice. A WGA possui a estrutura mais complexa que a Heveína porque a lectina nativa é um dímero de dois monômeros cada um dos quais consistindo de quatro domínios de Heveína estruturalmente semelhantes (A₁, B₁, C₁ e D₁, do monômero I e A₂, B₂, C₂ e D₂ do monômero II) (WRIGHT, 1977; WRIGHT, 1987). A atividade e especificidade de ligação a carboidrato das lectinas que se ligam a quitina é determinada exclusivamente por seus domínios de Heveína. Estudos detalhados da especificidade feita com WGA, aglutinina de *Urtica dióica* e lectinas de batata e zabumba confirmaram que os sítios de ligação a carboidrato dessas lectinas que se ligam a quitina têm uma estrutura complexa, que é mais complementar ao trímero ou ao tetrâmero de GlcNAc. A presença de tais sítios complexos de ligação explica o porquê do potencial inibitório de oligômeros de GlcNAc aumentar com o prolongamento da cadeia em 4 resíduos, e porque a maioria das lectinas que se ligam a quitina não são inibidas por GlcNAc mas requerem pelo menos o dímero deste açúcar.

- *Lectinas do floema de Cucurbitaceae*

Estas lectinas constituem uma pequena família de aglutininas que se ligam a quitina que até agora foram encontradas exclusivamente em exudatos de floema de numerosas espécies de Cucurbitaceae e, apresentam-se como proteínas diméricas compostas de subunidades não glicosiladas de cerca de 25kDa. Todas essas lectinas exibem especificidade para oligômeros de GlcNAc. O potencial inibitório dos oligômeros de GlcNAc aumenta fortemente com o prolongamento da

cadeia em 5 resíduos indicando que essas lectinas possuem um sítio de ligação a carboidratos estendido. Além de oligômeros de GlcNAc, as lectinas de Cucurbitaceae também reconhecem as seqüências internas de di-N-acetilquitobiosil de cadeias glicanas N-ligadas (ALLEN, 1979; ANATHARAM *et al*, 1986). A estrutura funcional total e a estrutura exata do sítio de ligação das lectinas de floema de Cucurbitaceae ainda não são conhecidas pelo fato de nenhuma estrutura tridimensional relacionada a esta família ter sido determinada.

- *Lectinas relacionadas a Jacalina*

Compreende todas as lectinas de plantas que são relacionadas estruturalmente e evolutivamente a jacalina, uma lectina galactose específica de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Basicamente, a família da jacalina compreende um subgrupo específico por galactose e outro por manose. A subfamília específica por galactose está aparentemente restrita a sementes de espécies de poucos gêneros da família Moraceae, enquanto a subfamília específica por manose está amplamente distribuída em plantas superiores. Todas as lectinas relacionadas a jacalina específicas por galactose caracterizadas até o momento são constituídas de 4 protômeros idênticos consistindo de uma grande cadeia α e de uma pequena cadeia β de 133 e 20 resíduos respectivamente. Ambas as cadeias são derivadas de um precursor simples que sofre um processamento complexo pós e co-tradução. Porém, nem todas as isoformas são glicosiladas (YANG & CZAPLA, 1993). Lectinas muito semelhantes a jacalina também têm sido isoladas de sementes de *A. incisa* (frutalina) (MOREIRA *et al.* 1998), (frutapina) (MONTEIRO-MOREIRA, 2002), *A. altilis*, *A. champeden*, *A. integer*, *A. lakocha*, *A. tonkinensis* (BLASCO *et al.*, 1996).

A estrutura tridimensional da jacalina foi obtida por análise cristalográfica em raios X (SANKARANARAYANAN *et al*, 1996). Cada protômero consiste de um dobramento com três domínios em β -prisma constituído de 3 folhas β com 4 segmentos. Desses 12 segmentos (numerados de 1 a 12), 11 são formados por cadeia α e um por cadeia β . Quatro protômeros estão associados por interações não covalentes dentro de uma estrutura tetramérica, que provavelmente resulta da associação de dois dímeros. Assim, a cadeia β ocupa uma região central no

tetrâmero que desempenha um papel crucial.

A jacalina e seus homólogos galactose-ligantes de outras espécies de Moraceae reagem fortemente com resíduos terminais α -D-galactosil não redutor. Todavia, eles têm uma afinidade muito alta por antígeno T Gal $\beta(1,3)$ GalNAc (SASTRY et al, 1986). A estrutura do sítio de ligação foi determinada por cristalografia em raios X de complexos de jacalina com antígeno T. Cada protômero abriga um sítio de ligação a monossacarídeo único constituído dos resíduos de Gly1, Tyr122, Trp123 e Asp125 da cadeia α que cria uma rede de 9 pontes de hidrogênio com O3, O4, O5 e O6 do metil- α -D-galactose. O fato de que o resíduo Gly1 da cadeia α é liberado somente depois do processamento proteolítico da pro jacalina, subentende-se que a atividade de ligação a açúcar da jacalina requer um correto processamento pós-tradução do precursor.

Lectinas específicas por manose relacionadas a jacalina foram identificadas em muitas espécies de grupos taxonomicamente diferentes. Depois da descoberta do primeiro membro desta sub-família de lectinas relacionadas a jacalina em *Calystegia sepium* (erva daninha: visgo) (VAN DAMME et al, 1996a), lectinas semelhantes foram isoladas de banana (PEUMANS *et al.*, 2000a), de arroz (ZHANG *et al.*, 2000) e também de jaca (ROSA *et al.*, 1999). Todas as lectinas relacionadas a jacalina que se ligam a manose caracterizadas até aqui possuem duas ou quatro subunidades não glicosiladas de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos.

- *Lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose*

As lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose são uma superfamília de lectinas com especificidade estrita a manose, fato que é reservado ao subgrupo de plantas monocotiledôneas compreendendo as famílias *Alliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araceae*, *Bromeliaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae* e *Orchidaceae*.

Embora a descoberta desta família de lectinas seja datada de 1987, somente quando uma lectina com especificidade exclusiva por manose foi isolada de bulbos de snowdrop (*Galanthus nivalis*) (VAN DAMME *et al.*, 1987), numerosas

lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose foram isoladas e clonadas. Além disso, a estrutura tridimensional de diversos membros dessa família de lectinas foi resolvida por cristalografia em raios X.

A superfamília de lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose exibe certa heterogeneidade no que diz respeito à estrutura molecular das proteínas nativas. Basicamente se distinguem dois grupos, no primeiro grupo inclui-se lectinas consistindo de um, dois ou quatro protômeros com um domínio de 11 – 14 kDa e no segundo grupo, lectinas consistindo de um, dois ou quatro protômeros com dois domínios de cerca de 30 kDa. O grupo de lectinas compostas de protômeros de 30 kDa é ainda subdividido em um subgrupo com protômeros consistindo de dois domínios idênticos ou muito semelhantes e um subgrupo com protômeros com dois domínios diferentes.

- *Lectinas relacionadas a estrutura das RIPs tipo 2*

As RIP tipo 2 constituem uma típica família de Quimerolectinas constituída de protômeros consistindo de um domínio na extremidade N-terminal da cadeia A com atividade N-glicosidase e um domínio na extremidade C-terminal da cadeia B com atividade lectínica (BARBIERI, *et al*, 1993). Visto que a cadeia A da RIP tipo 2 compartilha homologia de seqüência com a RIP tipo 1, as RIP tipo 2 são comumente consideradas como proteínas quiméricas compostas de uma subunidade de RIP 1 e uma subunidade de lectina. O termo "proteína que inativa ribossomos" refere-se à capacidade das RIP (ambas, tipo 1 e tipo 2) de inativarem cataliticamente ribossomos através da remoção enzimática de um resíduo de adenina específico de uma volta (loop) altamente conservada (A4324 do rRNA de rato) na grande subunidade do RNA ribossomal 28 S.

A RIP tipo 2 foi identificada em espécies de uma dúzia de famílias de plantas. Exemplos clássicos são as toxinas ricina, abrina e modicina, as lectinas de "mistletoe" (*Viscum album*) e as diferentes aglutininas de "elderberry" (*Sambucus Migra*). Todas as RIP tipo 2 são compostas de protômeros semelhantes consistindo de uma ligação por ponte dissulfeto nas cadeias A e B (camadas par [A-s-s-B]). As RIP tipo 2 nativas são mono-, di- ou tetrâmeros consistindo de um, dois e quatro pares

glicosilados [A-s-s-B], respectivamente.

- *Lectinas de leguminosas com estrutura tipo Concanavalina A.*

Lectinas de leguminosas com estrutura tipo a ConA são uma ampla família de proteínas intimamente relacionadas que ocorrem exclusivamente em espécies da família de plantas Leguminosae (Fabaceae). Aproximadamente uma centena de lectinas de leguminosas individuais foi caracterizada em cerca de 70 espécies diferentes pertencentes a vários grupos taxonômicos desta família.

As lectinas destas leguminosas assemelham-se em suas propriedades bioquímicas e estruturais embora se diferenciem em suas especificidades a carboidratos. Elas consistem de 2 ou 4 protômeros com massa molecular aparente de cerca de 30 kDa e cada protômero contém aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos. Em alguns casos, os protômeros são divididos em duas cadeias polipeptídicas pequenas. Estas lectinas são compostas de um protômero não dividido e dividido e são denominadas comumente de lectinas de leguminosas de uma cadeia e duas cadeias, respectivamente. São freqüentemente metaloproteínas (WAH *et al*, 2001) e algumas são N-glicosiladas (SHARON & LIS, 1990). A análise da estrutura primária e de estudos em difração de raios X demonstra as similaridades na conformação tridimensional destas lectinas. Sua estrutura é compreendida de uma seqüência de 7 segmentos de estrutura secundária antiparalela β na frente e outro de 6 segmentos β atrás, que são interconectadas por voltas ("turns") e alças ("loops") e formam uma estrutura achatada em forma de cúpula. A orientação das cadeias antiparalelas nas folhas β muda de uma face para a outra resultando em uma estrutura forte e rígida. (BOURNE *et al*, 1990).

Embora todas as lectinas de leguminosas tenham uma estrutura tridimensional semelhante, esta família de lectinas abrange proteínas com um variado e amplo grau de especificidades. Além das lectinas que se ligam a manose e das lectinas específicas por manose/maltose, todos os outros grupos, que são distinguidos pela preferência de monossacarídeos que se ligam, são representados na família de lectinas de leguminosas. É também impressionante que a maioria das lectinas com especificidade complexa são lectinas de leguminosas típicas. O grau de

especificidade ampla é contraditório às altas similaridades de seqüência e as estruturas conservadas de monômeros nas lectinas de leguminosas. Todavia, esta discrepância aparente pode ser explicada por substituições de poucos aminoácidos envolvidos na atividade de ligação a açúcar e por variações no comprimento de uma determinada alça (loop), que podem causar variações profundas no sítio de ligação sem afetar a estrutura tridimensional do protômero (SHARMA & SUROLIA, 1997).

Um exame de especificidade de grupos distintos, tendo como base a preferência por açúcares simples, ainda demonstra que lectinas de plantas abrangem um amplo espectro de especificidades incluindo manose/glicose, manose, manose/maltose, Gal/GalNAc, GlcNAc/(Glc/Nac)_n, fucose e ácido siálico. Além disso, muitas lectinas não se ligam a açúcares simples, mas reagem exclusivamente com glicanos complexos, e conseqüentemente são consideradas lectinas com especificidade complexa.

A tabela a seguir, apresenta um resumo da estrutura e especificidade de lectinas de plantas pertencentes a diferentes famílias.

TABELA 01. Revisão da estrutura e especificidade de lectinas de plantas pertencentes às diferentes famílias de lectinas.

Família de Lectinas	Estrutura	Especificidade
Amarantinas	β -tripla	GalNAc/antígeno T
Lectinas compostas de domínios que se ligam a quitina semelhantes ao da Heveína	Domínio de Heveína	(GlcNAc) _n
Lectinas de floema de Cucurbitaceae	Não conhecida	(G1cNAc) _n
Lectinas relacionadas a jacalina Sub-grupo Galactose-específico Sub-grupo Mano se-específico	β -prisma β -prisma	Gal/antígeno T Man
Lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose	β -sanduíche	Man
Lectinas relacionadas a estrutura das RIPs tipo II	β - barril (β -barrel)	Gal/GalNAc Sia α 2,3Gal/GalNAc
Lectinas de leguminosas com estrutura tipo ConA	β -tripla	Man/Glc Gal/GalNAc (G1cNAc) _n Fuc Sia α 2,3Gal/GalNAc Complex

PEUMANS *et al*, 2000b.

1.3. Detecção e Isolamento

A descoberta que extratos de determinadas plantas poderiam aglutinar hemácias humanas e de animais como também manifestar efeitos tóxicos quando ingeridos por esses mesmos animais (STILLMARK, 1988/89), marcou o início das investigações sobre lectinas.

Para a detecção deste tipo de proteína em material biológico utiliza-se uma das atividades biológicas mais conhecidas, sendo esta tão antiga quanto o estudo das lectinas; trata-se da capacidade de aglutinar hemácias ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas. A aglutinação é resultado da interação de açúcares da superfície celular e os sítios ligantes de açúcar existentes sobre as moléculas de lectinas. Estas interações são usualmente não covalentes, envolvendo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waal (MIRELMAN, 1986). Através da hemaglutinação podemos saber prontamente se um extrato de planta possui lectina. Se esta aglutinação não ocorrer após o extrato ser fervido e também se for inibida por açúcares simples ou sacarídeos complexos, prova-se a presença da lectina, uma vez que outros agentes podem aglutinar hemácias, como por exemplo, taninos, certos lipídios ou cátions bivalente em altas concentrações (RÜDIGER, 1998). A atividade hemaglutinante pode ser potencializada, em alguns casos, tratando as células eritrocitárias com enzimas proteolíticas tipo tripsina, ou através do tratamento com neuraminidase que remove ácido siálico de polissacarídeos complexos (MARIOVSKY *et al.*, 1976). Por este tratamento, os sítios ligantes das hemácias tornam-se mais expostos podendo facilitar a aglutinação. Outros procedimentos são a utilização do glutaraldeído ou formaldeído, com a finalidade de estabilizá-las para utilização por longos períodos (LIENER, 1975).

Lectinas localizadas na superfície celular também medeiam a interação célula-a-célula por combinar carboidratos com complementaridade localizados sobre as superfície de células em oposição, as quais podem ser iguais ou diferentes, como mostrado na figura 1. Sharon e Lis (1989) propuseram mecanismos para a interação célula-a-célula mediada através de superfície de lectinas. As células podem também interagir via outros mecanismos tais como:

- a) Formação de ponte por glicoproteínas solúveis que se ligam a lectinas situadas na superfície das células.
- b) As lectinas podem combinar-se com carboidratos de componentes insolúveis da matriz extracelular que promove a adesão celular.
- c) Lectinas solúveis podem ligar-se a carboidratos sobre células em oposição para agir como ponte entre as duas células.

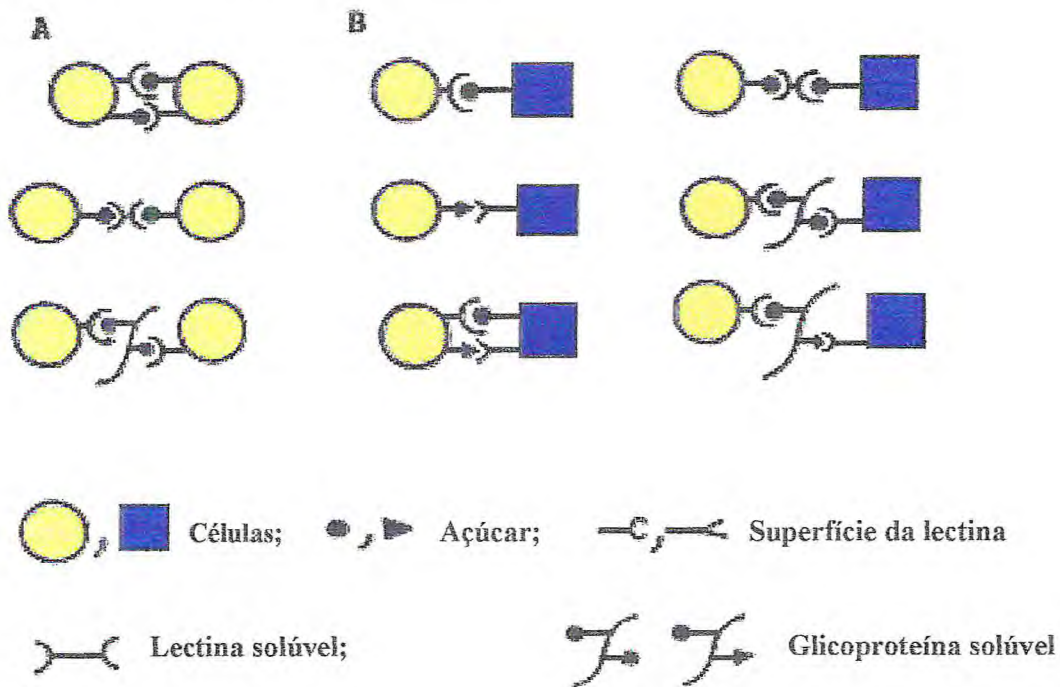


FIGURA 1. Diferentes modelos de interação célula-molécula e célula-célula mediado por lectinas (A) entre células de mesmo tipo (homotípica) e (B) entre células diferentes (heterotípica) . SHARON e LIS (1989), citado por SINGH (1999).

Um outro método utilizado para a detecção de lectinas é a “eletroforese de afinidade”, que combina os princípios de cromatografia de afinidade com eletroforese (HOREJSI *et al.*, 1977).

Para o isolamento de lectinas em vegetais, inicia-se normalmente pela preparação da farinha e extração desta com salina tamponada, seguido do fracionamento com sulfato de amônia. Pelo fato da lectina ligar-se especificamente a carboidratos, utiliza-se com freqüência, nos esquemas de purificação, a cromatografia de afinidade, onde a matriz contém o açúcar específico. A matriz a ser utilizada depende da especificidade da lectina. Para a obtenção da lectina purificada, a mesma, depois de ligada deve ser eluída, preferencialmente, com uma solução do açúcar ligante. Se necessário, a lectina purificada por afinidade pode ser submetida a uma segunda cromatografia de afinidade ou purificação adicional por técnicas clássicas tais como, filtração em gel, troca iônica, interação hidrofóbica, dentre outras (MONTEIRO-MOREIRA, 2002).

TAVARES (1998) mostrou que as lectinas galactose-ligantes de sementes de *Artocarpus incisa* e *A. integrifolia*, que apresentam uma elevada semelhança tanto a nível químico e físico-químico, como em nível imunoquímico, interagem diferentemente com a goma de guar (*Cyamopsis tetragonolobus*) e goma de carolina (*Adenanthera pavonina*). O mesmo acontece com a lectina de *Vatairea macrocarpa*, embora as lectinas de *Abrus precatorius* e *Abrus pulchellus* não mostrem diferenças sensíveis. É interessante notar que, enquanto as lectinas de *Artocarpus* apresentam uma afinidade maior pela goma de carolina a do gênero *Vatairea* apresenta mais afinidade pela goma de guar e as de *Abrus* mostraram afinidade praticamente iguais pelas duas resinas (Citado por MONTEIRO-MOREIRA, 2002).

O uso de diferentes polissacarídeos vegetais como matrizes mais específicas para o isolamento de lectinas, estão sendo objeto de investigações atualmente .

Também pode-se isolar lectinas através de sua habilidade de formar precipitados com polissacarídeos ou gliconjugados em meio líquido utilizando-se tubos capilares ou meio semi-sólido usando-se gel de agar (HOREJSI *et al.*, 1977).

1.4. Propriedades estruturais, químicas e físico-químicas

As lectinas representam uma classe de proteínas com uma grande heterogeneidade estrutural, não havendo propriedades estruturais comuns a todas elas, exceto o fato de serem proteínas e consistirem de subunidades ou protômeros (SHARON & LIS, 1989). Suas massas moleculares aparentes variam de 8.500 a 250.000 Daltons. Geralmente são oligômeros constituídos de duas ou mais subunidades, idênticas ou não. Porém, na forma cristalina, a estrutura tetramérica é a mais comum. Extensivos estudos de homologia de seqüência e estrutura tridimensional de várias lectinas de plantas sugerem que estas são conservadas através da evolução e deve ter um papel fisiológico importante, ainda não conhecido (ETZLER, 1992; BARONDES, 1981 citados por KONOZY *et al.*, 2003).

Lectinas de plantas são geralmente ricas em aminoácidos hidrofóbicos e ácidos e são pobres em aminoácidos sulfurados, com algumas exceções, as lectinas encontradas no germe de trigo (WGA) e na batata. A maioria delas são glicoproteínas com quantidade de açúcar variável, com algumas exceções observadas nas lectinas das espécies da sub-tribo *Diocleinae* (MOREIRA *et al.*, 1983). Os principais açúcares encontrados nas lectinas são N-acetil-glicosamina, manose, L-fucose e xilose. Estes açúcares são característicos das lectinas de leguminosas (SHARON & LIS, 1989). Por outro lado, as lectinas de Solanáceas possuem arabinose e galactose como únicos constituintes da porção glicídica. Nas lectinas de *Solanum tuberosum* (ALLEN *et al.*, 1978) e de *Datura stramonium* (DESAI *et al.*, 1989), todos os resíduos de arabinose (90 % da porção glicídica) estão ligados covalentemente aos resíduos de hidroxiprolina, enquanto que os resíduos de galactose estão ligados aos resíduos de serina. Estudos de especificidade e de análise estrutural demonstraram que lectinas de leguminosas podem interagir tanto com açúcares simples como complexos. A interação da lectina com açúcares simples se realiza no conhecido sítio de ligação a monossacarídeos localizado na superfície do monômero. Por exemplo, o sítio de ligação a manose/glucose da isolectina 1 (LoLI) de *Lathyrus ochrus* é formado por poucos resíduos de aminoácidos pertencentes a 4 voltas (loops) localizadas na parte superior do monômero (cúpula). Os resíduos Asp⁸¹,

Gly⁹⁹, Asn¹²⁵, Gly²⁰⁸, Ala²⁰⁹ e Glu²¹⁰ criam uma rede de sete pontes de hidrogênio com O3, O4, O5 e O6 do açúcar simples. Além disso, o resíduo aromático Phe¹²³ cria uma interação hidrofóbica com o anel de piranose do açúcar. Por outro lado, a interação de lectinas de leguminosas com muitos glicanos complexos (como cadeias laterais de oligossacarídeos pertencentes a glicoproteínas) ocorrem no sítio estendido de ligação a carboidrato que determina sua especificidade fina de ligação a carboidratos, (BOURNE *et al*, 1994). Este sítio estendido encerra, junto a um sítio de ligação a monossacarídeo central, um número de resíduos adjacentes na superfície da lectina que interagem com as unidades de açúcar do glicano complexo. Tanto as pontes de hidrogênio (mediadas por moléculas de água presentes e arranjadas na superfície da lectina), como as interações hidrofóbicas envolvendo resíduos aromáticos expostos na superfície da molécula desempenham um papel chave na ligação de oligossacarídeos com o sítio de ligação estendido (PEUMANS, *et al*, 2000b).

Um grande número de lectinas são metaloproteínas, as quais precisam de cátions bivalentes (por ex: Ca⁺² e Mn⁺²) para exibirem uma atividade completa. Cada subunidade possui um sítio de ligação para Mn⁺², denominado S1, e um segundo sítio S2 ocupado por Ca⁺² na proteína nativa (HARDMAN & AINSWORTH, 1972). A ligação de Mn⁺² ao sítio S1 da apo-Con A (Con A desmetalizada) induz uma mudança conformacional na proteína que resulta na formação do sítio S2. A ligação de Ca⁺² ao sítio S2 induz a formação do sítio de ligação a carboidrato. A energia de ativação do processo de conversão da forma inativa para a forma ativa é de 22 Kcal.Mol⁻¹, com uma constante de tempo de 17 minutos a 5 °C (BROWN *et al*, 1977). Lectinas de leguminosas freqüentemente contém um íon de Mn²⁺ e um de Ca²⁺ em cada subunidade, que são essenciais para a atividade de ligação a carboidrato da lectina como a lectina de *Dioclea guianensis* contém íons cálcio e manganês ligados próximos do sítio de ligação a carboidratos (WAH *et al*, 2001).

