

LECTINA DE Dioclea guianensis (DUKE)
VARIEDADE LASIOPHYLLA

ILKA MARIA VASCONCELOS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO
DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA,
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM BIOQUÍMICA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1990

[Redacted]

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

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

[Redacted]

Ilka Maria Vasconcelos

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/04/90

[Redacted]

José Tadeu Abreu de Oliveira

[Redacted]

Iracema Lima Ainoz *I*

[Redacted]

Benildo Sousa Cavada

[Redacted]

Renato Azevedo Moreira

Se não houver frutos
Valeu a beleza das flores
Se não houver flores
Valeu a sombra das folhas
Se não houver folhas
Valeu a intenção da semente
(citado por HENFIL)

A meus pais, que sempre acreditaram que com dignidade e perseverança todos os objetivos são concretizados.

A minha irmã, Ana Mara.

AGRADECIMENTOS

De modo especial ao orientador desta Tese, Professor José Tadeu Abreu de Oliveira, pela orientação constante e segura que contribuiu significativamente para a execução deste trabalho, bem como pela expressiva consideração e confiança demonstradas.

Sou imensamente grata aos professores Iracema Lima Ainouz, Benildo Sousa Cavada e Renato Azevedo Moreira pelas sugestões e discussões apresentadas, assim como pela atenção e amizade transmitidas ao longo do trabalho.

Ao Professor José Xavier Filho pela inestimável ajuda e sugestões prestadas na realização deste trabalho.

A Professora Célia Guimarães Carlini, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), pela valiosa colaboração neste trabalho.

Aos bolsistas Talles Barbosa Grangeiro e Francineide Firmino pela cooperação e amizade.

Aos meus amigos Vânia Maria Maciel Melo, Alexandre Holanda Sampaio, Kátia Flávia Fernandes Silva e Claudinei Sousa Lima expresso os meus mais sinceros agradecimentos pela contribuição e amizade demonstradas.

A todos professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela cooperação e incentivo.

Finalmente de modo preciosíssimo aos meus

pais, José Gerardo Vasconcelos e Dora Lopes Vasconcelos, pelo total apoio e estímulo que contribuíram marcadamente na minha formação profissional.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES/PICD), pela Bolsa de Pós-Graduação concedida à autora e pelo convênio com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

Fundação Banco do Brasil (FBB), através de convênio com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Financiamento de Estudos e Projetos (FINEP), através de convênio com o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

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

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xiv
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xv
<u>RESUMO</u>	xvi
<u>ABSTRACT</u>	xviii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>Considerações Gerais</u>	1
1.2 - <u>História</u>	2
1.3 - <u>Ocorrência</u>	6
1.4 - <u>Deteccão, Isolamento e Purificação</u>	7
1.5 - <u>Especificidade por Açúcar</u>	9
1.6 - <u>Propriedades Gerais das Lectinas</u>	10
1.7 - <u>Biologia das Lectinas de Plantas</u>	11
1.7.1 - <u>Funções nas Plantas</u>	12
1.7.2 - <u>Interações com Outros Sistemas Biológicos</u> .	15
1.8 - <u>Aplicação das Lectinas</u>	17
1.9 - <u>Lectinas nas Dietas</u>	20
1.10 - <u>Destoxificação</u>	22
1.11 - <u>Objetivos do Trabalho</u>	23
2 - <u>MATERIAIS</u>	24
2.1 - <u>Sementes</u>	24
2.2 - <u>Sangue</u>	24
2.3 - <u>Ovos de Camarão</u>	24
2.4 - <u>Outros Materiais</u>	25
3 - <u>MÉTODOS</u>	26

	Página
3.1 - <u>Preparação da Farinha</u>	26
3.2 - <u>Análise Elementar</u>	26
3.2.1 - Determinação de Umidade	26
3.2.2 - Determinação do Nitrogênio Total	26
3.2.3 - Determinação de Lipídios Totais	27
3.2.4 - Determinação de Cinzas	27
3.3 - <u>Determinação da Concentração Ótima de NaCl para Extração das Proteínas e da Atividade Hemaglutinante</u>	28
3.4 - <u>Determinação do pH Ótimo para Extração de Proteínas e da Atividade Hemaglutinante</u>	28
3.5 - <u>Preparação do Extrato Total a pH 8,0</u>	29
3.6 - <u>Determinação de Proteínas</u>	29
3.7 - <u>Determinação da Atividade Hemaglutinante</u>	29
3.8 - <u>Cromatografias</u>	30
3.8.1 - Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-50	30
3.8.2 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de DEAE-Sepharose	31
3.8.3 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de CM-Sepharose	31
3.8.4 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Bio Gel P-100	32
3.8.5 - Cromatografia da fração PIII em Coluna de Sephadex G-100	32
3.8.6 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de Superose 30 6 HR 10/30 Acoplada em FPLC ...	33
3.9 - <u>Eletroforeses</u>	33
3.9.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS na Presença e Ausência de Beta-mercapto-etanol	33

	Página
3.9.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida das Proteínas Básicas	34
3.10 - <u>Métodos Imunoquímicos</u>	35
3.10.1 - Preparação de IgG(coelho) Contra Proteínas de <u>Dioclea guianensis</u>	35
3.10.2 - Imunoeletroforese	37
3.10.3 - Imunodifusão	37
3.10.4 - "Western Blots"	38
3.11 - <u>Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares</u>	40
3.12 - <u>Efeito do EDTA e dos Cátions Ca⁺² e Mn⁺² sobre a Atividade Hemaglutinante</u>	40
3.13 - <u>Determinação de Açúcares</u>	41
3.14 - <u>Especificidade Sanguínea da Fração PIII</u>	42
3.15 - <u>Alguns Parâmetros Nutricionais</u>	42
3.15.1 - Análise de Aminoácidos	42
3.15.2 - Termoestabilidade	43
3.15.2.1 - Termoestabilidade da lectina nas sementes	43
3.15.2.2 - Termoestabilidade da Fração PIII	43
3.16 - <u>Bioensaio com Artemia salina LEACH</u>	43
4 - <u>RESULTADOS</u>	45
4.1 - <u>Caracterização da semente de Dioclea guianensis Duke</u>	45
4.2 - <u>Efeito da Concentração de NaCl na Extração de Proteína e da Atividade Hemaglutinante de Dioclea guianensis</u>	45
4.3 - <u>Efeito do pH na Extração de Proteína e da Atividade Hemaglutinante</u>	45

	Página
4.4 - <u>Purificação da Lectina de Sementes de Dioclea guianensis</u>	49
4.5 - <u>Critérios de Avaliação do Grau de Purificação da Lectina de Dioclea guianensis</u>	52
4.6 - <u>Propriedades da Lectina de Dioclea guianensis</u> .	57
4.7 - <u>Determinação do Peso Molecular da Lectina de Dioclea guianensis</u>	62
4.8 - <u>Comparação da Lectina de Dioclea guianensis com Outras Lectinas</u>	66
4.9 - <u>Parâmetros Nutricionais</u>	70
4.9.1 - <u>Análise Elementar</u>	70
4.9.2 - <u>Composição Química</u>	70
4.9.3 - <u>Termoestabilidade</u>	70
4.9.4 - <u>Bioensaio com Artemia salina LEACH</u>	76
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	78
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	85
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	87

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Esquema geral para obtenção de IgG de coelho anti-Extrato Total e anti-PIII	36
2 Esquema do modelo sanduíche usado nos experimentos de "Western blots"	39
3 Flor, vagens e sementes de <u>Dioclea guianensis</u>	46
4 Cromatografia de afinidade do extrato total em coluna de sephadex G-50	50
5 Cromatografia da fração PIII em coluna de DEAE-Sepharose	53
6 Cromatografia da fração PIII em coluna de CM-Sepharose	54
7 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem SDS para proteínas básicas das frações ativas obtidas em colunas de Sephadex G-50, DEAE- e CM-Sepharose	55
8 Imunoeletroforese em gel de agarose do extrato total e da fração PIII de <u>Dioclea guianensis</u>	56
9 Imunodifusão em gel de agarose do extrato total e da fração PIII de <u>Dioclea guianensis</u> com antissoro preparado contra extrato total e fração PIII de <u>Dioclea guianensis</u>	58
10 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS na presença e ausência de beta-mercaptoetanol das frações obtidas durante a purificação da lectina de <u>Dioclea guianensis</u>	59
11 Estimativa do peso molecular da fração PIII por cromatografia em coluna de Bio Gel P-100 ...	64

Figura		Página
12	Estimativa do peso molecular da fração PIII por cromatografia em coluna de Sephadex G-100	65
13	Cromatografia da fração PIII em coluna de Superose 6 HR 10/30 acoplada em FPLC	67
14	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e beta-mercaptoetanol de lectinas de sementes pertencentes a tribo Diocleae e a outras tribos	68
15	Imunodifusão em gel de agarose de lectinas pertencentes a tribo Diocleae e a outras tribos	69
16	"Wester blots" da lectina de <u>Dioclea guianensis</u> e de outras lectinas pertencentes a tribo Diocleae	71
17	Atividade hemaglutinante residual detectada em sementes de <u>Dioclea guianensis</u> após tratamento térmico	74
18	Atividade hemaglutinante residual da lectina de <u>Dioclea guianensis</u> após tratamento térmico a diferentes temperaturas	75
19	Atividade tóxica da lectina de <u>Dioclea guianensis</u> a larvas de <u>Artemia salina</u>	77

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Extração das proteínas e da atividade hemaglutinante de sementes de <u>Dioclea guianensis</u> a diferentes concentração de NaCl	47
2 Extração das proteínas e da atividade hemaglutinante de sementes de <u>Dioclea guianensis</u> a diferentes valores de pH	48
3 Purificação da atividade hemaglutinante do extrato total de sementes de <u>Dioclea guianensis</u> por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50	51
4 Especificidade da lectina de <u>Dioclea guianensis</u> por açúcares simples	60
5 Inativação da lectina de <u>Dioclea guianensis</u> por adição de EDTA	61
6 Ativação da lectina desmetalizada de <u>Dioclea guianensis</u> por adição de Ca^{+2} e Mn^{+2}	63
7 Composição mínima de sementes de <u>Dioclea guianensis</u>	72
8 Composição de aminoácidos da lectina <u>Dioclea guianensis</u>	73
9 Comparação do teor de lectinas presente em sementes maduras de vários representantes da tribo Diocleae	79

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CM - Sepharose = Carboximetil - sepharose

DEAE- Sephadex = Dietilaminoetil - sephadex

DEAE- Sepharose = Dietilaminoetil - sepharose

EDTA = Etilenodiaminotetracético

SDS = Dodecil sulfato de sódio

Tris = Tris (hidroximetil) - aminometano

UH = Unidade de hemaglutinação. Definida com o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2 %.

RESUMO

As sementes de Dioclea guianensis Duke., variedade lasiophylla contém uma lectina específica para manose/glicose que foi purificada através de cromatografia de afinidade em Sephadex G-50. A lectina mostrou-se homogênea através de vários critérios de pureza tais como imunoeletroforese, eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes e cromatografias em DEAE- e CM-celulose.

A lectina de Dioclea guianensis assemelha-se a outras lectinas do gênero Canavalia e Dioclea em muitas de suas propriedades: é uma metaloproteína que requer Mn^{2+} e Ca^{2+} para exercer plena capacidade de aglutinar hemácias; é inibida por manose, frutose e glicose mas não por galactose; não é uma glicoproteína; possui composição de aminoácidos caracterizada pelo baixo conteúdo em cisteína e metionina e alto conteúdo em aminoácidos hidroxílicos e ácidos e não apresenta ligações tipo S-S na sua estrutura nativa.

Por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio a lectina de Dioclea guianensis dissocia-se em três bandas de proteínas com massas moleculares aparentes de 30, 18 e 12 KDa. As duas bandas menores representam, provavelmente, fragmentos resultantes da clivagem proteolítica da subunidade principal, no exemplo do que ocorre com outras lectinas da tribo Diocleae já estudadas.

A pH 7,6 a lectina predomina como um dímero de peso molecular de cerca de 47 KDa (74,4 %) coexistindo ainda em menor proporção um agregado de peso molecular de cerca de 110 KDa (25,6 %).

Por imunodifusão e "Western blots" foi constatado que a lectina de Dioclea guianensis possui determinantes antigênicos semelhantes aos das lectinas extraídas de sementes de Canavalia brasiliensis, Canavalia ensiformis, Dioclea

grandiflora, Dioclea paraquariensis e Dioclea rostrata mas não Lathyrus cicera, Lathyrus alternatus, Lathyrus odoratus e Vatairea macrocarpa, o que sugere a estreita relação filogenética entre as espécies pertencentes a tribo Diocleae e a importância fisiológica destas proteínas que conservaram muitas de suas características durante a especiação.

Na avaliação de sua toxicidade a lectina de Dioclea guianensis impediu a sobrevivência de Artemia salina de maneira dose dependente. Esta toxicidade foi abolida pela presença de glicose, um inibidor da lectina, sugerindo o envolvimento dos sítios reativos a açúcares na letalidade desta proteína.

ABSTRACT

Seeds of Dioclea guianensis Duke, var. lasiophylla contain a mannose/glucose - binding lectin which was purified by affinity chromatography on Sephadex G-50. The lectin showed to be homogenous by immunoelectrophoresis, polyacrylamide gel electrophoresis in non-denaturing conditions and by chromatography on DEAE- and CM - Sepharose.

The lectin of Dioclea guianensis resembles other lectins of Canavalia and Dioclea genera in many of their physicochemical properties: it is a metalloprotein requiring Mn^{+2} and Ca^{+2} for full haemagglutinating activity; it is inhibited by mannose, fructose and glucose but not by galactose; it is devoid of carbohydrate; it possesses an amino acid composition characterized by the low content of cysteine and methionine and rich in hydroxylic and acidic amino acids; and its native structure is devoid of any S-S bond.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gave three protein bands with apparent molecular masses of 30, 18 and 12 KDa. The two minor bands probably resulting from the major subunit by proteolytic clivage as observed for the lectins extracted from other members of the tribe Diocleae.

At pH 7.6 the Dioclea guianensis lectin exists predominantly as a species of apparent molecular weight of 47 KDa (74,4 %). An aggregate molecular weight of 110 KDa is also present (25,6 %).

Ouchterlony immunodiffusion and Western blots assays showed that the lectin of Dioclea guianensis is immunochemically identical to the seed lectins of Canavalia brasiliensis, Canavalia ensiformis, Dioclea grandiflora, Dioclea paraguariensis, and Dioclea rostrata but antigenically

distinct from the seed lectins of Lathyrus cicera, Lathyrus alternatus, Lathyrus odoratus, and Vatairea macrocarpa. The cross-reaction observed within the tribe Diocleae suggests that those lectins share the same antigenic determinants which were conserved during the evolution supporting the hypothesis that these proteins have an important physiological role in the plant.

The lectin of Dioclea guianensis shows to be toxic to Artemia salina in a dose response fashion. It seems that the binding sites to sugars are involved since the presence of glucose was able to abolish the lectin toxicity.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais

A capacidade de interagir específica e reversivelmente com substâncias de natureza diversificada é uma característica da maioria das proteínas. Exemplo dessas proteínas são as lectinas, que interagem com resíduos de carboidratos livres ou constituintes de membranas induzindo aglutinação das células ou precipitação de polissacarídeos e glicoproteínas. Esta propriedade pressupõe sua natureza multivalente, isto é, a existência de, no mínimo, dois sítios de ligação para cada molécula, a fim de que haja o estabelecimento de ligações cruzadas entre células ou macromoléculas que contenham açúcar.

A capacidade de aglutinação e eventual precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas ou células pelas lectinas assemelham-se às reações tipo antígeno-anticorpo. Entretanto, existem alguns aspectos fundamentais que, notadamente, as distinguem destes últimos. Ao contrário dos anticorpos, muitas lectinas são encontradas em plantas, microorganismos e vírus (SHARON & LIS, 1989) que não sintetizam imunoglobulinas e, ainda, não se encontram confinadas em órgãos ou tecidos específicos. Uma outra diferença marcante é que elas apresentam uma diversidade estrutural variando, dessa maneira, em composição de aminoácidos, peso molecular, dependência de metal e estrutura tridimensional.

Por outro lado, a habilidade de se ligar a carboidratos não está confinada somente às lectinas, uma vez que muitas enzimas, tais como quinases, mutases, glicosidasas e transferases, que participam do metabolismo dos carboidratos, também possuem esta propriedade. No entanto, apesar destas proteínas possuírem esta propriedade em comum, as

lectinas são classificadas distintamente desde que são destituídas de atividade catalítica e, ainda, devido ao fato das enzimas poderem conter apenas um sítio de ligação para carboidratos por molécula sendo, portanto, desprovidas de atividade aglutinante.

Uma outra classe de moléculas que possui a capacidade de aglutinar células são os lipídios, como é o caso do ácido oléico e dioleil fosfatídeo, e gangliosídeos que aglutinam eritrócitos de rato e coelho (TSIVION & SHARON, 1981). Porém, em contraste com as lectinas, essas aglutinações são insensíveis à variação de temperatura (RUSSEL *et al.*, 1983) e inibição por açúcares simples (TSIVION & SHARON, 1981).

Recentemente, foi relatada a existência de uma classe de proteínas com muitas características em comum com as lectinas, as hemilectinas (CARLINI *et al.*, 1988). Entretanto, estas são desprovidas de atividade hemaglutinante aparentemente por possuírem apenas um sítio de ligação.

Diante da existência de várias características em comum entre as lectinas e alguns compostos, a definição mais amplamente usada de lectinas é que estas são proteínas de origem não imune, capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos (ou compostos contendo carboidratos) e de aglutinar células e glicoconjugados, sem induzir qualquer alteração química nas mesmas (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KOCOUREK & HOREJSI, 1983).

1.2 - História

Apesar do estudo das lectinas ter se iniciado no século passado, somente nas duas últimas décadas elas têm se tornado um grande foco de interesse para os pesquisadores. A grande motivação nesta área da pesquisa é decorrente dos numerosos efeitos que as lectinas exercem sobre vários sistemas biológicos (LIS & SHARON, 1973).

A primeira referência de que extratos de plantas possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos humano ou de

animais surgiu na Tese de Doutorado de HERMANN STILLMARK (1888). Ele, estudando a toxicidade de Ricinus communis (mamona), observou que quando extratos da planta eram adicionados a uma suspensão de hemácias estas aglutinavam, sendo este efeito atribuído a uma proteína que ele denominou de ricina. Logo em seguida, HELLIN (1891), observou que uma preparação proteínácea obtida de sementes de Abrus precatorius (jequiriti), denominada de abrina, também apresentava propriedades semelhantes.

Após as descobertas iniciais de STILLMARK (1888) e HELLIN (1891), foi detectada a presença de atividade hemaglutinante em outras espécies, tais como Croton tiglium (ELFSTRAND, 1897) e Robinia pseudoacacia (POWER & CAMBIER, 1889).

Estas descobertas logo atraíram a atenção de PAUL EHRLICH (1891a,b), que reconheceu nas aglutininas de plantas melhores modelos antigênicos para a solução de problemas imunológicos. Ao contrário das toxinas bacterianas elas eram mais estáveis e podiam ser obtidas em larga escala. EHRLICH verificou que quando doses subletais de ricina ou abrina eram administradas subcutaneamente em animais estimulavam a produção de anticorpos que inibiam as atividades tóxica e hemaglutinante. Ele, então, observou o desenvolvimento de imunidade específica contra elas, isto é, o soro anti-ricina não protegia os animais contra os efeitos tóxicos da abrina, e vice-versa. Ele ainda observou que durante a gravidez esta imunidade era transferida da mãe para o filho pelo sangue e que após o nascimento esta transferência era feita através do leite. Estudando o efeito inibitório do soro imune anti-ricina sobre a atividade hemaglutinante da ricina, ele demonstrou que havia uma relação quantitativa entre o anti-soro e o antígeno neutralizado, realizando, portanto, a primeira determinação quantitativa de um anticorpo "in vitro".

Apesar de STILLMARK (1888) ter observado que hemácias diferentes se comportavam diferentemente frente à mesma lectina, somente por volta de 1908 é que foi demonstrado que as fitohemaglutininas eram espécie-específicas, isto é,

que a atividade hemaglutinante detectada em extratos obtidos de diferentes sementes variava conforme a origem das hemácias (LANDSTEINER & RAUBITSCHKE, 1908). Por exemplo, extrato de ervilha (Pisum sativum) aglutinava mais fortemente eritrócitos de coelho do que eritrócitos de porco e carneiro.

Embora a existência de fitohemaglutininas em extratos de sementes já tivesse sido mencionada desde o século passado, somente em 1919 é que foi isolada a primeira fitohemaglutinina, a concanavalina A, a partir de feijão-de-porco (Canavalia ensiformis) (SUMNER; 1919). Mais tarde, SUMNER e HOWELL (1936) verificaram que a concanavalina A além de possuir a habilidade de aglutinar células, tais como eritrócitos e leveduras, era capaz de precipitar glicogênio e mucoproteínas. Eles mostraram, ainda, que as atividades da concanavalina A eram inibidas por açúcar de cana, sugerindo que os receptores da lectina nas células aglutinadas devia ser um carboidrato.

A propriedade de certas lectinas aglutinarem especificamente hemácias só foi claramente determinada por SUGISHITA (1935), quando estudou a lectina presente em soro de enguia, e BOYD (1947) e RENKONEN (1948), em plantas. RENKONEN (1948) mostrou que extratos de sementes de Vicia cracca aglutinavam preferencialmente hemácias do tipo A, enquanto que extratos de sementes de Lotus tetragonolobus eram específicos para hemácias do tipo O. Algumas lectinas são, ainda, mais seletivas exibindo uma maior especificidade por determinados subgrupos sanguíneos. BIRD (1951) observou que lectinas de Dolichos biflorus aglutinavam mais fortemente eritrócitos do tipo A₁ do que os do tipo A₂. Esta propriedade associada à especificidade das lectinas por determinados carboidratos, teve um papel fundamental na elucidação das bases químicas da especificidade do sistema ABO (MORGAN & WATKINS, 1953). A partir de então, estudos sistemáticos foram intensificados na tentativa de descobertas de novas lectinas que possibilitassem seu uso em tipagem sanguínea.

Embora ELFSTRAND (1897) já tivesse sugerido a de-

signação de hemaglutinina para as aglutininas vegetais, posteriormente estendido às imunoglobulinas, foram BOYD e SHARPLEIGH (1954) que, devido à especificidade sanguínea exibida por algumas aglutininas, propuseram o termo lectina (do latim "legere", escolher). Esta denominação foi, então, estendida para todas as proteínas de origem não imune que se ligassem a açúcares ou glicoconjugados sem modificá-los covalentemente, quer fossem elas provenientes de plantas, animais ou microorganismos.

Até o início de 1960 o interesse nas lectinas era limitado. A partir de então, ocorreram descobertas importantes nesta área de investigação científica atraindo um maior número de pesquisadores. O primeiro grande passo foi quando NOWELL (1960) observou que a lectina de Phaseolus vulgaris, conhecida como PHA, era mitogênica. Esta descoberta causou um grande impacto à imunologia, desfazendo a idéia de que os linfócitos seriam células que já haviam atingido um estágio final não podendo sofrer, portanto, divisão ou diferenciação posterior. Mais recentemente, foi visto que a capacidade mitogênica não está associada apenas às lectinas de Phaseolus vulgaris, uma vez que a concanavalina A apresentava propriedade semelhante (NOVOGRODSKY & KATCHALSKI, 1971). Esta descoberta foi de importância fundamental, uma vez que a atividade da concanavalina A, ao contrário da PHA, foi inibida por baixas concentrações de manose, sugerindo que a estimulação mitogênica era resultante da interação da lectina com açúcares da superfície celular.

Uma outra descoberta marcante foi feita por AUB e colaboradores (1963, 1965a,b) e BURGER e GOLDBERG (1967), que observaram ser possível a distinção entre células normais e malignas através da lectina de germe de trigo (Triticum vulgare), atribuindo esta capacidade de diferenciação às alterações das propriedades da superfície das células cancerosas. Outras lectinas, tais como a concanavalina A (INBAR & SACHS, 1969) e a lectina de soja (Glycine max) (SELA et al., 1970) foram também reconhecidas quanto à sua capacidade de preferencialmente aglutinar células malignas.

Hoje em dia, elas são uma ferramenta muito útil na pesquisa sobre o câncer.

A cromatografia de afinidade empregada para o isolamento de novas lectinas (AGRAWAL & GOLDSTEIN, 1965) juntamente com a importância de suas propriedades mitogênicas e habilidade de distinção entre células sadias e malignas deram um novo impulso ao estudo dessas proteínas. Como consequência, fatos novos contribuíram significativamente para o enriquecimento da história das lectinas: o sequenciamento e o estabelecimento, pela primeira vez, da estrutura tridimensional de uma lectina, a concanavalina A (EDELMAN et al., 1972; HARDMAN & AINSWORTH, 1972); reconhecimento da participação de lectinas animais na endocitose de glicoproteínas (ASHWELL & MORELL, 1974) e de lectinas bacterianas na infecção (OFEK et al., 1977) e, ainda, o uso de aglutinina de soja no transplante de medula (REISNER, 1987).

1.3 - Ocorrência

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas tanto no reino animal como no reino vegetal e até mesmo em vírus (SHARON & LIS, 1989).

A maioria das lectinas até hoje estudadas se encontra no reino vegetal, principalmente na família Leguminosae (BOYD, 1963; SHARON et al., 1974). No entanto, a distribuição das lectinas difere entre as várias famílias. Nas leguminosas, embora pequenas quantidades de lectinas possam estar presentes nos eixos e mesmo nas cascas das sementes, grande parte delas se encontra nos cotilédones em organelas conhecidas como corpos protéicos (CLARKE et al., 1975). Nos cereais, como é o caso da lectina de germe de trigo (WGA) ela está associada ao embrião (MISHKIND et al., 1980). As lectinas também podem estar associadas a outras partes da planta, como aquelas isoladas de espécies pertencentes à família das Solanáceas que estão restritas aos tubérculos (MARINOVICH, 1964). Em muitas es-

pécies de plantas as lectinas estão ainda presentes embora em menor quantidade, em folhas (LAMB et al., 1983; Mc PHERSON et al., 1987), raízes (CAMMUE et al., 1985), flores (CAZAL & LALOURIE, 1952), caules (PUEPPKE, 1979), pericarpos (TALBOT & ETZLER, 1978) e em cascas de árvores (NSIMBA-LUBAKI et al., 1986).

Embora tenhamos nas plantas as principais fontes de lectinas, um número considerável destas tem sido detectado tanto nos vertebrados como nos invertebrados. Em relação aos vertebrados, dependendo da localização das lectinas, elas são distinguidas em duas classes: solúveis e ligadas a membranas, plasmática e/ou intracelular. Lectina solúvel foi encontrada no soro de Anguilla anguilla (JONSSON, 1944). Outros autores também relataram a presença de lectinas em soros de outros peixes (DESAI & SPRINGER, 1972). Por outro lado, lectinas de membranas foram encontradas no fígado, mais especificamente em hepatócitos e células Kupffer, de vários animais, tais como coelho (LEE & LEE, 1988), rato (LEHRMAN et al., 1986) galinha (BEYER et al., 1979). Lectinas foram também encontradas em anfíbios (ROBERSON & BARONDES, 1982), na medula de coelho (CATT & HARRISSON, 1983), no plasma humano (KAMAZAKI, 1986) e em pulmões de rato (CERRA et al., 1984). Nos invertebrados, as lectinas foram encontradas em esponjas (MULLER et al., 1979), caranguejos (RAVINDRANATH & COOPER, 1984), caramujos (OTTAVIANI & TARUGI, 1986) e insetos (BARRACO & LOCH, 1988).

As lectinas também têm sido encontradas em protozoários (PETRI et al., 1987), algas (BOYD, 1966), bactérias (STUBBS, 1986), fungos (SAGE & CONNETT, 1969), vírus (PAULSON, 1985) e rickettsias (GOLD & BALDING, 1975).

1.4 - Deteccção, Isolamento e Purificação

A presença de lectina em um dado material biológico pode ser detectada verificando se a mesma aglutina eritrócitos, precipita polissacarídeos ou, ainda, glicopro-

teínas. Entretanto, a maneira mais simples de se detectar sua presença em uma dada preparação é através de ensaio de hemaglutinação. Uma vez que os resultados sejam positivos, o próximo passo é demonstrar que a aglutinação ou precipitação pode ser inibida por açúcares simples ou complexos.

A atividade hemaglutinante é normalmente determinada pelo método de diluição seriada, usando-se eritrócitos modificados enzimaticamente ou não, sendo a atividade expressa como o recíproco da maior diluição que dá aglutinação visível. O tratamento enzimático mais usual das hemácias é a digestão com tripsina (LIS & SHARON, 1972) ou neuraminidase (MARIKOVSKI *et al.*, 1976) que, em geral, aumenta a sensibilidade das células à aglutinação. É comum, também, fixar os eritrócitos com glutaraldeído ou formaldeído que, por conseguinte, estabilizam as células, obtendo-se, assim, uma preparação padrão capaz de ser utilizada por longos períodos de tempo (BUTLER, 1963; FISHER & BRANTON, 1974).

A obtenção de lectinas purificadas é essencial para o estabelecimento de suas propriedades moleculares, fisiológicas e possíveis aplicabilidades. Até recentemente, as lectinas eram isoladas através de métodos tradicionais de fracionamento de proteínas, como precipitação salina ou cromatografia de troca iônica. No entanto, devido ao fato das lectinas serem capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos, um novo método de isolamento tem sido empregado, a cromatografia de afinidade. Neste processo, ocorre a interação da lectina com uma matriz derivada ou ligada, a um açúcar inibidor específico desta proteína e, posteriormente, sua eluição com uma solução do açúcar específico ou por diminuição do pH do eluente (LIS *et al.*, 1974).

Um número considerável de polissacarídeos pode ser usado como adsorventes, tais como a Sephadex (MOREIRA *et al.*, 1983), quitina (SHANKAR-YER *et al.*, 1976) e a goma de guar (SALES *et al.*, 1989). Outros procedimentos empregados incluem o uso de colunas de Sepharose ligada a mono ou oligossacarídeos ou, ainda, a glicoproteínas, como lectina (PINTO, 1987), mucina gástrica (ETZLER & KABAT, 1970)

e substância do grupo sanguíneo A₁ (de OLIVEIRA *et al.*, 1989), e a ligantes sintéticos, por exemplo o N-β - aminocaproil e o N-acetilglucosaminilamina, que são usados na purificação da aglutinina de soja e de germe de trigo, respectivamente (LIS & SHARON, 1981). Estromas glutarizados, preparados a partir de hemácias humana, também foram usados no isolamento de lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero Artocarpus (de OLIVEIRA, 1980; MOREIRA & OLIVEIRA, 1983).

1.5 - Especificidade por Açúcar

A especificidade das lectinas por açúcares é, normalmente, determinada pela técnica de inibição, na qual diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicopeptídeos são testados e comparados com base na concentração mínima necessária para inibir a reação de hemaglutinação ou precipitação de glicoconjugados pela lectina.

De maneira geral, as lectinas são classificadas de acordo com suas especificidades por monossacarídeos estabelecida por MAKELA (1957) que dividiu os monossacarídeos inibidores em quatro grupos dependendo da configuração do C₃ e C₄ do anel piranosídico: L-fucose (grupo I), galactose / N-acetilgalactosamina (grupo II), glicose/manose (grupo III) e idose, gulose, L-glicose e L-xilose (grupo IV). As lectinas específicas para galactose (e N-acetilgalactosamina) parecem ser as mais abundantes uma vez que estão geralmente presentes em todas as classes de organismos. Por outro lado, a distribuição de lectinas que ligam manose é mais limitada tendo em vista que estas não foram encontradas em muitos organismos, por exemplo nos invertebrados.

Embora esteja bem estabelecido que lectinas interagem preferencialmente com os monossacarídeos, existem lectinas que se ligam mais fortemente a oligossacarídeos. Em tais compostos, o monossacarídeo para o qual a lectina é específica está presente, na maioria das vezes, na extremida-

de redutora, porém, há lectinas que também reconhecem seus carboidratos específicos contidos no interior da cadeia oligossacarídica (GREEN, 1987).

1.6 - Propriedades Gerais das Lectinas

De um modo geral, as lectinas se caracterizam por apresentarem uma série de propriedades moleculares distintas constituindo um grupo heterogêneo de proteínas. De fato, não há nenhuma propriedade estrutural que seja comum a todas elas, exceto que são proteínas.

As lectinas, usualmente, consistem de duas a quatro subunidades peptídicas que podem ser idênticas ou não. Como exemplo, temos as lectinas de Dioclea grandiflora (MOREIRA et al., 1983) com quatro subunidades idênticas e de Phaseolus vulgaris (PUSZTAI & STEWART, 1978) com duas subunidades diferentes. Os pesos moleculares das lectinas variam muito, sendo encontrados valores a partir de 8.500 (PEUMANS et al., 1984) a 500.000 daltons (SHARON & LIS, 1989).

A maioria das lectinas requer a presença de íons metálicos divalentes para poder exercer suas atividades biológicas. KALB e LEVITZKI (1968) observaram a existência de dois sítios de ligação diferentes para cada subunidade na concanavalina A, um para o Mn^{+2} (sítio 1) e o outro para o Ca^{+2} (sítio 2). A ocupação do sítio 1 pelo Mn^{+2} constitui um pré-requisito à formação do sítio 2 e esta, por sua vez, é uma condição para que haja a formação subsequente de sítios específicos de ligação para açúcares.

Com exceção de poucas lectinas, por exemplo as lectinas da tribo Diocleae, a maioria das lectinas já obtidas em estado puro são glicoproteínas possuindo algumas vezes um conteúdo de carboidratos igual ou superior a 50 % como é o caso da lectina de batata (ALLEN et al., 1978). Muitas evidências, no entanto, sugerem que a porção glicídica não desempenha papel fundamental na ligação de açúcares ou nas atividades biológicas das lectinas, desde que as atividades

biológicas das lectinas permanecem mesmo quando o açúcar é removido ou modificado por tratamento químico ou enzimático (HOFFMAN & DONALDSON, 1987). Os açúcares mais frequentemente encontrados são a manose e N-acetilglucosamina embora muitas lectinas de legumes contenham D-fucose e xilose (ASHFORD et al., 1987).

As lectinas vegetais se caracterizam por serem ricas em ácido aspártico, serina e treonina e, pobres em aminoácidos sulfurados. No entanto, existem algumas exceções, como é o caso das lectinas de germe de trigo e de batata, que são ricas em cisteína possuindo 20 e 11,5 % do total de resíduos de aminoácidos, respectivamente (ALLEN, 1983; ALLEN et al., 1973).

As sequências primárias de muitas lectinas têm sido determinadas pelo emprego de métodos convencionais para o sequenciamento de proteínas (HAPNER et al., 1983) e por dedução da sequência de nucleotídeos do DNA (cDNA) sintetizado pela transcriptase reversa a partir do mRNA da lectina (VODKIN et al., 1983), revelando a existência de várias lectinas homólogas. Examinando a sequência de aminoácidos da concanavalina A e comparando-a com as sequências de outras lectinas, como as de lentilha (FORIERS et al., 1978), ervilha (RICHARDSON et al., 1978) e *Dioclea grandiflora* (RICHARDSON et al., 1984), observa-se um elevado grau de homologia. As similaridades das estruturas primárias das lectinas pertencentes a uma família de planta sugerem uma origem genética comum para essas proteínas e, ainda, que esta conservação durante o processo evolutivo foi fundamental à preservação das funções comuns das lectinas, bem como à sobrevivência da espécie (HOWARD et al., 1979).

1.7 - Biologia das Lectinas de Plantas

A ocorrência generalizada de lectinas na natureza e sua habilidade em discriminar sacarídeos intimamente relacionando-os, tem levado a uma série de especulações sobre suas funções fisiológicas. Existem vários indícios, tais co-

mo a sua conservação durante a evolução como família de proteínas homólogas e o controle de sua síntese e degradação durante o ciclo vital do organismo, que reforçam a idéia de que as lectinas, de fato, foram adaptadas para uma série de papéis fisiológicos.

1.7.1 - Funções nas Plantas

Apesar de ser senso comum entre a maioria dos pesquisadores de lectinas de plantas, a idéia de que elas são proteínas com papéis fisiológicos bem definidos, estes ainda não foram claramente determinados. As especulações feitas a este respeito advêm, primariamente, da capacidade das lectinas de interagir com carboidratos (ou compostos que contenham carboidratos). CALLOW (1975) sugeriu que tal característica deveria ter alguma implicação "in vivo", presumindo a existência de receptores glicídicos ou glicocjugados endógenos com os quais as lectinas estivessem destinadas a interagir. De fato, tais receptores foram detectados em sementes de várias espécies, tais como Canavalia ensiformis (BOWLES & MARCUS; 1981), Dioclea grandiflora e Dioclea esclerocarpa (HORTA-BARROS et al., 1987).

A presença de sacarose e seus derivados em sementes de leguminosas, levou à sugestão de que as lectinas poderiam participar na fixação e transporte desses carboidratos na planta, uma vez que esses açúcares participam da mobilização de reserva de carboidratos (ENSGRABER, 1958).

Uma outra função atribuída às lectinas é que elas atuam como reserva para o vegetal. A ocorrência de quantidades substanciais de lectinas em órgãos de reserva, o controle do seu aparecimento na semente e seu comportamento durante a germinação assemelham-se bastante ao que ocorre com outras proteínas de reserva. (ROUGÉ, 1974), observou que as lectinas e globulinas cotiledonárias de lentilha desapareciam paralelamente ao longo da germinação. No entanto, o comportamento das lectinas de Canavalia brasiliensis durante a

germinação em presença (CAVADA *et al.*, 1989) e ausência de luz (MOREIRA & CAVADA, 1984) mostra que as lectinas presentes nos cotilédones são metabolizadas mais tardiamente do que as outras proteínas, sugerindo que as lectinas não funcionam primariamente como proteínas de reserva.

Pelo fato das lectinas possuírem capacidade de aglutinação e precipitação de modo análogo a dos anticorpos, foi sugerido que as lectinas poderiam atuar como anticorpos vegetais sendo, dessa maneira, produzidas em resposta à estimulação "antigênica" por microorganismos (SAINT-PAUL, 1961). Porém, até hoje, não existe qualquer evidência de que plantas são capazes de produzir anticorpos de maneira semelhante ao sistema imune dos animais, mas, apesar disso, existem alguns indícios que sugerem a participação das lectinas no mecanismo de defesa das plantas.

Um outro ponto de vista que estabelece o envolvimento das lectinas na proteção das plantas contra alguns microorganismos patogênicos foi ressaltado por MIRELMAN *et al.*, (1975). Eles observaram que a aglutinina de germe de trigo era capaz de se ligar a resíduos de N-acetilglucosamina existentes nas hifas do fungo *Trichoderma viride*, alterando todo o processo anabólico da quitina, bem como a germinação do esporo e crescimento do fungo. Resultados semelhantes foram obtidos com a lectina de batata em *Botrytis cinerea* (CALLOW, 1977). Mais recentemente, foi observado que algumas lectinas atuam inibindo a germinação dos esporos de *Neurospora crassa*, *Aspergillus amstelodami* e *Botrydiploidia ochraceus*.

Um exemplo muito investigado, envolvendo a interação lectina x microorganismos patogênicos, é a interação lectina-nematóide que resulta no bloqueio do reconhecimento dos fatores quimiotáticos pelos nematóides (ZUCKERMAN, 1983). Este fato sugere que a lectina bloqueia ou altera a conformação dos quimiorreceptores dos nematóides que medeiam a função de reconhecimento. MARBAN-MENDOZA *et al.* (1987) constataram, recentemente, que aplicações semanais de concanavalina A a uma concentração de 12 µg, foram efetivas no controle dos nematóides de galhas (*Meloidogyne*

incognita) em plantas de tomate (Lycopersicon esculentum) obtendo-se assim, um controle de até 75 % do patógeno em relação às plantas não infectadas.

A relação simbiótica entre as bactérias do gênero Rhizobium e as plantas leguminosas é de suma importância na agricultura. Esta simbiose é um processo que envolve a adesão da bactéria a raiz, internalização, e subsequente nodulação que culmina na habilidade da planta infectada em fixar nitrogênio. Algumas evidências experimentais sugerem que as lectinas estão envolvidas nessa interação, uma vez que elas são componentes intrínsecos da maioria dos legumes podendo agir no reconhecimento de açúcares presentes na superfície celular do simbionte (BAUER, 1981). Esta idéia foi reforçada pela recente demonstração que uma linhagem de células de raízes de soja era capaz de interagir com Rhizobium japonicum e, que, esta poderia ser evitada na presença do açúcar inibidor (HO et al., 1986).

Ainda nesta linha, tem sido especulado o mecanismo de ação das lectinas de uma maneira mais direta. DAZZO e colaboradores (1986), observando a interação simbiótica entre Rhizobium trifoli e Trifolium repens, propuseram que a lectina interage com os sacarídeos presentes nas superfícies celulares da bactéria e da raiz formando uma ponte. Além disso, eles mostraram que a trifolina, uma lectina do Trifolium repens, era capaz de interagir apenas com Rhizobium trifoli. Estudos posteriores demonstraram que a presença da lectina é um pré-requisito para que haja o desenvolvimento do nódulo, pois as bactérias invadiriam e formariam nódulos somente em alguns hospedeiros, sugerindo, dessa maneira, que as lectinas se comportam como mediadoras do reconhecimento e da ligação de bactérias específicas (LONG & EHRHARDT, 1989; DIAZ et al., 1989).

A descoberta de que algumas lectinas são mitogênicas levou à sugestão de que elas poderiam estar envolvidas nos processos de diferenciação e desenvolvimento do embrião da semente, possivelmente controlando a velocidade de divisão celular. KAUSS e GLASSER (1974) sugeriram que as lectinas presentes na parede celular dos vegetais estão envolvi-

das em processos de crescimento celular. Tem sido conferido às lectinas o papel de reconhecimento celular em plantas superiores e, particularmente, na interação polên-pistilo (KNOX *et al.*, 1976). Devido as lectinas estarem associadas não covalentemente a células da parede celular de plantas é sugerido que elas possam ligar componentes da parede na forma de ligações cruzadas, auxiliando na elongação celular (KAUSS & GLASER, 1974; HAASZ *et al.*, 1981). SHARON e LIS (1972) propuseram que as lectinas podiam atuar como agentes de manutenção de complexos multienzimáticos.

Apesar de nenhuma destas funções ter sido definitivamente estabelecida, sabe-se que as lectinas são proteínas de grande importância para o vegetal, visto que há vários indícios de que elas conservaram muitas de suas propriedades físico-químicas e imunológicas durante a evolução, principalmente entre espécies do mesmo gênero (de OLIVEIRA, 1980; MOREIRA & OLIVEIRA, 1983); e família (BHATTACHARYYA *et al.*, 1981).

1.7.2 - Interações com Outros Sistemas Biológicos

Todas as células possuem carboidratos em suas superfícies tanto na forma de glicoproteínas e glicolipídios (eucarióticas) ou de polissacarídios (procarióticas). Esses carboidratos servem como sítio de ligação para as lectinas, ligações estas que induzem uma variedade de alterações nas células que, por sua vez, refletem as atividades biológicas das lectinas. O estudo dessas atividades fornecem informações importantes a respeito das próprias lectinas, bem como de sua aplicabilidade.

A reação de aglutinação foi a primeira manifestação de interação entre lectinas e células e constituiu uma das maneiras mais fáceis para revelar a presença de lectinas em um material biológico. Embora a aglutinação pareça um processo simples, é necessário que algumas condições en-

tre a lectina e a célula complexante sejam satisfeitas. Com relação à lectina devem ser considerados seu peso molecular e o número de sítios de ligação para carboidratos. Do ponto de vista da célula deve ser levado em consideração o número e a acessibilidade dos sítios de ligação para as lectinas, fluidez das membranas, relevando-se, ainda, o estágio metabólico da célula (NICOLSON, 1974). A aglutinação é também afetada por condições externas, tais como temperatura, concentração celular, etc. A participação das lectinas nas reações de aglutinação, constitui uma excelente ferramenta utilizada na identificação da natureza dos carboidratos presentes nas células, bem como para a detecção de modificações das superfícies celulares durante os processos normais e patológicos, tais como crescimento, desenvolvimento ou transformações malignas (SELA *et al.*, 1970).

A estimulação mitogênica de linfócitos por certas lectinas, constitui uma de suas principais atividades biológicas, uma vez que a estimulação de linfócitos é um fenômeno chave na resposta imunológica. A primeira atividade mitogênica detectada em lectinas foi àquela associada a lectina de Phaseolus vulgaris (NOWELL, 1960). Posteriormente, foram encontradas atividades semelhantes em lectinas isoladas de Lathyrus sativa (KOLBERG & SLETTEN, 1982), Canavalia ensiformis (POWELL & LEON, 1970) e Lathyrus odoratus (KOLBERG, 1978). A maioria das lectinas mitogênicas até hoje estudadas estimulam somente uma população de linfócitos timo-dependentes (células T ou linfócitos T), sendo inativas para os linfócitos timo-independentes (células B ou linfócitos B). No entanto, existem exceções fora do reino vegetal, como é o caso da lectina de Dictyostelium purpureum (LIPSICK *et al.*, 1980) que estimulam células B mas não células T. Há também indicações que estimulam tanto linfócitos T como B (SHARON & LIS, 1989). Um fato interessante é que as lectinas mitogênicas, ao contrário dos antígenos, estimulam uma grande proporção de linfócitos susceptíveis independentemente de sua especificidade antigênica. Esta propriedade leva a uma amplificação da resposta

ta mitogênica, auxiliando no estudo e detecção de alterações associadas com a proliferação celular (IMBODEN, 1988).

Várias lectinas mitogênicas participam de reações de lise celular, processo conhecido como citotoxicidade dependente de lectina (YUE *et al.*, 1973). Nessas reações não é necessário que haja especificidade imune entre as células, haja vista a habilidade das lectinas para ligar-se a ambas as células, efetora e célula alvo, promovendo, assim, a proximidade necessária para facilitar a atividade citolítica das células efetoras. No entanto, deve ser ressaltado que a ligação das lectinas às células não é suficiente para desencadear o processo de lise celular, pois sabe-se que lectinas não mitogênicas também ligam-se às células sem causar-lhes nenhum dano. Tem sido proposto para as reações dependentes de lectinas, que estas se ligam e modificam a superfície das células facilitando o reconhecimento pelas células efetoras (SHARON & LIS, 1989).

Uma outra participação das lectinas em processos de citotoxicidade é na destruição de células tumorais pelos macrófagos (ROTHLEIM & KIM, 1982). Essa propriedade é mediada por um número limitado de lectinas que são hábeis para se ligarem a carboidratos das células alvos e efetoras.

Uma outra atividade biológica atribuída a algumas lectinas é a ação insulinomimética. É hoje bastante evidente que a concanavalina A, aglutinina de germe de trigo e outras lectinas (CUATRECASAS & TELL, 1973; SHECHTER & SELA, 1981) mimetizam os efeitos da insulina nos adipócitos estimulando a lipogênese, o transporte de glicose e a inibição da lipólise. Esta atividade pressupõe que existem receptores glicídicos nas superfícies celulares para a insulina com os quais as lectinas são capazes de interagir (CUATRECASAS, 1973).

1.8 - Aplicação das Lectinas

As lectinas se caracterizam por apresentarem uma

série de propriedades biológicas singulares e algumas das quais já têm sido empregadas em estudos bioquímicos, clínicos e biológicos (SHARON & LIS, 1989).

A inibição da interação específica entre um biopolímero e uma lectina por açúcares simples, pode ser tida como uma evidência de que o polímero contém carboidratos. Assim é que as lectinas têm sido utilizadas como suportes em cromatografias de afinidade para o isolamento e demonstração da natureza glicoprotéica de receptores de hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores, imunoglobulinas e compostos relacionados (GIOANNINI *et al.*, 1982).

As lectinas têm dado uma grande colaboração ao conhecimento da estrutura química das membranas, das vias intracelulares de glicosilação de proteínas e de mudanças que ocorrem em glicoconjugados durante a diferenciação, crescimento e desenvolvimento celular (LIS & SHARON, 1986).

As modificações no conteúdo, na distribuição e acessibilidade de glicoconjugados celulares e extracelulares são, frequentemente, associadas com os processos patológicos. Assim sendo, o estudo das lectinas tem se intensificado na tentativa de usá-las como reagentes nos diagnósticos em casos clínicos. Dessa forma, é que numerosos estudos têm sido feitos comparando a ligação das lectinas a células normais e malignas. Tais investigações tem contribuído para o esclarecimento das alterações estruturais dos carboidratos das superfícies celulares que acompanham as transformações malignas, bem como, na caracterização de metástases (FREEMAN, 1983; FISCHER *et al.*, 1984). Assim, estudos de interação da lectina de *Helix pomatia* com células malignas, forneceram indicações que esta pode ser utilizada no prognóstico de câncer de mama (YUAN *et al.*, 1986). Por outro lado, embora tenha sido detectado um número considerável de lectinas que interagem com células malignas, o uso clínico destas ainda é limitado. A principal razão para isto é que os tumores geralmente mostram uma heterogeneidade celular. Ainda na patologia as lectinas têm se mostrado como excelentes ferramentas nos estudos de doenças lisossomais (CASTAGNARO *et al.*, 1987; LAGERON, 1987) e da pneumonia (DAMJANOV, 1987).

Na clínica, lectinas têm contribuído para a elucidação da estrutura química dos determinantes de grupos sanguíneos do sistema ABO. Assim, estudos de 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, forneceram as primeiras indicações de que N-acetilgalactosamina e L-fucose desempenham um papel importante na especificidade dos grupos A e O(H), respectivamente (LIS & SHARON, 1986). Lectinas também têm sido usadas na distinção de células e subgrupos sanguíneos como exemplo temos a lectina de Dolichos biflorus (JUDD, 1980) e Crotalaria striata (de OLIVEIRA et al., 1990) que distinguem o subgrupo A₁ do A₂ e a lectina de Vicia graminea que diferencia células M e N (PRIGENT & BOURRILLON, 1981). Ainda na pesquisa clínica, a estimulação mitogênica por lectinas, em particular a PHA e a concanavalina A, fornecem um meio fácil e simples para avaliar a imunocompetência de pacientes padecendo de uma diversidade de doenças, como por exemplo os portadores da AIDS (SHARON & LIS, 1989). Ainda nesta área, as lectinas têm se mostrado uma ferramenta poderosa nos estudos de transplante de medula (REISNER & GAN, 1985; REISNER, 1987), no efeito do vôo espacial sobre o funcionamento do sistema imune do homem (COGOLI & TSCHOPP, 1985) e na identificação de células leucêmicas (GABIUS et al., 1988).

A seletividade de lectinas por glicoproteínas de superfícies celulares tem sido empregada em microbiologia e em parasitologia. Assim é que lectinas têm sido usadas na diferenciação de membros da família Neissariaceae. SCHAEFER et al. (1979) encontraram que a aglutinina de germe de trigo aglutina mais frequentemente Neisseria gonorrhoeae do que Neisseria meningitidis, embora tenha sido relatado que a maioria dos gonococci, uma cepa de Neisseria lactamica e vários meningococci também interagem com a aglutinina de germe de trigo (CURTIS & SLACK, 1981). As lectinas também têm auxiliado na diferenciação entre formas procíclicas de tripanossomas africanos (MUTHARIA & PEARSON, 1987) e de cepas de Tripanossoma cruzi (SCHOTTELIUS, 1982).

1.9 - Lectinas nas Dietas

Devido a grande tendência atual à utilização de alimentos naturais, principalmente de origem vegetal e, tendo em vista que um aumento no suprimento de proteínas animais não é realístico, as proteínas vegetais terão uma função mais relevante no campo da nutrição animal.

É de conhecimento geral que a maior parte dos alimentos, principalmente os pertencentes a família Leguminosae, contém lectinas as quais podem ser potencialmente tóxicas quando consumidas, representando um grande risco para a saúde animal e humana (LIENER, 1986; PUSZTAI, 1989). A toxicidade parece depender não somente do animal que ingere essas lectinas, mas do tipo de lectina utilizada. O grau de toxidez das lectinas de diferentes origens pode ser atribuída a variações na susceptibilidade à digestão no intestino dos animais.