Os sítios de ligação a metais e a carboidratos estão intimamente relacionados. Peptídeos com 8 a 11 resíduos, obtidos por digestão da proteína intacta e que retêm a capacidade de ligação a carboidratos, foram isolados a partir de hidrolisados das lectinas de *Bauhinia purpurea* (YAMAMOTO *et al.*, 1991), *Cytisus sessilifolius*

(lectina I, KONAMI *et al.*, 1992b), *Cytisus scoparius* (lectina II, KONAMI *et al.*, 1992a), *Lotus tetragonolobus* e *Ulex europeus* (lectinas I e II; KONAMI *et al.*, 1992c). A sequência de aminoácidos destes peptídeos mostrou uma alta homologia com uma região da Con A (resíduos 10 a 17) que faz parte do sítio de ligação a metais, principalmente com o sítio de ligação a cálcio, pois contém os resíduos ASP10, que é compartilhado pelos dois cátions e ASN14, que interage somente com o cálcio.

O sítio de ligação a carboidratos da Con A (um por cada subunidade), está localizado em uma depressão na superfície da proteína e distante 10 a 14 ângstrons do íon Mn^{+2} (ALTER & MAGNUSON, 1974; HARDMAN & AINSWORTH, 1976). Os resíduos envolvidos na ligação a carboidratos são TRY12, ASN14, ASP16, LEU99, TYR100, ASP208 e ARG228 (HARDMAN & AINSWORTH, 1976). De todos esses resíduos somente ASP208 é conservado nas lectinas de Leguminosas já sequenciadas (KONAMI *et al.*, 1991).

A marcação por fotoafinidade e espectroscopia de ressonância de spin de várias lectinas mostrou que o sítio de ligação a carboidratos e os sítios hidrofóbicos são diferentes e não guardam proximidade entre si (MALIARIK e GOLDESTEIN, 1988).

Os sítios para ligantes hidrofóbicos têm tido sua presença investigada com maior frequência em lectinas de Leguminosas. Estes sítios podem ocorrer dentro de uma única subunidade ou se estabelecer no centro do tetrâmero.

Na Con A, o sítio da subunidade liga-se ao ácido indolacético (um hormônio vegetal do grupo das auxinas) com uma constante de associação de $7 \times 10^2 M^{-1}$ (EDELMAN & WANG, 1978) e está localizado a 35 ângstron do sítio de ligação a carboidrato (HARDMAN & AINSWORTH, 1976). Os resíduos de aminoácidos da Con A (BECKER *et al.*, 1975) envolvidos na formação deste sítio (TYR54, LEU81, LEU85, VAL89, VAL91, PHE111, SER113, VAL179, ILE181, PHE191, PHE212 e ILE214) são altamente conservados nas demais lectinas de Leguminosas até então sequenciadas (KONAMI *et al.*, 1991a). Já o sítio hidrofóbico existe como uma cavidade única por tetrâmero que liga adenina e também citocinas, (hormônios vegetais derivados da adenina, SHARON & LIS, 1990). Nas lectinas de *Phaseolus lunatus*, *Dolichos biflorus*, *Phaseolus vulgaris* (PHA E4) e *Glycine max*, este sítio possui uma alta

afinidade de ligação à adenina, da ordem de 10^5 a 10^6 M⁻¹ (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983).

1.5. Atividades e Aplicações Biológicas

As lectinas possuem várias especificidades que estão associadas com a habilidade destas para interagir com acetilamino-carboidratos, amino-carboidratos, ácido siálico, hexoses, pentoses e muitos outros carboidratos e glicoproteínas (SINGH *et al.*, 1999).

As diferentes atividades biológicas apresentadas pelas lectinas advêm da sua propriedade de interagir com carboidratos. Assim, a presença de açúcares na superfície das células, correspondendo à porção glicídica das glicoproteínas e glicolipídios de membrana, servem como sítios potenciais de ligação para as lectinas. Essa ligação poderá induzir uma variedade de mudanças, levando à expressão das propriedades biológicas (SHARON & LIS, 1989).

As lectinas vegetais apresentam vários efeitos biológicos, sendo os mais estudados a aglutinação e a estimulação mitogênica. Além desses outras interessantes propriedades foram observadas: atividade semelhante à insulina em células gordurosas, modificação das atividades de enzimas de membrana, bloqueio da fertilização do ovo por espermatozóides, toxicidade "*in vitro*" e "*in vivo*" e inibição do crescimento de fungos. No entanto, nem todas as lectinas exibem tais efeitos (LIS & SHARON, 1981).

A capacidade de estimular a proliferação de linfócitos das lectinas foi iniciada com os estudos feito por Nowell (1960) com as lectinas de *Phaseolus vulgaris* (SHARON & LIS, 1989). BARRAL-NETO *et al.* (1992), observaram o comportamento da proliferação de linfócitos e estimulação da produção de interferon-gama por diversas lectinas da sub-tribo *Diocleinae* e compararam com a Concanavalina A. Os resultados mostraram que todas as lectinas são mitogênicas apresentando, no entanto, atividade diferenciada. Os autores sugeriram que pequenas diferenças na seqüência de

aminoácidos próximo a região envolvendo a interação com açúcar poderiam afetar a especificidade fina de cada lectina para o mesmo receptor na membrana celular, visto que tais proteínas possuem a mesma especificidade glicose/manose. SHANGARY *et al.*, (1995) purificaram duas lectinas de tubérculos de *Arisaema consaguinem* e *A. curvatum* pertencentes à família das *Araceae* e que mostraram-se especificamente mitogênicas para células T do sangue periférico humano. Tal atividade foi inibida por asialofetúina de maneira dose-dependente. As lectinas mitogênicas ou não, têm sido bastante utilizadas como indutoras na produção de interferon natural, a exemplo da *Dioclea grandiflora*, mas até o momento não está esclarecido o mecanismo utilizado por essas proteínas (KIYOTA, 1993).

Lectinas vegetais, quando administradas intraperitonealmente em animais, podem induzir exsudação intracavitária de leucócitos, a exemplo das lectinas de *Artocarpus incisa* (frutalina) e *Artocarpus integrifolia* (jacalina e KM⁺), estudadas por DIAS-BARUFFI *et al.* (1995) e SANTOS-de-OLIVEIRA *et al.* (1994), respectivamente. Entretanto, a lectina KM⁺, quando injetada endovenosamente, contra um estímulo inflamatório administrado em cavidade peritoneal de ratos, apresentou um efeito protetor de inflamação (anti-inflamatório) (SAKAMOTO *et al.*, 1998).

FARIAS (1995) e COSTA (1995) verificaram que as lectinas de algas *Meristiella echinocarpa* e *Amancia multifida* apresentaram atividade mitogênica sobre células mononucleares do sangue periférico humano e que as isolectinas da alga marinha *Meristiella echinocarpa* foram inibidoras do efeito mitogênico das lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e *Canavalia brasiliensis* em doses bastante estimulatórias (FARIAS, 1995). Esta atividade mitogênica pode ser afetada por alterações que ocorram na superfície de linfócitos e modificação química na lectina (LIS & SHARON, 1981).

Os efeitos inflamatório e anti-inflamatório da lectina de soja (SBA) foram investigados por BENJAMIN, *et al.*, (1997). Seus dados indicaram que a lectina de soja induz uma reação inflamatória quando injetada localmente, isto deve contribuir para seu efeito prejudicial sobre o intestino delgado. Entretanto, foi observado um efeito inibitório sobre a migração de neutrófilo, quando a SBA está presente na circulação sangüínea, sugerindo um efeito anti-inflamatório.

FREIRE *et al.*, (2003) demonstraram que a nova lectina de sementes de *Talisia esculenta* (TEL) induz a migração de neutrófilo em diferentes cavidades em camundogo e edema de pata. Os autores sugerem que estas atividades devem estar relacionadas com as propriedades da TEL ligar açúcar especificamente.

Algumas lectinas como Con A e WGA apresentam atividades insulinomiméticas sobre células adiposas de ratos. Observou-se que as lectinas se ligam a receptores de insulina localizados na membrana celular, estimulando o transporte de glicose, a lipogênese e inibindo a lipólise (KOCOUREK & FREED, 1990). Todavia, PRADO *et al.*, (1998) demonstraram que a Con A aumenta os níveis de insulina circulante em ratos e que esta resposta é opióide dependente e regulada hormonalmente.

GOMES *et al.* (1994) observaram a indução da liberação de histamina por oito lectinas pertencentes à família das leguminosas, sub tribo *Diocleinae*. Estas lectinas apresentaram atividades diferentes quando comparadas à Concanavalina A e foi verificada a necessidade de íons cátions para o melhor desempenho dessa propriedade biológica para a lectina de *Dioclea virgata*.

KARASAKI *et al.*, (2001) demonstraram que uma lectina extraída de *Allium sativum*-L reduziu fortemente o crescimento e síntese de DNA em células de tumor humano, numa relação tempo e dose dependentes. Além disso, esta lectina induziu apoptose em células a baixa concentração.

Como observado, as lectinas vegetais possuem diferentes atividades biológicas que estão relacionadas com suas propriedades de ligarem-se à carboidratos. Por outro lado algumas lectinas possuem efeitos biológicos de mesma natureza, porém de intensidades diferentes. Estes devem estar relacionados com características estruturais peculiares dessas proteínas. Um exemplo é a lectina Con Br (*Canavalia brasiliensis*) que, por cristalografia, mostrou ter estrutura quaternária semelhante à Con A, porém sua estrutura é mais aberta quando comparada à Con A (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997). Essas duas proteínas que pertencerem ao mesmo grupo de especificidade por glucose e manose, apresentam efeitos biológicos semelhantes mas em intensidades diferentes.

A aplicabilidade das lectinas oferece muitas vantagens, considerando sua alta estabilidade e sua distinta especificidade, possibilitando ser uma ferramenta poderosa

na investigação bioquímica, imunológica, biológica e áreas correlatas. Abaixo são relacionadas algumas aplicações das lectinas:

- Isolamento, purificação e estudos estruturais de gliconjugados;
- Estudos de componentes de membrana celular e subcelular;
- Estudos de componentes de superfície de vírus;
- Estudos de mudanças na superfície celular sobre transformações malignas;
- Estimulação mitogênica de linfócitos e estudos de divisão celular, constituição cromossomial celular e anormalidades cromossomiais;
- Separação celular;
- Diagnóstico e identificação de microrganismos;
- Tipagem sangüínea;
- Transportadores de drogas;
- Defesa de plantas contra predadores;
- Construção de mísseis biológicos;
- Proteção contra doenças.

Devido à sua capacidade em reconhecer carboidratos, as lectinas podem ser utilizadas como suportes em cromatografias de afinidade para isolamento e demonstração da natureza glicoprotéica de receptores de hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados (GIOVANNINI *et al.*, 1982). Por outro lado, as lectinas também são usadas na detecção e acessibilidade de gliconjugados celulares e extracelulares que estão associados com processos patológicos. Pelo fato das lectinas se ligarem diferentemente com células saudáveis e malignas, é possível utilizá-las no reconhecimento de alterações estruturais dos carboidratos de superfície celular, e assim caracterizar as metástases (FREEMAN,

1983; FISHER *et al.*, 1984). As lectinas têm se mostrado como excelentes ferramentas no estudo de pneumonia (DAMJANOV, 1987).

GABOR *et al.*, (2001) observou a interação entre a aglutinina de germe de trigo (WGA) e outras lectinas de plantas com células Du-145 portadoras de câncer de próstata. Seus resultados identificaram a WGA apresentando melhor interação com células Du-145 devido a transporte ativo imediato da lectina ligada a membrana dentro de compartimentos acidificados. Os autores sugerem que a WGA pode representar uma alternativa na terapia de câncer de próstata através dos sistemas liberação de droga sítio dirigido.

Na tipagem dos grupos sangüíneos, em especial os do sistema ABO, as lectinas têm desempenhado papel importante. Na inibição por haptenos com as lectinas de *Phaseolus limensis*, *Vicia cracca*, específicas para o grupo A, e de *Lotus tetragonolobus* e *Anguilla anguilla*, específicas para o grupo O, descobriu-se a importância de L-fucose e de N-acetilgalactosamina na especificidade dos grupos A e O (H) respectivamente (LIS & SHARON, 1986).

As lectinas têm servido como ferramentas em laboratório de imunologia em virtude da capacidade destas para desencadear a sinalização de eventos por ligação a glicoconjugados sobre a superfície de células envolvidas na resposta imune (VILLALOBO e GABIUS, 1998).

Na área da pesquisa médica, a estimulação mitogênica por lectinas, em particular a PHA e a Con A, fornecem um meio fácil e simples para avaliar a imunocompetência de pacientes padecendo de uma diversidade de doenças, como por exemplo a AIDS (SHARON & LIS, 1989). As lectinas são também importantes nos estudos de transplantes de medula, no efeito do vôo espacial sobre o funcionamento do sistema imune do homem e na identificação de células leucêmicas (GABIUS *et al.*, 1991).

A ligação covalente de algumas lectinas tóxicas com anticorpos monoclonais, tem sido testado diretamente em células alvo, que seriam destruídas pela ação da imunotoxina (VIETTA & UHR, 1985; PASTAN *et al.*, 1986).

As lectinas também são usadas como ferramentas importantes para o estudo de processos inflamatórios (BENTO *et al.*, 1993) e da indução de liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994).

Na agricultura as lectinas podem ser usadas no combate a predadores, baseado no seu potencial inseticida, já identificado para algumas lectinas (MARBAN-MENDONZA *et al.*, 1987).

Em virtude da ampla aplicabilidade das lectinas a mais diversas áreas da ciência, estas têm sido consideradas insumos básicos da biotecnologia.

1.6. Toxicidade de lectinas

Sabe-se, desde muito tempo, que muitas lectinas de sementes, principalmente de leguminosas, são reconhecidas como tóxicas para uma variedade de animais, quando ingeridas cruas. Ensaio alimentares com lectina (PHA) purificada de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), tem demonstrado que a toxicidade pode ser atribuída a esta lectina, que está abundantemente presente nestas sementes (PUSZTAI *et al.*, 1978). Esta atividade tóxica é devida à resistência, destas lectinas, à hidrólise enzimática no trato intestinal, e sua ligação às células da borda em escova do intestino, daí advindo diversos efeitos, graças à endocitose que resulta num aumento da atividade metabólica e eventualmente leva à hiperplasia e hipertrofia do intestino delgado (PUSZTAI *et al.*, 1990).

Não é difícil imaginar que o acúmulo de grandes quantidades de uma lectina que causa vários efeitos no intestino (além de trazer desconforto para o animal) torna o feijão comum muito menos palatável para possíveis predadores. Desta forma, em vez de comerem estes feijões, eles procurarão (numa reação de rejeição) outras fontes de alimento (PEUMANS & VAN DAMME, 1997).

Pusztai e colaboradores demonstraram que não somente PHA, mas a maioria das lectinas de plantas, resistem bem a hidrólise enzimática no intestino e estão disponíveis para ligação às células da borda em escova das membranas do intestino (PUSZTAI *et al.*, 1990). Embora nem todas estas lectinas sejam fatores de crescimento

tão potente quanto a PHA, muitas causam distúrbios sérios bem como o próprio funcionamento e crescimento do intestino. Conseqüentemente, sementes ou tecidos vegetativos que contenham tais lectinas antinutricionais são virtualmente não palatáveis e, portanto, serão evitados. De fato, a expressão destas proteínas moderadamente tóxicas que além de causarem vários desconfortos para os animais que as utilizam como parte de sua dieta, tem sido considerado como uma estratégia evolucionariamente adaptacional das plantas para garantir a sobrevivência das espécies. Sem dúvida, a toxicidade moderada delas e os efeitos desconfortantes retardados, determinados pela presença de lectinas não podem impedir que a semente ou a planta (ou parte da planta) sejam ingeridas. Entretanto, a reação de rejeição será benéfica para as espécies de plantas (PEUMANS & VAN DAMME, 1997).

A susceptibilidade da frutalina, uma lectina galactose ligante, isolada de sementes de *Artocarpus incisa*, às enzimas proteolíticas pepsina, tripsina e quimotripsina foi investigada, usando como referência a albumina sérica bovina (BSA). O tratamento hidrolítico adotado (pepsina 8 minutos, tripsina 10 minutos, quimotripsina 30 minutos e tripsina+quimotripsina 10 minutos) para verificar a possível ação inibitória da frutalina, levou a níveis de hidrólise da BSA variando de 19 a 31%, sugerindo uma possível inibição pela lectina. Todavia, em novas condições em que o tratamento proteolítico foi realizado (pepsina, 2 horas ou pepsina, 2 hs + tripsina e quimotripsina, 3hs) sobre BSA + frutalina não foi observado indícios de inibição por parte da frutalina. Nesse estudo verificou-se ainda que a frutalina é mais resistente a tripsina, seguida pela quimotripsina e pepsina baseado em cinética hidrolítica com duração de 36 horas (CORDEIRO-CARLOS, 2000).

Outras lectinas cujas toxicidades têm sido investigada são: Con A, WGA e a lectina de *Robinia pseudoacacia*, e são todas tóxicas para células de mamíferos (LIS & SHARON, 1981). KULKARNI & MCCULLOCH (1995) verificaram que a lectina Concanavalina A mostrou-se indutora de apoptose em fibroblastos humanos e de camundongos. Os autores propuseram que as ligações cruzadas provocadas pela lectina ao ligar-se nos resíduos de manose presentes nas glicoproteínas da superfície celular, podem servir de sinal para dar início ao processo de apoptose. Além disso, esses cientistas afirmam que, a morte celular programada deve-se também à inibição

da síntese protéica causada por aquela proteína. Esses resultados foram similares aos observados por KAPLOWITZ & HAAR (1988) quando verificaram que a lectina WGA induzia o bloqueio do ciclo celular também em fibroblastos. Contudo, essa toxicidade é bem menor do que a encontrada para ricina e abrina, lectinas pertencentes ao grupo de proteínas inativadoras de ribossomas (RIPs).

As RIPs tipo 2 são conhecidas por sua ação citotóxica potente, e representam uma classe especial de quimerolectinas com uma toxicidade geral frente a todos os eucariontes. A ação destas lectinas ocorre da seguinte forma: a cadeia B (das RIPs tipo 2) ligante de carboidrato liga-se a um (glicoconjugado) receptor sobre a superfície celular, promovendo a entrada da RIP. Depois de sua entrada para dentro da célula a cadeia A inativa cataliticamente os ribossomas eucarióticos por clivar a ligação N-glicosídica de um resíduo de adenosina simples da subunidade maior do RNA ribossômico. Em princípio, as RIPs tipo 2 são extremamente tóxicas para todos eucariontes se elas atingem o citoplasma (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

O uso de grãos de leguminosas e de outras fontes vegetais na nutrição é limitado devido à presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais os quais podem causar respostas adversas ao homem e/ou animais (LIENER, 1980; SALUNKHE *et al.*, 1982).

PUSZTAI *et al.*, (1998) estudaram os efeitos de uma lectina de *Viscum album* (RIP tipo 2), administrada oralmente, sobre crescimento, composição corpórea, estrutura do intestino delgado e níveis de insulina em ratos jovens. Os resultados mostraram que a referida lectina não teve efeito sobre a digestibilidade de proteínas e outros componentes da dieta, mas aumentou a perda do nitrogênio urinário, o balanço de nitrogênio e redução do conteúdo de nitrogênio corpóreo, particularmente para altas doses da lectina. A gordura corpórea foi também reduzida, provavelmente devido à diminuição dos níveis de insulina circulante. Alguns órgãos foram afetados: houve hipertrofia do pâncreas e pulmões e, mais importante ainda, uma hiperplasia do intestino delgado, provavelmente devido a uma forte ligação e endocitose da lectina pelas células epiteliais do intestino delgado.

VASCONCELOS *et al.*, (2001) realizaram um estudo nutricional com duas cultivares de soja (*Glycine max*) observando que todos os componentes em estudo

(proteínas tóxicas e fatores anti-nutricionais) interferem com os parâmetros nutricionais e/ou tamanho de órgãos embora, as alterações biológicas tenham sido principalmente devido a lectina e inibidor de tripsina. Todavia estes efeitos negativos podem ser parcialmente eliminados ou inativados com tratamento térmico adequado.

Os efeitos tóxicos das lectinas de plantas têm sido observados, além daqueles descritos para animais, também sobre as ordens de insetos Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera. Tem sido demonstrado que algumas lectinas ligam-se a membrana das células epiteliais do intestino dos insetos ou membrana peritrófica como no caso de lectinas ligantes de quitina (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Outra possibilidade de efeito tóxico é a interação das lectinas com enzimas digestivas glicolísiladas. Entretanto, o mecanismo preciso de ação das lectinas sobre insetos ainda não é conhecido (GETEHAUSE *et al.*, 1995 citado por CARLINE *et al.*, 2002).

TRIGUEROS *et al.*, (2003) identificaram mais uma lectina com propriedades inseticidas, isolada da espécie *Xerocomus chrysenteron* apresentando alta atividade inseticida comparada a lectinas isoladas de *Lathyrus ochrus* ou *Galanthus Nivalis*; o mecanismo de toxicidade desta nova lectina ainda não foi elucidado.

1.7. Considerações sobre o gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* pertence à família Caesalpiniaceae (formalmente Leguminosae) (PANDA & KAR, 1999). São plantas encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies. Muitas destas plantas são usadas como remédio na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul (ACHENBACH *et al.*, 1988).

As plantas do gênero *Bauhinia*, no Brasil, são conhecidas como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi”. As folhas, caules e raízes das espécies de *Bauhinia*, especialmente *B. manca*, *B. rufescens*, *B. forficata*, *B. cheitantha* e *B. splendens*, são amplamente utilizadas no Brasil e em outros países em forma de chás e outras preparações fitoterápicas para o tratamento de várias enfermidades, principalmente infecções, processos dolorosos e diabetes (TESKE & TRENTINI., 1995). Estudos realizados com

Bauhinia manca, *Bauhinia divaricata*, *Bauhinia purpurea* e *Bauhinia variegata* têm demonstrado atividade hipoglicêmica em animais de laboratório (VASCONCELOS, 2000; IVORRA *et al.*, 1989).

O uso medicinal das plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* pela população de diferentes partes do mundo tem encontrado respaldo nos estudos científicos, que comprovam a eficácia destas plantas em vários modelos experimentais. Neste contexto, alguns efeitos biológicos ou farmacológicos, como antifúngicos, antibacterianos, analgésicos, antiinflamatórios e especialmente antidiabéticos, são relatados na literatura, comprovando e justificando o uso destas espécies na medicina popular. Embora muitos compostos, incluindo alcalóides, terpenos, esteróides, estilbenos, etc, mas principalmente flavonóides, tenham sido isolados e identificados nestas espécies, são raros os estudos que relacionam tais compostos aos efeitos biológicos indicados (CECHINEL FILHO e SILVA, 2002).

A *Bauhinia forficata*, conhecida como “pata de vaca”, é a espécie do gênero *Bauhinia* mais usada como erva medicinal anti-diabético no Brasil. Esta espécie é uma arbórea de origem asiática, bem adaptada ao clima brasileiro, atingindo até 12m de altura (MIYAKE *et al.*, 1986; DONATO, 1995).

Inibidores de tripsina foram purificados do extrato salino de sementes de *B. bauhinioides* através de uma coluna cromatográfica de troca iônica. Dessa planta foram isolados os inibidores BbTI-I e BbTIII. Este último, inibe a kaliceína pancreática, hidrolisando os aminoácidos H-Pro-Phe-Arg-ACM (OLIVA *et al.*, 1999).

Outros estudos tem reportado o isolamento e caracterização da lectina das sementes de *Bauhinia purpurea*. Esta lectina é purificada por cromatografia de afinidade imobilizada com N-acetil-D-galactosamina (YOUNG, *et al.* 1985). Ela tem sido usada para detecção de glicoconjugados contendo galactose e cadeias de açúcar tipo mucina e também como marcador de células de Reed-Sternberg em doença de Hodgkins (SARKER *et al.*, 1992). Recentemente, WU *et al.*, (2004) publicaram um estudo sobre a especificidade fina da lectina de *Bauhinia purpurea* (BPA) demonstrando que esta tem alta afinidade por glicoproteína polivalente de alta densidade tipo: GalNAc α 1-Ser/Thr e “glycotopes” presente sobre macromoléculas Gal β 1-3/4GlcNAc. Uma lectina galactose específica foi também encontrada nas folhas de

Bauhinia monandra, que em condições desnaturante apresenta duas bandas protéicas contendo 33 e 26 kDa (COELHO & SILVA, 2000).