Realmente, tem sido observado que proteínas vegetais são, geralmente, mais resistentes ao ataque proteolítico do que as proteínas de origem animal (LIENER, 1976; BRESSANI & ELIAS, 1980; PUSZTAI, 1985). Experimentalmente, tem se verificado que certas lectinas são altamente resistentes a proteólise no trato gastrointestinal, visto que algumas lectinas podem ser recuperadas intactas e biologicamente ativas em amostras de fezes de ratos alimentados com dietas contendo lectinas de Phaseolus vulgaris (PUSZTAI, 1981), Canavalia ensiformis (NAKATA & KIMURA, 1985) e Canavalia brasiliensis (VASCONCELOS et al., 1989).

Sendo as lectinas resistentes à digestão no intestino elas podem reagir com carboidratos existentes nas membranas das numerosas células intestinais, interferindo nas suas funções digestivas, absorptivas, protetoras e secretórias (JAFFÉ, 1960). Assim é que tem sido observado que a lectina de Phaseolus vulgaris se liga as microvilosidades do duodeno e jejuno de ratos, resultando no aparecimento de lesões e desenvolvimento anormal das vilosidades (PUSZTAI et al., 1979; KING et al., 1986).

Por outro lado, a ingestão de lectinas tóxicas provoca um desequilíbrio do metabolismo intermediário das proteínas, gorduras e carboidratos, possivelmente devido a alterações da permeabilidade intestinal (DONATUCCI et al., 1987). Ademais, lectinas podem interagir com hidrolases da superfície intestinal interferindo no processo normal de absorção, uma vez que estas enzimas desempenham um papel fundamental na digestão de proteínas e carboidratos (TRIADOU & AUDRAN, 1983). Mais ainda, esta interação causa uma inibição das peptidases (ERICKSON & KIM, 1983) e enteroquinases (ROUANET et al., 1983) intestinais. De fato, foi verificado que muitas vezes a ingestão de lectinas induz uma redução das atividades das peptidases da mucosa intestinal (HIGUCHI et al., 1984; ROUANET et al., 1985).

Essas observações dos efeitos das lectinas sobre a estrutura e função absorptivas do intestino apoiam a sugestão original de JAFFÉ (1960) de que os resultados observados devido a ingestão de lectinas se devem a habilidade delas combinarem-se com receptores celulares intestinais específicos, levando a uma interferência não específica em relação a absorção e utilização dos nutrientes. Realmente, grande parte das lectinas ocasiona uma modificação das vilosidades intestinais, redução da área de absorção e aceleração da perda de células. Todos esses danos podem justificar o baixo valor nutritivo das proteínas de leguminosas quando ingeridas cruas.

De maneira geral, a administração oral de lectinas a ratos e camundongos causa um retardamento no crescimento, distúrbios gastrointestinais e, eventualmente, a morte (ISHIGURO et al., 1983; VASCONCELOS et al., 1989).

PUSZTAI et al. (1981), consideraram a possibilidade das lectinas intactas ou parcialmente digeridas penetrarem no sistema circulatório levando a uma série de reações adversas, tais como a inibição da síntese de proteínas, hipersensibilidade imune local ou sistêmica ou, ainda, a dano direta dos tecidos. Exemplos mais diretos de alterações causadas pela ingestão de lectinas tóxicas é a hiperplasia pancreática, causada pela lectina da soja (GRANT

et al., 1987) e atrofia do timo, decorrente da lectina de Phaseolus vulgaris (de OLIVEIRA et al., 1988; de OLIVEIRA, 1986).

Assim a combinação de todos esses efeitos pode afetar a utilização dos nutrientes bem como o crescimento e a saúde dos homens e animais.

1.10 - Destoxificação

Os efeitos tóxicos das lectinas podem ser minimizados pelo uso de EDTA (YARIV et al., 1968), urea, detergentes sintéticos e enzimas (LIENER, 1958), extremos de pH (SHIOMI et al., 1979) e tratamento térmico (LIENER & HILL, 1953; GRANT et al., 1982).

Um número considerável de trabalhos mostrou que o tratamento térmico tem sido bastante aplicado na inativação de substâncias antinutricionais por ser um método acessível e fácil. No entanto, a eficácia desse tratamento depende das condições em que ele é feito. Por exemplo, OSBORNE e MENDEL (1917) verificaram que o aquecimento a seco é menos efetivo do que sob condições aquosas. Assim é que a lectina presente em sementes de Phaseolus vulgaris retém parte de sua atividade mesmo quando submetida a aquecimento a seco durante 18 horas (de MUELENAERE, 1964), enquanto que o cozimento das mesmas a 100°C por 10 minutos é suficiente para abolir toda sua atividade tóxica (GRANT et al., 1982). Por outro lado, o superaquecimento leva, algumas vezes, a inviabilidade de certos aminoácidos resultando na redução do valor nutritivo do alimento. Assim, a eficácia da inativação dos fatores antinutricionais depende do controle da temperatura, assim como da duração do tratamento.

Estratégias alternativas visando a eliminação total da toxidez das lectinas ou mesmo sua redução no vegetal têm sido empregadas. Exemplos destas são a autoclavagem (KAKADE & EVANS, 1965) e a obtenção de cultivares geneticamente modificados contendo um baixo teor de lectinas, sem,

contudo, alterar a proteína total da semente (OSBORN & BLISS, 1985).

1.11 - Objetivos do Trabalho

O presente trabalho tem como objetivo a purificação da lectina presente em sementes de Dioclea guianensis Duke, var. lasiophylla e a sua caracterização parcial através de métodos físicoquímicos, imunoquímicos e biológicos. Pretende-se também com os dados obtidos, demonstrar a semelhança desta lectina com outras já isoladas de sementes de espécies pertencentes a tribo Diocleae e assim, indiretamente, comprovar a importância fisiológica dessas proteínas para o vegetal, bem como contribuir com a idéia de seu uso como marcadores taxonômicos.

2 - MATERIAIS

2.1 - Sementes

No presente trabalho foram utilizadas sementes de Dioclea guianensis Duke, variedade lasiophylla, coletadas no campus da Universidade Federal do Ceará.

2.2 - Sangue

Amostras de sangue humano do sistema ABO foram obtidas de doadores sadios através do Centro de Hemoterapia do Ceará (HEMOCE).

Amostras de sangue de coelho foram obtidas de animais adultos mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Amostras de sangue de boi, carneiro, porco e ovelha foram coletadas de animais pertencentes ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

2.3 - Cistos de Artemia salina

Cistos de camarão (Artemia salina Leach) foram doados pelo Setor de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

2.4 - Outros Materiais

Acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, agarose, albumina sérica bovina, inibidor de tripsina de soja, ovalbumina e superose 6 HR 10/30, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

Adjuvante completo de Freund, B.D. Merieux, França.

Beta-mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio, E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Bio Gel P-100, Bio Rad Laboratories, EUA.

CM-Sepharose, DEAE-Sepharose e Sephadex G-50 e G-100, Uppsala, Suécia.

Diaminobenzidino, Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Ovos de camarão, Carolina Biological supply Company, Burlington, North Carolina, Gladstone, Oregon.

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3 - MÉTODOS

3.1 - Preparação da Farinha

Sementes quiescentes de Dioclea guianensis Duke, foram primeiramente fragmentadas e, em seguida, trituradas em moinho de café (Krups tipo 200). A farinha resultante foi transferida para frascos hermeticamente fechados e mantida a temperatura de aproximadamente 8°C.

3.2 - Análise Elementar

3.2.1 - Determinação de Umidade

Para a determinação da umidade, pesa-filtros tarados contendo de 1 a 2 gramas de farinha de Dioclea guianensis, foram colocados em estufa a 110°C por 24 horas. Em seguida, eles foram transferidos para um dessecador até que atingissem a temperatura ambiente. Os pesa-filtros foram pesados e colocados na estufa por mais quatro horas e, assim, sucessivamente até a obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo esse valor expresso em percentagem.

3.2.2 - Determinação do Nitrogênio Total

A determinação do teor de nitrogênio total da fa-

rinha de Dioclea guianensis foi feita seguindo-se o método descrito por DAVIDSON (1970).

Amostras contendo de 5 a 10 mg da farinha foram mineralizadas na presença de 1,5ml de ácido sulfúrico concentrado e 1,5 g de catalisador ($K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O$, na proporção de 5:1, peso/peso). As amostras digeridas foram, então, transferidas para um destilador de Kjeldahl onde foram adicionadas 25 ml de água deionizada e 15 ml de NaOH 40 %. O destilado foi coletado em 10 ml de ácido bórico a 2 % encerrando o indicador verde de bromocresol e vermelho de metila e titulado com HCl 0,01 N, que havia sido previamente padronizado usando-se amostras de $(NH_4)_2SO_4$ de massa conhecida.

3.2.3 - Determinação de Lipídios Totais

Os lipídios totais foram determinados conforme a técnica descrita por TRIEBOLD (1946), sendo o éter substituído por hexana.

Amostras contendo de 1 a 2 gramas da farinha de Dioclea guianensis foram pesadas em cartuchos de papel de filtro e colocadas em um extrator de Soxhlet contendo hexana normal por aproximadamente 4 horas. Ao término da extração, o solvente foi evaporado em banho-maria a 70°C e, em seguida, o material extraído pesado. A fração lipídica total foi estimada em percentagem do peso seco da amostra.

3.2.4 - Determinação de Cinzas

Para determinação do teor de cinzas foram utilizados cadinhos de porcelana tarados contendo de 1 a 2 gramas da amostra. Os cadinhos foram colocados em mufla a 500°C até a completa destruição da matéria orgânica, após o que foram mantidos em um dessecador até que atingissem a tempe-

ratura ambiente. Em seguida, eles foram pesados e o teor de cinzas calculado por diferença e expresso em porcentagem do peso seco da amostra.

3.3 - Determinação da Concentração Ótima de NaCl para Extração da Atividade Hemaglutinante

A farinha de Dioclea guianensis preparada como descrito em 2.1 foi submetida à extração com água destilada e com soluções de NaCl a diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 M) na relação de 1:10 (peso/volume) por 4 horas sob agitação constante a temperatura ambiente. Os extratos foram centrifugados a 20.000 x g (centrífuga Sorval RC-5) por 20 minutos a 5°C. Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em papel de filtro Whatman nº 1 e submetidos a ensaio de atividade hemaglutinante e dosagem de proteína. Os precipitados foram descartados.

3.4 - Determinação do pH Ótimo de Extração

A farinha de Dioclea guianensis, obtida conforme o item 2.1, foi submetida à extração com NaCl 0,15 M na proporção de 1:10 (peso/volume), sendo o pH ajustado com HCl ou NaOH para os seguintes valores: 2, 4, 6, 8 e 10. Estas suspensões foram deixadas 4 horas a temperatura ambiente sob agitação constante e, então, centrifugadas a 20.000 x g por 20 minutos, a 5°C. Os sobrenadantes foram filtrados em papel de filtro. Os resíduos obtidos foram desprezados e alíquotas dos sobrenadantes foram usadas para determinação de proteína e ensaio de atividade hemaglutinante.

3.5 - Preparação do Extrato Total a pH 8,0

Conforme os resultados obtidos nos itens 3.3 e 3.4, farinha de sementes quiescentes de Dioclea guianensis, preparada como descrito em 2.1, foi submetida à extração com NaCl 0,15 M, pH 8,0, na proporção de 1:10 (peso/volume) por 4 horas a temperatura ambiente. Após esse tempo, a suspensão foi centrifugada a 20.000 x g, por 20 minutos, a 5°C e em seguida, filtrada em papel de filtro. O resíduo foi descartado e o sobrenadante obtido, chamado Extrato Total, foi usado para determinação da atividade hemaglutinante e de proteína. O extrato total foi dialisado contra água durante 48 horas e, posteriormente, liofilizado e armazenado a 7°C, para uso posterior.

3.6 - Determinação de Proteínas

As dosagens de proteínas nas diversas amostras foram feitas pelo método de BRADFORD (1976). A 100 µl de amostra, em diferentes concentrações foram adicionados 5 ml do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm em espectrofotômetro Varian 634. A concentração de proteínas foi estimada em relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina.

A concentração de proteína nos eluatos das colunas cromatográficas foi determinada pela medida da absorbância a 214, 230 ou 280 nm.

3.7 - Determinação da Atividade Hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada utilizando-se o método descrito por MOREIRA & PERRONE (1977) mo-

dificado para uso de hemácias a 2 % em NaCl 0,15 M na presença de Ca^{+2} e Mn^{+2} 5 mM usando-se tubos de ensaio.

As amostras a serem dosadas foram submetidas a diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) em salina 0,15 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM. A 0,25 ml de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho ou de outros animais. Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e deixados em repouso por mais 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, o material foi centrifugado a 3.000 x g (centrífuga Olidef cz) por 30 segundos e as leituras feitas a olho nú, sendo o título expresso como unidade de hemaglutinação (UH). 1 unidade de hemaglutinação é definida como sendo o inverso da maior diluição de uma dada solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2 %.

3.8 - Cromatografias

3.8.1 - Cromatografia de Afinidade em Sephadex G-50

Ensaio preliminares de inibição por açúcares simples indicaram que a glicose era capaz de inibir a aglutinação de hemácias de coelho por extrato total de sementes de Dioclea guianensis. Desse modo, Sephadex G-50 foi usado como suporte de afinidade para o isolamento da lectina.

As cromatografias de afinidade em Sephadex G-50 foram feitas em uma coluna medindo 48 x 2,5 cm, preparada segundo DETERMAN (1969). O gel foi entumescido com água por 48 horas e a coluna montada deixando-se o gel sedimentar por gravidade. A coluna foi, então, equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM sendo a seguir aplicado o Extrato Total. Inicialmente a eluição foi feita com a mesma solução de equilíbrio e, em seguida, com glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M ou soluções de glicose 0,1 M em NaCl 0,15 M de modo a eluir todo o material retido na coluna. A eluição foi feita a um fluxo constante de 22 ml/hora e as frações de 0,3 ml tiveram suas absorbâncias determinadas a 280 nm em um espectrofotômetro Varian 634. Os picos obtidos foram

usados para dosagem de proteína e atividade hemaglutinante, dialisados, liofilizados e estocados para uso posterior.

3.8.2 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de DEAE-Sepharose

A fração retida na coluna de Sephadex G-50, denominada PIII, foi submetida a cromatografia de troca iônica em uma coluna de DEAE-Sepharose preparada segundo PETERSON & SOBER (1962). A resina foi previamente lavada com água seguida de NaOH 0,1 M, água, HCl 0,1 M e água. O gel foi usado para montagem de uma coluna medindo 26 x 1,3 cm sendo, a seguir, equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM. À coluna foram aplicados 15 mg do PIII dissolvidos em 1 ml do tampão de equilíbrio. A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio até a obtenção de todo material não retido e, em seguida, com um gradiente, linear de NaCl (0 → 1 M; 140 ml) preparado no tampão inicial. Todo processo cromatográfico foi feito a um fluxo constante de 34,8 ml/hora, sendo os efluentes da coluna recolhidos em frações de 2,4 ml/tubo. A absorbância a 230 nm e a atividade hemaglutinante foram determinadas como já citado nos itens 3.6 e 3.7, respectivamente.

3.8.3 - Cromatografia da Fração PIII em Coluna de CM-Sepharose

As cromatografias de troca iônica em CM-Sepharose foram feitas em uma coluna medindo 28 x 1,5 cm, preparada segundo PETERSON & SOBER (1962). O adsorvente foi lavado com água seguida de HCl 0,1 M, água, NaOH 0,1 M e água. À coluna equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, foram aplicados 15 mg do PIII dissolvidos em 1 ml do tampão de equilíbrio. A eluição foi feita com o tampão de equilíbrio

seguido por um gradiente linear de NaCl (0→1 M; 140 ml). Foram coletadas frações de 2,9 ml/tubo mantendo-se um fluxo de 34,8 ml/hora. A absorbância a 230 nm e a atividade hemaglutinante foram determinadas como já citado nos itens 3.6 e 3.7, respectivamente.

3.8.4 - Filtração em Gel da Fração PIII em Bio Gel P-100

Com a finalidade de determinar o peso molecular da lectina em estudo, foi utilizada uma coluna de Bio Gel P-100 medindo 82 x 1,7 cm. O gel foi entumescido com água por pelo menos 72 horas e a coluna preparada deixando-se o gel sedimentar por gravidade sendo, a seguir, equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM.

A coluna foi previamente calibrada com "Blue dextran", albumina sérica bovina, ovalbumina, inibidor de tripsina de soja e lectina de Dioclea grandiflora. À coluna padronizada foi aplicada a fração PIII obtida por cromatografia em Sephadex G-50. Todas as amostras encerravam 2,5 mg das diferentes substâncias dissolvidas em 250 ul do tampão de equilíbrio e foram eluídas com o mesmo tampão. O fluxo foi mantido a 6 ml/hora sendo coletadas frações de 1,9 ml/tubo. O peso molecular foi determinado com relação as amostras de peso molecular conhecido.

3.8.5 - Fração PIII em Coluna de Sephadex G-100

A fração PIII foi submetida a filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 (87 x 1,7 cm) equilibrada e eluída com tampão tris-HCl contendo glicose 0,3 M.

Amostras de "Blue dextran", albumina sérica bovina, ovalbumina e inibidor de tripsina de soja, foram utilizadas a fim de calibrar a coluna. À coluna padronizada foi

aplicada uma alíquota do PIII. As amostras (2,5 mg/250 μ l) foram eluídas usando-se o mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo foi mantido a 28 ml/hora sendo os efluentes da coluna recolhidos em frações de 2,4 ml/tubo.

3.8.6 - Filtração em Gel da Fração PIII em Coluna de Superose 6 HR 10/30 Acoplada em FPLC

Alíquotas de 100 μ l da fração PIII foram analisadas num sistema de FPLC (Pharmacia) equipado com uma coluna de filtração em gel, Superose 6 HR 10/30, equilibrada e eluída com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e monitorada a 214 nm. A eluição foi feita a um fluxo de 0,1 a 0,5 ml/min e as frações recolhidas em um coletor automático FRAC/100. As frações coletadas foram submetidas ao ensaio de atividade hemaglutinante como já descrito no item 3.7.

3.9 - Eletroforeses

3.9.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS na Presença e Ausência de Beta-mercaptoetanol

As eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo SDS, na presença e ausência de beta-mercaptoetanol, foram feitas seguindo-se o método de LAEMMLI (1970), adaptado para o uso de placas medindo 17,5 x 16,5 cm. Para a montagem das placas foram usados um gel espaçador, encerrando 3,95 % de acrilamida e 1 % de SDS em tampão tris-HCl 1 M, pH 6,8 e um gel de separação, contendo 17,6 % de acrilamida e 1 % de SDS em tampão tris-HCl 1 M pH 8,8.

Farinha (60 mg/ml), amostras liofilizadas de extrato total (1-2 mg/ml), bem como lectinas (1-2 mg/ml) de várias espécies de leguminosas foram dissolvidas em tampão

fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, contendo 1 % de SDS e, quando requerido, 1 % de beta-mercaptoetanol. As amostras tratadas com beta-mercaptoetanol foram incubadas a 100°C por 10 minutos, sacarose a 20 % e azul de bromofenol a 0,05 % foram adicionados às amostras a fim de aumentar a densidade e permitir a visualização da frente da corrida, respectivamente. Aliquotas de 8 ul foram aplicadas aos poços existentes no gel espaçador.

Para desenvolvimento da eletroforese foi aplicada uma corrente de 40 mA, durante 4 hora, utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua Buchler. As proteínas foram visualizadas por tratamento com solução de coomassie brilliant blue R-250 0,005 % em metanol, ácido acético e água (4:0,7:5,3) por um período de 16 horas. O descoloramento foi feito em uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5:1:8,0).

3.9.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para Proteínas Básicas.

Amostras liofilizadas de PIII, obtidas por cromatografias de afinidade em Sephadex G-50 e das frações ativas obtidas por cromatografias de troca iônica (DEAE- e CM-Sepharose) foram estudadas por eletroforese em gel de poliacrilamida segundo a técnica descrita por REISFELD (1962).

Tubos medindo 12,5 x 0,5 cm foram montados usando-se géis de concentrações de acrilamida diferentes: um gel espaçador e um gel de corrida encerrando 2,5 e 7,5 % de acrilamida, respectivamente.

As amostras foram dissolvidas em tampão tris-HCl 0,01 M pH 6,8 de modo que suas concentrações finais fossem de 2 mg/ml. Aliquotas de 10 a 20 ul contendo fucsina a 0,5 % (a fim de permitir a visualização da frente de corrida) foram aplicadas aos tubos de gel e submetidas a uma corrente de 6 mA/tubo durante 3 horas.

A coloração para detecção de proteínas foi feita com coomassie brilliant blue R-250 0,005 % em metanol, ácido acético e água (4:0,7:3,3) durante 16 horas. Para a descoloração foi utilizada uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5:1:8,0).

3.10 - Métodos Imunoquímicos

3.10.1 - Preparação de IgG (Coelho) contra Proteínas de Dioclea guianensis

Antissoros contra extrato total e fração PIII de Dioclea guianensis foram obtidos em coelhos albinos adultos. A sensibilização inicial foi feita por via intramuscular, na coxa, com uma emulsão contendo extrato total (10 mg) ou PIII (2 mg) dissolvidos em 0,5 ml de NaCl 0,15 M e 0,5 ml do adjuvante completo de Freund. Após 21 dias, foi administrado subcutaneamente, nas costas do animal, uma dose de reforço encerrando a mesma quantidade de proteína dissolvida em 1,0 ml de NaCl 0,15 M. Decorridos 15 dias do primeiro reforço, foi feita a primeira sangria na orelha do animal e dado uma dose adicional igual a anterior. O sangue coletado foi deixado em repouso por uma hora a 37°C e o soro obtido centrifugado a 4.000 x g por 10 minutos. A partir de então, foram feitas sangrias e administradas doses adicionais de reforços a intervalos de 7 dias até que tenha acumulada uma quantidade de soro satisfatória. As imunoglobulinas foram obtidas conforme FIGURA 01 segundo o método de HARBOE & INGLID (1973).

Antes dos animais terem sido sensibilizados, seus soros foram coletados e usados como controles nos experimentos imunoquímicos.

ANTISSORO

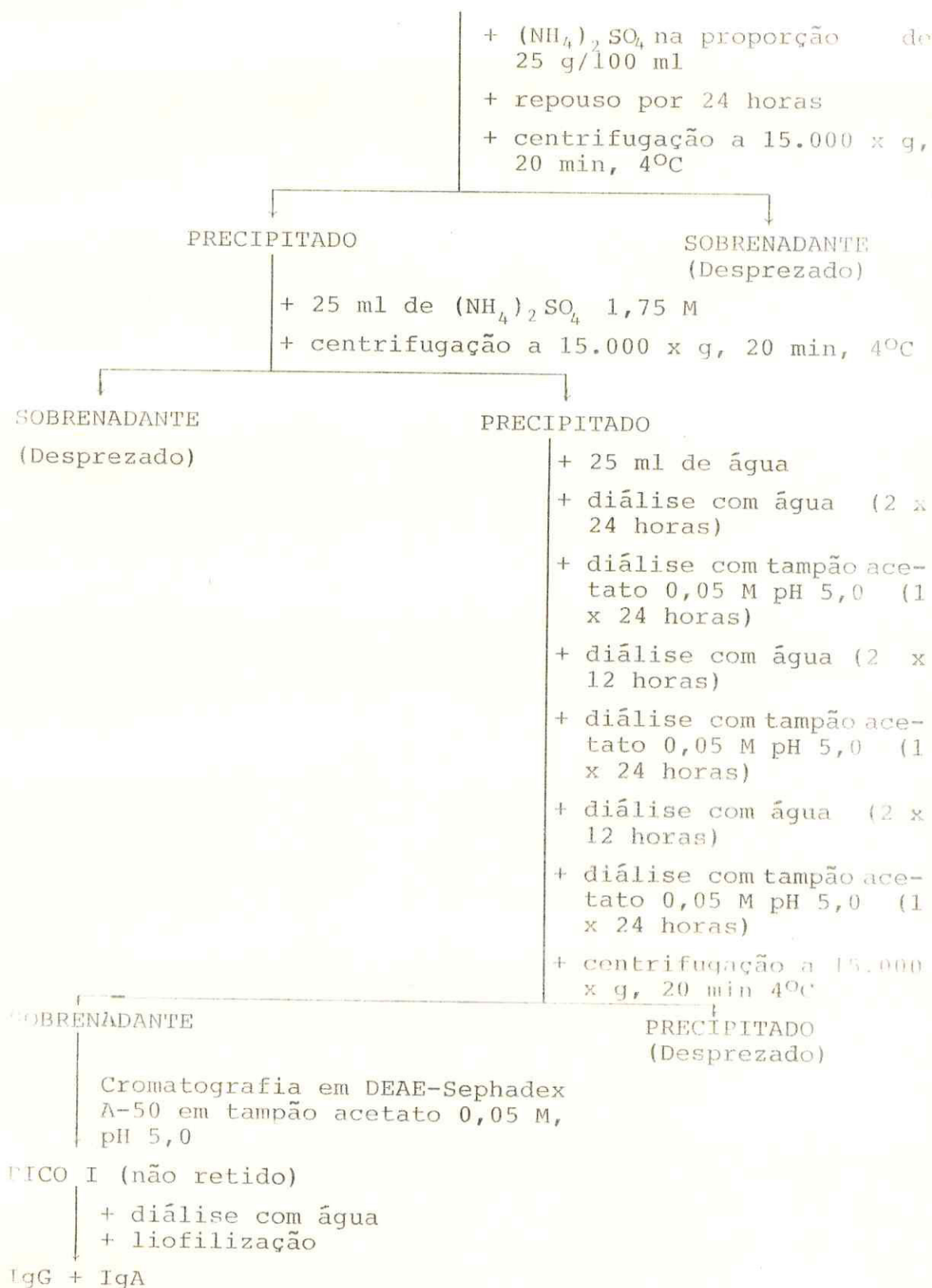


FIGURA 01 - Esquema geral para obtenção de IgG de coelho.

3.10.2 - Imunoeletroforese

As experiências de imunoeletroforese usadas para avaliar a purificação do PIII foram desenvolvidas segundo o método descrito por CLAUSEN (1969).

Gel de agarose a 1 % em tampão tris-barbital pH 8,8, foi montado em placas de vidro medindo 19 x 6,5 cm. Após a solidificação foram feitos orifícios ao lado de uma canaleta central cortada longitudinalmente, onde foram aplicadas as amostras de extrato total de Dioclea guianensis e da fração PIII. A eletroforese foi desenvolvida a uma tensão constante de 7 volts/cm durante 3 horas. Ao final da corrida eletroforética, a IgG contra extrato total de Dioclea guianensis foi aplicada na canaleta e deixada difundir por 48 horas, em câmara úmida, de modo a permitir a reação antígeno e anticorpo. Em seguida, as placas foram imersas em NaCl 0,15 M por 48 horas e lavadas com água destilada por 24 horas. O gel foi então seco e corado com coomassie brilliant blue 0,005 % por 12 horas e descorado com ácido acético a 7 %.

3.10.3 - Imunodifusão

Os ensaios de imunodifusão foram efetuados seguindo-se a técnica de imunodifusão dupla de Outcherlony descrita por CLAUSEN (1969).

Gel de agarose a 1 % contendo 0,02 % de azida sódica foi preparado em tampão tris-barbital, pH 8,8, e montado em placas de vidro medindo 10,5 x 8,0 cm. Após solidificação, foram feitos orifícios seguindo-se um esquema que permitia a comparação da lectina em estudo (PIII) com outras pertencentes ou não a tribo Diocleae. Nos orifícios radiais foram aplicadas as soluções de lectinas (25 mg/ml) e nos orifícios centrais as amostras de IgG anti PIII (50 mg/ml). Antígenos e anticorpo foram deixados difundir por pelo

menos 48 horas em câmara úmida e após a formação dos arcos de precipitação, as placas foram imersas em solução de NaCl 0,9 % contendo azida sódica 0,02 % durante 48 horas, com diversas trocas, a fim de retirar as proteínas que não reagiram. O NaCl foi retirado das placas através de lavagens sucessivas com água destilada por 24 horas. O gel foi posto para secar numa estufa a 37°C e corado com solução de Ponceau S (0,1 % em ácido acético 2 %) seguido de Verde Brilhante (0,1 % em ácido acético 2 %). A remoção do excesso de corante foi feita com solução de ácido acético a 7 %.

3.10.4 - "Western Blots"

A técnica descrita por TOWBIN *et al.*, (1974) foi usada nas experiências de "Western blots".

Amostras liofilizadas (1 mg/ml) das lectinas de Dioclea guianensis, Dioclea grandiflora, Canavalia brasiliensis e Canavalia ensiformis foram submetidas à corrida eletroforética seguindo-se o mesmo procedimento citado no item 3.9.1. Em seguida o gel de corrida foi colocado entre uma folha de papel de filtro e outra de nitrocelulose e o conjunto encubado no tampão tris-glicina pH 8,3. Após 30 minutos o conjunto foi montado na cuba de transferência como mostra a FIGURA 02. A transferência para o filtro de nitrocelulose foi feita a 4°C com uma corrente de 6v/cm.h. Após transferência, o filtro de nitrocelulose foi posto em contato com a IgG anti-PIII de Dioclea guianensis por 2 horas a 37°C e, em seguida, lavado pelo menos 5 vezes com tampão tris-HCl pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, BSA 1 % e Tween 20 0,05 % (tampão de lavagem). Posteriormente, o filtro de nitrocelulose foi colocado em contato com o anticorpo secundário marcado (Peroxidase-anti IgG de coelho) por 1 hora a 37°C e, a seguir, submetido ao mesmo processo de lavagem já citado. A revelação foi feita usando-se uma solução de tris 2 M contendo diaminobenzendino (DAB), H₂O₂ 30 % e água deionizada, sendo o excesso da solução de revelação

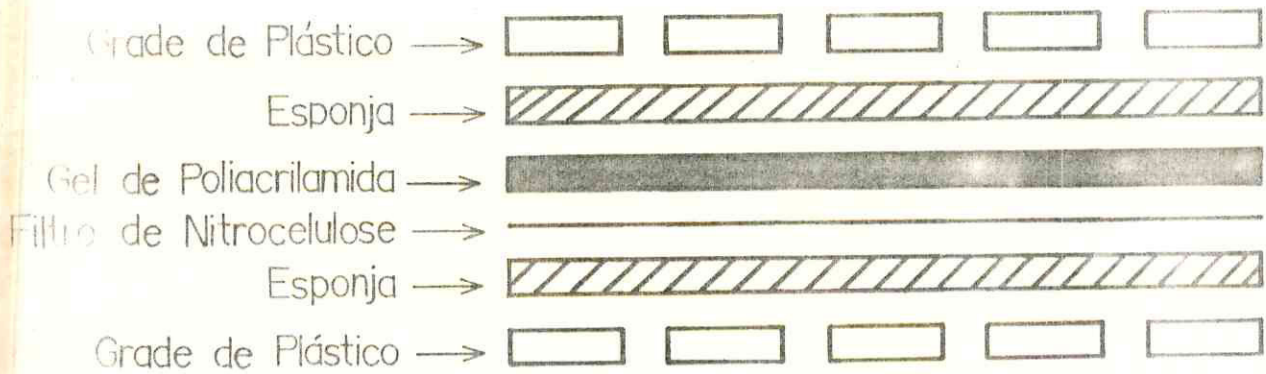


FIGURA 02 - Esquema do modelo sanduíche usado nos experimentos de "Western blots".

retirado com água deionizada.

3.11 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares

Soluções 1 M (em NaCl 0,15 M) de vários carboidratos foram utilizadas para determinação da especificidade da lectina por açúcares. A partir da solução inicial foram feitas diluições seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.) com solução de NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM. A 0,25 ml de cada diluição foram adicionadas alíquotas de 0,25 ml de uma solução de PIII que apresentava uma atividade hemaglutinante de 2 UH/ml. Os tubos foram, então, incubados a 37°C por 30 minutos e depois deixados em repouso por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, a 0,5 ml de cada diluição foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho a 2 %. Os tubos foram novamente incubados a 37°C por 30 minutos, mantidos a temperatura ambiente por mais 30 minutos, e centrifugados a 3.000 x g (centrífuga Olidef cz) por 30 segundos. A especificidade da lectina foi determinada comparando-se as menores concentrações dos diferentes açúcares capazes de inibir completamente a atividade hemaglutinante.

3.12 - Efeito do EDTA e dos Cátions Ca^{+2} e Mn^{+2} sobre a Atividade Hemaglutinante

Para a determinação do efeito do EDTA na atividade hemaglutinante foram preparadas soluções contendo 2 mg/ml da fração PIII dissolvidas em NaCl 0,15 M e em soluções de EDTA a 0,025 M; 0,05 M; 0,20 M e 0,25 M que foram, então, deixadas em repouso durante 30 minutos. A seguir, foram retiradas alíquotas das soluções para ensaio de atividade conforme descrito no item 3.7. A concentração de EDTA satisfa-

tória foi determinada com base no maior título de inibição de aglutinação obtido pelas diferentes molaridades de EDTA.

Após a obtenção da concentração de EDTA mais efetiva (0,20 M), a fração PIII foi desmetalizada de acordo com o método descrito por GALBRAITH & GOLDSTEIN (1970). 50 mg da lectina nativa foram dissolvidos em 7,5 ml de água deionizada sendo, a seguir, dialisada contra EDTA 0,20 M por 48 horas e, posteriormente, contra água deionizada por pelo menos 48 horas. Foram realizadas, ainda, mais duas diálises sucessivas, utilizando-se ácido acético 1 M e água deionizada por 48 e 50 horas, respectivamente. A solução dialisada foi liofilizada e submetida a ensaio de hemaglutinação.

O efeito dos cátions Ca^{+2} e Mn^{+2} foi determinado através da ativação da fração PIII que havia sido desmetalizada como descrito acima. Amostras contendo 2 mg/ml do material liofilizado foram dissolvidas em NaCl 0,15 M contendo Ca^{+2} e Mn^{+2} em concentrações variando de 0 a 10 mM. À partir de então, foram avaliadas as atividades hemaglutinantes para os diversos tratamentos.

3.13 - Determinação de Açúcares

O teor de açúcares foi determinado de acordo com a técnica descrita por DUBOIS et al., (1956). À Aliquota de 0,3 ml de uma solução contendo 0,3 mg da fração PIII, que havia sido previamente dialisada contra ácido acético 1 M, foram adicionadas 0,7 ml de água, 1 ml de fenol 5 % e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi inicialmente agitada e, então, deixada em repouso por 15 minutos. A seguir, foram feitas leituras das absorbâncias a 490 nm. A quantidade de açúcar foi determinada fazendo-se referências a uma curva de calibração previamente feita com glicose.

3.14 - Especificidade Sanguínea da Fração PIII

Com a finalidade de detectar o grau de especificidade sanguínea da fração PIII, foram feitos ensaios de atividade hemaglutinante com suspensões de hemácias (normais e tripsinizadas) a 2 % como descrito no item 3.7. Para o ensaio, foram utilizadas amostras (2 mg/ml) do PIII dissolvidas em NaCl 0,15 M e hemácias de coelho, boi, porco, ovelha e carneiro. Os eritrócitos tripsinizados foram obtidos seguindo-se a técnica usada por LIS & SHARON (1972). Inicialmente, 1 ml de sangue foi lavado três vezes com NaCl 0,15 M sendo, a seguir, adicionado tripsina na proporção de 0,2 mg de enzima por 10 ml de sangue. Esta suspensão, foi deixada em repouso por 1 hora a temperatura ambiente com agitações ocasionais e centrifugada a 3.000 x g por 5 minutos. O precipitado foi lavado por 6 vezes consecutivas com uma solução de NaCl 0,15 M e o precipitado resultante da última lavagem suspenso em salina 0,15 M. Os títulos foram determinados observando-se a última diluição de PIII que ainda apresentava aglutinação.

3.15 - Alguns Parâmetros Nutricionais

3.15.1 - Análise de Aminoácidos

A determinação da composição de aminoácidos foi feita pelo método de MOORE et al. (1958). Cisteína e Metionina foram determinadas pelo método de MOORE (1963).

3.15.2 - Termoestabilidade

3.15.2.1 - Termoestabilidade da lectina nas sementes

A estabilidade térmica da atividade hemaglutinante presente em sementes quiescentes de Dioclea guianensis foi determinada submetendo-as ao cozimento a aproximadamente 100°C. As sementes foram retiradas a intervalos de 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Após secagem a 37°C em estufa de circulação forçada de ar foram preparadas farinhas e então submetidas à extração como descrito em 3.5. Dos extratos totais obtidos foram retiradas alíquotas para determinação de proteína e ensaio de atividade hemaglutinante seguindo-se os métodos descritos anteriormente.

3.15.2.2 - Termoestabilidade da fração PIII

Com a finalidade de avaliar a termoresistência da lectina purificada, amostras da fração PIII (2 mg/ml) foram dissolvidas em NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM e incubadas em banho-maria a 70, 80, 85, 90 e 100°C por períodos de 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 minutos. As amostras aquecidas foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos e alíquotas foram retiradas dos sobrenadantes para dosagem de proteínas e ensaio de atividade hemaglutinante como previamente descritos.

3.16 - Bioensaio com Artemia Salina LEACH

No intuito de especular a toxicidade da lectina de Dioclea guianensis, bioensaios usando-se Artemia salina foram feitos seguindo-se a metodologia desenvolvida por MEYER

et al. (1982).

Ovos (5 mg) de Artemia salina foram colocados para eclodirem em um aquário contendo 5 l de água do mar, submetida previamente a um processo de filtração no LABOMAR (Laboratório de Ciência do Mar) da Universidade Federal do Ceará. Após 48 horas, as larvas foram coletadas usando-se uma pipeta Pasteur e transferidas para frascos, cada um encerrando 10 larvas e 5 ml de água do mar. Em seguida, foram adicionados a cada frasco amostras de PIII de modo a se obter concentrações finais de 10, 100, 1000 e 2000 $\mu\text{g/ml}$ ou de caseína nas mesmas concentrações (controle). Paralelamente foram feitas experiências usando-se amostras de concanavalina A (1000 $\mu\text{g/ml}$) e da lectina de Dioclea guianensis (2000 $\mu\text{g/ml}$) com glicose 0,1 M. Foram usados glicose 0,1 M e caseína como controle. A cada frasco, uma gota de uma suspensão de levedura (3 mg/5 ml de água do mar) foi adicionada como alimento. Decorridas 24 horas, as larvas vivas foram contadas e o percentual de morte de cada dose determinado.

4 - RESULTADOS

4.1 - Caracterização da Sementes de Dioclea guianensis Duke

A semente de Dioclea guianensis Duke, variedade lasiophylla (FIGURA 03), presente normalmente em número de 7 em vagens medindo aproximadamente 7,5 x 1,5 cm, é caracterizada por apresentar um tegumento castanho colado a amêndoa, forma elíptica e peso médio de 0,10 g, sendo cerca de 90 % do peso constituído pela amêndoa.

4.2 - Efeito da Concentração de NaCl na Extração de Proteína e da Atividade Hemaglutinante de Dioclea guianensis

Os resultados obtidos quando a farinha de Dioclea guianensis foi submetida a extração a diferentes concentrações de NaCl estão apresentados na TABELA 01, onde se pode observar a inexistência de diferenças significativas no que diz respeito ao teor protéico e a atividade hemaglutinante.

Tendo em vista este fato, optou-se pela concentração de NaCl 0,15 M para extração da proteína por ter uma tonicidade próxima àquela do sangue.

4.3 - Efeito do pH na Extração de Proteína e da atividade Hemaglutinante de Dioclea guianensis

A TABELA 02 mostra os resultados da influência do pH na extração de proteínas e da atividade hemaglutinante. Pode-se observar uma solubilidade crescente das proteínas a

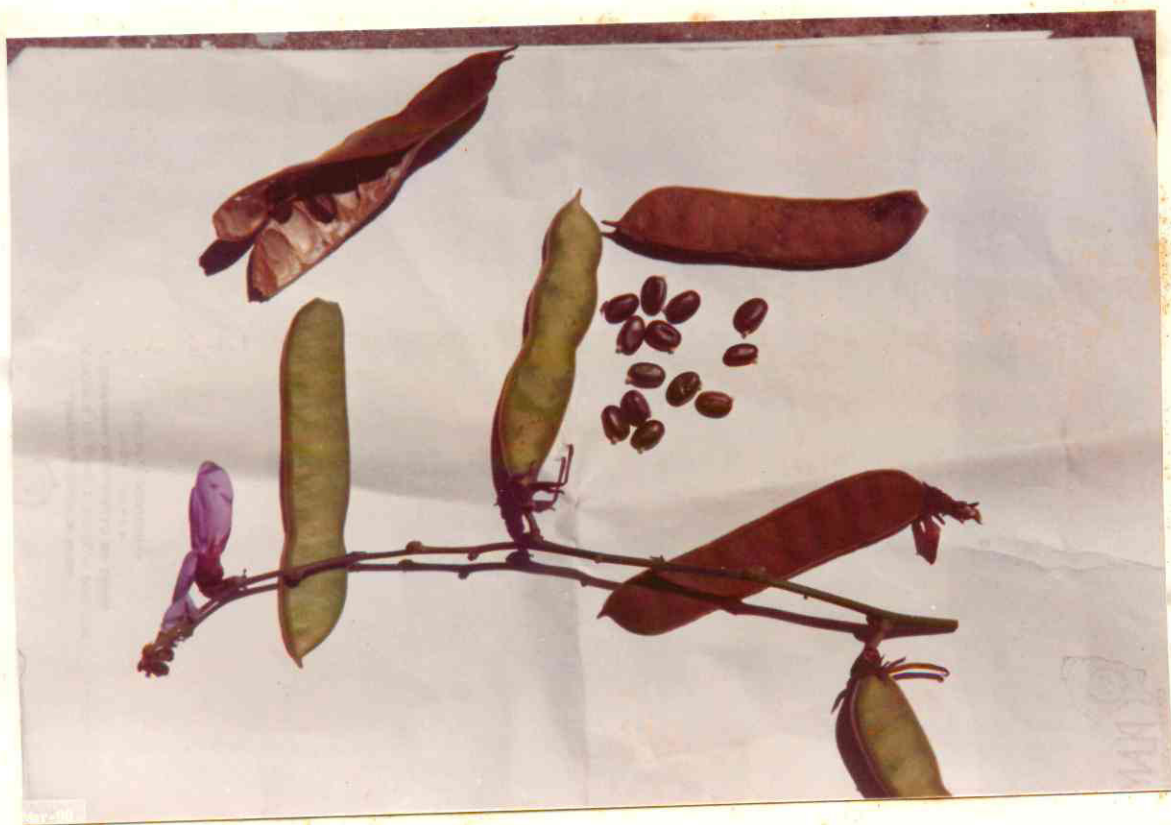


FIGURA 03 - Flor, vagens e sementes de Lioeclea guianensis

TABELA 01 - Extração das proteínas e da atividade hemaglutinante de sementes de *Dioclea guianensis* a diferentes concentrações de NaCl.

NaCl (M)	Proteína extraída mg/g de farinha	Atividade UH/g farinha (x 10 ³)	Hemaglutinante UH/mg proteína
Água	38,25	11,52	301,18
0,1	38,55	15,36	398,44
0,2	41,25	15,36	372,36
0,4	39,90	15,36	384,96
0,6	40,80	15,36	376,47
0,8	43,80	15,36	350,68
1,0	43,05	15,36	356,79

TABELA 02 - Extração das proteínas e da atividade hemaglutinante de sementes de Dioclea guianensis a diferentes valores de pH.

pH ^a	Proteína extraída	Atividade	Hemaglutinante ^b	
	mg/g de farinha ($\bar{x} \pm \sigma$)	UH/g farinha ($\bar{x} \pm \sigma$) (x 10 ⁻³)	UH/mg proteína ($\bar{x} \pm \sigma$)	
2,0	55,9 ± 4,6	19,5 ± 2,6	349,5 ± 81,9	
4,0	29,2 ± 1,2	19,5 ± 2,8	677,4 ± 104,8	
6,0	52,4 ± 2,4	21,1 ± 2,4	446,7 ± 23,6	
8,0	72,4 ± 0,9	63,7 ± 0	766,0 ± 120,2	
10,0	88,4 ± 4,2	23,4 ± 4,7	201,5 ± 114,8	

a - Meio de extração: NaCl 0,15 M com pH ajustado com HCl ou NaOH 1 N.

b - n = 3.

partir do pH 4,0, enquanto que uma melhor purificação foi obtida nos valores de pH 4,0 e 8,0. A atividade total extraída foi cerca de 4 vezes maior em pH 8,0 do que aquela extraída a pH 4,0.

4.4 - Purificação da Lectina de Sementes de *Dioclea guianensis*

De posse dos resultados obtidos, foi usado NaCl 0,15 M pH 8,0 como solução extratora das proteínas e da atividade hemaglutinante.

Ensaio preliminares de inibição mostraram que a atividade hemaglutinante do extrato total de *Dioclea guianensis* era inibida por açúcares simples, tais como glicose e manose. Assim sendo, o extrato total foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex G-50, previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM.

O perfil cromatográfico (FIGURA 04) obtido mostra a existência de três picos: dois (PI e PII) não ficaram retidos na coluna sendo eluídos com a própria solução de equilíbrio. Um terceiro pico (PIII), que contém toda a atividade hemaglutinante, só foi eluído com solução tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6, contendo NaCl 0,15 M ou com uma solução de glicose 0,1 M preparada em NaCl 0,15 M.

A TABELA 03 mostra os dados referentes à recuperação total da proteína e atividade hemaglutinante durante a purificação. De acordo com os resultados obtidos verificou-se que a cromatografia em coluna de Sephadex G-50 se mostra eficaz para fracionar as proteínas e separar a lectina de *Dioclea guianensis*, resultando numa purificação de cerca de 62 vezes e um rendimento em torno de 182 % em relação ao extrato total. Isto se deve provavelmente a eliminação de inibidores presentes nas sementes.

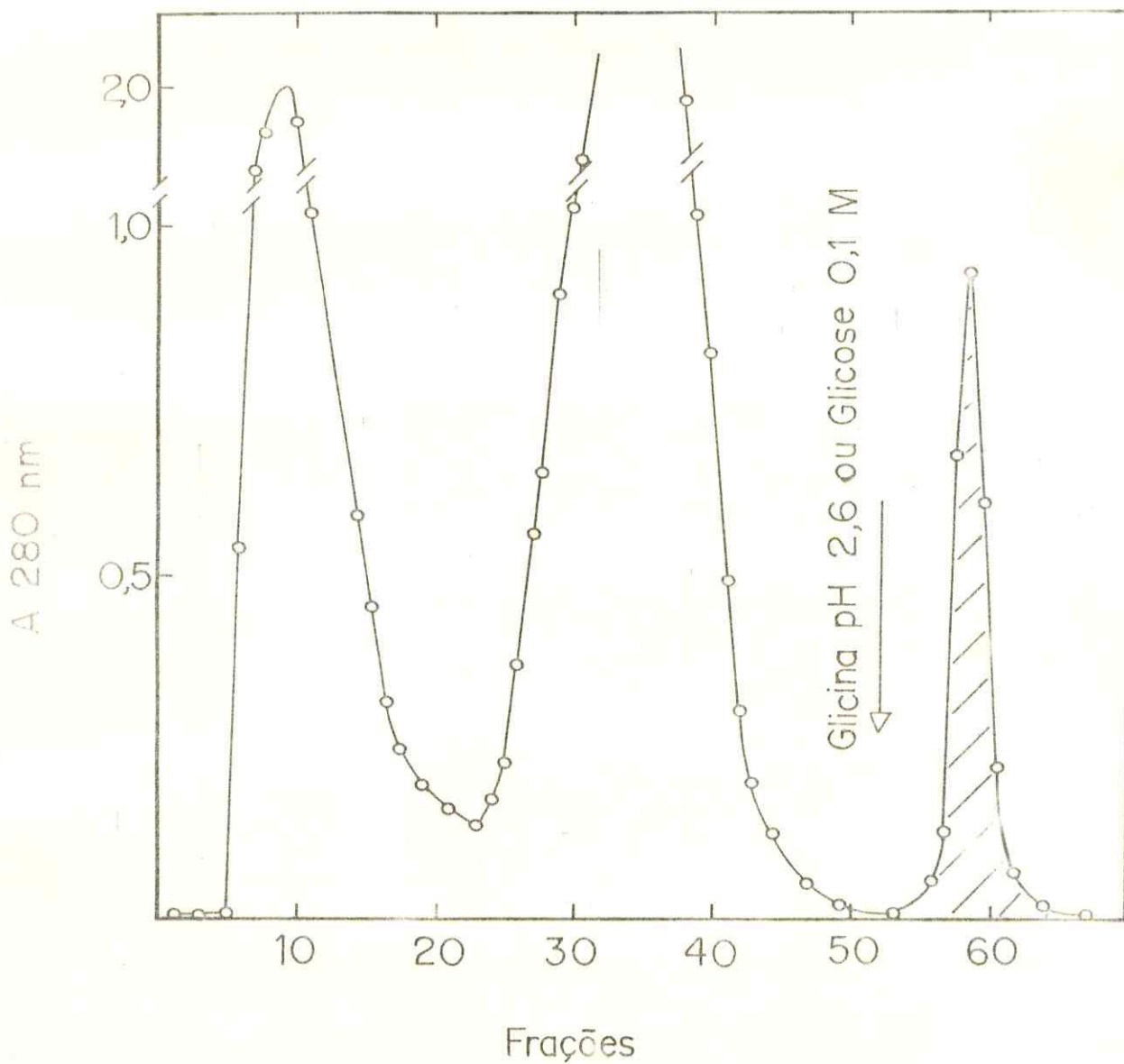


FIGURA 04 - Cromatografia de afinidade do extrato total em coluna de Sephadex G-50 equilibrada com NaCl 0.15 M contendo CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, e eluída com a mesma solução, seguida de tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,6 ou glicose 0,1 M em NaCl 0,15 M. Amostra: 35 ml; Fluxo: 22 ml/hora Fração: 3,0 ml

TABELA 03 - Purificação da atividade hemaglutinante a partir do extrato total de sementes de Dioclea guianensis por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50.

Fração	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Atividade Hemaglutinante (UH/ml)	Atividade Específica (UH/mgP)	Purificação (x)
Extrato Total	100,0	9,2	1448	157,4	-
PIII	151,3	0,21	2048	9572,4	62

4.5 - Critérios de Avaliação do Grau de Purificação da Lectina de Dioclea guianensis

Com a finalidade de avaliar o grau de pureza da lectina de Dioclea guianensis obtida por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, a fração PIII foi submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose previamente equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,6. O padrão cromatográfico (FIGURA 05) obtido mostra que toda a fração PIII foi eluída em um único pico não retido, o qual concentra toda atividade hemaglutinante.

A fração PIII foi também submetida a cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose previamente equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,6. A FIGURA 06 mostra que a fração PIII foi retida sendo eluída como um único pico a uma concentração de NaCl 0,2 M. Esses resultados sugerem um elevado grau de homogeneidade da fração PIII.

Quando as frações ativas, obtidas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (PIII) e por troca iônica em coluna de DEAE- e CM-Sepharose, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas sob condições não desnaturantes (FIGURA 07) foram encontrados padrões essencialmente iguais para as três frações, apresentando-se como uma única banda com migrações eletroforéticas semelhantes e comparáveis a fração PIII de Dioclea grandiflora.

Por imunoeletroforese em gel de agarose contra IgG anti-extrato total de Dioclea guianensis (FIGURA 08), foi observado que enquanto o extrato total apresenta pelo menos cinco arcos de precipitação reconhecidos pela IgG, a fração PIII apresenta um único arco de precipitação.