Em 2001, SILVA et al. publicou o isolamento e caracterização parcial de uma lectina de sementes de *Bauhinia pentandra* galactose ligante. Esta lectina foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-4B, mostrando apenas uma banda protéica de massa molecular aparente de 30 kDa por eletroforese, requer a presença de cátions divalentes (Ca^{+2} e Mn^{+2}) para exercer sua atividade e tem uma composição de aminoácidos caracterizada pelo alto teor de ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina e pelo baixo teor de metionina, cisteína e triptofano. A lectina de *Bauhinia pentandra* aglutina eritrócitos de coelho e humano do grupo A e foi relativamente resistente ao tratamento térmico, retendo parte de sua atividade original mesmo após 60 min a 70 ° C.

Neste trabalho deu-se seqüência ao estudo da lectina de *Bauhinia pentandra* galactose específica afim de somar novos conhecimentos, aqueles publicados, do ponto de vista fisico-químico e biológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O propósito deste trabalho foi caracterizar físico-química e biologicamente a lectina galactose-ligante presente nas sementes da espécie de leguminosa *Bauhinia pentandra*, cujo isolamento foi procedido por nosso grupo de pesquisa nesse Departamento.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar estruturalmente a lectina galactose-ligante presente nas sementes da espécie de leguminosa *Bauhinia pentandra*;
- Investigar alterações estruturais induzidas pela presença de metais e pela ação da temperatura;
- Explorar atividades biológicas da LBp quanto à sua toxicidade e indução de reação inflamatória.

2.3. Estratégias Experimentais

- Purificar a lectina galactose-ligante de *Bauhinia pentandra* em matriz Superdex;
- Determinar a massa molecular da lectina galactose-ligante de *Bauhinia pentandra* por filtração em gel;
- Determinar a estrutura secundária da lectina galactose-ligante de *Bauhinia pentandra* específica;
- Verificar a termoestabilidade desta proteína por dicroísmo circular e por atividade biológica;

- Observar a estrutura da proteína quanto à fluorescência estática;
- Caracterizar melhor a dependência desta lectina por metais divalentes;
- Seqüenciar a porção N-terminal da lectina galactose-ligante de *Bauhinia pentandra*.
- Investigar a participação desta lectina na toxicidade intraperitoneal das sementes, em camundongos;
- Estudar o efeito da LBp sobre a migração de neutrófilos na cavidade intraperitoneal e o edema de pata em ratos.

3. MATERIAIS

3.1. Material Botânico

As sementes de *Bauhinia pentandra*, utilizadas na investigação objeto deste trabalho, foram obtidas no Estado do Ceará.

3.2. Animais

Foram utilizados coelhos Nova Zelândia branco, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Carlos - São Paulo, para coleta de sangue cujas hemácias foram usadas para verificar atividade hemaglutinante.

Foram utilizados camundongos swiss para experimentos de toxicidade e *Rattus norvegicus* de linhagem Wistar Albina, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará para experimentos de migração de neutrófilos e edema de pata.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará.

3.3. Equipamentos

- Espectrofotômetro Hitachi (mod. U-2000) e Ultrospec 2000 – Ainarsham
- Espectropolarímetro Jasco, modelo J 720
- Espectrofluorímetro K2 (ISS – Illinois, USA)
- Seqüenciador automatizado de proteínas, PPSQ-23A Shimadzu
- Centrífuga refrigerada Sorvall (mod. RC-5B)
- Liofilizador Savant micromodulyo (Modelo VLP200)
- pH-metro micronal (mod. B-374)
- ÁKTA (Pharmacia –LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)
- Coletores de fração – (Pharmacia – LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia)
- Banho-maria (mod. Y28) – Grant
- Câmera de Neubauer Herka
- Microscópio (model CH20BIMF200) - Olympus Optical CO., LTD. Japan

- Pletysmometer (modelo 7140, Ugo Basile, Milão, Itália)

3.4. Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados durante a purificação da lectina galactose-ligante de *Bauhinia pentandra* foram todos de pureza analítica. Os seguintes tampões foram utilizados:

- Tampão glicina-HCl 0,1M, pH 2,6;
- Tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8;
- Tampão fosfato de sódio (PBS) 0,15M pH 7,4;
- Solução tamponada com fosfato de sódio (PBS) 0,15M pH 7,4:
 - NaCl.....0,15M
 - D-Galactose..... 0,10M
 - D-Manose..... 0,10M

Foram utilizadas solução de Turk, carragina e corante de Instant Prov para análise de esfregaço do exsudado peritoneal.

3.5. Outros Materiais

- Comassie Brilliant Blue R-250, epicloridrina, acrilamida, metileno-bisacrilamida e TEMED fornecidos pela Sigma Chemical Co, St. Louis ,USA.
- Goma de Guar manufaturada em nossos laboratórios.
- Superdex 75 HR (Pharmacia – LKB Biotechnology, Uppsala, Suécia) acoplada a um sistema ÁKTA.
- Centriprep 10 (Amicon Corp, rpm 4000) e Centricon 10 (Amicon Crop, rpm 6000).
- Cubetas de quartzo retangulares (1,0 ou 3,0 mL) com caminho óptico de 1 cm com duas ou quatro faces polidas.
- Cubeta de quartzo cilíndrica (0,3 mL) com caminho óptico de 1 mm.

4. MÉTODOS

4.1. Isolamento da lectina galactose especifica de Bauhinia pentandra

O esquema de isolamento teve por base o trabalho de SILVA *et al.* de 2001 sobre isolamento e caracterização parcial da lectina das sementes de *Bauhinia pentandra*. Inicialmente a farinha de sementes foi delipidada com hexano, e feita a extração com NaCl 0,15 M (1:10, m/v), por 3 horas; seguido por centrifugação (8.000 rpm), sendo o sobrenadante do extrato salino das sementes submetido a uma cromatografia de afinidade em goma de guar. A coluna foi inicialmente equilibrada com a solução de extração e eluída com tampão glicina-HCl 0,1M, pH 2,6, contendo NaCl 0,15M e Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ 5 mM, quando foi obtido a fração retida (lectina). Esta fração foi dialisada contra água destilada e liofilizada para utilização posterior. A concentração protéica foi monitorada por determinação da absorbância a 280nm. O grau de pureza e a atividade biológica foram verificados através de eletroforese em gel de poliácridamida e ensaios de hemaglutinação, respectivamente. O esquema abaixo ilustra o protocolo de isolamento (FIGURA 02)

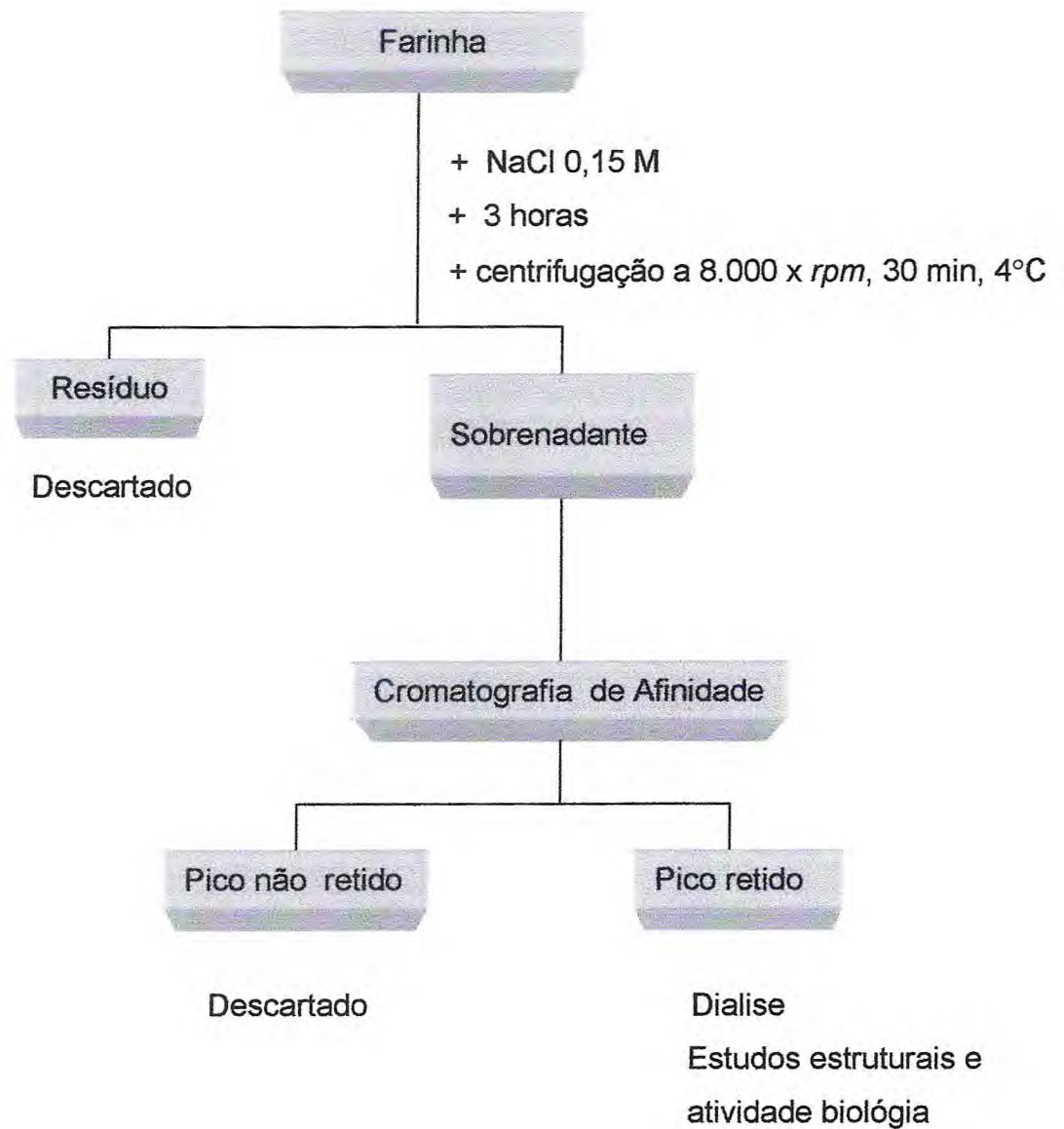


FIGURA. 02 Esquema do protocolo de isolamento da lectina de *Bauhinia pentandra* galactose específica em goma de Guar.

4.2. Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna Superdex 75

A fração obtida do isolamento em goma de Guar, foi cromatografada em coluna de filtração em gel, em sistema ÄKTA (Pharmacia), utilizando-se Superdex – 75 HR. As amostras foram analisadas na solução tampão PBS 0,15 M contendo NaCl-0,15M pH 7,4 e D-Galactose 0,1M + D-Manose 0,1 M. A lectina, foi inicialmente diluída com o tampão de equilíbrio e concentrada em membranas semi-permeável (centricon). Foi aplicado 1 mL da amostra à coluna de Superdex - 75 para a corrida cromatográfica. A eluição foi procedida com o mesmo tampão de equilíbrio, ao fluxo de 0,5ml/min., sendo coletadas frações de 1 ml. O conteúdo protéico das frações foi monitorado por leitura de absorbância a 280nm (FIGURA 03).



FIGURA. 03 Esquema do protocolo de purificação da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* em Superdex – 75 (ÄKTA)

4.3. Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna Superdex 200

A fração obtida do isolamento em goma de Guar, foi cromatografada em coluna de filtração em gel, em sistema de FPLC da Pharmacia, utilizando-se Superdex – 200 HR 10/30. As amostras foram analisadas na solução tampão Tris-HCL, 25 mM contendo NaCl-0,15M pH 7,5. A lectina, foi inicialmente diluída com o tampão de equilíbrio e centrifugada a 6000 rpm. Foi aplicado 200 μ L da amostra à coluna de Superdex - 200 HR 10/30 para a corrida cromatográfica. A eluição foi procedida com o mesmo tampão de equilíbrio, ao fluxo de 0,5ml/min., sendo coletadas frações de 1 ml. As proteínas contidas nestas frações foram dosadas a 280nm.

4.4. Ensaio de hemaglutinação

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados conforme metodologia descrita por MOREIRA & PERRONE (1977). As placas de microtitulação receberam inicialmente 50 μ L de NaCl 0,15M com ou sem Ca^{++} e Mn^{++} em cada poço, em seguida 50 μ L das amostras foram acrescentados ao primeiro poço de cada fileira e diluídas duplo-seriadamente. Posteriormente, foi adicionado a esta diluição igual volume de uma suspensão de hemácias a 2% (diluída em NaCl 0,15 M). As placas foram incubadas por 30 minutos a 37⁰C, seguido por repouso de 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foi então procedido a visualização dos aglutinados macroscopicamente. Os títulos de hemaglutinação foram calculados como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação das hemácias.

O efeito do monômero da LBp (pico II) sobre atividade hemaglutinante do PI foi realizada em placas de microtitulação que receberam inicialmente 50 μ L de NaCl 0,15M em cada poço, em seguida 50 μ L do monômero de LBp (pico II) foram acrescentados ao primeiro poço de cada fileira e diluídas duplo-seriadamente. Posteriormente, foi adicionado a esta diluição igual volume de uma suspensão de hemácias a 2% (diluída em NaCl 0,15 M). As placas foram incubadas por 30 minutos a 37⁰C, seguido por

repouso de 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida o conteúdo dos poços foi resuspenso e adicionado 50 μ L do dímero de LBp (pico I) ao primeiro poço de cada fileira e diluídas duplo-seriadamente. As placas foram incubadas novamente por 30 minutos a 37^oC, seguido por repouso de 30 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foi então procedido a visualização dos aglutinados a olho nu.

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os experimentos envolvendo eletroforese foram todos efetuados seguindo-se a metodologia descrita por LAEMMLI (1970), adaptada para uso em placas verticais medindo 17,5 x 16,5cm, com espaçamento de 1 mm . O gel de aplicação foi preparado de forma a conter 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 0,5M, pH 6,8. O gel de separação foi preparado contendo 15 % de poliacrilamida e 1,0% de SDS. A mobilidade eletroforética foi realizada sob amperagem constante de 25 mA.

As bandas protéicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue 0,3% em ácido acético – água – metanol (1:4, 5:4, 5) e descoradas com água, sendo o conjunto aquecido no microondas por 1 minuto repetidas vezes, seguido por tratamento com ácido acético a 7% até total evidencia destas.

4.6. Determinação de Carboidratos

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* foi investigada quanto a presença de carboidrato em sua estrutura utilizando o reagente de Schiff. Após eletroforese, o gel foi fixado em ácido acético 7,5 % durante 60 minutos à temperatura ambiente, e então transferido para uma solução de ácido periódico 0,2 % , deixando por cerca de 45 minutos a 4 °C. Em seguida o gel foi transferido para o reagente de Schiff, sendo mantido durante cerca de 45 minutos a 4-8 °C. O descoramento foi feito com ácido acético 10 % (SILVA-JUNIOR, 2001)

O conteúdo de carboidratos foi determinado segundo o método descrito por DUBOIS *et al.*, (1956). A lectina (1mg/ml) foi dissolvida em água mili-Q. A uma alíquota

de 0,5ml desta solução foram adicionados 0,5ml de fenol a 5%, 2,5ml de ácido sulfúrico concentrado e, após agitação, a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos. Subseqüentemente, foi realizada a leitura da absorbância a 490nm. A concentração de carboidratos foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com glucose.

4.7. Estrutura Primária e determinação da massa Molecular

Uma alíquota contendo entre 200 e 300 pMol da lectina, em água e Sequa-Brene (Sigma-Aldrich), foi aplicada num disco de fibra de vidro especial (Wako, Osaka, Japão), previamente tratado com Sequa-Brene. A análise da seqüência do N-terminal foi realizada através da degradação de Edman, num seqüenciador automatizado de proteínas, PPSQ-23A Shimadzu (Kyoto, Japan), junto ao Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, alocado no laboratório da Profa. Heloisa S. Araújo, do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. Os procedimentos foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

4.8. Dicroísmo Circular (CD)

O espectro de dicroísmo circular foi determinado para amostras da lectina nativa, diluída em PBS 0,15 M, pH 7,4 e água. As medidas foram feitas em um espectropolarímetro Jasco, modelo J 720 (*Jasco Corporation*, Japão). As soluções de lectina em $D.O_{280\text{ nm}} 0,24$, foram acondicionadas em cubetas cilíndrica de quartzo de 1 mm de caminho óptico. Os espectros foram gravados num intervalo de 195-250 nm à temperatura de 22 °C, com uma média de dezesseis varreduras. Os espectros de CD foram obtidos numa escala de elipticidade (θ) e expressos em mgrau, transformados em elipticidade molar $\{\theta\}$ considerando a concentração da proteína (mg/mL), o caminho óptico da cubeta em cm (l) e a massa média dos resíduos de aminoácidos da proteína (115 Daltons).

4.9. Cálculo do Conteúdo de Estrutura Secundária

Para o cálculo das frações de estrutura secundária foi utilizado o programa **SELCON 2 – Self Consistent Method** (SREERAMA, et al., 1993). Para estimar o conteúdo de estrutura secundária pelo SECON foi utilizado um grupo de proteínas de referência contendo 33 espectros de CD, bem como suas frações de estrutura secundária determinadas por cristalografia de raios-X.

4.10. Curva de Termoestabilidade da Estrutura Secundária

A solução de lectina em D.O. (280nm) de 0,360 em PBS 0,15M foi acondicionada em cubeta de quartzo, do tipo cilíndrica, de 1 mm de caminho ótico, seguida por medidas de CD procedidas em um espectropolarímetro Jasco J720 (*Jasco Corporation*, Japão). Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 250 nm, a temperatura variou de 30 a 85 °C, com intervalos de 5°C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos, com 8 varreduras. Para curva de transição o ponto monitorado foi 221 nm.

4.11. Curva de Termoestabilidade de Atividade Biológica

A solução de lectina (Pico II de extrato salino de sementes de *Bauhinia pentandra*, eluído de coluna de goma de Guar) em D.O. _{280nm} de 0,730 em NaCl 0,15M foi incubada em banho-maria (mod. Y28) – Grant às temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos. Foram retiradas alíquotas correspondentes a cada temperatura e submetidas à avaliação da atividade hemaglutinante de acordo com o protocolo de MOREIRA & PERRONE (1977).

4.12. Medidas Fluorimétricas

As medidas de emissão da fluorescência da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* foram realizadas a 20 °C em um espectrofluorímetro K2 (ISS – Illinois, USA), modo estático. As amostras diluídas em PBS pH 7,4 foram excitadas em 280 nm e 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 295 a 450 nm. Cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico, com 1 mL de volume foram utilizadas nas medidas. Um filtro com 85% de transmitância para comprimento de onda acima de 295 nm, posicionado no canal da emissão, teve a função de eliminar a luz espalhada. A concentração de proteína usada nestes experimentos variou de 0,08 a 0,1 mg/mL e a absorbância das amostras, em 280 nm, não ultrapassou 0,08. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz pelo tampão, de cada amostra foi subtraído o espectro deste (PBS pH 7,4).

4.13. Ensaio de Atividade Tóxica em Cavidade Peritoneal

Camundongos swiss foram divididos em 4 grupos de 4 animais (25 a 30g), aos quais foram ministrados, por via intraperitoneal, solução contendo extrato da semente e solução de lectina. O extrato da farinha de sementes em NaCl 0,15 M foi administrado em 3 grupos de animais nas seguintes concentrações 1:5; 1:10 e 1:20 (m/v). A proteína foi injetada em um grupo de animais dose única na concentração de 2µg / g de peso de animal (RAMOS *et al.*, 1998). Cada animal recebeu volume de 1 mL de amostra dissolvida em solução salina. Essa solução diluente serviu como controle negativo para o experimento. A atividade tóxica foi caracterizada no caso de morte do animal no período de até 72 horas, depois da injeção da amostra.

4.14. Migração de Neutrófilos in vivo para a Cavidade Peritoneal

A solução de lectina em três doses diferentes todas suspensas em soro fisiológico (1ª dose: 10µg/mL, 2ª dose: 30µg/mL, 3ª dose: 60µg/mL) foram injetadas intraperitonealmente (i.p) 1mL em ratos Wistar machos, pesando em torno de 180 a 200g, divididos em 5 grupos e cada grupo era composto por 6 animais, tomados ao acaso. Um controle negativo foi realizado usando o diluente (soro fisiológico) e para o controle positivo foi utilizado a carragenina na concentração de 300µg/animal. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e imediatamente, tiveram a cavidade peritoneal lavada com injeções de 10 ml de soro fisiológico contendo 0,1% de heparina (5 U/mL). Após massagem da região abdominal, aproximadamente 5 mL do exsudato peritoneal, foram removidos com auxílio de pipeta "Pasteur" para contagem total e diferencial das células. Para contagem total, realizada em câmaras de Neubauer, foi procedido uma diluição, partindo-se de 20µL do exudato peritoneal de cada animal em 380 µL de solução de TURK (15ml de ácido acético glacial, 0,2ml de azul de metileno a 2% p/v completando-se o volume com água destilada para 500 ml) e a contagem diferencial de células foi feita através de esfregaços corados pelo método Instant Prov (solução de ciclohadienos a 0,1%, solução de azobenzenosulfônico a 0,1%, solução de fenotiazinas a 0,1%), sendo as lâminas levadas ao microscópio para leitura. Foram contadas 100 células, diferenciando-se 3 tipos de leucócitos: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares.

Os resultados de cada grupo foram expressos pela média de número de neutrófilos ($\times 10^6$), por ml do lavado peritoneal, analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.15. Edema de pata em ratos

Foi induzido em ratos machos (150 – 170 g), divididos em 4 grupos de 6 animais cada, tomados ao acaso, que receberam uma injeção subplantar de 0,1 ml de solução de lectina e/ou carraginanina suspensas em soro fisiológico na pata posterior esquerda. Os grupos receberam as seguintes soluções: grupo 1 soro fisiológico, grupo 2 carraginanina 1%, grupo 3 lectina 30 µg/mL, grupo 4 carraginanina 1% + lectina 30 µg/mL. O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um pletismomenteter (modelo 7140, Ugo Basile, Milão, Itália) 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração das soluções referidas. Os resultados foram expressos como diferença de volume (mL) entre as patas injetadas com soro fisiológico, lectina e/ou carraginanina e estas mesmas patas antes de receberem a injeção, analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.16. Efeito de carboidratos sobre a atividade da lectina pró-inflamatória

O edema de pata foi induzido em ratos, machos (150 – 170 g), em 1 grupo de 6 animais, tomados ao acaso, que receberam uma injeção subplantar 0,1 ml de solução de lectina 30 µg/mL + galactose 0,1 M suspensas em soro fisiológico na pata posterior esquerda, previamente incubadas por 30 minutos. Os grupos 1 e 2 do experimento imediatamente anterior foram usados para este experimento como controles negativo e positivo respectivamente. O volume do edema foi determinado semelhante ao modelo descrito no item 5.14.

Foi também verificado a influência do açúcar sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzido pela LBp, assim 4 grupo de 6 animais cada, tomados ao acaso, receberam as amostras via intraperitonealmente (i.p). A concentração utilizada de lectina foi de 30 µg/mL a qual foi incubada com três diferentes

concentrações de galactose 0,05 M, 0,10M e 0,15M por 30 minutos antes. Um controle negativo foi realizado usando galactose 0,15 M com o diluente (soro fisiológico). Após 4 horas, os animais foram sacrificados seguindo metodologia descrita no item 5.13.

Os resultados de cada grupo foram expressos pela média de número de neutrófilos ($\times 10^6$), por ml do lavado peritoneal, analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

4.17. Efeito de moduladores farmacológicos sobre a migração de neutrófilo induzido por LBp

O efeito dos moduladores farmacológicos foi observado em ratos machos (150 – 170 g), em 2 grupo de 6 animais cada, tomados ao acaso, que receberam uma injeção intraperitonealmente (i.p) de solução de lectina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suspensas em soro fisiológico, sendo um grupo tratado previamente (30 minutos) com 0,5 mL de talidomida (80 mg/Kg por via oral) e outro com 0,5 mL de pentoxifilina (80 mg/Kg por via oral). Para controle negativo foi usado o diluente (soro fisiológico) 1 mL intraperitonealmente (i.p). Após 4 horas, os animais foram sacrificados seguindo metodologia descrita no item 5.13.