Por imunodifusão dupla de Outcherlony em gel de agarose contendo IgG contra PIII, observou-se que a IgG reconhece apenas uma fração tanto no extrato total como no PIII. Por sua vez, quando a mesma experiência foi feita usando-se IgG contra extrato total, detectou-se no extrato total a formação de pelo menos 3 arcos de precipitação, en-

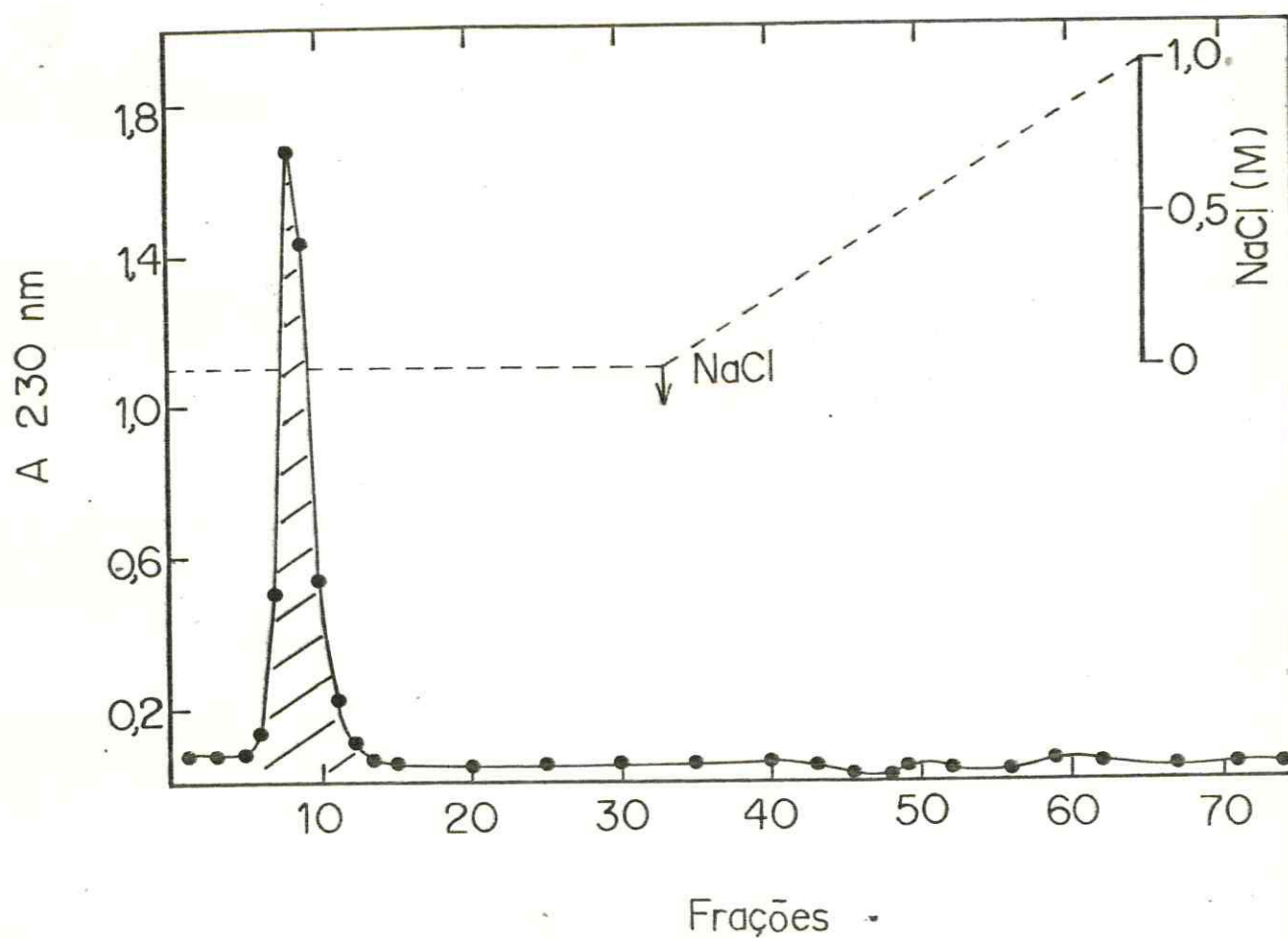


FIGURA 05 - Cromatografia da Fração PIII em coluna de DEAE-Sepharose eluída com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, seguido de NaCl 1 M no mesmo tampão.
 Amostra: 12 mg/ml; Fluxo: 40 ml/hora; Fração: 3,0 ml

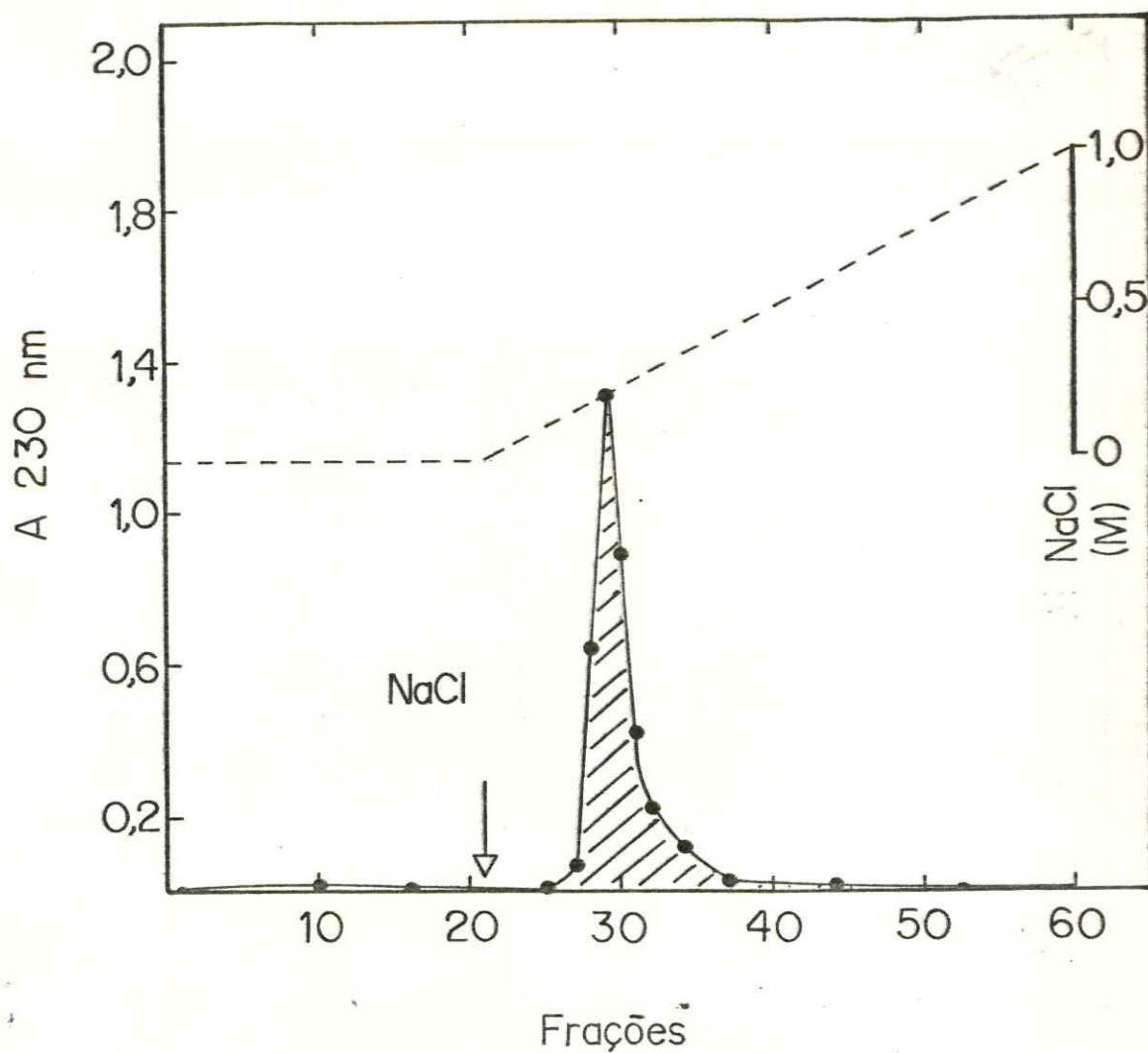


FIGURA 06 - Cromatografia da Fração PIII em coluna de CM-Sepharose eluída com tampão tris-HCl 0,5 M, pH 7,6, seguido de NaCl 1 M no mesmo tampão. Amostra: 10 mg/ml; Fluxo: 40 ml/hora; Fração: 3,0 ml

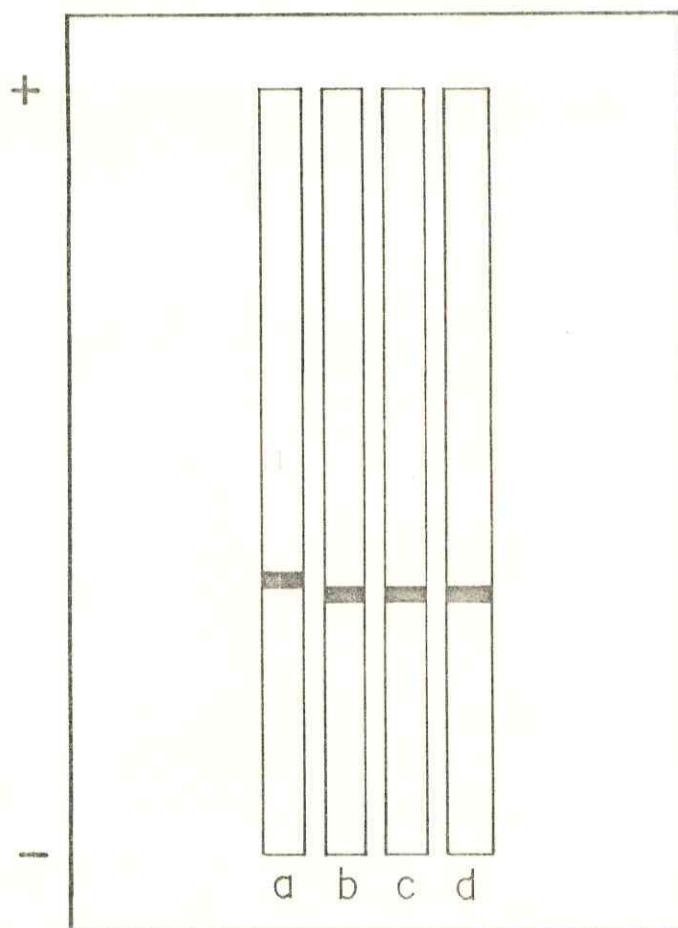


FIGURA 07 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sem SDS para proteínas básicas das frações ativas obtidas em colunas de Sephadex G-50(b), CM-Sepharose(c) e DEAE-Sepharose(d).
(a) Dioclea grandiflora.

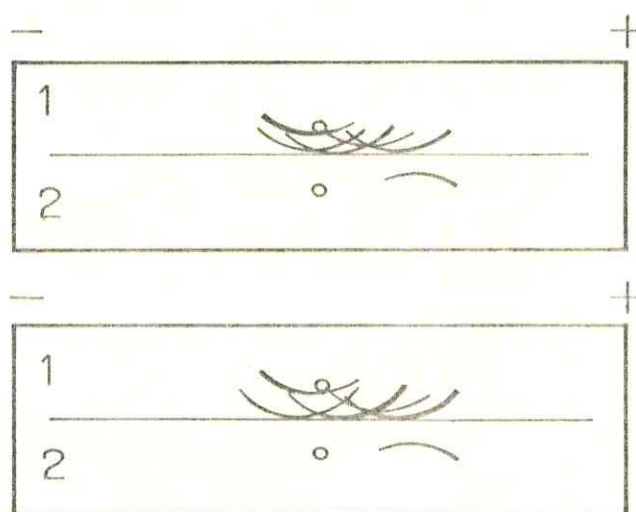


FIGURA 08 - Imunoeletroforese em gel de agarose do Extrato Total(1) e da Fração PIII(2) de Dioclea guianensis.

quanto que a fração PIII apresentou um único arco (FIGURA 09).

4.6 - Propriedades da Lectina de Dioclea guianensis

Farinha, extrato total, PI e PII e fração ativa (PIII) quando submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, foram detectadas bandas cujos pesos moleculares aparentes variavam dentro de uma faixa de aproximadamente 12.000 a 80.000 daltons sendo que, aquelas com pesos moleculares aparentes em torno de 30.000, 18.000 e 12.000 daltons foram características da fração PIII. O tratamento da farinha do PI e PII com beta-mercaptoetanol deu origem a bandas adicionais além das observadas pelo tratamento com apenas SDS, principalmente na região de peso molecular acima de 30.000. Já o PIII mostrou-se insensível ao tratamento com este agente redutor (FIGURA 10).

A lectina de Dioclea guianensis não apresentou carboidrato quando submetida ao método de DUBOIS (1956).

Ensaio de hemaglutinação usando-se eritrócitos de vários animais, mostraram que a lectina de Dioclea guianensis é ativa para eritrócitos de coelho (1 796,5 UH/mgP) e de galinha (56,1 UH/mgP). Quando as hemácias foram tripsinizadas, observou-se um aumento de aproximadamente 8 vezes tanto para os eritrócitos de coelho (14 124ml) como de galinha (449,1). A lectina não foi capaz de aglutinar eritrócitos de porco, boi, ovelha, carneiro e humanos (A_1 , A_2 , B e O), mesmo quando tripsinizados.

A lectina (PIII) mostrou uma maior especificidade por manose, frutose e glicose e seus derivados, preferencialmente por α -metilmanose e α -metilglicose (TABELA 04).

Quando a fração PIII foi desmetalizada por EDTA, verificou-se que uma concentração de 0,20 M deste agente quelante foi suficiente para reduzir em aproximadamente 92,5 % a atividade hemaglutinante da lectina nativa (TABELA 05). Quando o EDTA foi removido por diálise e alíquotas

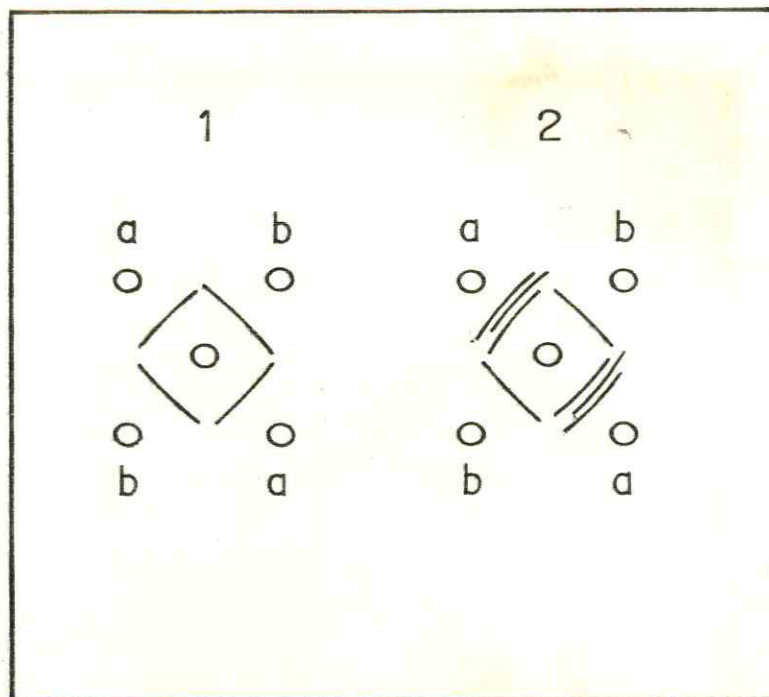


FIGURA 09 - Imunodifusão dupla em gel de agarose do Extrato Total(1) e da Fração PIII(b) de Dioclea guianensis com antissoro preparado contra Extrato Total(2) e Fração PIII(1) de Dioclea guianensis.

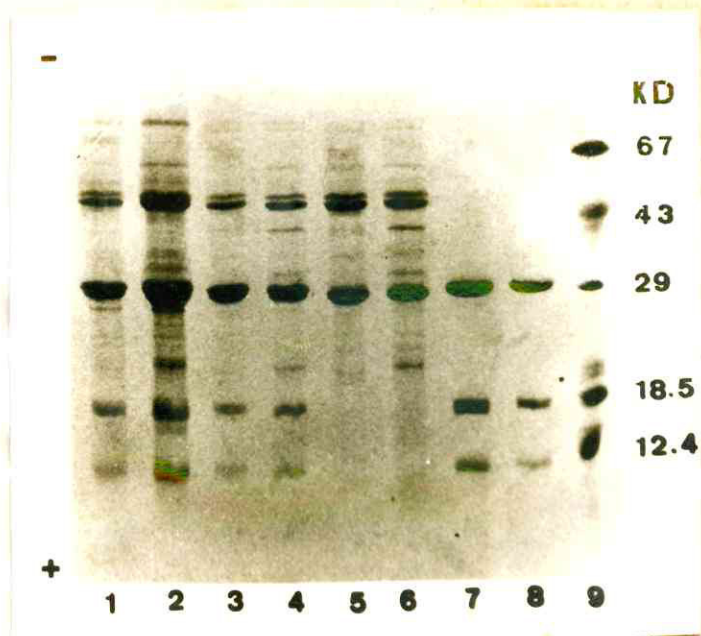


FIGURA 10 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS na presença e ausência de beta-mercaptoetanol das frações obtidas durante a purificação da lectina de Dioclea guianensis.

1 e 2, farinha; 3 e 4, extrato total; 5 e 6, PI + PII; 7 e 8, PIII; 9, marcadores. Frações 2, 4, 6 e 8 foram tratadas com beta-mercaptoetanol.

TABELA 04 - Especificidade da lectina de *Dioclea guianensis* por açúcares simples.

Açúcar ^b	Concentração mínima (mM) requerida para inibição de uma unidade de hemaglutinação
α - metil-manose	15,62
α - metil-glucose	31,25
Manose	62,50
Glucosamina	62,50
Manosamina	87,72
Frutose	125,00
Glucose	250,00
Lactose	N.I. ^a
Sacarose	N.I
Rafinose	N.I
Arabinose	N.I
Galactose	N.I
Fucose	N.I
Ramnose	N.I

N.I.^a: não inibiu a uma concentração de 1 M.

b: Todos os açúcares possuem configuração D.

TABELA 05 - Inativação da lectina de Dioclea guianensis por adição de EDTA.

Concentração final de EDTA (M)	Atividade de (%)
Sem EDTA (NaCl 0,15 M)	100,0*
0,025	19,6
0,05	12,5
0,10	8,2
0,20	7,5

* - A atividade hemaglutinante de uma solução de PIII a 2 mg/ml foi considerada 100 %.

de CaCl_2 e MnCl_2 de concentrações crescentes foram adicionadas, a atividade da lectina foi restabelecida. Este aumento foi de cerca de 26,6 vezes na concentração de 5 mM de ambos os cátions divalentes (TABELA 06).

4.7 - Determinação do Peso Molecular da Lectina de *Dioclea guianensis*

Quando a fração PIII, dissolvida em tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl_2 5mM e MnCl_2 5mM, foi submetida a filtração em gel em coluna de Bio Gel P-100 equilibrada com o mesmo tampão, tendo sido previamente calibrada com a lectina de *Dioclea grandiflora* e proteínas de pesos moleculares conhecidos, tais como Albumina sérica bovina (67.000), ovalbumina (43.500), inibidor de tripsina de soja (21.500), ribonuclease (13.700), foi obtido um único pico com peso molecular da ordem de 49.000 daltons (FIGURA 11).

A fração PIII foi também submetida a filtração em gel em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,6, contendo NaCl 0,15 M, CaCl_2 5mM, MnCl_2 5mM e glicose 0,3 M. A coluna foi previamente calibrada com albumina sérica bovina, ovalbumina e inibidor de tripsina de soja. A fração PIII quando eluída apresentou apenas um pico bem definido com peso molecular em torno de 50.000 daltons (FIGURA 12).

Quando foram comparados os perfis cromatográficos obtidos através da coluna de Bio Gel P-100 e da Sephadex G-100, observou-se que a fração PIII apresentou o mesmo peso molecular confirmando a predominância do dímero a pH 7,6. Esta predominância foi independente da presença de glicose sugerindo que a ocupação dos sítios de açúcar pela glicose aparentemente não afeta a estrutura quaternária desta lectina.

Quando a fração PIII foi submetida a um sistema de FPLC equipado com uma coluna de Superose 6 HR 10/30 equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,5 contendo NaCl 0,1 M

TABELA 06 - Ativação da lectina desmetalizada de Dioclea guianensis por adição de Ca^{+2} e Mn^{+2} .

Concentração final de Ca^{+2} e Mn^{+2} (mM)	Atividade * (%)
0	3,8
1	10,5
3	24,8
5	100,0
7	100,0
10	100,0

* - A atividade hemaglutinante máxima obtida pela adição de metal foi considerada 100 %.

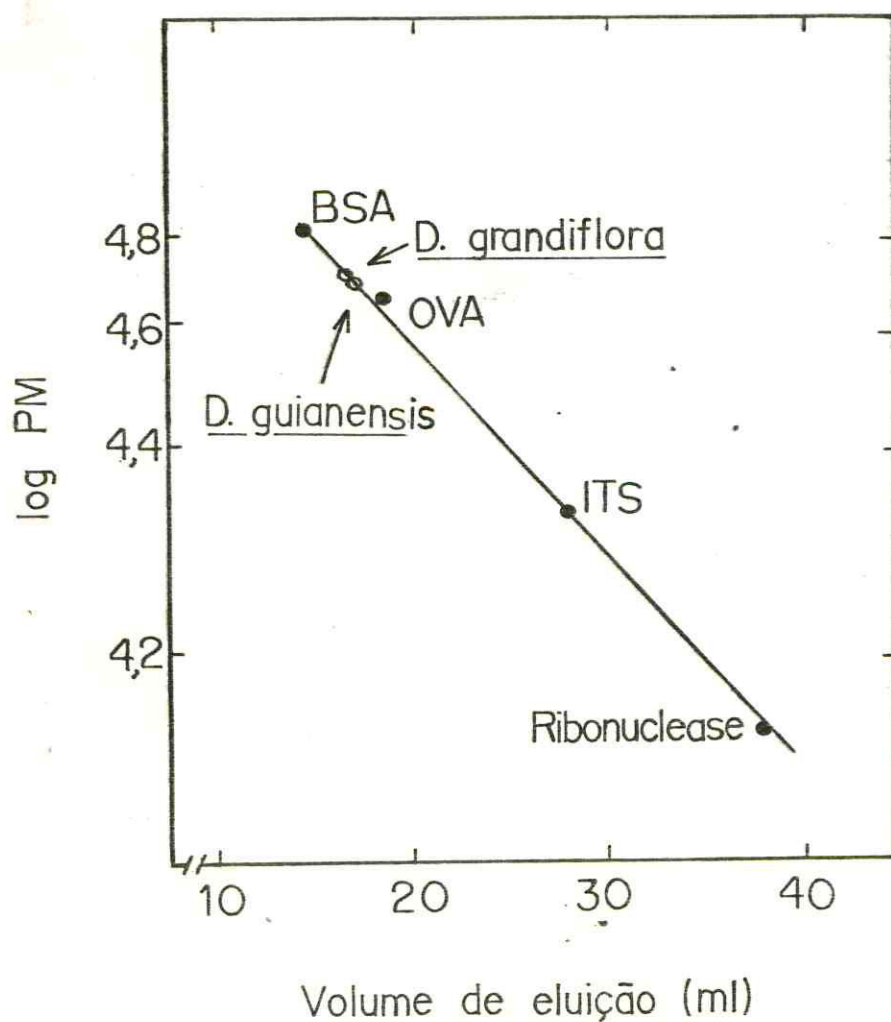


FIGURA 11 - Estimativa do peso molecular da Fração PIII por cromatografia em coluna de Bio Gel P-100 equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,6, contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM e MnCl₂ 5mM.

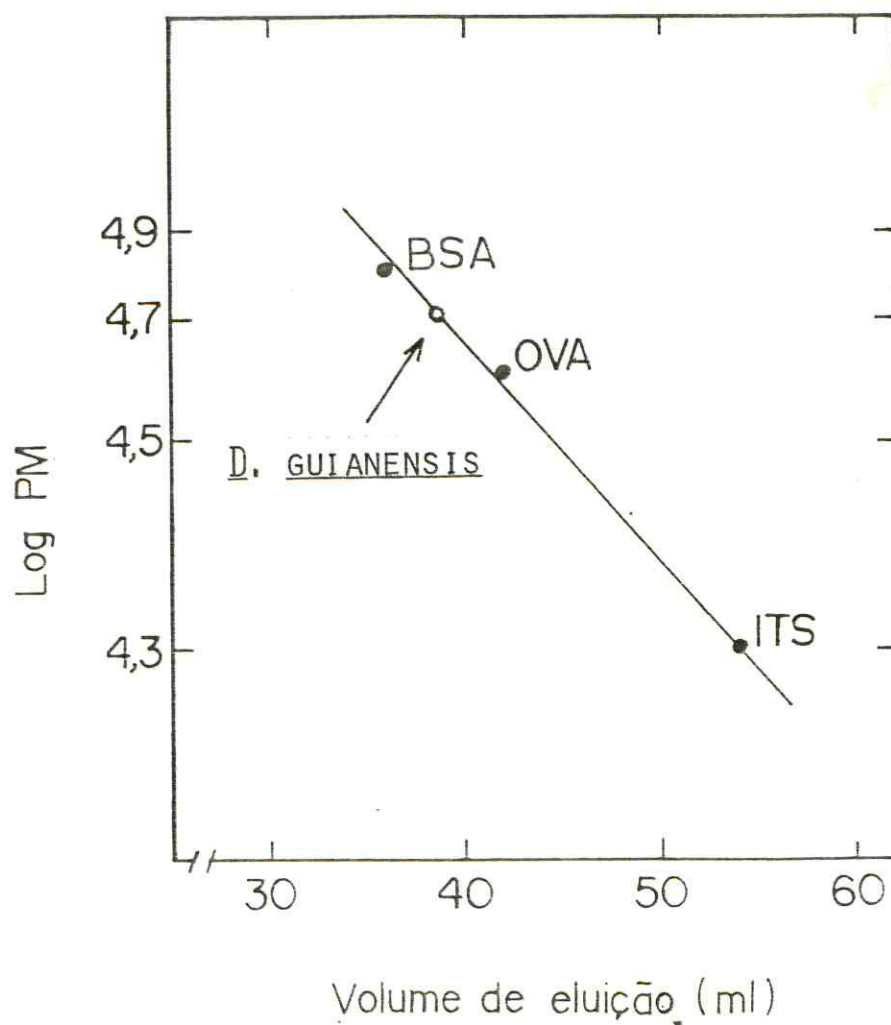


FIGURA 12 - Estimativa do peso molecular da Fração PIII por cromatografia em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5mM, MnCl₂ 5mM e glicose 0,3 M.

foram obtidos dois picos bem distintos (FIGURA 13), indicando a existência de pelo menos duas formas da lectina: uma tetramérica, com peso molecular da ordem de 100.000 daltons e outra dimérica, com peso molecular em torno de 47.000 daltons correspondendo a 25,6 e 74,4 %, respectivamente.