Os resultados de cada grupo foram expressos pela média de número de neutrófilos ($\times 10^6$), por ml do lavado peritoneal, analisados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Purificação da LBp

O isolamento da LBp, lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*, foi realizado em matriz de goma de Guar, eluída com tampão glicina-HCl 0,1M, pH 2,6, contendo NaCl 0,15M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM, quando foi obtido a fração retida (lectina) (FIGURA 02). Posteriormente a lectina foi submetida a filtração molecular sobre Superdex-75, com as amostras em tampão PBS 0,15 M contendo NaCl-0,15M pH 7,4 e D-Galactose 0,1M + D-Manose 0,1 M (FIGURA 03).

As frações foram analisadas para detecção da atividade hemaglutinante, inibição da hemaglutinação, eletroforese em SDS-PAGE,(FIGURA 05) e estudos estruturais.

As primeiras cromatografias em superdex 75 não apresentaram um perfil de separação de picos provavelmente devido a interação da lectina com a matriz cromatográfica, assim sendo, foram adicionadas galactose e manose na concentração de 0,1 M ao tampão de equilíbrio que também era o tampão de eluição, isto fundamentado no fato de que a lectina era inibida por galactose prevenindo as interações com a resina (matriz). A existência de multilectinas ou seja, lectinas de especificidade múltipla, justifica o uso da manose. Sabe-se por exemplo que a frutalina não é inibida por galactose ou manose, todavia pode interagir com estes açúcares em matriz cromatográfica MONTEIRO-MOREIRA (2002). O resultado desta estratégia foi positivo, apresentando picos mais definidos em relação ao perfil anterior (FIGURA 04). O perfil desta cromatografia apresentou diferenças quando amostra estava acondicionada em solução ou liofilizada, observou-se que a LBp em solução favorecia a formação de monômero, no entanto quando esta proteína foi congelada ou liofilizada favoreceu a formação de dímero. A transição dímero-monômero torna-se diminuída com a retirada do sal favorecendo a formação do dímero possivelmente por facilitar as interações hidrofóbicas entre os monômeros; já na presença de sal existe a possibilidade deste bloquear parcialmente interações fracas entre os monômeros e evitando assim a formação do dímero.

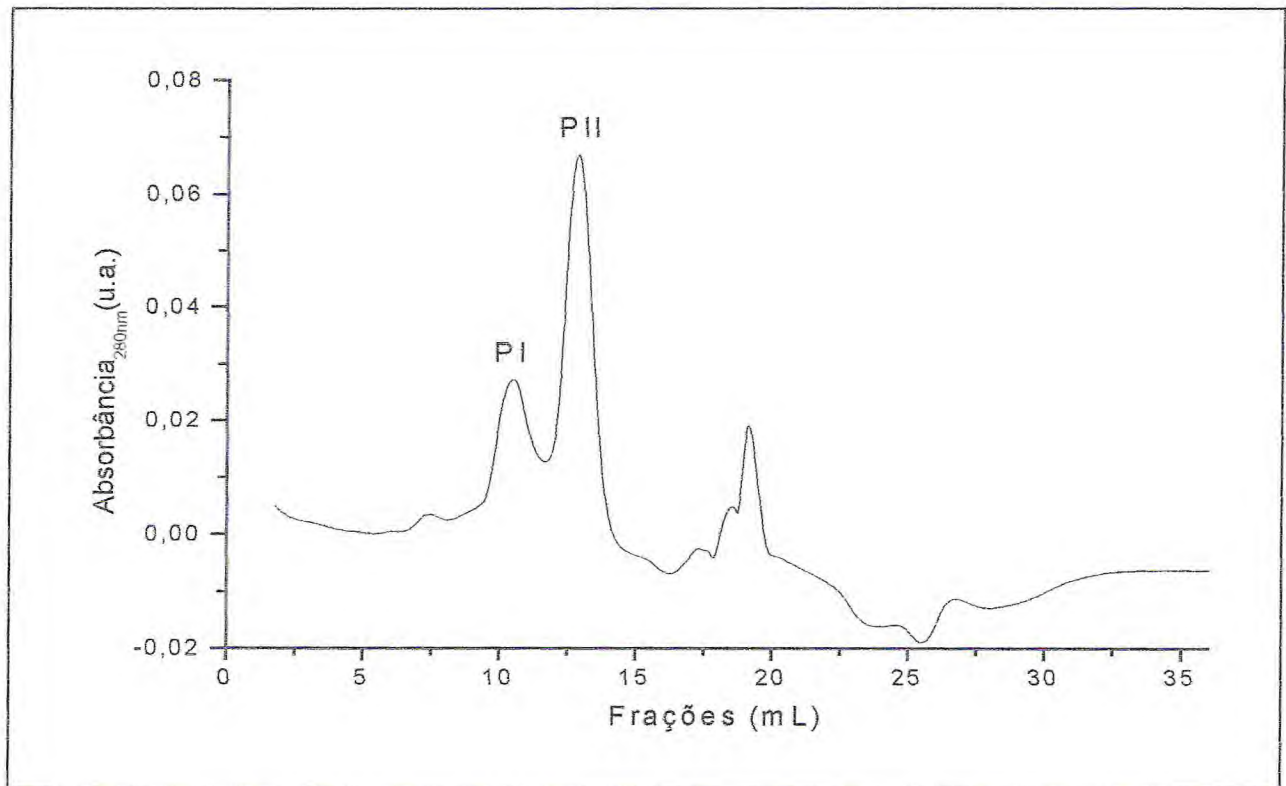


FIGURA 04: Cromatografia em superdex 75 da LBP, isolada em goma de guar, eluída com PBS 0,15 M contendo NaCl-0,15M pH 7,4 e D-Galactose 0,1M + D-Manose 0,1 M.

As frações 9 e 10 (Pico I) e a fração 12 (Pico II), foram recromatografadas, nas mesmas condições, separadamente, e foram eluídas nas mesmas posições, o que confirmou suas massa moleculares aparentes de 52 e 28 KDa (Figura não mostrada).

Para confirmar a pureza das frações obtidas em superdex 75 foi feita eletroforese em PAGE-SDS e β -mercaptoetanol. Pelos resultados, pode-se observar uma banda protéica bem definida para o pico I, confirmando a massa molecular aparente de 30 kDa (FIGURA 05). Este valor está de acordo com os dados obtidos por SILVA *et al.*, (2001). O pico II não apresentou visibilidade na eletroforese corada com coomassie brilliant blue, provavelmente em função da baixa concentração presente nesta fração. Esta eletroforese fornece ainda um indicativo de pureza da lectina quando comparada com eletroforese da fração protéica obtida diretamente da matriz de goma de Guar, que apresentavam discretas bandas acima e abaixo da massa molecular 30 kDa (Figura não mostrada).

Examinou-se a atividade hemaglutinante nos picos I e II obtidos na cromatografia de exclusão molecular superdex 75. A atividade hemaglutinante foi observada no pico I. Todavia, o pico II não apresentou atividade hemaglutinante, porém foi retido no polímero de Guar. Isto indicou que pelo menos um sítio ligante existia nesta população molecular. Assim foi investigado se o pico II poderia bloquear a hemaglutinação observada para pico I. O resultado foi positivo, confirmando que esta população molecular tem apenas um sítio ligante em hemácias. Com base nesses resultados pode ser sugerido que esta proteína comporta-se como oligômero e que a população molecular referente ao pico II seja a forma monomérica da proteína. SILVA *et al.*, 2001 observou que a atividade hemaglutinante no extrato total de farinha de *Bauhinia pentandra* foi verificada somente após 12 horas após a adição dos eritrócitos. Este fato pode sugerir uma competição entre subunidades monoméricas e oligômeros presentes no extrato, haja vista que a ligação de lectina a carboidrato é reversível. Após isolada a lectina de *Bauhinia pentandra* em goma de Guar esse tempo é reduzido para 1 hora, podendo representar uma aumento na relação oligômero / monômero, e assim ter-se-ia as moléculas passíveis de aglutinação em maior número, uma vez que para acontecer hemaglutinação é necessário que a lectina apresente pelo menos dois sítios para carboidratos.

5.2. Conteúdo de Carboidrato da LBp

A eletroforese (não mostrada) revelada para glicoproteínas com o reagente “PAS – stain” (Ácido Periódico / Schiff) revelou uma banda para a LBp indicando que está possui carboidrato em sua estrutura, sendo portanto uma glicoproteína. Este dado foi confirmado usando o método de Dubois *et al.*, (1956) que mostrou o conteúdo de 13% de carboidrato neutro da LBp tendo como base o monossacarídeo glucose.

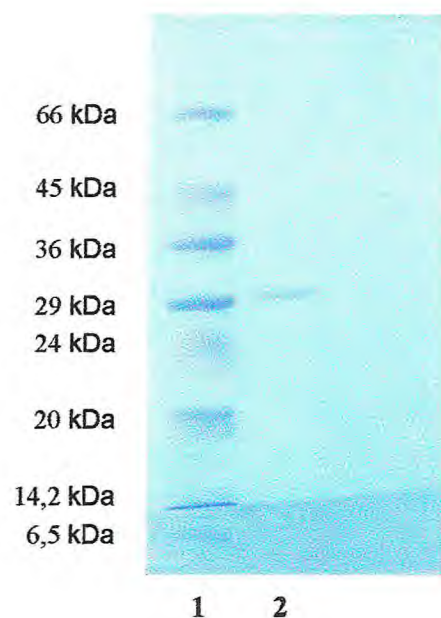


FIGURA 05: PAGE-SDS da LBp purificada em superdex 75. Poços: 1- padrões: BSA 66 kDa, ovoalbumina 45 kDa, gliceraldeído-3P 36 kDa, anidrase carbônica 29 kDa, tripsinogênio (pâncreas bovino) 24 kDa, Inibidor de tripsina 20 kDa, α -lactoalbumina 14,2 kDa, aprotina 6,5 kDa; 2 – Pico I de LBp.

5.3. Determinação da massa molecular da LBP

A massa molecular da LBP foi determinada utilizando-se os dados de eluição desta na cromatografia de exclusão molecular em Superdex 75. Os padrões utilizados foram os seguintes: blue dextran (1.000.000 Da), BSA (66.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), α -lactoalbumina (14.200 Da), riboflavina (3.000 Da) (FIGURAS 06 e 07). A equação da reta obtida para os padrões foi:

$$Y=3,25923 - 0,14672 X$$

Usando-se o volume 10,52 mL de eluição do pico I; e o volume 12,35 mL de eluição do pico II, obteve-se as seguintes massas moleculares aparentes para estas frações: aproximadamente 52 kDa para o pico I e 28 kDa para o pico II. Estas massas sugerem que a proteína pode comportar-se como dímero ou monômero. Obtivemos também em Superdex 200 acoplado a um sistema FPLC da Pharmacia uma massa molecular aparente de 30,2 kDa para a LBP sugerindo forma monomérica.

Várias lectinas de similar especificidade apresentam-se como oligômero. A massa molecular da lectina nativa de *Bauhinia purpurea* foi estimada para 100 kDa por filtração em gel Sephadex G-200 comparável com o valor de 120 kDa obtida em HPLC por exclusão molecular. Em condições desnaturantes a lectina de *Bauhinia purpurea* apresentou cadeia de 26 kDa indicando que esta proteína possui uma estrutura tetramérica (YOUNG *et al.*, 1985). A lectina de *Artocarpus incisa*, frutalina, é uma proteína oligomérica, encontra-se como tetrâmero em pH fisiológico, apresentando massa molecular aparente de aproximadamente 60 kDa (MOREIRA *et al.*, 1998). A lectina de sementes de *Erythrina speciosa*, galactose específica, apresenta massa molecular de 58 kDa em condições nativa e 27,6 kDa em SDS-PAGE indicando que a proteína comporta-se como dímero, estando de acordo com os resultados obtidos por espectrometria de massa (KONOZY *et al.*, 2003).

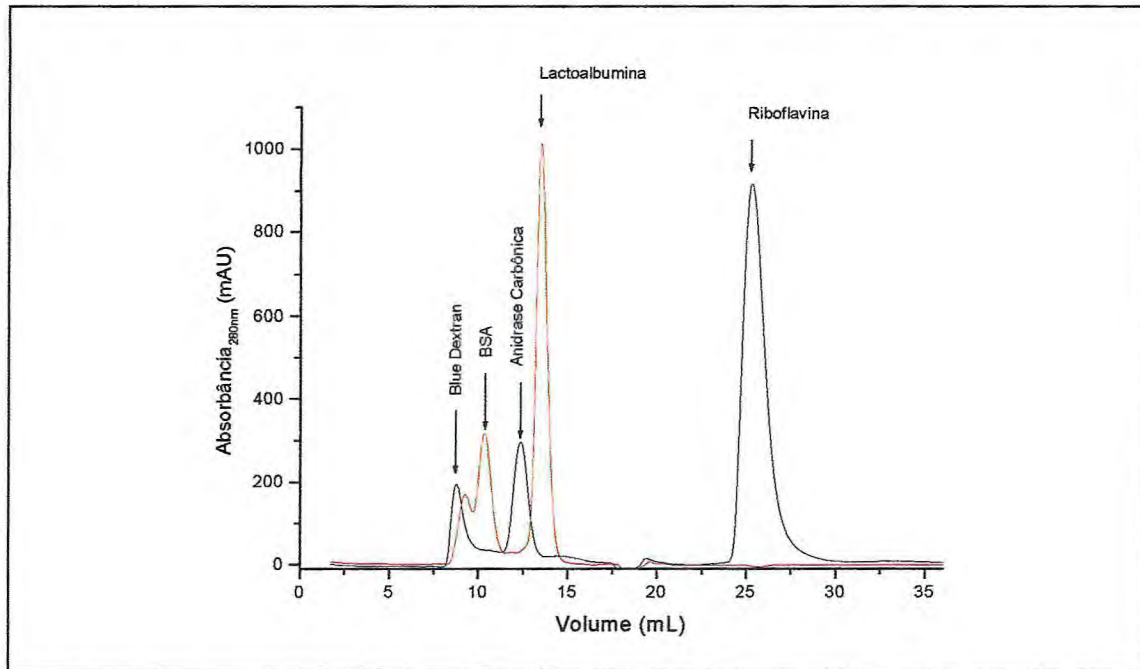


FIGURA 06 - Cromatografia em Superdex 75, em sistema ÄKTA da Pharmacia, dos padrões moleculares para determinação da massa molecular da LBp

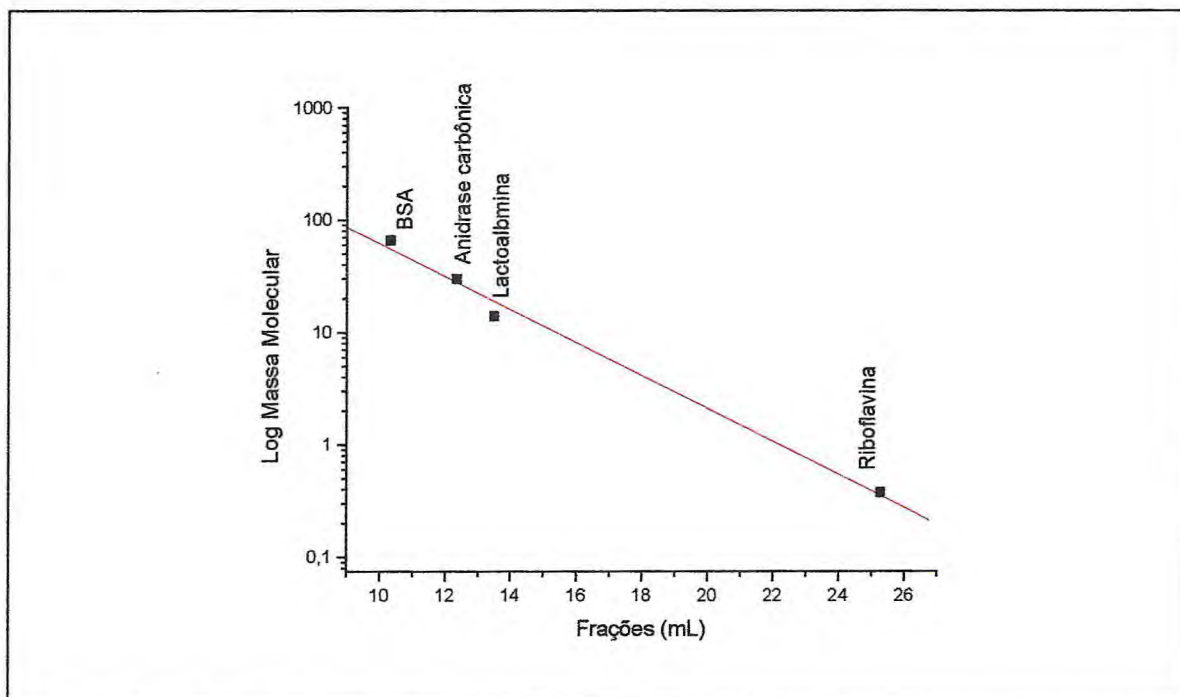


FIGURA 07 - Curva dos padrões de massa molecular

5.4. Ação de cátions divalentes sobre a atividade biológica da LBp

SILVA *et al.*, (2001) observaram que a atividade hemaglutinante da lectina contra eritrócitos de coelho reduziu drasticamente após diálise prolongada da lectina nativa contra EDTA 0,2 M seguido por diálise contra NaCl 0,15 M. Entretanto, a adição de Ca^{2+} e Mn^{2+} (1, 3, 5, 7 e 10 mM) para a lectina dialisada restaurou a atividade. A concentração ótima para hemaglutinação máxima foi entre 3 e 5 mM para ambos os cátions.

Assim, acreditava-se que esta lectina necessitasse da adição de cátions divalentes para manter ou até melhorar sua performance de atividade. Realizou-se então atividade hemaglutinante da LBp na presença e na ausência dos cátions divalentes cálcio e manganês na concentração de 5 mM. O resultado não apresentou diferença, sugerindo que os cátions divalentes adicionados não são primordiais para esta atividade. Esta observação associada aos resultados obtidos por SILVA *et al.*, (2001) sugerem que a LBp possui Ca^{2+} e Mn^{2+} fortemente ligados e que os processos de extração e purificação não são suficientes para eliminá-los em quantidades significativas. Estes são fundamentais para manter a atividade hemaglutinante da LBp, sendo também suficientes não havendo a necessidade da adição de cálcio e manganês para obter-se a atividade hemaglutinante máxima promovida por esta lectina.

KONOZY *et al.*, (2003) cita um trabalho de GERALDO (1986) sobre exaustiva diálise da lectina de *Erythrina rubrinervia* contra agentes quelantes de metal que não acarretaram nenhuma mudança no título da hemaglutinação. Estes resultados levaram a concluir que os íons metálicos estão firmemente ligados à lectina ou eles não são cruciais para sua atividade hemaglutinante. Podemos então, sugerir que os íons metálicos da LBp, ao contrário da lectina de *Erythrina rubrinervia*, são sensíveis à ação de diálise com quelantes, todavia estes íons incorporados à lectina durante sua síntese são cruciais para sua atividade. Semelhante a LBp uma nova lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* – TEL (FREIRE *et al.*, 2002) necessitou de Ca^{2+} (2,5 – 10 mM) para sua atividade; similar comportamento tem sido observado para as lectinas antifúngicas isoladas de *Gastrodia elata* (XU *et al.*, 1998) e *Sphenostyles* sp. (MACHUKA *et al.*, 1999).

5.5. Caracterização Estrutural da Lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*

A determinação do N-terminal desta lectina, através da degradação de Edman, em sequenciador automatizado de proteínas, não foi efetivo, uma vez que, após várias tentativas concluiu-se que o N-terminal da LBp encontra-se bloqueado.

5.5.1. Espectros de CD e Estimativa da Estrutura Secundária por Dicroísmo Circular

O espectro de dicroísmo circular (CD) foi determinado para os picos I e II da lectina, diluída em PBS 0,15 M, pH 7,4 e água. O espectro do pico I da LBp, eluído da coluna de Superdex 75 (FIGURA 08) foi caracterizado por uma banda negativa com mínimo de 221,2 nm, cruzando a abscissa de valores negativos para valores positivos em 197,6 nm. O espectro do pico II da LBp é praticamente idêntico ao do pico I (FIGURA 08). Estes espectros assemelham-se aquele apresentado pela lectina de semente de *Bauhinia purpurea* (YOUNG *et al.*, 1985) no que diz respeito a presença de uma única banda, sendo esta negativa e pelo forte conteúdo de estrutura folha- β .

O conteúdo das frações de estrutura secundária da LBp foi estimado usando o programa Selcon 2. Este programa é um método de desconvolução, ou seja, extrai as componentes comuns de um grupo de espectros calculando assim suas curvas básicas. Teoricamente a partir da combinação destas curvas básicas pode-se obter qualquer curva contida no grupo de espectros. A este grupo de espectros dá-se o nome de espectros de referência (SREERAMA, 1993). O conteúdo de estrutura secundária dos picos I e II da LBp, foram de 8 % de α -hélice, 55 % de estruturas folha- β , 30 % de volta- β e 7 % de outras contribuições, com um RMS (desvio médio quadrático) de 2 %. Estes dados corroboram para explicar o fato de que se trata da forma monomérica e dimérica da LBp. Esta lectina tem um conteúdo de frações de estrutura secundária próximo aquele apresentado pela lectina de sementes de *Bauhinia purpurea* N-acetil-D-galactosamina específica com alto teor de estruturas beta (β) e baixo conteúdo de estrutura alfa hélice. A desconvolução do espectro de CD da lectina de sementes de *Bauhinia purpurea* N-acetil-D-galactosamina específica indicou o seguinte conteúdo:

65 % de estruturas folha- β , 19 % de volta- β (β -turn) e/ou folha- β e nenhum percentual de α -hélice (YOUNG *et al.*, 1985). O conteúdo de estrutura secundária estimado para uma lectina extraída de fruto de *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc, também assemelha-se ao perfil da LBp em termos de estruturas alfa hélice e beta, apresentando: 10 % de α -hélice, 38 % de folha- β , 19 % de volta- β , 28 % de estruturas desordenadas e 6 % da conformação P_{II} (hélice poli-L-prolina II) (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Estas altas quantidades de estrutura folha- β são encontradas em uma ampla variedade de lectina de leguminosas (LORIS *et al.*, 1998).

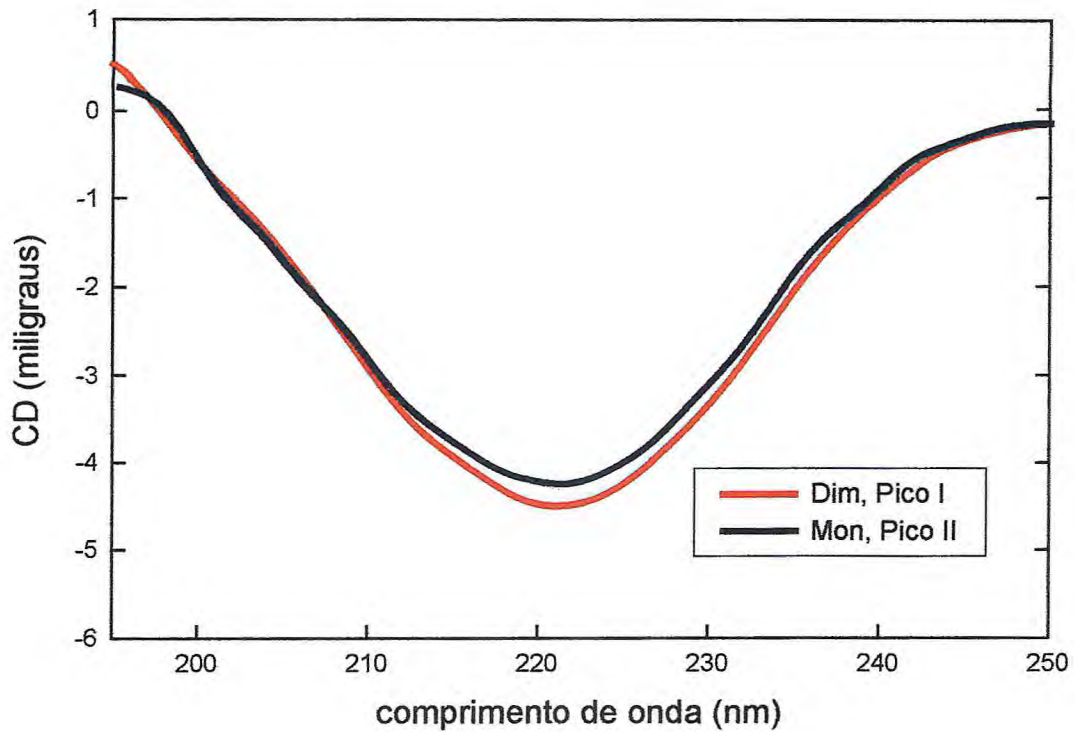


FIGURA 08 – Espectro de dicroísmo circular da LBp ($D.O_{280\text{ nm}}$ 0.320 a 0.360) diluída em PBS 0,15 M, pH 7,4. Os espectros foram gravados num intervalo de 195-250 nm à temperatura ambiente, 20 °C, com uma média de 16 varreduras em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho ótico. A estimativa do conteúdo de estrutura secundária foi calculada pelo programa Selcon 2.