4.8 - Comparação da Lectina de Dioclea guianensis com Outras Lectinas

Quando a lectina de Dioclea guianensis e lectinas de outras leguminosas, previamente tratadas com β -mercapto-etanol foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, observou-se padrões eletroforéticos essencialmente semelhantes para aquelas pertencentes à tribo Diocleae (Dioclea guianensis, Dioclea grandiflora, Cratylia floribunda, Canavalia brasiliensis e Canavalia ensiformis) com três bandas de pesos moleculares aparentes em torno de 30.000, 18.000 e 12.000 daltons. Quando comparação semelhante foi feita entre a lectina de Dioclea guianensis e lectinas de sementes pertencentes a outras tribos (Phaseolus vulgaris, Glycine max e Vatairea macrocarpa) verificou-se que a lectina de Vatairea macrocarpa apresentava as mesmas três bandas encontradas nas da tribo Diocleae, enquanto as de Phaseolus vulgaris e Glycine max apenas a banda de mais alto peso molecular (FIGURA 14).

Quando lectinas de plantas pertencentes a tribo Diocleae e as outras tribos foram submetidas a imunodifusão dupla em gel de agarose utilizando-se IgG contra PIII de Dioclea guianensis, foram observados os resultados mostrados na FIGURA 15. Apenas as lectinas da tribo Diocleae (Dioclea guianensis, Dioclea paraquariensis, Canavalia brasiliensis e Canavalia ensiformis) apresentaram reações cruzadas, indicando a existência de determinantes antigênicos idênticos ou similares àqueles da fração PIII de Dioclea guianensis. Por outro lado, as lectinas de plantas de tribos diferentes não exibiram reações cruzadas.

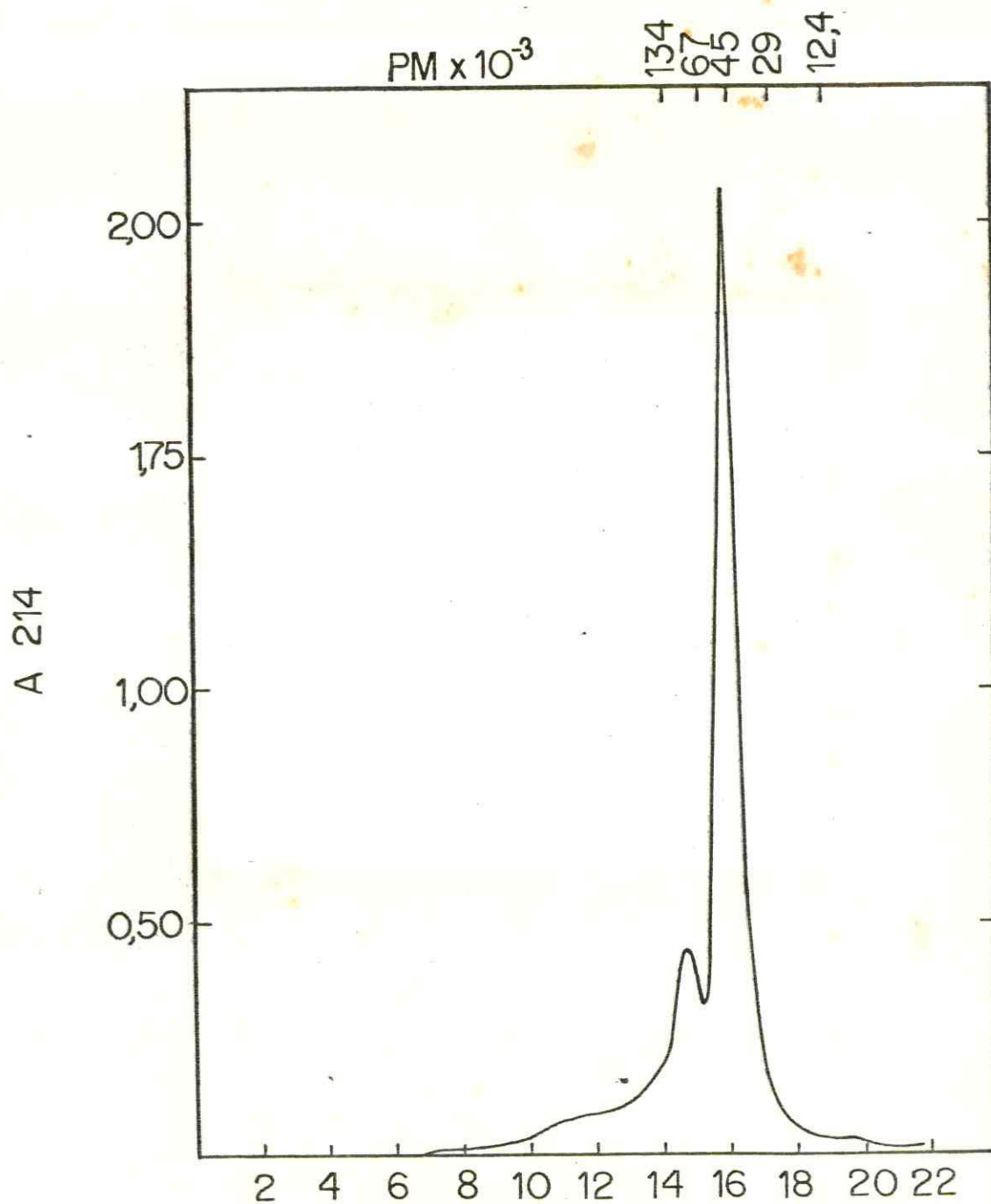


FIGURA 13 - Cromatografia da Fração PIII em coluna de Superose 6 HR 10/30 equilibrada com tampão tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,1 M.

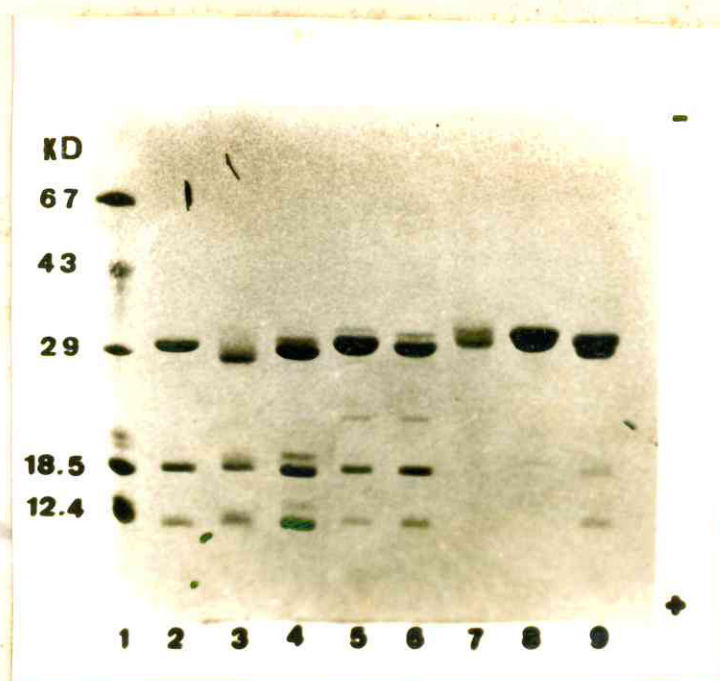


FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e beta-mercaptoetanol de lectinas de sementes pertencentes a tribo Diocleae e a outras tribos.

(2) - Dioclea guianensis; (3) - Dioclea grandiflora; (4) - Cratylia floribunda; (5) - Canavalia ensiformis; (6) - Canavalia brasiliensis; (7) - Phaseolus vulgaris; (8) - Glycine max; (9) - Vatairea macrocarpa.

(1) - marcadores.

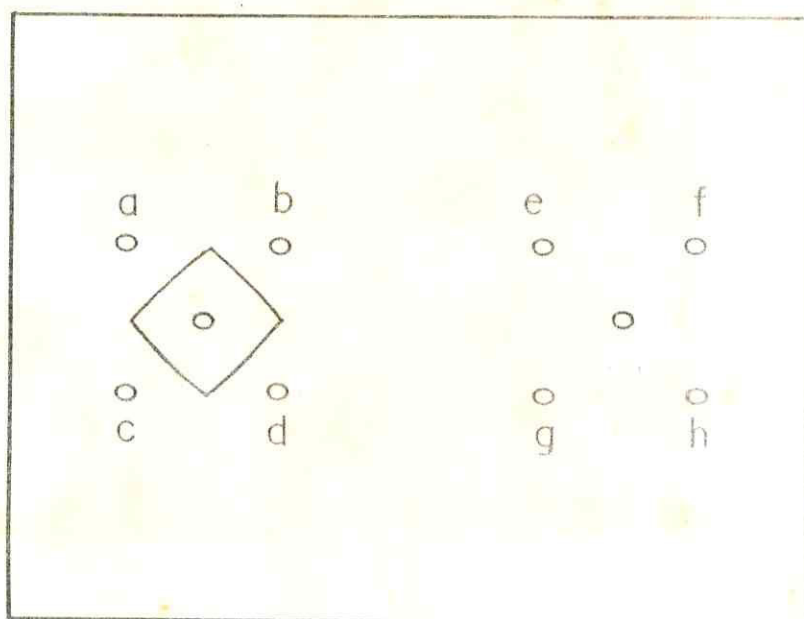


FIGURA 15 - Imunodifusão em gel de agarose da lectina de Dioclea guianensis (a), Dioclea rostrata (b), Canavalia brasiliensis (c) Canavalia ensiformis (d), Vatairea macrocarpa (e), Crotalaria striata (f), Lathyrus cicera (g) e Lathyrus odoratus (h) com antissoro preparado contra a lectina de Dioclea guianensis.

Resultados semelhantes foram encontrados quando lectinas de plantas da tribo Diocleae foram submetidas a eletroforese em gel de poli(acrilamida) e transferidas para a nitrocelulose por "Western blots" (FIGURA 15).

4.9 - Parâmetros Nutricionais

4.9.1 - Análise Elementar

A TABELA 07 mostra os resultados da análise elementar da sementes de Dioclea guianensis onde se observa o alto teor de proteína (cerca de 30,10 %).

4.9.2 - Composição de Aminoácidos

A TABELA 08 mostra a composição de aminoácidos da lectina de Dioclea guianensis comparada com aquela da FAO. Verificou-se um alto teor de ácido aspártico, serina e treonina, ausência total de cisteína e uma baixa concentração de metionina.

4.9.3 - Termoestabilidade

A atividade hemaglutinante presente em sementes íntegras de Dioclea guianensis apresentou certa resistência a desnaturação, uma vez que a atividade original somente foi abolida quando as sementes foram submetidas à fervura (aproximadamente 100°C) durante 20 minutos (FIGURA 17).

Em relação a fração PIII, esta se comportou diferentemente quando submetida a aquecimento a várias temperaturas por diferentes intervalos de tempo (FIGURA 18). A fração PIII quando incubada a 70°C apresentou uma redução de 50 % de sua atividade hemaglutinante original com apenas 10 minutos de aquecimento, mantendo-se constante até 90 mi-

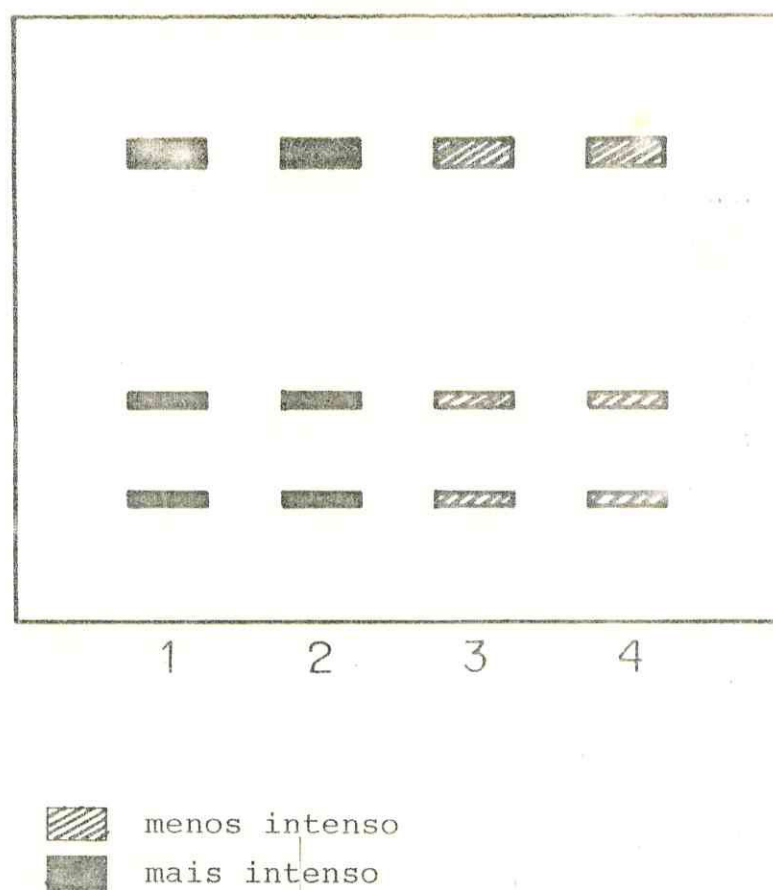


FIGURA 16 - "Western blots" da lectina de Dioclea guianensis e de outras lectinas pertencentes a tribo Diocleae.

(1)- Dioclea guianensis; (2)- Dioclea grandiflora;
(3)- Canavalia brasiliensis e (4) Canavalia ensiformis.

TABELA 07 - Composição mínima de sementes de *Dioscorea guianensis* com base no peso seco e em porcentagem.

Constituintes	Teor da Amostra (%)
Umidade	11,75
Proteína bruta *	30,10
Lipídios	3,10
Glicídios **	65,41
Cinzas	1,39

* = Nitrogênio total x 6,25

** = Obtido por diferença

TABELA 08 - Composição de aminoácido da lectina de Dioclea guianensis. Os valores são dados em g de aminoácido anidro por 100 g de proteína.

Aminoácido	FAO	g/100 g de proteína
Ácido aspártico		16,63
Treonina	4,0	9,60
Serina		13,83
Ácido glutâmico		5,47
Prolina		4,80
Glicina		5,01
Alanina		6,14
Cisteína		0,15
Valina	5,0	3,17
Metionina	3,5 *	0,15
Isoleucina	4,0	3,53
Leucina	7,0	7,32
Tirosina		4,74
Fenilalanina	6,0 **	6,40
Lisina	5,5	4,07
Histidina		1,45
Arginina		4,83
Triptofano	1,0	N.D.

* = Soma dos valores para metionina e cisteína

** = Soma dos valores para fenilalanina e tirosina

N.D.= Não determinado

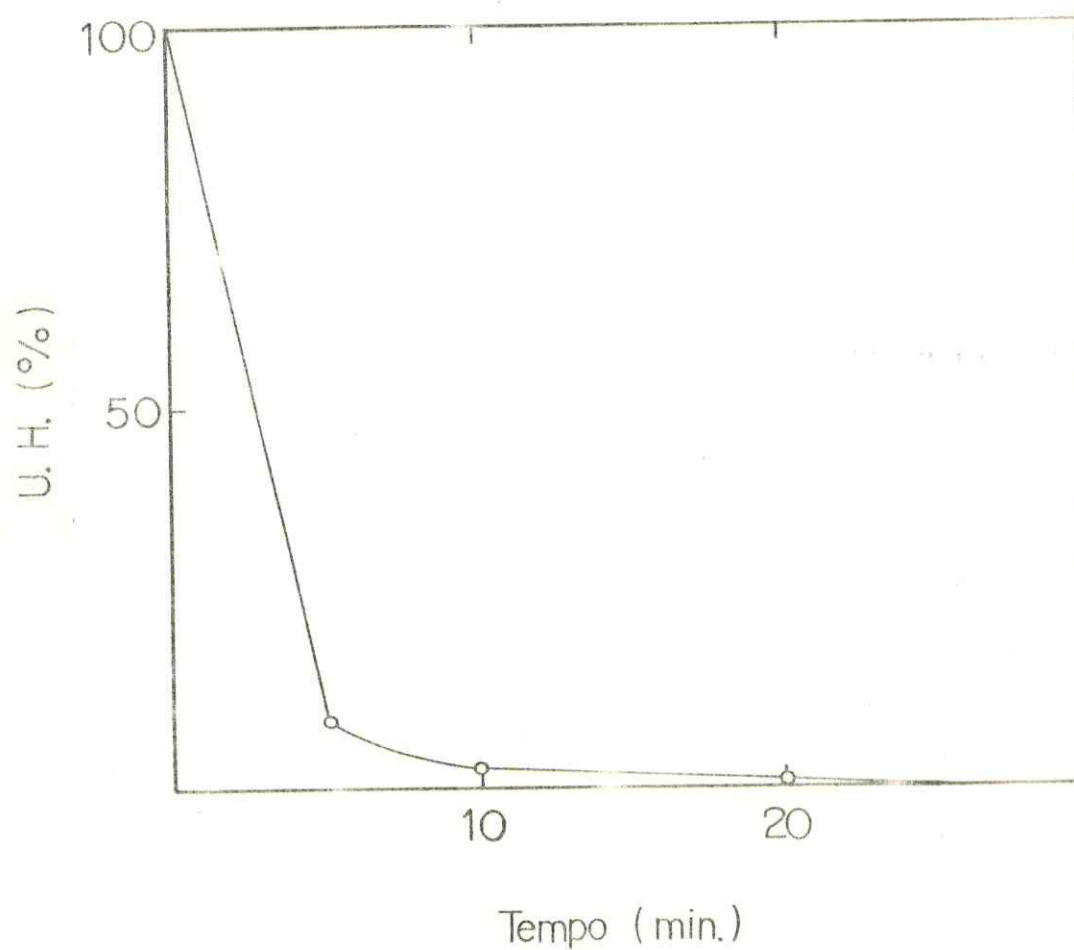


FIGURA 17 - Atividade hemaglutinante residual detectada em sementes de Dioclea guianensis depois do tratamento térmico (100°C).

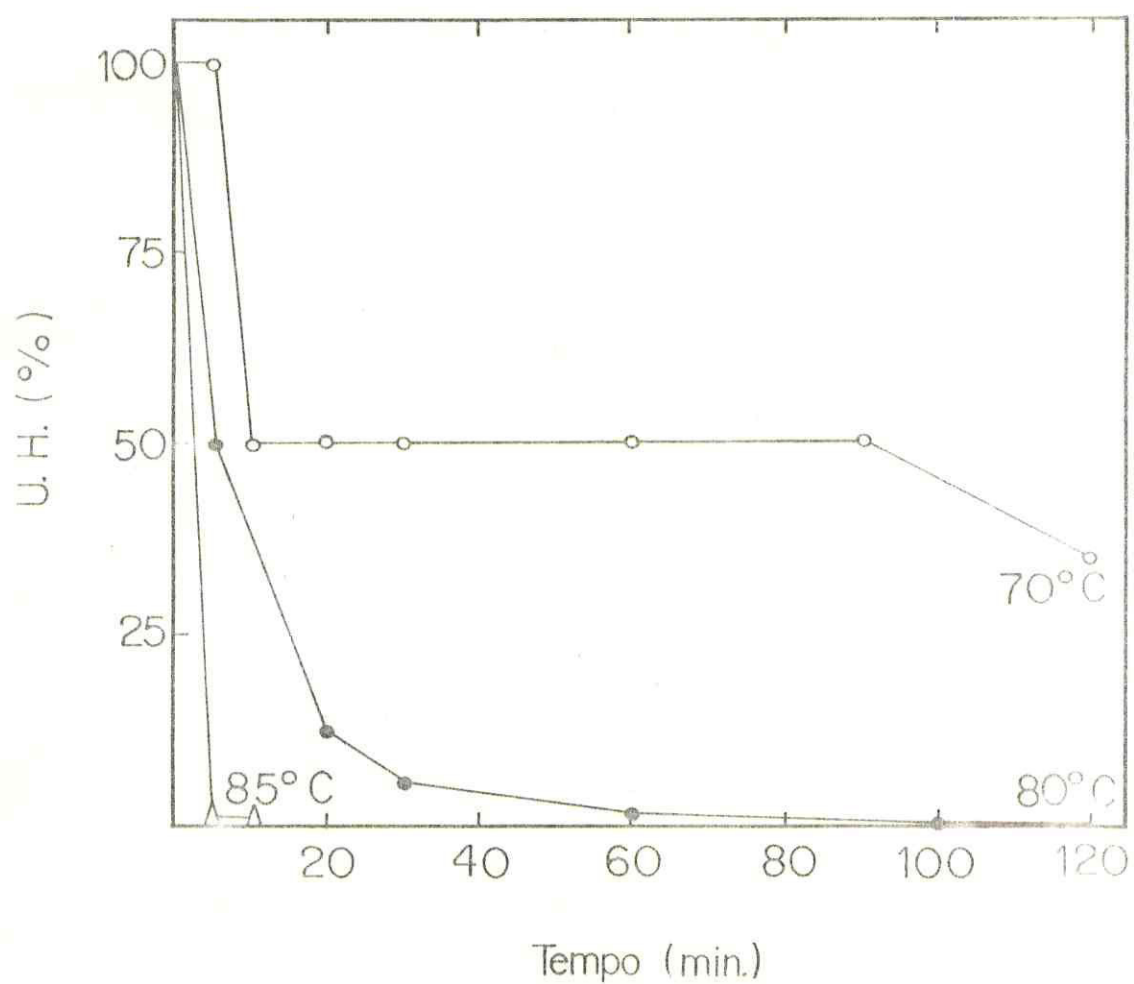
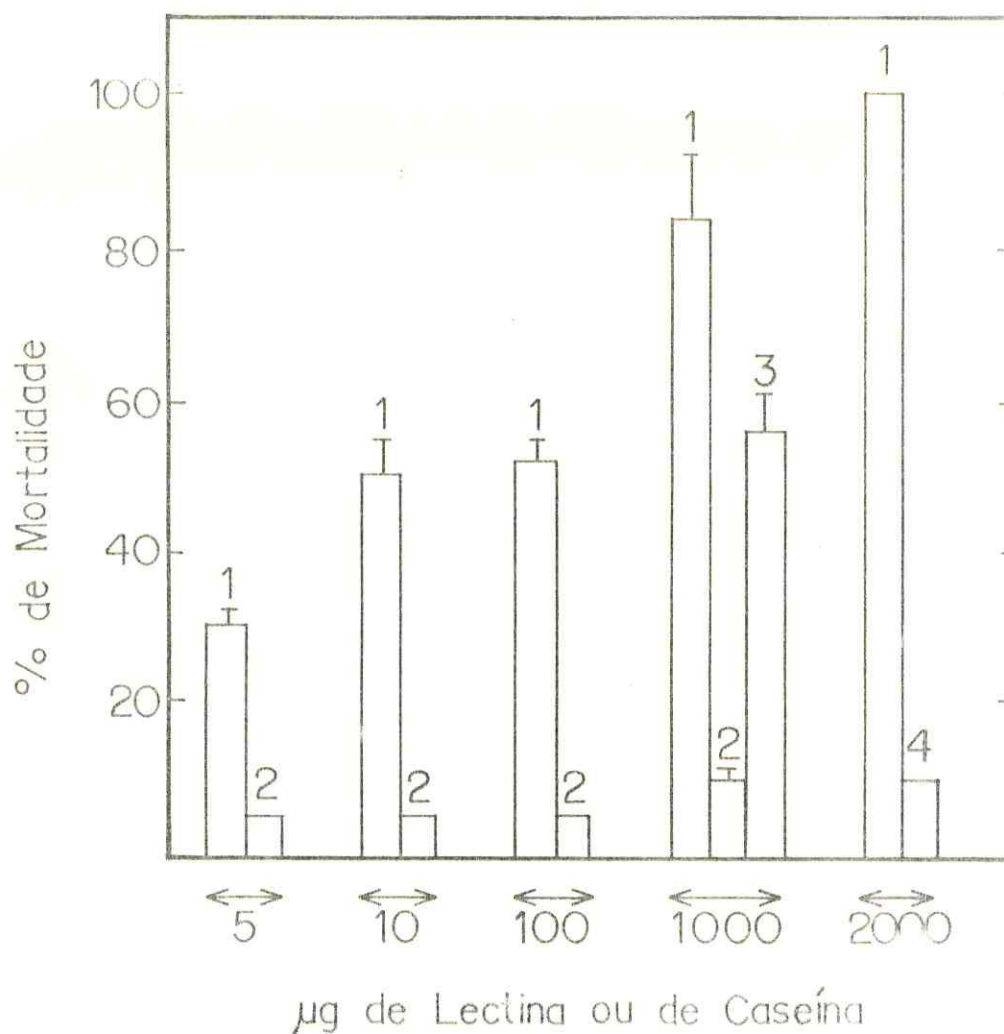


FIGURA 18 - Atividade hemaglutinante residual da lectina de Dioclea guianensis depois do tratamento térmico a diferentes temperaturas.

nutos de tratamento. A 80°C, a fração PIII se tornou mais suscetível ao tratamento e com 90 minutos de aquecimento toda atividade foi perdida. Quando a temperatura foi elevada para 85°C, a inativação da lectina ocorreu de uma maneira mais acentuada de modo que apenas 5 minutos foram suficientes para que 100 % da atividade fosse completamente perdida.