5.5.2. Curva de termoestabilidade

Os espectros de dicroísmo circular das estruturas da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*, forma oligomérica, gravados num intervalo de 195 a 250 nm, com temperatura variando de 30 a 85 °C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos, com 8 varreduras mostra claramente o desaparecimento da forma nativa à medida que aumenta a temperatura, evidenciando a diferença nas curvas referentes a mínima e máxima temperatura em que foram realizadas as medidas (FIGURA 09).

Observou-se que a referida lectina mantém sua estrutura praticamente inalterada até 45 °C (FIGURA 10). A temperatura de transição está ao redor de 65 °C, nesta faixa de temperatura as percentagens de formas nativas e desnaturadas estão próximas e acima dessas temperaturas predomina a forma desnaturada. Para curva de transição o ponto monitorado foi 221 nm, obtendo-se uma curva sigmóide.

A termoestabilidade da LBp foi também acompanhada através de atividade hemaglutinante onde a solução de lectina (Pico II de extrato salino de sementes de *Bauhinia pentandra*, eluído de coluna de goma de Guar - forma oligomérica em maior concentração) em D.O. 280nm de 0,730 em NaCl 0,15M foi incubada em banho-maria (mod. Y28) – Grant às temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos. Alíquotas correspondentes a cada temperatura foram submetidas à avaliação da atividade hemaglutinante observando-se que a lectina foi estável até 40 °C (FIGURA 11), aos 55 °C a atividade havia sido perdida em mais de 80 %, sendo completamente inativada a partir de 70 °C. Estes dados estão de acordo com Silva *et al* ., 2001 que demonstrou a perda de atividade desta lectina aos 80 °C. Observa-se que a perda de mais de 80 % da atividade hemaglutinante ocorre 10 °C antes da temperatura de transição da estrutura, isto deve estar relacionado com alterações em torno do sítio de ligação da lectina em função do rompimento de interações fracas (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações de van der Waals, interações iônicas) motivado pelo aumento da energia térmica sobre estas moléculas.

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* apresenta-se com estabilidade térmica relativamente baixa (estável até 40°C) quando comparada com outras lectinas de leguminosas, que em geral estas são estáveis até 60 °C, mas todas são semelhantes no que diz respeito a perda da atividade total em torno de 80 °C (MACHUKA et al., 1999 ; OLIVEIRA et al., 2002; SUSEELAN et al., 2002).

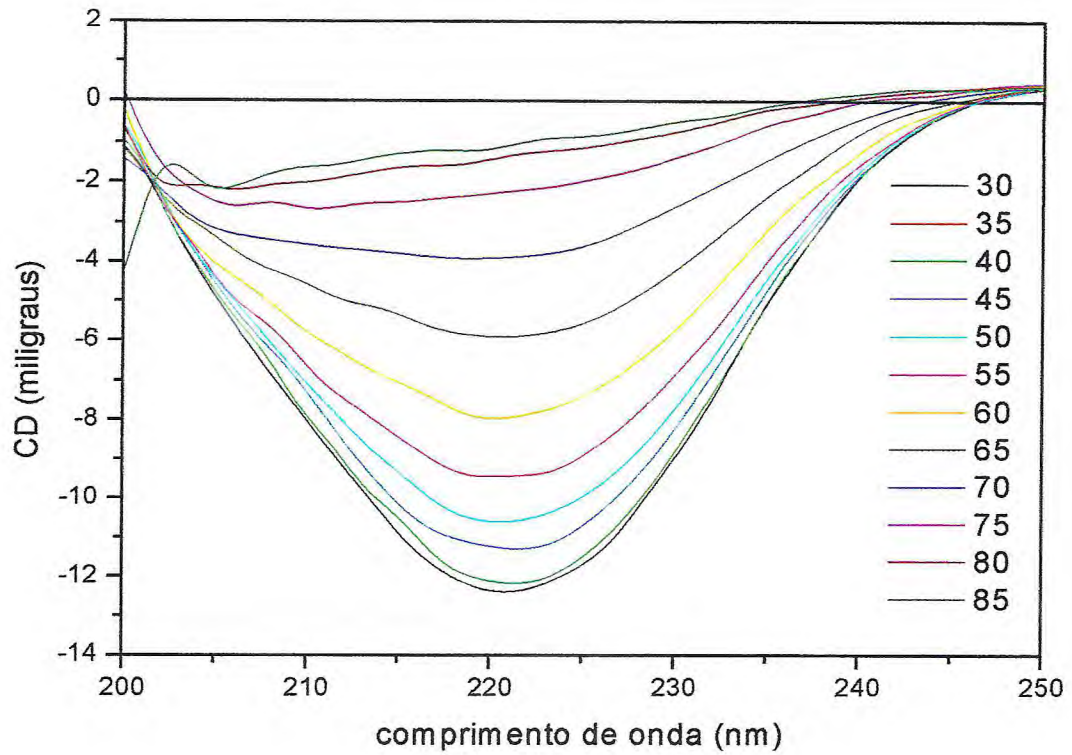


FIGURA 09 – Espectro de dicroísmo circular da LBp ($D.O_{280\text{ nm}}$ 0.320 a 0.360) diluída em PBS 0,15 M, pH 7,4. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 250 nm, com temperatura variando de 30 a 85 °C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos, com 8 varreduras, em uma cubeta cilíndrica de 0,1 cm de caminho ótico.

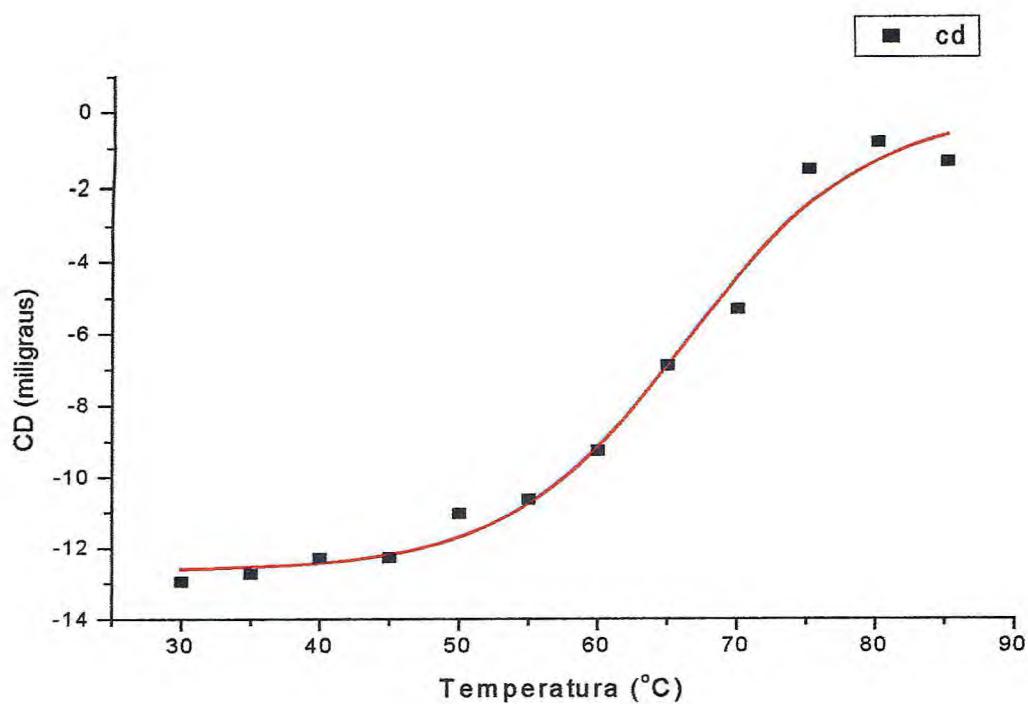


FIGURA 10 – Curva de termoestabilidade da estrutura baseada nos espectros de dicroísmo circular da LBp ($D.O_{280\text{ nm}} 0.320$ a 0.360) diluída em PBS $0,15$ M, pH $7,4$. Os espectros foram gravados num intervalo de 195 a 250 nm, com temperatura variando de 30 a 85 °C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos, com 8 varreduras, em uma cubeta cilíndrica de $0,1$ cm de caminho ótico. O ponto monitorado foi 221 nm.

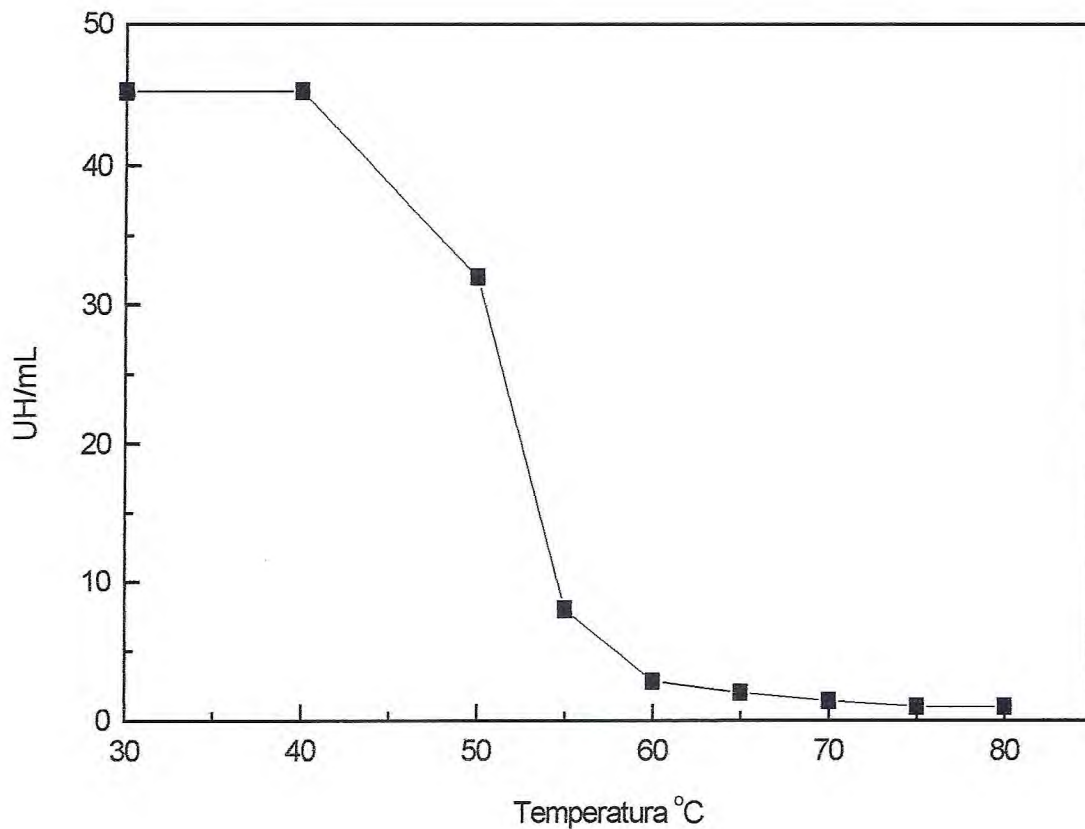


FIGURA 11 – Curva de termoestabilidade da atividade hemaglutinante onde a solução de lectina (Pico II de extrato salino de sementes de *Bauhinia pentandra*, eluído de coluna de goma de Guar - forma oligomérica em maior concentração) em D.O. $_{280nm}$ de 0,730 em NaCl 0,15M foi incubada em banho-maria (mod. Y28) – Grant às temperaturas de 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 e 80 °C, permanecendo em cada temperatura por 5 minutos. Alíquotas correspondentes a cada temperatura foram submetidas à avaliação da atividade hemaglutinante.

5.6. Fluorescência estática

A fluorescência é muito utilizada em proteínas pois estas possuem três fluoróforos naturais, tirosina, triptofano e fenilalanina. Os espectros de emissão dos resíduos de triptofano, por exemplo, podem refletir a polaridade do solvente que os envolve, e os espectros das proteínas são sensíveis às ligações de substratos, reações de associação e desnaturação. A sensibilidade dos supressores (agentes ou processos que diminuem a fluorescência de uma determinada substância) levam à determinação da acessibilidade dos resíduos de triptofano da proteína. Os experimentos com proteína são feitos com comprimentos de onda de excitação geralmente próximo ao máximo de absorção, que para fenilalanina este máximo é aproximadamente 260 nm, seu rendimento quântico é bem menor que o do triptofano. Então na região de 280 nm a fluorescência é devida à contribuição da tirosina e triptofano. Seus máximos de emissão em água são em 303 e 348nm respectivamente. Estes máximos são altamente sensíveis à polaridade de solvente. Desta forma o máximo de emissão das proteínas é dependente dos fatores que afetam à exposição dos fluoróforos ao solvente, levando então à dependência da estrutura tridimensional da proteína.

As medidas de emissão da fluorescência dos picos I e II da lectina de *Bauhinia pentandra*, foram realizadas a 20 °C com amostras diluídas em salina antes e após diálise contra EGTA. A concentração de proteína variando de 0,08 a 0,1 mg/mL e a absorvância das amostras, em 280 nm, não ultrapassaram 0,08, sendo excitadas em 280 nm e a emissão monitorada no intervalo de 295 a 450 nm.

Os espectros de emissão de fluorescência (FIGURAS 12 e 13) apresentaram perfil diferenciado quanto a presença e ausência de metais tanto para o pico I quanto para o pico II. Na presença de metais foi obtida uma menor intensidade na emissão de fluorescência em ambos os casos, sendo portanto obtido maior intensidade de emissão quando os picos foram dialisados exaustivamente contra EGTA. No caso do pico I a retirada do metal não provocou deslocamento sensível do máximo de emissão (de 329nm – 330nm). Entretanto, a diálise do pico II contra EGTA deslocou significativamente o máximo de emissão da fluorescência (de 317nm para 328nm).

Provavelmente a baixa intensidade da fluorescência em presença de metais seja ocasionada por uma supressão interna onde estes íons metálicos favorecem a estruturas tridimensionais que facilitam aos resíduos básicos localizados nesta região capturarem os elétrons emitidos. A diferença no máximo de emissão apresentada pelo pico II após o tratamento com EGTA, aumentando o máximo de emissão da fluorescência, evidencia as alterações ocasionadas na estrutura tridimensional da fração protéica do pico II pela ausência dos metais, tornando seus resíduos de triptofanos mais expostos ao solvente. Estes dados sugerem a necessidade dos metais intrínsecos para as estruturas nativas dos dímeros (PI) e dos monômeros (PII). O fato das alterações (no máximo de emissão) serem mais pronunciadas nos monômeros fortalece a idéia de que na ausência dos metais eles tornam-se mais vulneráveis a mudanças conformacionais.

A LBp apresenta em sua composição de aminoácidos 2,0 resíduos de triptofano e 4,2 resíduos de tirosina por 100 resíduos de aminoácidos (SILVA *et al.*, 2001). Outras proteínas com valores próximos a esses, exemplo a frutalina (MONTEIRO-MOREIRA, 2002) que possui 1,4 resíduos de triptofano e 5,8 resíduos de tirosina por 100 resíduos de aminoácidos (máximo de emissão em 328,5 nm), apresentam intensidade de fluorescência duas vezes maior que a LBp, todavia o conteúdo de aminoácidos básicos desta é aproximadamente 14%, enquanto que a frutalina é aproximadamente 11%. É possível que estes aminoácidos básicos se estiverem posicionados na estrutura próximo aos triptofanos e com a contribuição dos íons metálicos corroborem para uma supressão interna que leva a pouca intensidade da fluorescência da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*.

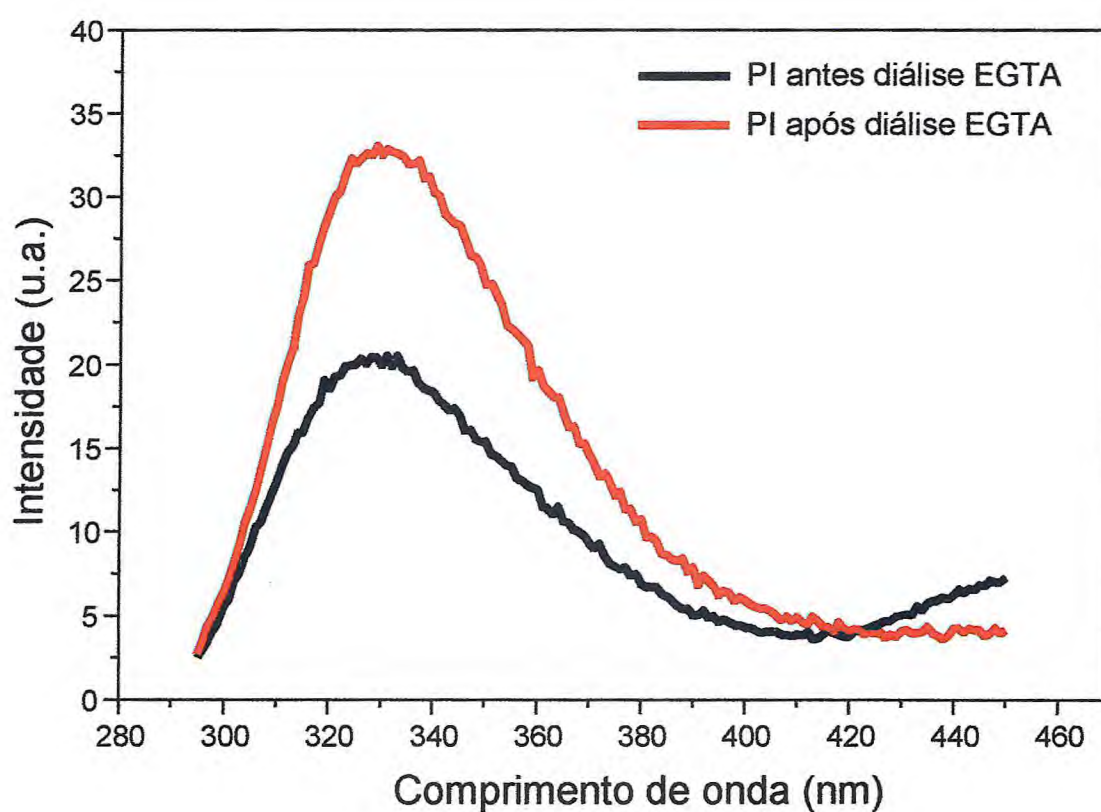


FIGURA 12 – Espectros de emissão de fluorescência pico I da LBp antes e após diálise contra EGTA, dissolvidos em salina, concentração de proteína variando de 0,08 a 0,1 mg/mL e a absorbância das amostras, em 280 nm, não ultrapassaram 0,08. As amostras foram excitadas a 280 nm, a 20 °C, e os espectros monitorados no intervalo de 295 a 450 nm.

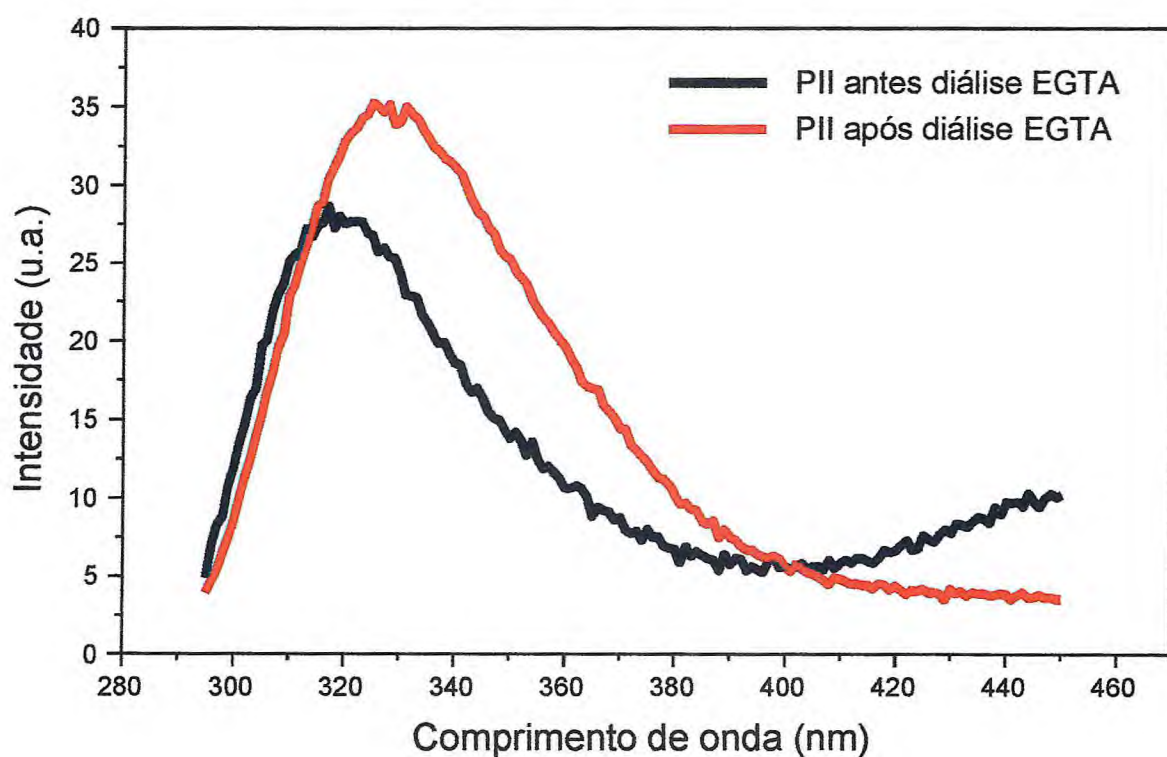


FIGURA 13 – Espectros de emissão de fluorescência pico II da LBP antes e após diálise contra EGTA, dissolvidos em salina, concentração de proteína variando de 0,08 a 0,1 mg/mL e a absorbância das amostras, em 280 nm, não ultrapassaram 0,08. As amostras foram excitadas a 280 nm, a 20 °C, e os espectros monitorados no intervalo de 295 a 450 nm.

5.7. Toxicidade aguda

O extrato da farinha de sementes de *Bauhinia pentandra* em NaCl 0,15 M foi injetado por via intraperitoneal em 3 grupos de animais nas concentrações de 1:5; 1:10 e 1:20 (m/v), e a lectina injetada em um grupo de animais em dose única na concentração de 2µg / g de peso de animal. Os camundongos foram observados por 72 horas, verificando-se 75% de morte no grupo de camundongos que receberam extrato da farinha na concentração de 1:5, após 24 horas. Os demais grupos não apresentaram morte. LUZ *et al.* 1995 verificou toxicidade aguda no extrato bruto da *Bauhinia forficata* que provocou morte em 50% dos animais na dose de 2,85 g/Kg de peso do animal, quando administrado por via intraperitoneal. A partir desse experimento podemos sugerir que o extrato da farinha de sementes de *Bauhinia pentandra* apresenta baixa toxicidade pois as mortes somente ocorreram numa dose de 6,6g/Kg, sendo esta toxicidade inferior aquela observada para *Bauhinia forficata*. A toxicidade decresce com a diluição da dose e não está relacionada com a lectina, haja vista que não foi registrada nenhuma morte no grupo de animais tratados com a lectina. Apesar da LBp ser uma lectina galactose específica, em termos de toxicidade ela difere de outras lectinas de plantas galactose específicas identificadas como tóxicas, como por exemplo lectinas de *Abrus pulchellus* fortemente inibida por galactose e açúcares derivados que são altamente tóxicas (RAMOS *et al.*, 1998). A especificidade por galactose tem sido uma característica muito preservada da RIPs tipo II, e a funcionalidade de seus sítios ligantes de carboidratos tem-se mostrado essencial para a internalização da toxina e endereçamento dentro da célula eucariótica (LORD *et al.*, 1994).