4.9.4 - Bioensaio com Artemia salina LEACH

As taxas de mortalidade obtidas pela utilização da lectina de Dioclea guianensis no bioensaio feito com Artemia salina são bastante expressivas quando comparadas com as da caseína que foi usada como controle (FIGURA 19). Este efeito causado pela lectina é dose-dependente aumentando significativamente quando concentrações crescentes da fração PIII foram usadas. Um índice de mortalidade de 100 % foi verificado quando 2000 µg da lectina foram usadas. Este efeito parece ser devido a uma interação lectina-carboidrato, uma vez que é revertido em presença de glicose 0,1 M.



1 - PIII de Dioclea guianensis

2 - Caseína

3 - Concanavalina A

4 - PIII de Dioclea guianensis + glicose 0,1 M

FIGURA 19 - Atividade tóxica da lectina de Dioclea guianensis a larvas de Artemia salina.

5 - DISCUSSÃO

As sementes de Dioclea guianensis Duke., a exemplo de vários outros representantes da tribo Diocleae tais como Canavalia ensiformis, Canavalia gladiata, Canavalia marítima (HAGUE, 1975), Dioclea grandiflora (MOREIRA et al., 1983) Canavalia brasiliensis (MOREIRA & CAVADA, 1984) e Cratylia floribunda (de OLIVEIRA, 1980), apresentam atividade hemaglutinante. O teor de lectina da semente em estudo é de cerca de 1,4 % do seu peso seco (TABELA 09). Este valor está próximo daqueles obtidos para outras sementes.

A lectina de Dioclea guianensis mostrou especificidade por resíduos de manose, frutose e glicose e seus derivados, preferencialmente por α -metilmanose. Todos esses açúcares têm em comum grupos hidroxílicos equatoriais nos carbonos 3 e 4. Em adição, foi verificado que os sacarídeos α -metilmanose e α -metilglicose são inibidores mais potentes do que a manose e glicose, respectivamente. As baixas capacidades inibitórias destes em relação aos seus derivados sugere a importância do carbono 1 na interação do açúcar com a lectina desde que a única diferença entre esses açúcares se encontra neste carbono. Isto sugere que a este nível a contribuição da interação hidrofóbica do grupo metil substituído com o sítio da ligação a açúcares da lectina é maior do que a interação iônica. Este fato é, ainda, mais ressaltado quando se verifica a capacidade não inibitória da sacarose, dissacarídeo contendo uma ligação glicosídica $\alpha(1 \rightarrow 2)$, uma vez que ela é constituída por glicose e frutose.

Tendo em vista a especificidade da lectina de Dioclea guianensis por glicose, esta pode ser obtida por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50. A lectina pode ser eluída tanto com tampão glicina-HCl pH 2,6 como com glicose 0,1 M. Neste último caso se faz necessário uma diálise

TABELA 09 - Comparação do teor de lectinas presente em sementes maduras de vários representantes da tribo Diocleae.

Espécie	% do peso seco	
<u>Canavalia gladiata</u>	3,9	(HAGUE, 1975)
<u>Canavalia marítima</u>	5,5	(4,5-6,3)(HAGUE, 1975)
<u>Canavalia ensiformis</u>	3,5	(2,0-3,5)(HAGUE, 1975)
<u>Canavalia brasiliensis</u>	2,2	(MOREIRA & CAVADA, 1984)
<u>Dioclea grandiflora</u>	1,4	(MOREIRA et al., 1983)
<u>Dioclea guianensis</u>	1,4	

prévia contra ácido acético de modo a eliminar quaisquer vestígios de glicose, uma vez que este açúcar pode interferir no ensaio de atividade hemaglutinante já que se trata de um potente inibidor da lectina.

Quando a fração PIII foi submetida a cromatografia de troca iônica em pH 7,6, ela foi eluída em um único pico não retido em DEAE-Sepharose e retido em coluna de CM-Sepharose, sugerindo que a fração PIII além de se encontrar numa forma altamente purificada possui ponto isoelétrico básico. Estes resultados concordam com aqueles obtidos para a lectina de Dioclea grandiflora (MOREIRA et al., 1983).

Por eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas sob condições não desnaturantes foi observado que a fração PIII obtida por colunas de Sephadex G-50, de DEAE- e de CM-Sepharose mostram padrões eletroforéticos essencialmente iguais, com uma única banca. Do mesmo modo que para as lectinas isoladas de Canavalia marítima, Canavalia ensiformis e Canavalia gladiata (HAGUE, 1975), estes resultados vêm ressaltar que a cromatografia em Sephadex G-50 se mostrou eficaz para o isolamento e purificação da lectina Dioclea guianensis.

Por imunoeletroforese em gel de agarose contra IgG anti-extrato total de Dioclea guianensis (FIGURA 08) verificou-se que a fração PIII apresentou apenas um arco de precipitação, concordando com os demais resultados obtidos por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- e de CM-Sepharose assim como por eletroforese em gel de poliacrilamida, indicando que a lectina de Dioclea guianensis se encontra homogênea. Esta homogeneidade também foi comprovada por imunodifusão dupla de Outcherlony.

A valores de pH em torno de 7,6 foi verificado por cromatografia em coluna de Bio Gel e em Sephadex G-100 que a lectina apresenta pesos moleculares da ordem de 49.000 e 50.000 daltons, respectivamente. Tendo em vista que as lectinas pertencentes a tribo Diocleae geralmente são proteínas tetraméricas com pesos moleculares em torno de 100.000 a 120.000 daltons, os valores obtidos nestes experimentos sugerem que a pH 7,6 a lectina de Dioclea guianensis se en-

contra predominantemente na sua forma dimérica.

Quando a fração PIII foi submetida a um sistema de FPLC equipado com uma coluna de Superose 6 HR 10/30 foram obtidos dois picos com pesos moleculares da ordem de 100.000 e 47.000 daltons que correspondem as formas tetramérica e dimérica da lectina, respectivamente.

Entretanto, é válido ressaltar que apesar das divergências entre os padrões cromatográficos resultantes deste experimento com os obtidos anteriormente, verificou-se a predominância do pico com menor peso molecular, tornando-se mais um indicativo a reforçar que na faixa de pH 7,5 - 7,6 a lectina de Dioclea guianensis se apresenta principalmente como um dímero.

Nos experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi observado que a lectina de Dioclea guianensis apresenta padrões eletroforéticos similares aos da conconavalina A, diferindo das lectinas da tribo Viciae. A lectina de Dioclea guianensis contém 3 bandas, α , β , γ , de pesos moleculares aparentes em torno de 30, 18 e 12 KDa. Por comparação com a conconavalina A e a lectina de Dioclea grandiflora a banda de peso molecular de 30 KDa corresponde à subunidade básica enquanto as duas bandas menores seriam fragmentos resultantes da subunidade básica. A presença desses fragmentos parece ser característica das lectinas da tribo Diocleae desde que o principal ponto de clivagem tanto para a lectina de Canavalia ensiformis (WANG et al., 1971) como para Dioclea grandiflora (RICHARDSON, 1984; AINOZ, 1987) é entre os aminoácidos Asn₁₁₈ e Ser₁₁₉, dando duas subunidades praticamente simétricas a partir da cadeia básica de 237 aminoácidos. Estes fragmentos permanecem fortemente associados fazendo parte da estrutura final da proteína como se fosse uma única subunidade. A hipótese de que estes fragmentos seriam artefatos devidos ao processo de isolamento foi descartada por MOREIRA et al. (1983) e de OLIVEIRA et al. (1990) que demonstraram por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β -mercaptoetanol que as farinhas de Dioclea grandiflora e Cratylia floribunda já apresentam estes fragmentos. Os mesmos resultados foram

obtidos para farinha de Dioclea guianensis.

A lectina de Dioclea guianensis não contém carboidratos na sua estrutura não sendo, portanto, glicoproteína. Este resultado está de acordo com os obtidos com outras lectinas da tribo Diocleae. Tais como a concanavalina A (GOLDSTEIN & PORETZ, 1986), Canavalia brasiliensis (MOREIRA & CAVADA; 1984), Dioclea grandiflora (MOREIRA et al., 1983) e Cratylia floribunda (de OLIVEIRA et al., 1990).

O tratamento da lectina de Dioclea guianensis com EDTA leva a inibição da aglutinação de eritrócitos, possivelmente por uma mudança conformacional da proteína. Em contraposição quando os íons Ca^{+2} e Mn^{+2} são adicionados a atividade hemaglutinante é restabelecida. Isto demonstra que a lectina é uma metaloproteína que requer íons metálicos divalentes para sua atividade. A dependência desta lectina por Ca^{+2} e Mn^{+2} é semelhante àquela das lectinas de Canavalia ensiformis (EDELMAN et al., 1972), Lens esculenta (PAULOVÁ et al., 1971), Canavalia brasiliensis (MOREIRA & CAVADA, 1971) e várias outras.

A detecção de arcos de precipitação com identidade total por imunodifusão dupla radial de Ouchterlony demonstrou que as lectinas (antígenos) apresentam os mesmos determinantes antigênicos que reagem com o anticorpo específico para a Dioclea guianensis. Resultados semelhantes foram encontrados por "Western blots". A existência de determinantes antigênicos comuns nas várias lectinas sugerem que muitas de suas propriedades físico-químicas e imunológicas foram conservadas durante a evolução, sendo estas provavelmente descendentes de um ancestral comum da mesma forma como foi sugerido para três espécies do gênero Canavalia: Canavalia ensiformis, Canavalia gladiata, Canavalia maritima (HAGUE, 1975) e para três representantes do gênero Artocarpus (de OLIVEIRA, 1980).

A análise de aminoácidos da lectina de Dioclea guianensis revelou que esta é relativamente rica em ácido aspártico, serina e treonina e caracterizada por ausência quase total de cisteína e metionina. Isto é característico de proteínas de plantas e está de acordo com a composição

de aminoácidos da maioria das lectinas vegetais (LIS & SHARON, 1981), como é o caso das lectinas de Vicia faba (ALLEN & JONHSON, 1976), Phaseolus vulgaris (PUSZTAI & STEWART,) e Dioclea grandiflora (MOREIRA et al., 1983).

As sementes de Dioclea guianensis contêm um alto teor de proteínas. Este parâmetro credencia-as como uma fonte alternativa de alimento. Entretanto, a presença de lectinas nestas sementes pode se constituir num fator desfavorável para seu uso na alimentação. Sabe-se que há lectinas que são comprovadamente causadoras de distúrbios intestinais e sistêmicos quando ingeridas na sua forma "in natura" (PUSZTAI et al., 1979; KING et al., 1980; GRANT et al., 1985). Desse modo é de importância estudos que definam claramente se esta lectina é tóxica e, ainda mais, os meios práticos de eliminar seus efeitos adversos.

Os ensaios biológicos usando-se Artemia salina mantidas na presença de concentrações variáveis de lectina de Dioclea guianensis claramente demonstraram a toxicidade destas proteínas para estes animais. O grau dessa toxidade mostrou-se dose dependente e ficou claro que o sítio de ligação a açúcares está diretamente envolvido, desde que a adição de glicose à solução de lectina evitou os efeitos deletérios antes observados. Embora não se possa generalizar tais observações dos efeitos tóxicos onde a Artemia salina foi usada como um modelo experimental (na tentativa de se utilizar um ensaio rápido e menos dispendioso para se testar a toxicidade de proteínas) é possível que também outros animais sejam negativamente afetados quando ingerirem dietas contendo lectina de Dioclea guianensis, a exemplo do que ocorre com ratos alimentados com concaivalina A (JAYNE-WILLIAMS, 1976) ou com dietas contendo lectina de Canavalia brasiliensis (VASCONCELOS et al., 1989). Salienta-se aqui que parte da lectina de Canavalia brasiliensis foi recuperada nas fezes desses animais. Esta resistência à digestão "in vivo" pode ter sérias implicações nutricionais.

As observações acima sugerem que as sementes de Dioclea guianensis se usadas para alimentação devem ter sua lectina inativada.

A eficiência do tratamento térmico na destruição da atividade hemaglutinante da lectina purificada (PIII) foi maior do que quando este tratamento foi utilizado para as sementes íntegras, isto é, enquanto foi necessário um cozimento das sementes a 100°C por 20 minutos, a lectina purificada requereu apenas 5 minutos a 85°C. Resultados similares foram obtidos com a lectina de Canavalia brasiliensis (VASCONCELOS et al., 1989), exceto o tempo requisitado para a completa destruição de sua lectina quer quando presente em sementes (2 horas e 30 minutos a 100°C) quer quando purificada (20 minutos a 100°C). Estes resultados sugerem que a lectina quando presente juntamente com outros constituintes na semente é de alguma maneira protegida contra a rápida desnaturação térmica. Este fato tem importância econômica desde que leva a um maior gasto energético para gerar o calor necessário para a completa eficiência do processo de destoxificação da semente.

6 - CONCLUSÕES

- 1 - A lectina de Dioclea guianensis foi melhor extraída com NaCl 0,15 M ajustada a pH 8,0.
- 2 - A lectina de Dioclea guianensis é inibida por resíduos de glicose, frutose, manose e seus derivados.
- 3 - A cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 se mostrou um método eficaz para o isolamento e purificação da lectina de Dioclea guianensis.
- 4 - Por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- e de CM-Sepharose, sugere-se que a lectina de Dioclea guianensis apresenta ponto isoelétrico básico.
- 5 - A lectina de Dioclea guianensis a pH 7,5 apresenta-se principalmente como um dímero com peso molecular em torno de 50.000 daltons.
- 6 - A lectina apresenta uma subunidade maior de peso molecular aparente em torno de 30 KDa e duas outras subunidades adicionais com pesos moleculares aparentes em torno de 18 e 12 KDa.
- 7 - Não foi detectado carboidrato na estrutura da lectina de Dioclea guianensis, não sendo, portanto, uma glicoproteína.
- 8 - O tratamento da lectina de Dioclea guianensis com EDTA mostrou que ela é uma metaloproteína que requer íons metálicos divalentes (Ca^{+2} e Mn^{+2}) para sua atividade.
- 9 - Ensaios de atividade hemaglutinante utilizando-se hemácias de vários animais mostraram ser a lectina de Dioclea guianensis específica para eritrócitos de coelho e galinha.
- 10 - Todas as lectinas pertencentes a tribo Diocleae comparadas neste trabalho, estão imunologicamente relacionadas sugerindo que houve conservação de determinantes antigênicos durante a evolução desses vegetais a partir de uma an-

cestral comum.

11 - A análise de aminoácidos de lectina de Dioclea guianensis revelou que esta é relativamente rica em ácido aspártico, serina e treonina e caracterizada por ausência quase total de cisteína e metionina.

12 - As sementes de Dioclea guianensis tem um alto teor protéico o que sugere seu uso como fonte alternativa de alimento.

13 - Estudos nutricionais são necessários para estabelecer o valor nutricional destas sementes, tanto na forma "in natura" como quando tendo suas lectinas inativadas.

14 - Ensaio biológico usando-se Artemia salina demonstraram que a lectina de Dioclea guianensis é tóxica, e esta toxicidade é dose dependente.

15 - A eficiência do tratamento térmico na destruição da atividade hemaglutinante da lectina purificada de Dioclea guianensis foi maior do que quando este tratamento foi utilizado para as sementes íntegras.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of Concanavalin A to cross linked dextran gels. Biochem. J., 96:23C-25C(1965).
- AINOUZ, I.L., MOREIRA, R.A., CAMPOS, F.A.P., RICHARDSON, M., BEGBIE, R., STEWART, J.C., WATT, W.B. & PUSZTAI, A. The isolation and aminoacid sequence of the beta and gama subunits of the lectin from seeds of Dioclea grandiflora. Phytochemistry, 26:1435-1440(1987).
- ALLEN, A.K. Potato lectin - A glycoprotein with two domains. In: Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins. pp.71-75, Goldstein, I.J. and Etzler, M.E. eds., Alan R. Liss, Inc., New York (1983).
- ALLEN, A.K., NEUBERGER, A. & SHARON, N. The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. Biochem. J., 131:112-155 (1973).
- ALLEN, A.K., DESAI, N.N., ALLEN, A.K., NEUBERGER, A. & CREETH, J.M. Properties of potato lectin and the nature of its glycoprotein linkages. Biochem. J., 171: 665-674 (1978).
- ALLEN, H.J. & JOHNSON, E.A.Z. Isolation and partial characterization of a lectin from Vicia faba. Biochim. Biophys. Acta, 444:374-385 (1976).
- ASHFORD, D., DWEK, R.A., WELPLY, J.K. The β 1 \rightarrow 2-D-xylöse and α 1 \rightarrow 3-L-fucose substituted N-linked oligosaccharides from Erythrina cristagali lectin: isolation, characterization, and comparison with other legume lectins. Eur. J. Biochem. 166:311-320 (1987).
- ASHWELL, G. & MORELL, A.G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv. Enzymol. 41:99-128 (1974).

- AUB, J.C., TIESLAU, C. & LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 50:613-619 (1963).
- AUB, J.C., SANFORD, B. H. & COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54:396-399 (1965a).
- AUB, J.C., SANFORD, B.H. & WANG, L. Reaction of normal and leukemic cell surfaces to wheat germ agglutinin Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 54:400 (1965b).
- BARRACO, M.A. & LOCH, C.T. Naturally occurring lectins in the haemolymph of Panstrongylus megistus (Hemiptera reduviidae) Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83:525-527 (1988).
- BAUER, W.D. Infection of legumes by Rhizobia. Ann. Rev. Plant. Physiol. 32:407-449 (1981).
- BEYER, E.C., TOKIRYASU, K.T. & BARONDES, S.H. Localization of an endogenous lectin in chicken liver, intestine, and pancreas. J. Cell Biol., 82:565-571 (1979).
- BHATTACHARYYA, L., DAS, P.K. & SEN, A. Purification and properties of D-galactose-binding lectins from some Erythrina species: comparison of properties of lectins from E. indica, E. arborescens, E. suberosa and E. lithosperma. Arch. Biochem. Biophys., 211:459-470 (1981).
- BIRD, G.W.G. Curr. Sci., 20:298-299 (1951). Citado por KOCOUREK (1986).
- BOWLES, D.J. & MARCUS, S. Characterization of receptors for the endogenous lectins of soybean and jackbean seeds. FEBS Lett., 129:135-138 (1981).
- BOYD, W.C. The lectins: their present status. Vox. Sang., 8: 1-32 (1963).
- BOYD, W. C. Fundamentals of Immunology, pp140, Wiley (Interscience), New York (1947). Citado por KOCOUREK (1986).
- BOYD, W.C. & SHARPLEIGH, E. Separation of individuals of blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin). Blood, 9:1195-1198 (1954).
- BOYD, W.C. ALMODOVAR, L.R. & BOYD, L.G. agglutinins in

- marine algae for human erythrocytes. Transfusion, 6: 82-83 (1966).
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72:248-254 (1976).
- BRESSANI, R. & ELIAS, L.G. Nutritional value of legume crops for humans and animals. In: Advances in Legume Science, 135-155, Summerfield, R.J. & Bunting, A.G. eds., Royal Botanic Gardens, Kew, England (1980).
- BURGER, M.M. & GOLDBERG, A.R. Identification of a tumor-specific determination on neoplastic cell surfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 57:359-366 (1967).
- BUTLER, W.T. Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. J. Immunol., 90:663-671 (1963).
- CALLOW, J.A. Plant lectins. Curr. Adv. Plant. Sci. 7: 181-193 (1975).
- CALLOW, J.A. Recognition, resistance and the role of plant lectin in host-parasite interactions. Adv. Bot. Res., 4:1-49 (1977).
- CAMMUE, B.P., PEETERS, B. & PEUMANS, W.J. Isolation and partial characterization of an N-acetylgalactosamine - specific lectin from winter-aconite (Eranthis hyemalis) root tubers. Biochem. J. 221:949-955 (1985).
- CARLINI, R.C., BARCELLOS, G.B.S., BAETA-NEVES, A.D.V. & GUIMARÃES, J.A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. Phytochemistry, 27:25-30 (1988).
- CASTAGNARO, M., ALROY, J., UCCI, A.A. and JAFFÉ, R. Lectin histochemistry and ultrastructure of kidneys from patients with I-cell disease. Arch. Pathol. Lab. Med., 111:285-290 (1987).
- CATT, J.W. & HARRISON, F.L. The distribution of a galactin, an endogenous lectin, in rabbit bone marrow. European J.

- Cell Biol. Abstracts, supplement 1, 11 (1983).
- CAVADA, B.S. Lectinas de Canavalia brasiliensis Mart. Isolamento, caracterização parcial e comportamento durante a germinação. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 87pp (1980).
- CAVADA, B.S., VIEIRA, C.C., GRANGEIRO, T.B., SALES, P.V.P., RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A. & de OLIVEIRA, J.T.A. Studies on germination of Canavalia brasiliensis Mart. Seeds in the light. Fresh and dry weight and hemagglutinating activity. Ciência e Cultura, 41: 80/-808 (1989).
- CAZAL, P. & LALOURIE, M. Recherches sur quelques phytoagglutinines spécifiques des groupes sanguins ABO. Acta Haematol., 8:73-80 (1952).
- CERRA, R.F., HAYWOOD, R., LAND, P. & BARONDES, H. Endogenous mammalian lectin localized extracellularly in lung elastic fibers. J. Cell Biol., 98:1580-1589 (1984).
- CLARKE, A.E., KNOX, R.B. & JERMYN, M.A. Localization of lectins in legume cotyledons. J. Cell. Sci. 19: 157-167 (1975).
- CLAUSEN, J. Immunochemical techniques for the identification of macromolecules, In: T.S. WORK and E. WORK. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 1, North-Holland. Publishing Company, Amsterdam-London. 572pp (1969).
- COGOLI, A. & TSCHOPP, A. Lymphocyte reactivity during spaceflight. Immunolo. Today, 6:1-4 (1985).
- CUATRECASAS, P. Interaction of wheat germ agglutinin and concanavalin A with isolated fat cells. Biochem., 12: 1312-1323 (1973).
- CUATRECASAS, P. & TELL, G.P.E. Insuline-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin - direct interactions with insulin receptors. Proc. Natl. Acad. Sci., 70:485-489 (1973).

- CURTIS, G.D.W. & SLACK, M.P.E. Wheat germ agglutination of Neisseria gonorrhoeae. A laboratory investigation. Br. J. Vener. Dis., 57:253-255 (1981).
- DAMJANOV, I. Biology of disease. Lectin citochemistry and histochemistry. Lab. Invest., 57:5-20 (1987).
- DAVIDSON, J., MATHIESON, J. & BOYNE, A.W. The use of automation in determining nitrogen by the kjeldhal method with calculations by computer. Analyst, 95:181-193 (1970).
- DAZZO, F.B., HOLLINGSWORTH, R.I. PHILIP, A.F. Recognition of Rhizobium trifolii by the white clover lectin trifoliin A. In: Molecular Biology of Seed Storage Proteins and Lectins. pp.45-52, Shannon, L.M. & Chrispeels, M.J. eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland (1986).
- DE OLIVEIRA, J.T.A. Estudo comparativo das lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero Artocarpus. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pp.1-100 (1980).
- DE OLIVEIRA, J.T.A. Seed Lectins - The Effects of Dietary Phaseolus vulgaris Lectins on the General Metabolism of Monogastric Animals. These de Ph.D. Universidade of Aberdeen, Scotland, 156pp., (1986).
- DE OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. & MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from Cratylia floribunda Mart. seeds (in press) (1990).
- DE OLIVEIRA, J.T.A., PUSZTAI, A. & GRANT, G. Changes in organs and tissues induced by feeding of purified kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectins. Nutr. Res., 8:943-947 (1988).
- DE OLIVEIRA, J.T.A., RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. An anti-blood group A₁ lectin from Crotalaria striata seeds. Arq. Biol. Tecnol. 32:152, (1989).

- DESAI, P.R. & SPRINGER, G.F. Eal serum anti-human blood group H (O) protein. Meth. Enzymol., 28:383-388 (1972).
- DETERMAN, H. Gel Chromatography. Gel filtration, Gel permeation molecular sieves 2nd. Ed. New York, Springer Verlag, 202 pp, (1969).
- DIAZ, C.L., MELCHERS, L.S., HOOYKAAS, P.J.J., LUGTENBERG, B.J.J. & KIJNE, J.W. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis. Nature, 338:579-581 (1989).
- DONATUCCI, D.A., LIENER, I.E. & GROSS, C.J. Binding of Navy bean (Phaseolus vulgaris) lectin to the intestinal cells of the rat and its effect on the absorption of glucose. J. Nutr., 117:2154-2160 (1987).
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28: 350-356 (1956).
- EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., REEKE, G.N., Jr., BECKER, J.W., WAXDAL, M.J. & WANG, J.L. The covalent and threedimensional structure of concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 62:2580-2585 (1972).
- EHRlich, P. Experimentelle Unterserchungen über immunität I. Über Ricin. Deut. Med. Wochschr., 17:976-979 (1891a).
- EHRlich, P. Experimentelle Unterserchungen über immunität II. Über Abrin. Deut. Med. Wochschr., 17: 1218-1219 (1891b).
- ELFSTRAND, M. Tese de Doutorado da Universidade de Uppsala, Uppsala (1897). Citado por Kocourek (1986).
- ENSGRABER, A. Die phytohamagglutinine und ihre funktion in der pflanze als kohlenhydrat-transport substanzen. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 71: 349-361 (1958).
- ERICKSON, R.H. & KIM, Y.S. Interaction of purified brush-border membrane aminopeptidase N and dipeptidyl peptidase IV with lectin-sepharose derivatives. Biochim. Biophys.

Acta, 743:37-42 (1983).