5.8. Indução da Migração de Neutrófilos *in vivo* para a Cavidade Peritoneal

Muitas lectinas vegetais tem sido investigadas quanto a capacidade de induzir migração de neutrófilos *in vivo* ou *in vitro*. Estes estudos tem chegado a resultados interessantes a respeito da interação célula-lectina demonstrando que pequenas diferenças na seqüência de aminoácidos próximo a região envolvendo a interação com açúcar poderiam afetar a especificidade fina de cada lectina para o mesmo receptor na membrana celular BARRAL-NETO et al. (1992). Assim as lectinas têm tornado-se ferramentas importantes a melhor compreensão da inflamação (BENTO *et al.*, 1993).

A fim de avaliar a capacidade da lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra* de induzir a migração de neutrófilos, 1 ml de solução de lectina em três doses diferentes todas suspensas em soro fisiológico (1^a dose: 10 µg/mL, 2^a dose: 30 µg/mL, 3^a dose: 60 µg/mL) foi injetada i.p. em ratos Wistar machos (180 a 200g). O controle negativo foi realizado usando o diluente (soro fisiológico) e para o controle positivo foi utilizado a carragenina na concentração de 300µg/animal. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e aproximadamente 5mL do exsudato peritoneal, foram removidos com auxílio de pipeta "Pasteur" para contagem total e diferencial das células.

Foi observado que a lectina induziu a migração de células totais para cavidade peritoneal, nas três doses administradas para esse tempo de 4 horas. A menor dose (10µg/mL) induziu uma migração 2,7 (vezes) superior à observada para o controle negativo, todavia foi 1,7 inferior ao controle positivo. A dose 30 µg/mL foi que apresentou a migração máxima sendo 5,9 superior à observada para o controle negativo e 1,2 maior ao controle positivo. A dose 60 µg/mL induziu uma migração 4,9 superior à observada para o controle negativo e não difere estatisticamente do controle positivo (FIGURA 14).

Lectina de soja (SBA), uma proteína presente em produtos alimentícios à base de soja crua, pode ligar-se às células epiteliais intestinais, e sendo nutricionalmente tóxico para a maioria dos animais. Estudos mostraram que SBA (5-200 µg/cavidade) injetado em cavidades diferentes de ratos induziu uma resposta inflamatória típica

caracterizada por exudação dose-dependente e migração de neutrófilo 4 h depois da injeção. Após administração intravenosa, a SBA aumentou o número de neutrófilos circulante e inibiu de maneira dose-dependente a migração de neutrófilo induzida por carragenina na cavidade peritoneal. Estes dados indicam que a lectina de soja induz reação inflamatória local mas tem um efeito anti-inflamatório quando presente na circulação sanguínea (BENJAMIN, *et al.*, 1997). Os resultados obtidos para LBp podem estar associados a um mecanismo semelhante aos resultados apresentados para SBA, onde a dose 60 µg/mL da LBp poderia estar sendo extravasada para a circulação, por isso apresentando menor migração de células em relação ao tratamento D2 (dose 30 µg/mL). Todavia na contagem diferencial de células observa-se uma migração de neutrófilo estatisticamente semelhante entre as doses D2 e D3 e controle positivo e uma menor migração de neutrófilo foi observado para D1 (FIGURA 15).

Outras lectinas têm apresentado resposta significativa na indução da migração de neutrófilos e células mononucleares. A lectina de sementes de *Talisia esculenta* induziu a migração de leucócitos para cavidade peritoneal e bolha de ar de forma dose (10-40µg) e tempo dependentes. Para neutrófilos a resposta máxima foi observada 16 horas após a injeção de lectina, enquanto o acúmulo máximo de células mononucleares ocorreu após 24 horas, retornando aos níveis do controle após 72 horas da injeção (FREIRE *et al.*, 2003).

A frutalina lectina galactose específica obtida de sementes de *Artocarpus incisa* é uma glicoproteína que apresentou atividade indutora de migração de neutrófilos *in vivo*, demonstrado nos ensaios realizados na cavidade peritoneal de ratos (ROCHA, 2003).

A lectina galactose específica obtida de sementes de *Vatairea macrocarpa* induziu a migração de neutrófilo em ratos por um mecanismo indireto, não envolvendo os mediadores lipoxigenase, cicloxigenase ou fator ativador de plaquetas. Sua ação deve estar relacionada com mediadores pro-inflamatórios ainda não identificados. A migração promovida pela lectina galactose/N-acetilgalactosamina específica de *Vatairea macrocarpa* foi parcialmente bloqueada na presença de galactose. Estes achados indicam que essas lectinas podem ser usadas, como ferramentas para

entender melhor os mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias (ALENCAR *et al.*, 2003).

A migração direcionada de células sangüíneas para o tecido perivascular, é uma característica do processo inflamatório, que tem como pré-requisito a adesão de leucócitos ao endotélio vascular (COLDITZ, 1985). A adesão de leucócitos ao endotélio durante a resposta inflamatória tem sido bem estudada em base molecular desde as interações adesivas entre neutrófilos e células endoteliais que ocorrem no interior dos vasos até a transmigração destas células.

A migração de leucócitos acontece por alterações do lúmen, diapedese e quimiotaxia. Moléculas Celulares de Adesão (CAM) junto com moléculas sinalizadoras formam a “cascata adesão célula leucócito-endotélio”, que participam do processo de extravasamento que acontece na vênula. Estes processos de quatro passos acontecem subsequentes a ativação endotelial. No primeiro passo ocorre o extravasamento em que o leucócito “amarrando” e “rolando” ao longo da parede vascular reduz a velocidade do leucócito. No segundo passo ocorre a “adesão firme”, conduzindo a uma apreensão do leucócito. No terceiro passo, a “diapedese”, que constitui-se no processo de migração do leucócito pela parede endotelial. E finalmente ocorre o movimento de leucócito ao longo do gradiente quimiotático para o local da inflamação (SOETHOUT *et al.*, 2002)

Os neutrófilos, inicialmente, são o tipo de células predominantes considerando que macrófagos se tornam mais abundantes depois (ARRUDA *et al.*, 2003). A capacidade do neutrófilo orientar sua locomoção ao longo do gradiente da molécula indutora de migração é denominada quimiotaxia; nessa situação os neutrófilos alteram sua forma, tornando-se morfológicamente orientados em direção ao gradiente, sendo a posição do neutrófilo dependente do padrão de receptor de membrana e da concentração de quimiocina presente no meio, implicando que os neutrófilos sejam capazes de detectar o gradiente através de uma resposta espacial, e não temporal (ROITT *et al.*, 1999).

Para avaliar a influência de carboidratos sobre a atividade pró-inflamatória da lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*, induzida na cavidade peritoneal de ratos, os animais receberam as amostras via intraperitoneal (i.p)

cuja concentração utilizada de lectina foi de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a qual foi incubada com três diferentes concentrações de galactose 0,05 M, 0,10M e 0,15M por 30 minutos antes. Após 4 horas, os animais foram sacrificados e procedida a contagem total e diferencial das células. Foi observado que ocorreu uma inibição em mais de 80% da indução da migração das células totais, sendo que a dose contendo galactose 0,10 M apresentou maior inibição (FIGURA 16), destacando-se discretamente em relação as outras doses. A contagem diferencial mostrou inibição da migração de neutrófilos a partir da concentração de galactose 0,10 M (FIGURA 17), aproximadamente 11%. Estes dados sugerem que a migração de células para cavidade peritoneal induzida pela LBp está associado aos sítios de ligação a carboidrato.

Tem sido demonstrado que muitas lectinas de leguminosa glucose-manose ligante estimulam efeitos pro-inflamatórios mediados por seus sítios ligantes de monossacarídeos. Acredita-se que a lectina galactose específica de *Vatairea macrocarpa*,(VML), deve produzir efeito similar no reconhecimento de células através de receptores distintos na superfície celular. Foi observada inibição na migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por VML, quando esta encontrava-se na presença de α -D-galactose 0,1 M, um conhecido inibidor desta lectina (ALENCAR *et al.*, 2003).

Nesse contexto as lectinas ligantes de galactose são de interesse particular. Estas lectinas foram identificadas em células animais como componentes da membrana de macrófago, linfócitos e hepatócitos, também como proteínas solúveis em vários órgãos de muitas espécies. Foram investigados os papéis funcionais destas proteínas, e muitas delas parecem participar do sistema imune e eventos fisiopatológicos. Reconhecimento de carboidrato célula-específica tem sido utilizado para mediar, pelo menos em parte, a adesão das células no endotélio vascular e a migração de leucócitos para tecidos inflamados. Uma lectina galactose-ligante liberada por macrófago ativado foi identificado como um atraente específico para neutrófilo *in vivo* e *in vitro*. Assim, estudar a interação de proteína-carboidrato envolvida na migração de leucócitos durante a resposta inflamatória seria útil para identificar lectinas exógenas que

apresentem características semelhantes das lectinas endógenas e que minimizam o efeito da lectina endógena (BENJAMIN, *et al.*, 1997).

O efeito de moduladores farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzido por LBp para cavidade peritoneal, foi observado em ratos machos que receberam via intraperitoneal (i.p) uma solução de lectina 30 µg/mL suspensas em soro fisiológico, sendo um grupo tratado previamente (30 minutos) com 0,5 mL de talidomida (80 mg/Kg por via oral) e outro com 0,5 mL de pentoxifilina (80 mg/Kg por via oral). Foi observada uma inibição do efeito da lectina a níveis próximos ao controle negativo pelos dois fármacos na contagem de células totais (FIGURA 18). Entretanto, não foi observado diferença estatística na inibição causada pela pentoxifilina ou talidomida. Efeito semelhante foi observado para inibição da migração de neutrófilos (FIGURA 19).

A pentoxifilina tem efeitos inibidores em vários mecanismos inflamatórios, incluindo a cascata do complemento, aderência dos neutrófilos e produção de citocinas (GILMAN *et al.*, 1996). Enquanto a talidomida age como inibidor seletivo TNF- α (fator de necrose tumoral) (MOREIRA *et al.*, 1993).

Acredita-se que os primeiros estágios do processo inflamatório, induzido por estímulos diferentes, o controle da migração de neutrófilos tenha como participantes as células residentes como macrófagos, mastócitos, e linfócitos. Este controle é mediado via liberação de fatores quimiotáticos como leucotrienos (RANKIN *et al.*, 1990), componentes do sistema complemento (WHALEY & FERGUSON, 1981), citocinas principalmente interleucina-1 (IL-1), IL-8, TNF- α (RANKIN *et al.*, 1990), e fator quimiotático de neutrófilo derivado de macrófago (MNCF) (CUNHA & FERREIRA, 1986). Em reações inflamatórias induzidas por estímulo exógenos tais como carragenina e lipopolisacarídeos ou por mediadores quimiotáticos com IL-1 ou TNF- α , os quais induzem a migração de neutrófilos por mecanismos indiretos, acredita-se que os macrófagos residentes são requeridos para o controle do recrutamento de neutrófilos (FACCIOLI *et al.*, 1990).

Nesse contexto a migração de neutrófilos induzida pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra* parece ocorrer por um mecanismo indireto, provavelmente via liberação de citocinas produzidas por macrófagos, haja visto

que pentoxifilina e talidomida inibiram a migração de forma indiferenciada. Semelhantes resultados foram obtidos para a lectina galactose específica de *Vatairea macrocarpa* (ALENCAR *et al.*, 2003).

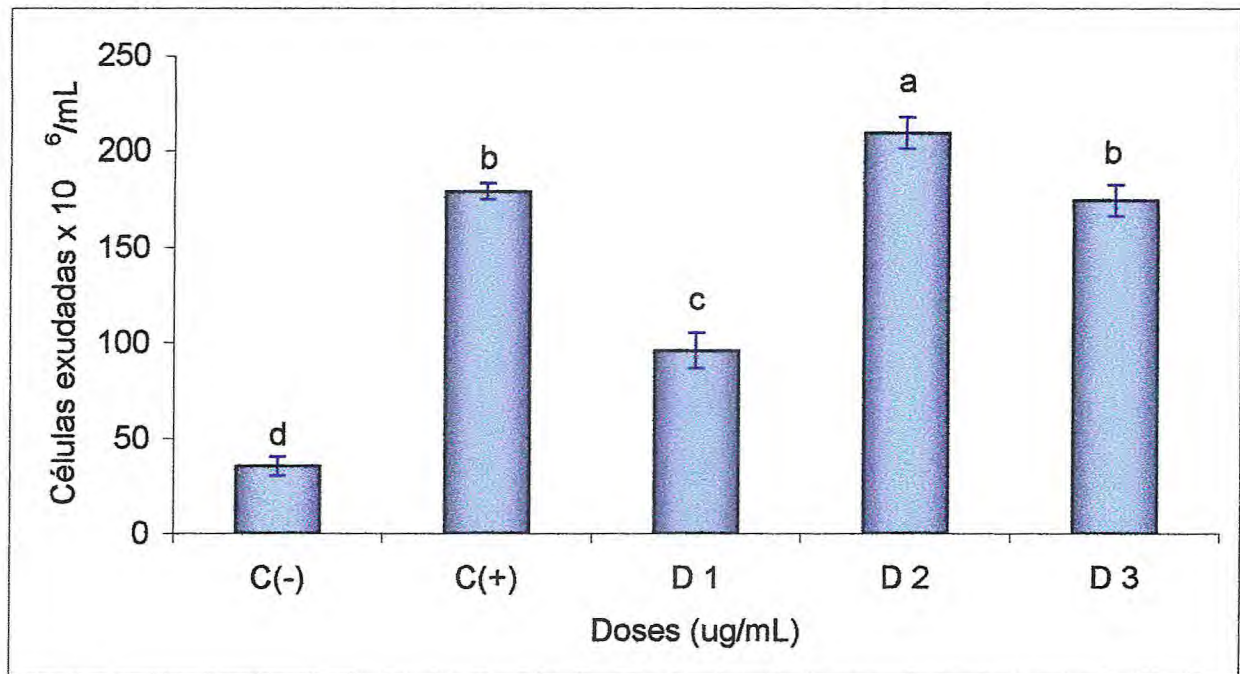


FIGURA 14 – Indução da migração de células totais, *in vivo*, para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*. A lectina foi dissolvida em soro fisiológico controle negativo - C(-). Carragenina (300 μ g/cavidade) foi usada como controle positivo – C (+). As doses administradas foram: D1 - 10 μ g; D2 - 30 μ g e D3 - 60 μ g. A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses (μ g/mL).

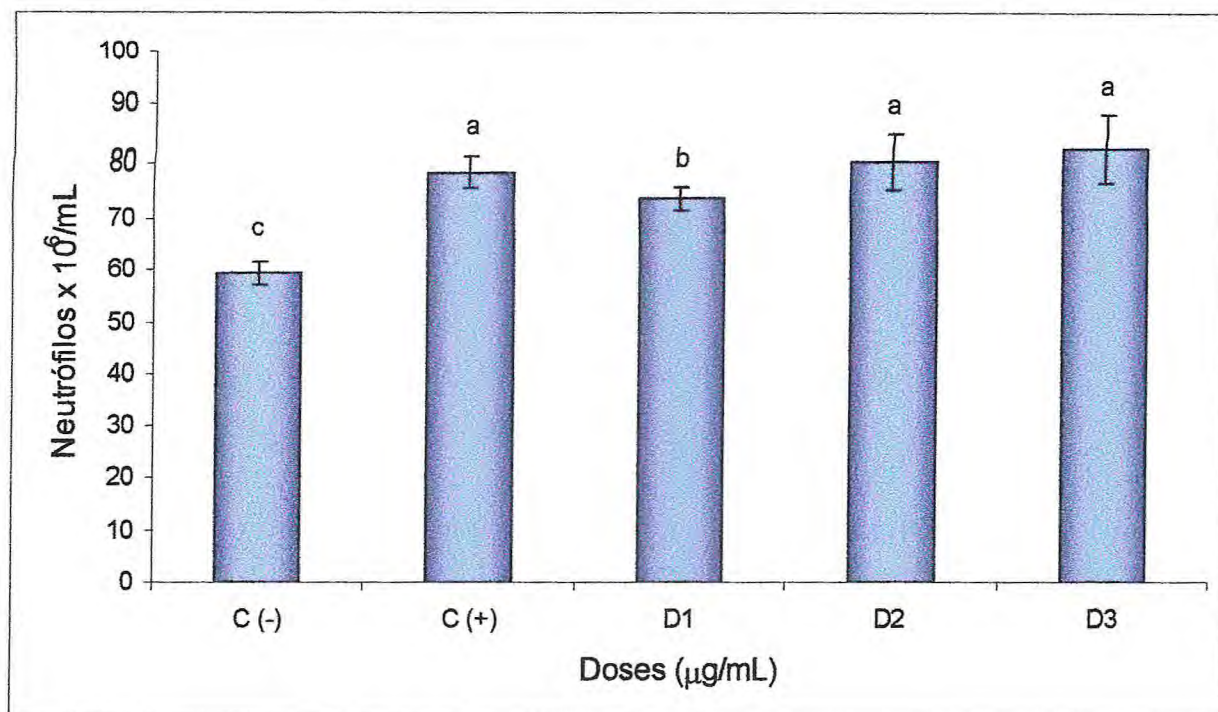


FIGURA 15 – Indução da migração de neutrófilos, *in vivo*, para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*. A lectina foi dissolvida em soro fisiológico controle negativo - C(-). Carragenina (300 µg/cavidade) foi usada como controle positivo – C (+). As doses administradas foram: D1 - 10µg; D2 - 30µg e D3 - 60µg. A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Doses (µg/mL).

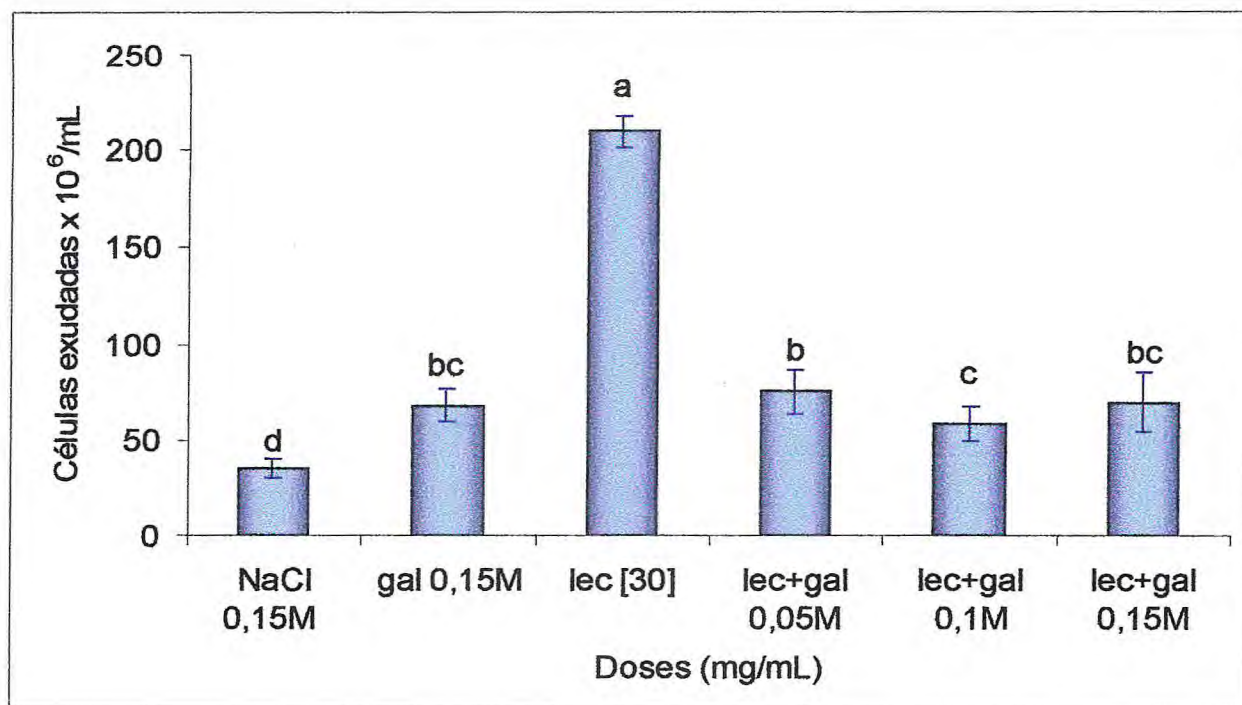


FIGURA 16 – Indução da migração de células totais, *in vivo*, para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*, em presença de galactose. A lectina foi dissolvida em soro fisiológico na presença ou ausência de galactose. Controles negativos: salina e galactose 0,15M. A lectina foi usada na concentração de 30 µg/mL, e as concentrações de galactose incubadas com a lectina foram 0,05 M, 0,10 M e 0,15 M. A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

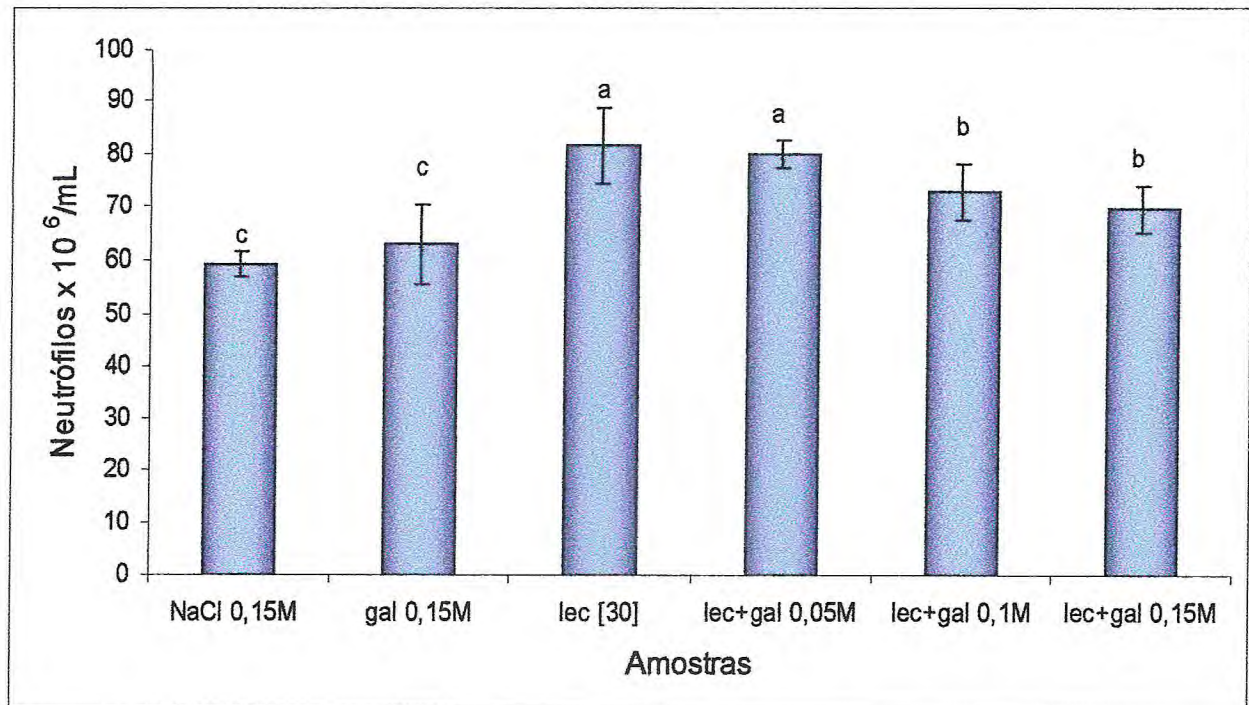


FIGURA 17 – Indução da migração de neutrófilos, *in vivo*, para a cavidade peritoneal de ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*, em presença de galactose. A lectina foi dissolvida em soro fisiológico na presença ou ausência de galactose. Controles negativos: salina e galactose 0,15M. A lectina foi usada na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, e as concentrações de galactose incubadas com a lectina foram 0,05 M, 0,10 M e 0,15 M. A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

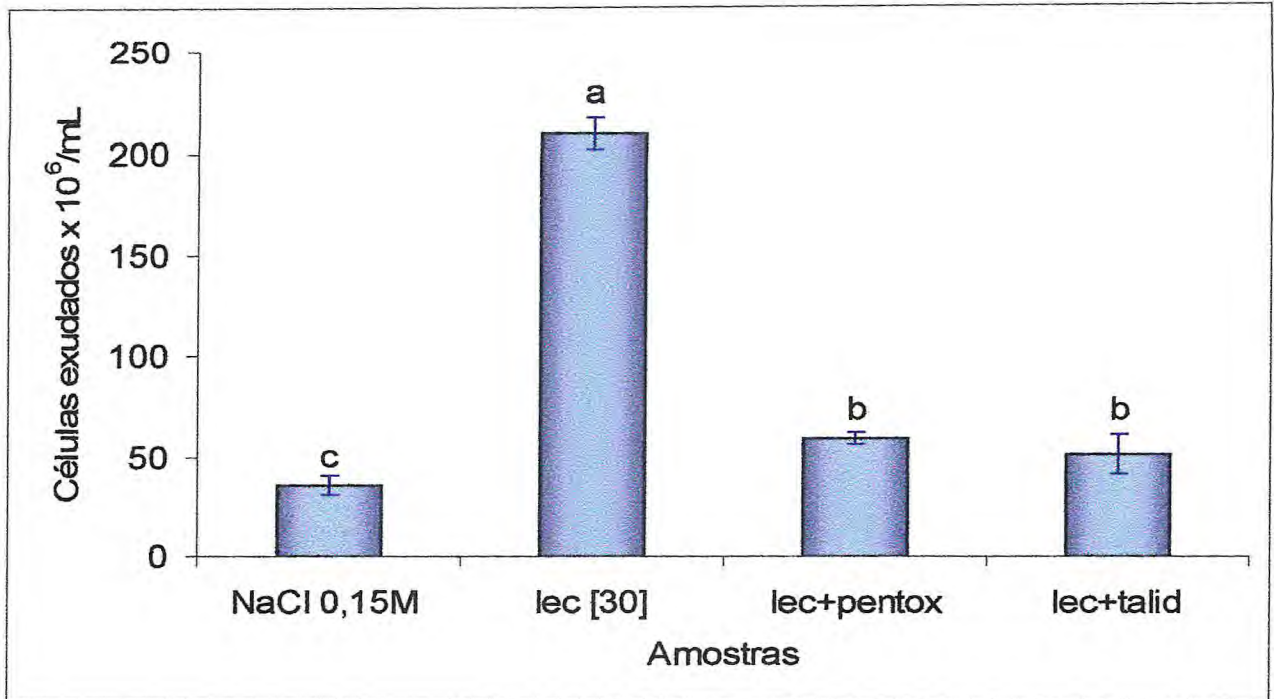


FIGURA 18 – Efeito de moduladores farmacológicos sobre indução da migração de células totais, *in vivo*, para a cavidade peritoneal de ratos machos (150 – 170 g), que receberam uma injeção intraperitonealmente (i.p) de solução de lectina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suspensas em soro fisiológico, sendo um grupo tratado previamente (30 minutos) com 0,5 mL de talidomida (80 mg/Kg por via oral) e outro com 0,5 mL de pentoxifilina (80 mg/Kg por via oral). Para controle negativo foi usado o diluente (soro fisiológico) 1 mL (i.p). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

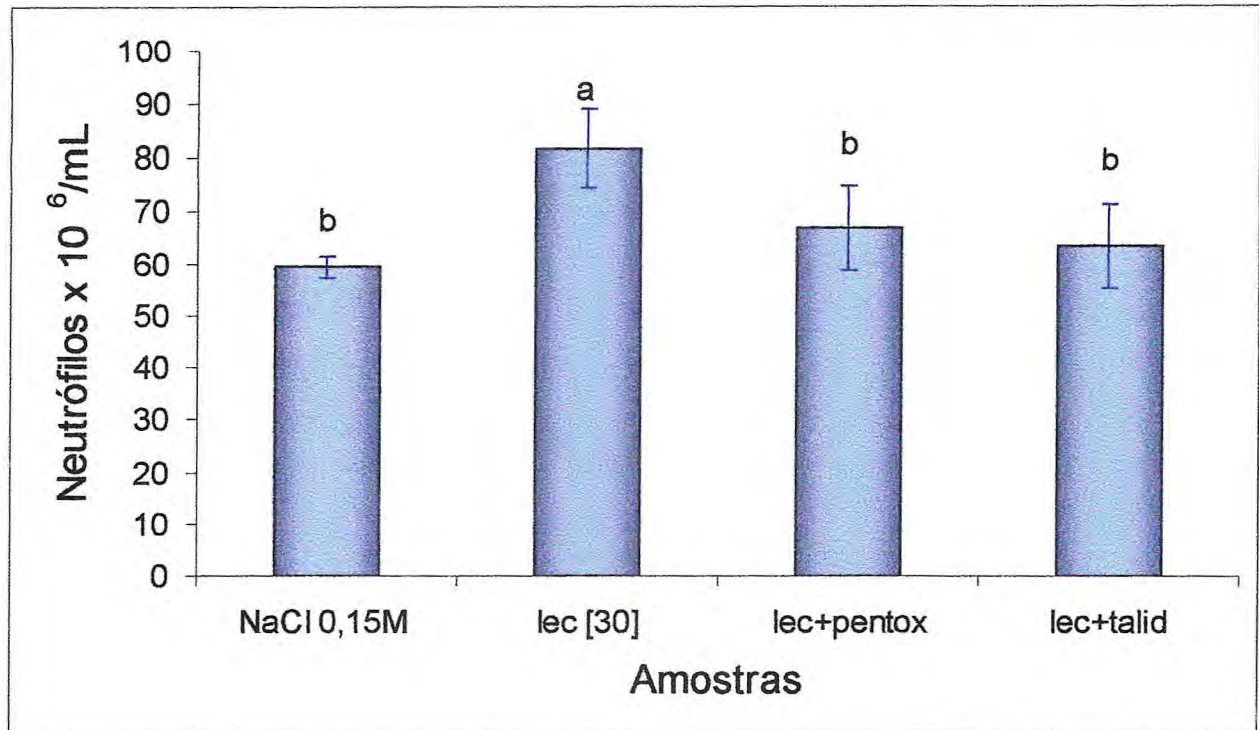


FIGURA 19 – Efeito de moduladores farmacológicos sobre indução da migração de neutrófilos, *in vivo*, para a cavidade peritoneal de ratos machos (150 – 170 g), que receberam uma injeção intraperitonealmente (i.p) de solução de lectina 30 μ g/mL suspensas em soro fisiológico, sendo um grupo tratado previamente (30 minutos) com 0,5 mL de talidomida (80 mg/Kg por via oral) e outro com 0,5 mL de pentoxifilina (80 mg/Kg por via oral). Para controle negativo foi usado o diluente (soro fisiológico) 1 mL (i.p). A migração foi avaliada 4 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

5.9. Indução de edema de pata

O edema de pata foi induzido em ratos, machos (150 – 170 g), divididos em grupos de 6 animais, que receberam uma injeção subplantar, 0,1 ml de solução de lectina, carragenina e galactose suspensas em soro fisiológico, na pata posterior esquerda. Os grupos receberam as seguintes soluções: grupo 1 soro fisiológico, grupo 2 carragenina 1%, grupo 3 lectina 30 µg/mL, grupo 4 carragenina 1% + lectina 30 µg/mL. grupo 5 lectina 30 µg/mL + D-galactose 0,1M.

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* induziu edema de pata em ratos Wistar com pico máximo entre 3 e 4 horas após a injeção subplantar da lectina. O edema provocado pela a LBp foi semelhante aquele apresentado pela carragenina usada como controle positivo e 5 vezes maior que o edema induzido pelo controle negativo. A LBp + carragenina induziu um edema estatisticamente semelhante para aqueles apresentados pelas duas amostras separadamente no tempos 2, 3 e 4 horas. A presença de galactose inibiu o edema induzido pela LBp parcialmente, algo em torno de 50%. Este resultado sugere que pelo menos parte da ação desta lectina em provocar o edema está associado aos sítios de ligação a carboidrato. (FIGURAS 20 e 21).

Semelhantes resultados foram obtidos por FREIRE *et al.*, (2003) com a lectina de sementes de *Talisia esculenta* manose específica, onde a inibição parcial do edema de pata foi observada quando a lectina foi administrada junto com D-manose 0,1 M, entretanto, não foi observado tal redução do edema quando a lectina foi incubada com D-glucose ou D-galactose. Estes resultados sugerem que o edema está relacionado as propriedades ligantes de açúcar específico da referida lectina.

O edema surge como consequência de vários eventos que ocorrem durante a inflamação aguda caracterizada por alteração vascular levando a um aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade e migração de leucócitos. Os sinais cardinais são dor, calor e rubor. O aumento da permeabilidade causado pela inflamação permite o extravasamento de um líquido rico em proteínas para o interstício. Este fato gera o acúmulo de líquido no interstício promovendo o edema. Além disso, ocorre

vasodilatação a qual leva ao aumento do fluxo sanguíneo caracterizando o calor e o rubor (ROITT *et al.*, 1999)

A migração de neutrófilos promovida pela lectina galactose/N-acetilgalactosamina específica de *Vatairea macrocarpa* observada em cavidade peritoneal, também manifestou-se através de edema de pata de ratos Wistar. Os resultados sugerem que a migração induzida por esta lectina ocorre por mecanismo indireto mediado por macrófago (ALENCAR *et al.*, 2003).

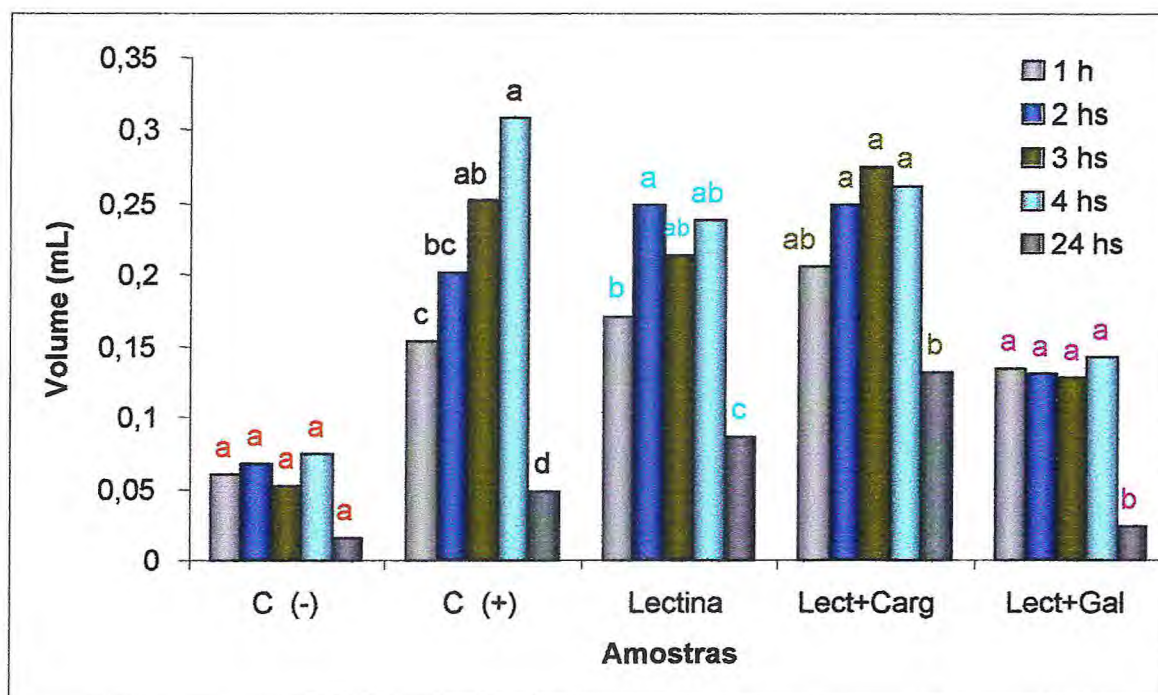


FIGURA 20 – Indução de edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*. A lectina foi dissolvida em soro fisiológico controle negativo - C(-). Carragenina (1%) foi usada como controle positivo – C (+). As amostras administradas foram: lectina - 30 μ g (LEC); lectina - 30 μ g + carragenina 1% (LEC+CARG) e lectina - 30 μ g + D-galactose 0,1 M (LEC+GAL). O edema foi avaliada 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Neste gráfico o teste de Tukey foi usado para avaliar médias de edema nos vários tempo para cada grupo.

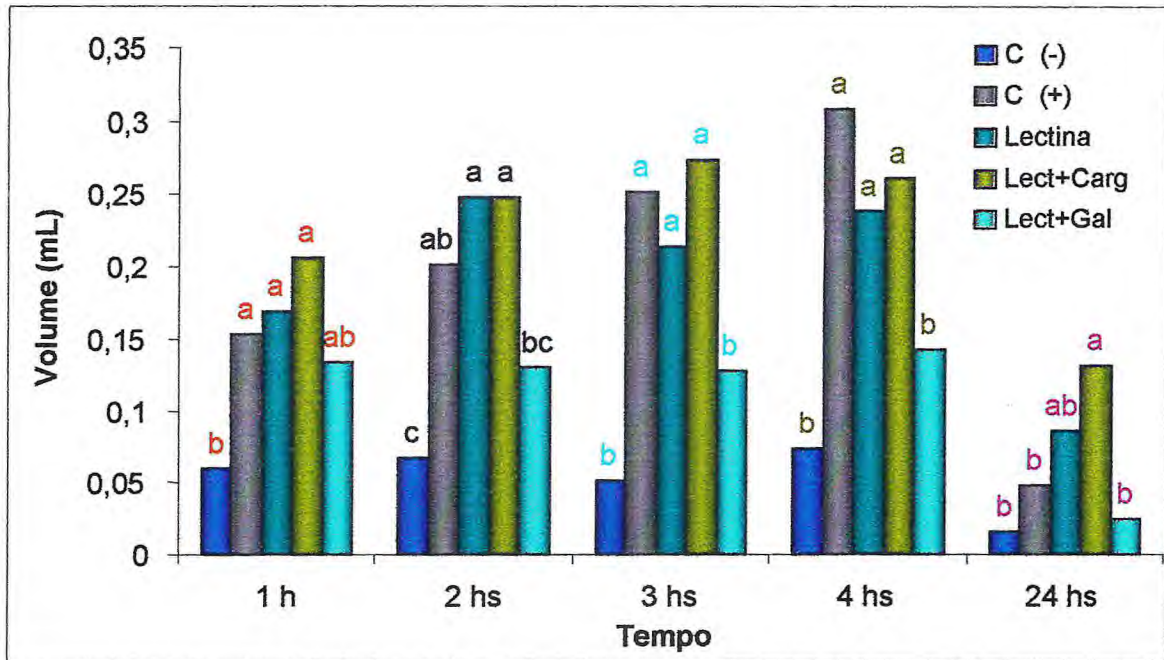


FIGURA 21 – Indução de edema de pata em ratos Wistar pela lectina galactose-específica de sementes de *Bauhinia pentandra*. A lectina foi dissolvida em soro fisiológico controle negativo - C(-). Carragenina (1%) foi usada como controle positivo – C (+). As amostras administradas foram: lectina - 30 μ g (LEC); lectina - 30 μ g + carragenina 1% (LEC+CARG) e lectina - 30 μ g + D-galactose 0,1 M (LEC+GAL). O edema foi avaliada 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a injeção das amostras. As medidas de mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Neste gráfico o teste de Tukey foi usado para avaliar médias de edema nos 5 grupos para cada tempo.

6. RESUMO DOS RESULTADOS

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*, LBp, foi purificada em Superdex 75 e apresentou dois picos com massas moleculares aparentes de 52 e 28 kDa. Estas massas sugerem que a proteína pode comportar-se como dímero ou monômero.

A LBp apresentou atividade hemaglutinante apenas para o pico I eluído da cromatografia em Seperdex 75.

A LBp é uma glicoproteína que apresenta um conteúdo de 13% de carboidratos neutros.

A LBp possui Ca^{2+} e Mn^{2+} intrínsecos e estes são fundamentais para manter a atividade hemaglutinante, sendo também suficientes não havendo a necessidade da adição de cálcio e manganês para obter-se a atividade hemaglutinante máxima promovida por esta lectina.

Os aminoácidos da porção N-terminal da lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* encontram-se bloqueados.

O conteúdo das frações de estrutura secundária da LBp estimado por CD usando o programa – Selcon 2 foi o seguinte: 8 % de α -hélice, 55 % de estruturas folha- β , 30 % de volta- β e 7 % de outras contribuições, com um RMS de 2 %. Os dois picos (I e II) da LBp apresentaram as mesmas frações de estrutura secundária.

A termoestabilidade da LBp avaliada por dicroísmo circular mostrou que esta lectina mantém sua estrutura praticamente inalterada até 45 °C, sendo a temperatura de transição ao redor de 65 °C e a curva apresentou formato sigmoidal. Quando avaliada por atividade hemaglutinante a lectina foi estável até 40 °C, aos 55 °C a atividade havia sido perdida em mais de 80 %, sendo completamente inativada a partir de 70 °C.

Os espectros de emissão de fluorescência apresentaram perfil diferenciado quanto a presença e ausência de metais tanto para o pico I quanto para o pico II. Na presença de metais foi obtida uma menor intensidade na emissão de fluorescência em ambos os casos, sendo portanto obtido maior intensidade de emissão quando os picos foram dialisados exaustivamente contra EGTA. No caso do pico I a retirada do metal não provocou deslocamento sensível do máximo de emissão. Entretanto, a diálise do pico II contra EGTA deslocou significativamente o máximo de emissão da fluorescência. Estes dados sugerem a necessidade dos metais intrínsecos para as estruturas nativas dos dímeros (PI) e dos monômeros (PII) pois na ausência dos metais eles tornam-se mais vulneráveis a mudanças conformacionais.

O extrato total de sementes de *Bauhinia pentandra* apresentou toxicidade aguda para camundongos na concentração 1:5 (m/v), entretanto esta reação não está relacionada com a LBp, uma vez que não ocasionou morte dos camundongos.

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* induziu a migração de células totais e neutrófilos para cavidade peritoenal, nas doses administradas (10, 30 e 60 µg/mL). Esta indução foi parcialmente inibida quando a lectina estava na presença de galactose.

O efeito de moduladores farmacológicos sobre a migração de neutrófilos induzido por LBp para cavidade peritoneal, indicaram que a migração parece ocorrer por um mecanismo indireto, provavelmente via liberação de citocinas produzidas por macrófagos, haja visto que pentoxifilina e talidomida inibiram a migração de forma indiferenciada.

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra* induziu edema de pata em ratos Wistar com pico máximo entre 3 e 4 horas após a injeção subplantar da lectina. O edema induzido pela LBp foi parcialmente inibido quando a lectina estava na presença de galactose .

7. CONCLUSÃO

A lectina galactose-ligante de sementes de *Bauhinia pentandra*, LBp, é uma glicoproteína de comportamento oligomérico cujos monômeros não apresentam atividade hemaglutinante mas bloqueiam a referida atividade dos dímeros, sendo a atividade hemaglutinante dependente de cátions intrínsecos bem como sua estrutura monomérica ou dimérica. Seu conteúdo de estrutura secundária é predominantemente β -folha. Estável até 40 °C, não tóxica, capaz de induzir edema de pata e migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos, provavelmente via liberação de citocinas produzidas por macrófagos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; STOCKER, M.; CONSTENLA, M.A. F.; Flavanoid and other constituents of *Bauhinia manca*. *Phytochemistry*, 27, 1835-1841; 1988.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 1674-1681; 2003.

ALLEN, A.K. A lectin from the exudate of the fruit of the vegetable marrow (*Cucurbita pepo*) that has a specificity for beta-1,4-linked N-acetylglucosamine oligosacchrides. *Biochem.J.*, 183(1):133-137; 1979.

ALLEN, A. K. & NEUBERGER, A. Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochem. J.*, 171: 665-674, 1978.

ALTER, G. M. & MAGNUSON, J. A. Characterization of concanavalin A sugar binding site by ¹⁹F nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, 13(19): 4038-4045, 1974.

ANATHARAM, V.; PATANJALI, S.R.; SWAMY, M.J.; SANADI, A.R., GOLDSTEIN, I.J.; SUROLIA, A. Isolation, macromolecular properties, and combining site of a chitooglycosaccharide-specific lectin from the exudate of ridge gourd (*Luffa acutangula*). *J. Biol. Chem.*, 261(31): 14621-14627; 1986.

ANDERSEN, N.H.; CAO, B.; RODRIGUEZ-ROMERO, A.; ARREGUIN, B. Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxic motif. *Biochem.*, 32: 1407-1422; 1993.

ARRUDA, V.A.; GUIMARÃES, A.Q.; HYSLOP, S.; ARAUJO, P.M.F.; BON, C.; ARAUJO, A.L. *AL Bothrops lanceolatus* (Fer de lance) venom stimulates leukocyte migration into the peritoneal cavity of mice. *Toxicon*. 41: 99-107, 2003.

BARBIERI, L., Batelli, G. B. & Stirpe, F. Ribosome-inactivating protein of plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1154:137-282. 1993.

BARONDES, S. H., Bifunctional properties of lectins; lectins redefined. **TIBS**, **13** (12): 480-482, 1988.

BARONDES, S.N. Lectins: their multiple endogenous cellular functions. **Anu. Rev. Biochem.** 50: 207-231; 1981 citado por KONOZY *et al.*, 2003.

BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S. B., BARRAL, A., MOREIRA, L. I. M., SANTOS, C. F., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* Tribe. **Immunol. Invest.**, **21** (4): 297-303, 1992.

BECKER, J. W., Reeke, G. N., Wang, J L., CunninGhem, B. A., & Edelman, F. M. The covalent structure of Concanavalin A III. Structure of the monmer and its internactions winh metals and saccharides. **J. Biochem.**, 250: 1513-1524; 1975

BEINTEMA, J.J. & PEUMANS, W.J. The primary structure of stinging nettle (*Urtica dioica*) agglutinin. A two-domain member of the hevein family, **FABS Letters**, 299 (2): 1311-134; 1992.

BENJAMIN C.F.; FIGUEIREDO,RC.; HENRIQUES, M.G.M.O. and BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical Research** (1997) 30: 873-881.

BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. & BARJA-FIDALGO, C. Estudy on endematogenic and leucocyte migratory effects of plant lectins. **Agents and actions**, 38, 48, 1993.

BLASCO, E.; NGOG, L.D.; AUCOUTURIER, P.; PREUD'HOMME, J.L. Mitogenic activity of new lectins from seeds of wild *Artocarpus species* from Vietnam. **C.R. Acad. Sci. Paris**, 319: 405; 1996.

BOURNE, Y. , Mazurier, J., Legrand, D., Rouge, P., Montreuil, J., Spik, G. & Cambillau, C.(.). Strutures of a legume lectim comploexid with the human lactotransforrim N2 fragment, and wnth na isolates biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety. **Struture**, 2(3): 209-219; 1994.

BOURNE, Y.; ABERGEL, C.; CAMBILLAU, C.; FREY, M.; ROUGÉ, P.; FONTENCILLA-CAMPS, J.C. X-ray crystal struture determination and refinement at 1.9Å resolution of isolectins I from the seeds of *Lathyrus ochrus*. **J. Mol. Biol.**, 214:571-584: 1990.

BROWN, R. D., BREWER, C. F. & KOENING, S. H. Conformation states of concanavalin A: kinetics of transitions induced by interaction with Mn²⁺ and Ca²⁺ ions. *Biochemistry*, 16(17): 3883-3896, 1977.

CARLINE C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539; 2002.

CECHINEL FILHO, V. & SILVA, K. L. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, vol. 25, n° 3, 449-454, 2002.

COELHO, L.C.B.B. & da SILVA, M.B.R. Simple method to purify miligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. *Phytochemical Analysis*. 11(5): 295-300, 2000.

COLDITZ, I.G. Margination and emigration of leukocytes. *Survey of Synthetic and Pathological Research*, 4, 44-68; 1985. Citado por ALENCAR *et al.* 2003.

CORDEIRO-CARLOS, E.R. Ação das enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina e quimotripsina) sobre a lectina de *Artocarpus incisa* (frutalina). Dissertação de Mestrado, 81p. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2000.

COSTA. F. H. F. Purificação e Caracterização Parcial de uma lectina mitogênica presente na Alga Marinha Vermelha *Amansia multifida* Lamouroux. Dissertação de Mestrado, 126p. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 1995.

CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S.H. The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *European Journal of Pharmacology*, 129, 65-76; 1986. Citado por ALENCAR *et al.* 2003.