- ETZLER, M.E. & KABAT, E.A. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specificity from Dolichos biflorus. Biochemistry, 9:869-877 (1970).
- FISHER, J., KLEIN, P., VIERBUCHEN, M., SKUTTA, B., UHLENBRUCK, G. & FISHER, R. Characterization of glycoconjugates of human gastrointestinal mucosa by lectins. I. histochemical distribution of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastric neoplasms. J. Histochem. Cytochem., 32:681-689 (1984).
- FISHER, K. & BRANTON, D. Application of the freeze-fracture technique to natural membranes. In: Methods in Enzymology, Vol. 32, pp35-44, Colowick and Kaplan eds., Academic Press., New York (1974).
- FORIERS, A., DENEVE, R., KANAREK, L. & STROSBERG, A. D. Common ancestor for concanavalin A and lentil lectin? Proc. Natl. Acad. Sci., 75:1126-1139 (1978).
- FREEMAN, H.J. Lectin histochemistry of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon neoplasia. J. Histochem. Cytochem., 32:681-689 (1983).
- GABIUS, H.J., VEHMEYER, K., GABIUS, S. & NAGEL, G. A. Clinical applications of various plant and endogenous lectins to leukemia. Blut, 56:147-152 (1988).
- GALBRAITH, W. & GOLDSTEIN, I.J. Phytohemagglutinin of the lima bean (Phaseolus lunatus). Isolation, characterization and interaction on the type A blood group substance. Biochemistry, 11:3976-3984 (1972).
- GIOANNINI, T., FOUCAUD, B., MILLER, J.M., HATTEN, M. E. & SIMON, E.J. Biochem. Biophys. Res. Commun, 105: 1128-1134 (1982). Citado em LIENER et al., (1986)
- GOLD, E.R. & BALDING, P. receptor-specific proteins, plant and animal lectins. Excerpta medica, Amsterdam, 440pp., (1975).

- GOLDSTEIN, I.J. & PORETZ, R.D. Isolation and properties of lectins. In: The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Academic Press, London (1986).
- GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA T. & SHARON, N. What should be called a lectin? Nature, 285: 66 (1980).
- GRANT, G., GREER, F., Mc KENZIE N.H. & PUSZTAI, A. The nutritional response of mature rats to kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectins. J. Sci. Food Agric., 36: 409-414 (1985).
- GRANT, G., MORE, L.J., Mc KENZIE N.H. & PUSZTAI, A. The effect of heating on the haemagglutinating activity and nutritional properties of bean (Phaseolus vulgaris) seeds. J. Sci. Food Agric., 33:1324-1326 (1982).
- GRANT, G., de OLIVEIRA, J.T.A., DORWARD, P. M., ANNAND, M. G., VALDRON, M. & PUSZTAI, A. Metabolic and hormonal changes in rats resulting from consumption of kidney bean (Phaseolus vulgaris) or soyabean (Glicine max). Nutr. Rep. Intl., 36:763-772 (1987).
- GREEN, E.D., BRODBECK, R.M. & BAENZIGER, J. U. Lectin affinity high-performance liquid chromatography. Interactions of N-glucanase-released oligosaccharides with Ricinus communis agglutinin I and Ricinus communis agglutinin II. Biol. Chem., 262:12030-12039 (1987).
- HAASZ, D., FREY, R., THISEN, M. & KAUSS, H. Partial purification of a hemagglutinin associated with cell walls from hypocotyls of Vigna radiata. Planta, 151: 490-496 (1981).
- HAGUE, D.R. Studies of storage proteins of higher plants. Plant. Physiol., 55:636-642 (1975).
- HAPNER, K.D., KOUCHALAKOS; R.N. & BRADSHAW, R.A. In: Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins, pp255-258, Goldstein, I.J. and Etzler, M.E. eds., Alan R. Liss, Ind., New York (1983).

- HARBOE, N. & INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: A Manual quantitative immunoelectrophoresis. Axelsen, N. H. et al. eds, Blackwell Scientific Publications, London (1973).
- HARDMAN, K.D. & AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2,4-Å resolution Biochemistry, 11:4910-4919 (1972).
- HELLIN, H. Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Dorpat (Tarty) (1891). Citado por Kocourek (1986).
- HIGUCHI, M., TSUCHIYA, I. & IWAI, K. Growth inhibition and small intestine lesions in rats after feeding with isolated winged bean lectin. Agric. Biol. Chem., 48: 695-701 (1984).
- HO, S.C., MALEK-HEYDAYAT, S., WANG, J.L. & SCHINDLER, M. Endogenous lectins from cultured soybean cells: isolation of a protein immunologically cross-reactive with seed soybean agglutinin and analysis of its role in binding of Rhizobium japonicum. J. Cell Bio., 103: 1043-1054 (1986).
- HOFFMAN, L.M. & DONALDSON, D.D. Synthesis of mitogenic phytohaemagglutinin-L in Escherichia coli. Bio/Technology, 5:150-160 (1987).
- HORTA - BARROS, A.C., CAVADA, B.S., de OLIVEIRA, J.T.A., CRISÓSTOMO-PINTO, F.S., ALMEIDA-SILVA, L.M. & MOREIRA, R.A. Receptores endógenos de lectinas de sementes da tribo Diocleae. XI Reunião Nordestina de Botânica, Fortaleza(CE), Livro de Resumos (1987).
- HOWARD, J., KINDIGER, J. & SHANNON, L.N. Conservation of antigenic determinants among different seed lectins. Arch. of Biochem. Biophys., 192:457-465 (1979).
- IMBODEN, J.B. The regulation of intracellular signals during Lymphocyte activation. Immunology Today 9:17-18 (1988).
- INBAR, M. & SACHS, L. Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 63:

- 1418-1425 (1999)
- ISHIGURO, M., HARADA, H., ICHIKI, O., SEKINE, I., NISHIMORI, I. & KIKUTANI, M. Effects of ricin, a protein toxic, on glucose absorption by rat small intestine (Biochemical studies on oral toxicity of ricin II). Chem. Pharm. Bull., 31:3222-3227 (1983).
- JAFFÉ, W.G., Über Phytotoxine aus Bohnen. Arzneimittel. Forsch 10:1012-1016 (1960).
- JAYNE-WILLIAMS, D.J. The significance of the intestinal microflora in relation to the oral toxicity of raw navy beans and jack beans for Japanese quail. In: Plant. Proteins (Norton, G., ed.). pp.141-153,(1976)Butterworths, London & Boston.
- JONSSON, B. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl. 54: 456-464 (1944). Cited by Kocourek (1986).
- JUDD, W.J. The role of lectins in blood group serology. CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 12:171-214 (1980).
- KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. Nutritive value of navy beans (Phaseolus vulgaris). Brit. J. Nutr., 19:269-276 (1965).
- KALB A.J. & LEVITZKI, A. Biochem. J., 109:669-672 (1968). Cited by PAULOVÁ et al., (1971).
- KAMAZAKI, H. Purification and characterization of a human lectin specific for penultimate galactose residues. J. Biol. Chem., 261:5455-5459 (1986).
- KAUSS, M. & GLASSER, C. Carbohydrate-binding proteins from plant cell walls and their possible involvement in extensive growth. FEBS Letters, 45:304-307 (1974).
- KING, T.P., PUSZTAI A. & CLARKE, E.M.W. Immunocytochemical localization of ingested kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectins in rat gut. Histochem. J., 12:201-208 (1980).
- KING, T.P., PUSZTAI, A., GRANT, G. & SLATER, D. Immunogold localization of ingested kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectins in epithelial cells of the rat small intestine. Histochem. J., 18:413-420 (1986).
- KOCOUREK, J. Historical background. In: The Lectins, Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine, pp.3-22, Liener, I.E., Sharon, N., and Goldstein, I.J. eds., Academic Press, London (1986).

- KOCOUREK, J. & HOREJSI, V. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin" In: Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry, Vol. 3. p3-6, Bøgg-Hansen, T.C. & Splengler, G.A. eds., Walter de Gruyter, Berlin (1983).
- KOLBERG, J. Isolation and partial characterization of a mitogenic lectin from Lathyrus odoratus seeds. Acta Path. Microbiol. Scand., 86:99-104 (1978).
- KOLBERG, J. & SLETTEN, K. Purification and properties of a mitogenic lectin from Lathyrus sativa seeds. Biochim. Biophys. Acta., 704:26-30 (1982).
- KNOX, R.P., CLARKE, A., HARRISON, S., SMITH, P. & MARCHALOUIS, J.J. Cell recognition in plant: determinants on the stigma surface and their pollen interactions. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73:2788-2792 (1976).
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T₄. Nature, 227: 680-685 (1970).
- LAGERON, A. Characterization by lectin binding of the sugar moiety of glycoconpounds stored in inherited diseases. Histochem. J. 19:419-425 (1987).
- LAMB, J.E., SHIBATA, S. & GOLDSTEIN, I.J. Purification and characterization of Griffonia simplicifolia leaf lectins. Plant. Physiol., 71:879-887 (1983).
- LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hamagglutination. Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. II Orig. 45:660-667 (1908).
- LEE, R.T. & LEE, Y.C. Rabbit and rat hepatic lectins have two sugar - combining sites per monomeric unit. Biochim. Biophys. Res. Commun., 155:1444-1451 (1988).
- LEHRMAN, M.A., HALTIWANGER, R.S. & HILL, R.L. The binding of fucose-containing glycoproteins by hepatic lectins. J. Biol. Chem., 261:7424-7432 (1986).
- LIENER, I.E. Inactivation studies on the soybean hemaggluti-

- nin. J. Biol. Chem., 233:401-405 (1958).
- LIENER, I.E. Isolation and properties of Concanavalin A.
In: Concanavalin A as a tool. Bittiger, H. & Schnebli,
H.P. eds., New York, John Wiley, 17-31 (1976).
- LIENER, I.E. Nutritional significance of lectins in the
diet. In: The lectins: Properties, Functions, and
Applications in Biology and Medicine, pp.227-552 (1986).
- LIENER, I.E. & HILL, E.G. The effect of heat treatment on
the nutritive value and hemagglutinating activity of
soybean oil meal. J. Nutr., 49:609-620 (1953).
- LIS, H. & SHARON, N. Soybean (Glicine max) Agglutinin. Meth.
Enzymol. Complex carbohydrate, 28:360-368 (1972).
- LIS, H. & SHARON, N. The biochemistry of plant lectins
(phytohemagglutinins). Ann. Rev. Biochem., 42: 541-574
(1973).
- LIS, H. & SHAPON, N. Lectins in higher plants. In: The
biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol.
6, Abraham M. ed., Academic Press. London (1981).
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins as molecules and as tools.
Ann. Rev. Biochem., 55:35-67 (1986).
- LIS, H., LOTAN, R. & SHARON, N. Synthesis and use of
affinity chromatography columns for the purification of
plant lectins. Annual. N. Y. Acad. Science, 234: 232-
238 (1974).
- LIPSICK, J.S. BEYER, E.C., BARONDES, S.H. & KAPLAN, N.O.
Lectins from chicken tissues are mitogenic for Thy-1
negative murine spleen cells. Biochem. Biophys. Res.
Commun, 97:56-61 (1980).
- LONG, S.R. and EHRHARDT, D.W. New route to a sticky subject.
Nature, 338:545-546 (1989).
- MAKELA, O. Studies hemagglutinins of leguminoseae seeds. II.
Ocurrence of agglutinins in plants. Ann. Med. Biol.
FENNIAE, 35:32 133 (1957).

- MARBAN - MENDOZA, N., JEYAPRAKASH, A., JANSSON, H. - B., DAMON, R.A., Jr., & ZUCKERMAN, B.M. Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. J. of Hematology, 19:331-335 (1987).
- MARIKOVSKY, Y., LOTAN, R., LIS, H., SHARON, N. & DANON, D. Exp. Cell. Res., 99:453-456 (1976). Citado por Lis and Sharon (1981).
- MARINKOVICH, V.A. Purification and characterization of the hemagglutinin present in potatoes. J. Immunol., 93:732-741 (1964).
- Mc PHERSON, A., HANKINS, C.N. & SHANON, L. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystalline lectins from the seeds and leaves of Sophora japonica. J. Biol. Chem., 262:1791-1794 (1987).
- MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E. & Mc LAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A covenient general bioassay for active plant constituents. J. Med. Plant. Res., 40:31-34 (1982).
- MIRELMAN, D., GALUN, E., SHARON, N. & LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. Nature, 256:414-416 (1975).
- MISHKIND, M., KEEGSTRA, K. & PALEVITZ, B.A. Distribution of wheat germ agglutinin in young wheat plants. Plant. Physiol. 66:950-955 (1980).
- MOORE, S. On the determination of cystine as cysteic acid. J. Biol. Chem., 238:235-237 (1963).
- MOORE, S., SPACKMAN, D.H. & STEIN, W.H. Chromatography of aminoacids on sulfonated polystyrene resins-An improved system. Anal. Chemistry, 30:1185-1190 (1958).
- MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. Lectin from Canavalia brasilien-sis. Mart. Isolation, Characterization and behavior during germination. Biologia Plantarum, 26: 113-120 (1984).
- MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. Comparative studies of seed proteins of the genus Artocarpus with respect of lectins. Biologia Plantarum, 25:336-342 (1983).
- MOREIRA, R.A. & PERRONE, J.C. Purification and partial

- characterization of a lectin from Phaseolus vulgaris. Plant. Physiol., 59:783-787 (1977).
- MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C. & PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of Dioclea grandiflora (Mart). Planta, 158: 63-69 (1983).
- MORGAN, W.T.J. & WATKINS, W.M. The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. Brit. J. Exptl. Med. Pathol., 34:94-103 (1953).
- de MUELENAERE, H.J.H. Effect of heat treatment on the haemagglutinating activity of legumes. Nature, 201: 1029-1030 (1964).
- MULLER, W.E.G., KURELEC, B., ZAHN, R.K., MULLER, I.I. VAITH, P. & UHLENBRUCK, G. Aggregation of sponge cells function of a lectin in its homologous, biological system. J. Biol. Chem., 254:7479-7481 (1979).
- MUTHARIA, L.M. & PEARSON, T.W. Surface carbohydrate of procyclic forms of African trypanosomes studied using fluorescence activated cell sorter analysis and agglutination with lectins. Mol. Biochem. Parasitol., 23: 165-172 (1987).
- NAKATA, S. & KIMURA, T. Effect of ingested toxic bean lectins on the gastrointestinal tract in the rat. J. Nutr., 115: 1621-1629 (1985).
- NICOLSON, G.L. The interactions of lectins with animal cell surfaces. Int. Rev. Cytol., 39:89-190 (1974).
- NOVOGRODSKY, A. & KATCHALSKI, E. Lymphocyte transformation induced by concanavalin A and its by methyl-D-mannopyranoside. Biochim. Biophys. Acta, 228:579-583 (1971).
- NOWELL, P. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res., 20: 462-466 (1960).
- NSIMBA-LUBAKI, M., ALLEN, A.K. & PEUMANS, W.J. Isolation

- and partial characterization of latex lectins from three species of the genus Euphorbia (Euphorbiaceae). Physiol. Plant, 67:193-197 (1986).
- OFEK, I., MIRELMAN, D. & SHARON, N. Adherence of Escherichia coli to human mucosa cells mediated by mannose receptors. Nature, London 265:623-625 (1977).
- OLSON, M.O.J. & LIENER, I.E. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the PHA of the jack bean. Biochem., 6:105-111 (1967).
- OSBORN, T.C. & BLISS, F.A. Effects of genetically removing lectin seed protein on horticultural and seed characteristics of common bean. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 110: 484-488 (1985).
- OSBORNE, T.B. & MENDEL, L.B. The use of soybean as food. J. Biol. Chem., 32:369-387 (1917).
- OTTAVIANI, E. & TARUGI, P. Isolation and characterization of an agglutinin present in the haemolymph of the freshwater snail Planorbarius corneus(L.) (gastropoda pulmonata). Comp. Biochem. Physiol. 84:295-297 (1986).
- PAULOVÁ, M., TICHÁ, M., ENTLICHER, G. KOSTIR, J.V. & KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins IX. Metal content and activity of the hemagglutinin from the lentil (Lens esculenta MOENCH). Biochim. Biophys. Acta., 252: 388-395 (1971).
- PAULSON, J.C. Interaction of animal viruses with cell surface receptors. In: The receptors, Vol. 2, pp. 131-219, Conn, P.M., ed., Academic Press, New York, (1985).
- PETERSON, E.A. & SOBER, H.S. Column chromatography of proteins: substituted celuloscs. In: Methods in Enzimology, Vol. 5. Colowick, S.P. ed., Academic Press, New York (1962).
- PETRI, W.A. Jr., SMITH, R.D., SCHLESINGER, P.M. Isolation of the galactose binding lectin that mediates the "in vitro" adherence of Entamoeba histolytica. J. Clin. Invest., 80:1238-1244 (1987).

- PEUMANS, W.J., DE LEY, M. & BROEKAERT, W.F. An unusual lectin from stinging nettle (Urtica dioica) rhizomes. Fed. Eur. Biochem. Soc., 177:99-103 (1984).
- PINTO, F.S.C. Isolamento e Caracterização das lectinas de sementes de Artocarpus incisa L. var. seminífera. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará. (1987).
- POWELL, A.E. & LEON, M.A. Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. Exp. Cells. Res., 62:315-325 (1970).
- POWER, F.B. & CAMBIER, J. On the chemical constituents and poisonous principles of the bark of the Robinia pseudoacacia. Read before the Winskonsin Academy of Sciences, Arts and Letters, Dec. 27 th, 1889, Pharmal. Redsch. (1889). Citado por GOLD and BALDING (1975).
- PRIGENT, M.J. & BOURRILLON, R. Purification and characterization of Vicia graminea lectin. Interaction of labelled lectin with native and enzyme-modified human M and N erythrocytes. In: Lectins-Biology. Biochemistry Clinical Biochemistry. Vol. 1, pp101-109. Bøg - Hansen, T.C. ed. Walter de Gruyter - Berlim (1981).
- PUEPPKE, S. Distribution of lectins in the Jumbo Virginia and Spanish varieties of peanut, Arachis hypogea L. Plant Physiol., 64:575-580 (1979).
- PUSZTAI, A. Nutricional toxicity of the kidney bean (Phaseolus vulgaris). Rep. Rowett Inst., 36: 110-118 (1981).
- PUSZTAI, A. Constraints on the nutritional utilization of plant proteins. Nutr. Abstr. Rev., 55:363-369 (1985).
- PUSZTAI, A. Lectins. In: Toxicants of Plant Origin. Vol. 3, pp29-71, Cheeke, P.R. ed., CRC Press Inc, Florida, (1989).
- PUSZTAI, A., CLARKE, E.M.W. & KING, T.P. The nutritional toxicity of Phaseolus vulgaris lectins. Proc. Nutr. Soc., 38:115-120 (1979).

- PUSZTAI, A. & STEWART, J.C. Isolectins of Phaseolus vulgaris. Physicochemical studies. Biochim. Biophys. Acta., 536: 38-49 (1978).
- RAVIDRANATH, M.H. & COOPER, E.L. Crab lectins: receptor specificity and biomedical applications. Prog. Clin. Biol. Res., 157:83-96 (1984).
- REISFELD, R.A., LEWIS, V.J. & WILLIAMS, D.E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, 1963: 281-283 (1962).
- REISNER, Y. Graft-versus-host disease and graft rejection: competing in bone marrow transplantation. In: Progress in Bone Marrow Transplantation, Vol. 53, pp175-183, Gale, R.P. & Champlin R. eds., Alan R. Liss, New York, (1987).
- REISNER, Y. & GAN, J. Differential binding of soybean agglutinin to human neuroblastoma cell lines: Potential application to autologous bone marrow transplantation. Cancer, 45:4026-4031 (1985).
- RENKONEN, K.O. Studies on the hemagglutinins present in seeds of some representatives of the family of Leguminosae. Ann. Med. Exptl. Fenniae (Helsinki), 26: 66-72 (1948).
- RICHARDSON, C., BEHNKE, W.D., FREISHEIM, J.H. & BLUMENTHAL, M.K. The complete aminoacid sequences of the α -subunit of pea lectin Pisum sativum. Biochim. Biophys. Acta., 537:310-319 (1978).
- RICHARDSON, M., CAMPOS, F.D.A.P., MOREIRA, R.A., AINOUZ, I. L., BEGBIE, D., WATT, W. B. & PUSZTAI, A. The complete aminoacid sequence of the major α -subunit of the lectin from the seeds of Dioclea grandiflora Mart. Eur. J. Biochem., 144:101-111 (1984).
- ROBERSON, M.M. & BARONDES, S.H. Lectins from embryos and oocytes of Xenopus laevis. J. Biol. Chem., 257: 7520-7527 (1982).
- ROTHLEIM, R. & KIM, Y.B. Porcine alveolar macrophages

- discriminate between self and nonself in lectin - mediated cellular cytotoxicity. Cell Immunol., 68: 368-376 (1982).
- ROUANET, J.M., BESANCON, P. & LAFONT, J. Effect of lectins from leguminous seeds on rat duodenal enterokinase activity. Experientia, 39:1356-1357 (1983).
- ROUANET, J.M., LAFONT, J., CHALET, M., CREPPY, A. & BESANCON, P. Effects of dietary kidney bean (Phaseolus vulgaris) lectins in growing rats. Nutr. Rep. Intern., 31: 237-244 (1985).
- ROUGE, P. Etude de la phytohemagglutinine des graines de lentille au cours de la germination et des premiers stades du developpement de la plante. Evolution dans les cotylédons. C.R. Acad. Sc. Paris, 278: 449-452 (1974).
- RUSSEL, C.S., RODRIGUES, J. & LAJ, P.S. Hemagglutinin activity in Nereis coelomic fluid. Comp. Biochem. Physiol., 75:57 (1983).
- SAGE, H.J. & CONNET, S.L. Studies on a hemagglutinin from the Meadow Mushroom. II. Purification, composition, and structure of Agaricus campestris hemagglutinin. J. Biol. Chem., 244:4713-4719 (1969).
- SAINT-PAUL, M. Les Hémagglutinines végétales. Transfusion, 4:3-37 (1961).
- SALES, P.V.P., de OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. Isolation and characterization of a lectin from Vatairea macrocarpa Duke seeds. Arg. Biol. Tecnol., 32: 151pp (1989).
- SCHOTTELIUS, J. Lectin binding strain specific carbohydrates on the cell surfaces of Leishmania strains from the old world. Z. Parasitenkd., 66:237-247 (1982).
- SELA, B.A., LIS, H., SHARON, N. & SACHS, L. Different locations of carbohydrate-containing sites in the surface-membrane of normal and transformed mammalian cells. J. Memb. Biol., 3:267-279 (1970).

- SCHAFFER, R.L., KELLER, K.F. & DOYLE, R.J. Lectins in diagnostic microbiology, use of wheat germ agglutinin for the laboratory identification of Neisseria gonorrhoeae. J. Clin. Microbiol., 10:669-672 (1979).
- SHANKAR-YER, P.N., WILKINSON, K.D. & GOLDSTEIN, I.J. An N-acetyl-D-glucosamine binding lectin from Bandeiraea simplicifolia seeds. Arch. Biochem. Biophys. 177: 330-333 (1976).
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science, 177:949-959 (1972).
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins, ppl-127, Chapman and Hall, London, (1989).
- SHARON, N. LIS, H. & LOTAN, R. On the structural diversity of lectins. In Methologie de la structural et du metabolisme des glicoconjugués. Vol. 1, (1974).
- SHECHTER, Y. & SELA, B.A. Insuline-like effects of wax bean agglutinin in rat adipocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 98:367-373 (1981).
- SHIOMI, K., KAMIYA, H. & SHIMIZU, Y. Purification and characterization of an agglutinin in the red alga Agardhiella tenera. Biochim. Biophys. Acta., 576: 118-127 (1979).
- STILLMARK, H. Uber rizin, ein giftiges ferment aus samen von Ricinus communis L., und einigen anderen euphorbiaceen. Tese de Doutorado, Universidade de Dorpat, Dorpat (Tartu) (1888). Citado por Kocourek (1986).
- STUBBS, M.E., CARVER, J.P. & DUNN, R.J. Production of pea lectin in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 261: 6141-6144 (1986).
- SUGISHITA, S. Juzenkwaï Zasshi, 40, 1938, 2331, 3369 and 4643 (1935). Citado por Kocourek (1986).
- SUMNER, J.B. The globulins of the jack bean Canavalia ensiformis. J. Biol. Chem., 37:137-143 (1919). Citado por Gold and Balding (1975).

- SUMNER, J.B. & HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J. Bacteriol., 32:227-237 (1936).
- TALBOT, C.E. & ETZLER, M.E. Development and distribution of Dolichos biflorus lectin as measured by radioimmunoassay. Plant. Physiol., 61:847-850 (1978).
- TOWBIN, H., STAEBENLIN, T. & GORDON, J. Eletroforese transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheet: Produces and some application. Troc. Nat. Acad. Sci., 76:4350-4354 (1979).
- TSIVION, Y. & SHARON, N. Lipid-mediated hemagglutination and its relevance to lectin-mediated agglutination. Biochim. Biophys. Acta., 642:336-344 (1981).
- TRIEBOLD, H.O. Quantitative analysis with applications to agricultural and food products. 331pp., D. Van Nostrand Co., New York (1946).
- TRIADOU, N. & AUDRAN, E. Interaction of the brush border hydrolases of the human small intestine with lectins. Digestion, 27:1-7 (1983).
- VASCONCELOS, I.M., FIRMINO, F., MOREIRA, R.A., CAVADA, B. S., GUIMARÃES, F.A. & OLIVEIRA, J.T.A. Nutritional studies of Canavalia brasiliensis Mart. seeds. Cien. Cult., 41S: 786pp, (1989).
- VODKIN, L.O., RHODES, P.R. & GOLDBERG, R.B. A lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. Cell, 34:1023-1031 (1983).
- WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A. & EDELMAN, G.M. Unusual fragments in the subunit structure of concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68:1130-1134 (1971).
- YARIV, J., KALB, A.J. & LEVITZKI, A. The interaction of con A with methyl α -D-glucopyranoside. Biochim. Biophys. Acta., 165:303-305 (1968).
- YUAN, M., ITZKOWITZ, S.M., BOLAND, C.R. Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant

human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. Cancer Res., 46:4841-4847 (1986).

YUE, C.L., TANIMOTO, K., & HORINCHI, Y. Characterization and possible mechanisms of mitogen-induced cell-mediated cytotoxicity. Scand. J. Immunol., 14:397-408 (1981).

ZUCKERMAN, B.M. Hypotheses and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. J. of Nematology., 15:173-182 (1983).