DAMJANOV, I. Biology of disease. Lectin cytochemist and histochemistry. *Lab. Invest.*, 57: 5-20, 1987.

DAS, R. H., KALSI, G., BABU, C.R., DAS, H. R. Lectin activities in developing roots of peanuts (*Arachis hypogaea*). In: J. Basu, M. Kundu and P. Chakrabarti, Eds. *Lectins:*

Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry. Wiley Eastern Ltd., India vol 9 pp. 35-43, 1993.

DESAI, N. N., ALLEN, A. K. & NEUBERGER, A. Some properties of the lectin from *Datura stramonium* (thorn-apple) and the nature of its glycoprotein linkages. *Biochem. J.*, 197: 345-353, 1989.

DIAS-BARUFFI, M., ROQUE-BARREIRA, M. C., MARQUES-MOTA, D., MONTEIRO, A. C., CASTELO-BRANCO, C. C., BELTRAMINI, L. M., MOREIRA, R.A. Atividade Quimioatratante da Frutalina sobre Neutrófilos: Similaridade com Jacalina e Efeito de Mudanças na Estrutura Secundária da Lectina. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 20, 1995, Angra dos Reis-RJ, **Livro de Resumos**, p 96.

DONATO, A.M. Anatomia foliar e abordagem fitoquímica de *Bauhinia forficata* link. **Bradea** 6, 357-371. 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chem.**, 28(3): 350-356, 1956.

EDELMAN, G.M. & WANG, J. L. (1978). Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. *J. Biol. Chem.*, 253(9): 3016-3022, 1978.

ETZLER, M.E. in: ALAN, H.J.; KISAILLIUS, E.C. (Eds.), *Plant Lectins Molecular Biology, Synthesis, and Function*, Marcel Dekker, New York, 521-539; 1992;

FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration in vivo by indirect mechanisms. **Agents Actions**, 30, 344-349; 1990.

FARIAS, W. R. L. Purificação, Caracterização Parcial e Atividade Biológica da Lectina da Alga Marinha Vermelha *Meristielle echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson. Dissertação de Mestrado 104p. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 1995.

FISHER, J.; KLEIN, P.J.; VIERBUCHEN, M.; SKUTTA, B.; UHLENBRUCK, G. & FISHER, R. Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucose by

lectin. Histochemical distribution of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastric neoplasia. **J. Histochem. Cytochem.**, 32:681-689, 1984.

FREEMAN, H.J. Lectin histochemistry of 1,2-dimethyl-hydrazine induced rat colon neoplasia. **Journal Histochem. Cytochem.**, 31:1241-1245, 1983.

FREIRE, M.G.M.; DESOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E. and MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon** 42, 275-280; 2003.

FREIRE, M. G. M., GOMES, V. M., CORSINI, R. E., MACHADO, O. L. T., DE SIMONE, S. G., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S. AND MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.** 40: 61-68; 2002.

GABIUS, H. J. & GABIUS, S. Tumor lectinology: a glycobiological approach to tumor diagnosis and therapy. **Lectin Reviews**, 1991.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U. and WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**. 221, 35-47; 2001.

GERARDO, P. Purification and characterization of a lectin from the seeds of *erythrina costaricensis*. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 27: 857-863; 1986.

GATEHOUSE, A.M., POWELL, K.S., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., GATEHOUSE, J.A., 1995. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. In: Pusztai, A., Bardocz, S. (Eds.), *Lectins: Biomedical Perspectives*, Taylor & Francis, London, pp. 35-58. citado por CARLINE et al., 2002.

GIOANNINI, T; FOUCAUD, B; HILLER, JM; HATTEN, ME; SIMON, EJ. Lectin binding of solubilized opiate rece. **Biochemical & Biophysical Research Communications.**; 105:1128-1134; 1982.

GILMAN, G. A.; RUDDON, R.W.; MOLINOFF, P.B.; HARDMAN, J.G. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9ª edição, **The McGraw-Hill Companies**. 1996.

GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. What Should Be Called A Lectin? **Nature**, 285: 66, 1980.

GOMES, J. C., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Histamine release induced by glucose (manose) specific lectins isolated from brazilian plants. Comparison with concanavalin A. **Agents and Action**, 41: 132-135; 1994.

HARDMAN, K. D. & AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-A resolution. **Biochemistry**, 11(26): 4910-4919, 1972. Citado por Moreira 1998.

HARDMAN, K. D. & AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A-methyl alpha-D-mannopyranoside complex at 6-A resolution. **Biochemistry**, 15(5): 1120-1128, 1976. Citado por Moreira, 1998.

HOREJSI, V.; Tichá, M.; KOCOUREK, J. Studies of lectins XXXII. Application of affinity electrophoresis to the study of the interaction of lectins and their derivatives with sugars **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 499(2): 301-308; 1977.

IVORRA, M.D., PAYÁ, M., VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **Journal of Ethnopharmacology** 27, 243-/245; 1989.

KAPLOWITZ, P., HAAR, B. Antimitogenic actions of lectins in cultured human fibroblasts. **Journal Cell Physiology**, 136: 13-22, 1988. Citados por KULKARNI & McCULLOCH, 1995.

KARASAKI, Y.; TSUKAMOTO, S.; MISUZAKI, K.; SUGIURA, T. and GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research International** 34, 7-13; 2001.

KENNEDY, J. F., PAIVA, P. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L. C. B. B. Lectins, Versatile Proteins of Recognition: a Review. **Carbohydr. Polym.**, 24: 219-230, 1995.

KIYOTA, S. Lectina de sementes de *Dioclea grandiflora* Mart. Atividade Mitogênica e Indução da Produção de Interferon. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, 66p. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993.

KOCOUREK, J., FREED, O, L. J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** vol 7 p.295-298, Sigma Chemical Co. St. Louis, USA, 1990. Citados por KIYOTA, 1993.

KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. Defining a lectin, **Nature**, 290: 188; 1981.

KONAMI, Y., YAMAMOTO, K & OSAWA, T. & IRIMURA, T. The primary structure of the **Cytisus scoparius** seed lectin and a carbohydrate-binding peptide. **Biochem. J.**, 112: 366-375, 1992 a.

KONAMI, Y., YAMAMOTO, K & OSAWA, T. & IRIMURA, T. Correlation between carbohydrate-binding specificity and amino acid sequence of carbohydrate-binding regions of **Cytisus**-type anti-H(O) lectins. **FEBS Letters**, 304(2,3): 129-135, 1992b.

KONAMI, Y., YAMAMOTO, K & IRIMURA, T. Purification and characterization of carbohydrate-binding peptides from **Lotus tetragonolobus** and **Ulex europeus** seed lectins using affinity chromatography. **Journal of Chromatography**, 597: 213-219, 1992 c.

KONAMI, Y., YAMAMOTO, K & OSAWA, T. The primary structure of the two types of the **Ulex europeus** seed lectin. **Biochemistry. Journal.**, 109: 650-658, 1991a.

KONOZY, E.H.E.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L.J.; WARD, R.J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of **Erythria speciosa**. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 410, 222-229; 2003

KULKARNI, G. V., McCULLOCH, C. A. G. CONCANAVALIN a Induced Apoptosis in Fibroblasts: The Role of Cell Surface Carbohydrates in Lectin Mediated Cytotoxicity. **Journal of Cellular Physiology**, 165: 119-133, 1995.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-5, 1970.

LIENER, I. E.; TURNER, RH. The use of glutaldehyde treated erythrocytes for assaying the agglutinating activity of lectins. **Anal. Biochem.**, 68: 651-653, 1975.

LIENER, I.E. Heat-labile antinutritional factors. In: SUMMERFIELD, R. J. & BUNTING, A.H. (eds.) *Advances in Legumes Science*. London: Royal Botanical Gardens, 1(3):157-170, 1980.

LIENER, I. E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I. J., **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**, New York: Academic press, 600p.; 1986.

LIS, H. & SHARON, N., Lectins in higher plants. In MARCUS, A. ed. **The Biochemistry of plant**. A Comprehensive Treatise. Protein and Nucleic Acids. Academic Press, 6:371-447, 1981.

LIS, H., SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Ann. Ver. Biochem.** 55: 35-67, 1986.

LORENZSONN, V. & OLSEN, W. A. In vivo responses of rat intestinal epithelium to intraluminal dietary lectins. **Gastroenterology**, 82, 838-48, 1982. Citado por Pusztai, 1991.

LORD, J. M. , ROBERTS, L. M. AND ROBERTUS, J. D. Ricin: Structure, mode of action and some current applications **FASEB Journal** 8. 201-208; 1994. Citado por RAMOS *et al.*, 1998

LORIS, R., HAMELRYCK T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta** 1383:9-36; 1998.

LUZ M. M. S. Monografia de Especialização em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, 1995.

MACHUKA, J.S.; OKEOLA, O. ; VAN DAMME, J.M.; CHRISPEELS, M.J.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles steneocarpa* Harms. **Pytochemistry**, 51: 721-728; 1999.

MALIARIK, M & GOLDSTEIN, I. J. Photoaffinity labeling of the adenine binding site of the lectins from lima beans, *Phaseolus lunatus*, and the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **J. Biol. Chem.**, 263(23) 11274-11279, 1988.

MARBAN-MENDOZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSSEON, H.-B., DAMON JR., R.A. and ZUCKERMAN, B.M. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. **J. Nematol.** 19: 331-335; 1987.

MARIKOVSKY, Y., LOTAN, R., LIS, H., SHARON, N. & DANON, D. Agglutination and labeling density of soybean agglutinin on young and old human red blood cells. **Exp. Cell Res.**: 99:453-456, 1976.

MIRELMAN, D. In: *Microbial lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity*, pp.443, John Wiley and Sons, New York;1986. Citado por SINGH *et al.*, 1999.

MIYAKE, E.T., AKISUE, G., AKISUE, M.K. 1986. Pharmacognostic characterization of pata-de-vaca *Bauhinia forficata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 1, 58-68.

MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta pão (*Artocarpus incisa* L.) Tese Doutorado em Bioquímica, 113f. Tese Doutorado em Bioquímica – departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MOREIRA, R. A. Lectinas Vegetais. Uma Abordagem Química e Físico-Química. Tese de Titular. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 600pp. 1998.

MOREIRA, R. A., BARROS, A. C. H., ESTEWART, J. C. & PUSZTAI, A., Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. **Planta**, 158:63-69, 1983.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; KENDALL, A.; KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor α enhancing mRNA degradation. **Journal of Experimental Medicine**, 177, 1675-1680, 1993. Citado por ALENCAR *et al.*, 2003.

MOREIRA, R.A., CASTELO-BRANCO, C.C., MONTEIRO, A.C.O., TAVARES, R.O., BELTRAMINE, L.M., Isolation and characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, 1998.

Referências Bibliográficas

MOREIRA, R. A., & PERRONE, J.C., Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, **59**:783-7, 1977.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinins: na iniciator of mitosis in culture of animal and human leucocytes. **Cancer Res.** **20**, 462, 1960. Citado por MOREIRA, 1998.

OLIVA, M.L.; ANDRADE, S.L.; BATISTA, I.F.; SAMPAIO, M. U.; JULIANO, M.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E. A.; SAMPAIO, C. A. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. **Immunopharmacology** , **45**,145–149; 1999.

OLIVEIRA, J.T.A.; MELO, V.M.M.; CÂMARA, M.F.L.; VASCOCELOS, I.M.; BELTRAMINI, L.M.; MACHADO, O.L.T.; GOMES, V.M.; PEREIRA, S.P.; FERNANDES, C.F.; NUNES, E.P.; CAPISTRANO, G.G.G.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, **61**: 301-310; 2002.

OLIVEIRA, M.L.; BELTRAMINI, L.M.; SIMONE, S.G.; BRUMANO, M.H.N.; SILVA-LUECA, R.A.; NAKAEMA, M.K.K.; PIRES, C.V.; OLIVEIRA, M.G.A. Purification and partial characterizatón of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. **Braz. J. Plant Physiol**, **15**(2):119-122; 2003.

PANDA, S.; KAR, S. *Withania somnifera* and *bauhinia purpurea* in the regulation of circulation thyroid hormone concentrations in female mice. **Journal. Of Ethnopharmacology** **67**, 223—239, 1999.

PASTAN, J.; WILLINGHAM, M. C. & FITZGERALD, D. J. P. Immunotoxins. **Cell**, **47**: 641-648, 1986.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E. J. M., Lectin as plant defence proteins. **Plant Physiology**, **109**:347-352, 1995.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E. J. M., PUSZTAI, A., BARDOCZ, S., Handbook of Plant Lectin: Properties and Biomedical Aplications; John Wiley & Sons, USA , 1997.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E. J. M., Plant Lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews em Biochemistry and Molecular Biology**, **33**: 209-258, 1998.

PEUMANS, W. J., Zhang, W., Barre, A., Houlos-Astoul, C., Balint-Kurtto, KP., Rovira, P., Rouge, P., May, G. D., Van Leuven, F., Truffa-Bache, P. & Van Damme, E. J. M. Fruit-Specific lectins from banana and plantain. **Planta** 211: 546-554; 2000a.

PEUMANS, W. J., Barre, A., Haom Q., Rouge, P. & Van Damme, E. J. M.) Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycoconjugates. **Trends in Glycoscience and Glycotech.**, 1264: 83-101; 2000b.

PEUMANS, W.J; DE LEY, M.; BROEKEART, W.F. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. **FEBS Lett.**, 177: 99-103; 1984.

PEUMANS, W.J; DE LEY, M.; BROEKEART, W.F. Isolation and partial characterization of a new lectin from seeds of the greater celandine (*Chelidonium majus*) **Plant Physiol.**, 78: 379-383; 1985.

PRADO, J.F.; ZAMBELLI, J.E.; MELO-LIMA, M.H. and RIBEIRO-DASILVA, G. The hyperinsulinemia produced by concanavalin A in rats is opioid-dependent and hormonally regulated. **Brazilian Journal of Medical Research** 31: 697-703; 1998.

PUSZTAI, A. and STEWART, J.C. Isolectins of *Phaseolus vulgaris*. Physicochemical studies. **Biochim. Biophys. Acta**, 536: 38, 1978.

PUSZTAI, A., EWEN, S. W. B., GRANT, G., PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M., RUBIO, L. & BARDOCZ, S. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. **Digestion**. 46: 308-316, 1990.

PUSZTAI, A., GRANT, G., GELENCSEK, E., EWEN, S. W. B., PFÜLLER, U., EIFLER, R. & BARDOCZ, S. Effects of orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. **Nutritional Biochemistry** 9:31-36, 1998.

RAIKHEL, N.V.; LEE, H.I.; BROEKEART, W.F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, 44: 591-615; 1993.

RAMOS, M.V. MOTA, D.M. TEIXEIRA, C.R. CAVADA B. S. AND MOREIRA R. A. Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds **Toxicon**, 36 (3): 477-484, 1998.

RANKIN, J.A.; SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T.; LEONARD, E.J. Macrophages cultured in vitro release leukotriene B₄ and neutrophil attractant activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **Journal of clinical Investigations**. 80, 1554-1564; 1990.

RINDERLE, S.J.; GOLDSTEIN, I.J.; MATTA, K.L.; RATCLIFFE, R.M. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T-(or cryptic T) – antigen, **The J. of Biol. Chem.**, 264 (27): 16123-16131; 1989.

ROBERTS, D.D. & GOLDESTINE, I.J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **J. Biol. Chem.**, 258(22): 13820-13824, 1983.

ROCHA, C.R. Indução da migração de neutrófilos polimorfonucleares para a cavidade peritoneal de ratos por frutalina – lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* (fruta-pão). Monografia (Trabalho de conclusão de Curso), Universidade de Fortaleza; 2003.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D., **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999.

ROSA, J.C.; OLIVEIRA, P.S.L.; GARRATT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Science**, 8: 13-24; 1999.

RÜDIGER, H., Plants lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica** 161:130 –152, 1998.

RUSSEL, C. S., RODRIGUES, J. & LAI, P.S. Hemagglutinin activity in *Nereis* coelomic fluid. **Comp. Biochem, Physiol.** 75A: 57; 1983.

SAKAMOTO, M., DIAS-BARUFFI, M., SANTOS-OLIVEIRA, R., CUNHA, F. Q., ROQUE-BARREIRA, M. C. An intravascular chemoattractant lectin inhibits neutrophil migration glucoconjugate. **Glycoconjugate Journal**, 15(5): 531-533, 1998.

SALUNKHE, D. K., SATHE, S. K. & REDDY, N. R. Legumes lipid. In: ARORA, S. K. (ed) **Chemistry and Biochemistry of Legumes**. New Delhi: Oxford & IBM Publissing Co. 51-107, 1982.

SANKARANARAYANAN, R., SEKAR, K., BANERJEE, R., SHARMA, V., SUROLIA, A. & VIJAYAN, M. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a *Moracea* plant lectin with a β -prism fold. **Nature Strutural Biology**, 3(7): 596-603, 1996.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., DIAS-BARUFFI, M., THOMAZ, S. M. , BELTRAMINI, L. M., ROQUE-BARREIRA, M. C. A Neutrophil Migration-Inducing Lectin from *Artocarpus integrifolia*. **The Journal of Immunology**, 153: 1798-1807, 1994.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANJEIRO, 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 proprieties from Concanavalina A., **FEBS Letters**, 405: 114-118, 1997.

SARKER, A.B.;AKAGI, T.; JEON, H.J.; MIYAKE, K.; MURAKAMI, I.; YOSHINO, T.; TAKAHASHI, K. and NOSE, S. *Bauhinia purpurea*: Anew marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. A comparison with Leu-M1 (CD15), LN2 (CD74), peanut agglutinin, and BER-H2 (CD30). **American Journal of Pathology**. 141: 19-23, 1992.

SASTRY, M.V.K., BARNAJIE, P., PATANJALI, S.R., SWAMY, M. J., SWARNALATHA, G.V. & SUROLIA, A. Analysis of saccharide bindig to *Artocarpus integrifolia* lectin reveal specific recognition of T-antigen (β -D-Gal(1-3) D-GalNAc). **J. Biol. Chem.**, 261: 11726-33, 1986.

SHANGARY, S., SINGH, J., KAMBOJ, S. S.,, KAMBOJ, K. K., SANDHU, R. S. Purification and properties of four monocot lectins from family *Araceae*. **Phytochemistry** 40: 449-454, 1995.

SHARMA, V., & SUROLIA, A. Analysis of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combimming site loops and their primary specificity. **J. mol. Biol.**, 267:433-445; 1997.

SHARON, N., LIS, H., **Lectins**. London: Chapman and Hall, 126pp.,1989.

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

SILVA, A.L.C., HORTA, A.C.G. and MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. Ex. Steua. R. Bras. Fisiol. Veg. 13(3): 262-269, 2001.

SILVA JUNIOR, J.G. Eletroforese de proteínas: guia teórico e prático. Rio de Janeiro: Interciencia, . 125p. 2001;

SINGH, R.S.; TIWARY, A.K. and KENNEDY, J.F. Lectins: Sources, activities, and applications(1999). **Critical Reviews in Biotechnology**, 19(2): 145-178; 1999.

SOETHOUT, E.C.; MÜLLER, K.E.; RUTTEN, V.P.M.G. Neutrophil migration the lung, general and bovine-specific aspects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 87: 277-285; 2002.

SREERAMA, N. & WOODY, R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Anal. Biochem.**, 209: 32-44. 1993.

STILLMARK, H. über Ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiacees. Inaugural Dissertation Dorpat (Tartu). Citado por SHARON & LIS, 1989.

SUSEELAN, K.N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K.B.; KRISHNA, T.G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 407: 241-247; 2002.

TAVARES, R. A. Galactomanana de *Adenanthera pavonina* L. aplicação para o isolamento de lectinas galactose-específicas. Dissertação de Mestrado, 85pp. Departamento de Bioquímica e Biologia e Molecular, 1998.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M.; Compendio de Fitoterapia; Herbarium Lab. Botânica, Curitiba, Paraná, 1995.

TRANSUE, T.R.; SMITH, A.K.; MO, H.; GOLDSTEIN, I.J.; SAPER, M.A. *Amaranthus* lectin structure at 2,2Å reveals T-antigen disaccharide bound to β -trefoil domains. **Nat. Struct. Biol.**, 10: 779-783; 1997.

TRIGUEROS, V.; LOUGARREA, A.; ALI-AHMEDA, D.; RAHBE, Y.; GUILLOT, J.; CHAVANTA, L.; FOURNIERA, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1621: 292–298; 2003.

VAN DAMME, E.J.M., Allen, A.K., Peumans, W.J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Lett.**, 215:140-144; 1987.

VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I.J., and PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem.** 236: 419-427., 1996(a). Citado por PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E. J. M., 1998.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W.J., PUSZTAI, A., and BARDACZ, S. Handbook of Plant Lectins: Properties and Biochemical Applications. 452pp., 1998.

VASCONCELOS, F. Estudo da insulina e do extrato de *Bauhinia forficata* Link sobre a letalidade, hiperglicemia, e alteração de eletrólitos e catecolaminas induzidos pelo veneno do escorpião *Tityus serruleatus* Lutz & Mello. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, São Paulo, Brazil, p. 124; 2000.

VASCONCELOS, I.M.; MAIA, A.A.B.; SIEBRA, E.A.; OLIVEIRA, J. T.A.; CARVALHO, A.F.F.U. MELO, V.M.M.; CARLINI, C. R. CASTELAR, L.I.M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry** 12: 55–62; 2001.

VITETTA, E. S. & URH, J. W. The potential use of immunotoxins in transplantation, cancer therapy and immunoregulation. **Ann. Rev. Immunological.**, 3: 197-212, 1985.

VILLALOBO, A., GABIUS, H.J., Signalin pathway for transduction of the initial message of the glycode into cellular responses. **Acta Anat.** 161:110-129, 1998.

WAH, D. A., Romero, A., Sol, F. Gallego Del, Cavada, B.S., Ramos, M. V., Grangeiro, T. B., Sampaio, A. H. & Calvete, J.J. () Crystal Structure of Native and Cd/Cd-substituted *Sioctlea guianensis* Seed Lectin, A novel Manganese-binding Site and Strutural Basis of Simer-tetramer Associatiom. **J. mol. Biol.** 310:885-894., 2001.

WHALEY, K. & FERGUSUN, A. Molecular aspects of complement activation. **Molecular Aspects of Medicine**, 4, 209-273; 1981. Citado por ALENCAR *et al.* 2003.

WRIGHT, C.S. Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, 194 (3): 501-529; 1987.

WRIGHT, C.S. The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å. **J. Mol. Biol.**, 111: 439-457; 1977.

WU, A.M.; WUB, J. H.; LIUA, JIA-HUA, SINGHA, T. Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). **Life Sciences** 74: 1763–1779; 2004.

XU, Q.; LID, Y.; WANG, X.; GU, H.; CHEN, Z. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. **Plant Physiol. Biochem.**, 36(12): 899-905; 1998.

YAMAGUCHI, K.; MORI, A.; FUNATSU, G. The complete amino acid sequence of lectin-C from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Biosc. Biotech. And Biochem.**, 59(7): 1384-1385; 1995.

YAMAGUCHI, K.; MORI, A.; FUNATSU, G. Amino acid sequence and some properties of lectin-C from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Biosc. Biotech. And Biochem.**, 60(8): 1380-1382; 1996.

YAMAGUCHI, K.; YURINO, N.; KINO, M.; ISHIGURO, M.; FUNATSU, G. The complete amino acid sequence of mitogenic lectin-C from the roots o pokeweed (*Phytolacca americana*). **Biosc. Biotech. And Biochem.**, 61(4): 69-698; 1997.

YAMAMOTO, K., KONAMI, Y., KUSUI, K. & OSAWA, T. Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide from *Bauhinia purpurea* lectin. **FEBS Letters**, 281(1,2): 258-262, 1991.

YANG, H & CZAPLA, T.H. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. **Journal of Biological Chemistry**, 268: 5905-5910; 1993.

YOUNG, N.M., WATSON, D.C. and WILLIAMS, R.E. Lectins and legume taxonomy. Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific from *Bauhinia purpurea*. **FEBS Letters**, 182: 404-406, 1985.

ZHANG, W., Peumans, W. J., Barre, A., Hooules-Astoul. C., Rovira, P., Rougé, P., Proost, P., Truffa-Vacchi, P., Jalali, A. A. H. & Van Damme, E. J. M. Isolation and Characterization of jacalin-related mannosyl-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Planta**, 210:970-978.; 2000.