

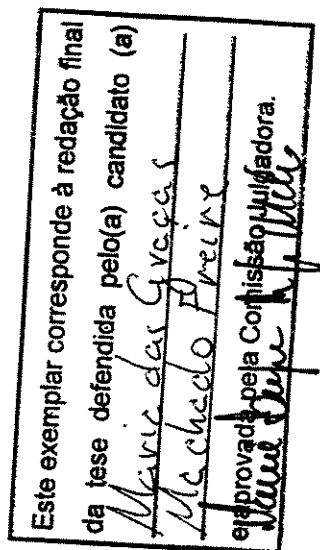
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



MARIA DAS GRAÇAS MACHADO FREIRE

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDO
DAS ATIVIDADES INSETICIDA, MICROBICIDA E INFLAMATÓRIA DA
LECTINA ISOLADA DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* (St. HIL)

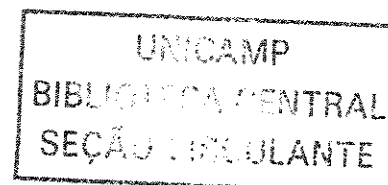
RADLK



*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de doutor em Biologia Funcional e
Molecular, Área de Bioquímica*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo

CAMPINAS-SP
2003



UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
F	883i
V	EX
TOMBO BC/	55134
PROC.	16-124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/08/03
Nº CPD	

BIBID. 297418

CM00187242-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Freire, Maria das Graças Machado

F883i Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (ST.HIL) RADLAK /Maria das Graças Machado Freire. -- Campinas, SP:[s.n.], 2003.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

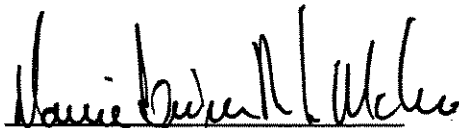
Instituto de Biologia.

1. Fungos. 2. Bactérias. 3. Insetos. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

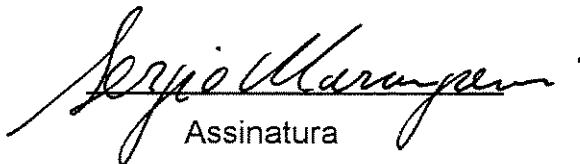
Campinas, 26 de março de 2003.

BANCA EXAMINADORA

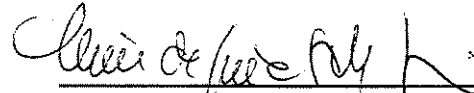
Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora)


Assinatura

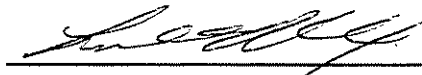
Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

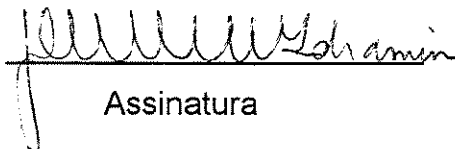
Prof^a. Dr^a. Maria da Guia Silva Lima


Assinatura

Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho


Assinatura

Prof. Dr. José Djair Vendramim


Assinatura

SUPLENTES

Prof^a. Dr^a. Denise Vaz de Macedo

Assinatura

Prof^a. Dr^a. Eneida de Paula

Assinatura

00006461

“Não sejas o de hoje.
Não suspires por ontens...
Não queiras ser o de amanhã.
Faze-te sem limites no tempo”.

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, por ter me ensinado a gostar de fazer ciência com entusiasmo e dedicação. Por apostar em mim e possibilitar que meus horizontes se alargassem sem fronteiras.

Ao professor Dr. Sérgio Marangoni, por ter me recebido em seu laboratório e assim proporcionado a oportunidade para que este trabalho fosse desenvolvido.

Aos professores Drs. Paulo Mazzafera, Hiroshi Aoyama, Stephen Hylosp e Denise Vaz Macedo pela participação no exame de qualificação, onde fizeram importantes observações para a revisão dessa tese.

Aos professores Drs. Maria da Guia Silva Lima, Luana Cassandra B. B. Coelho, José Djair Vendramim, Sérgio Marangoni, Denise Vaz de Macedo e Eneida de Paula, por participarem da banca examinadora desta tese, valorizando assim o meu trabalho.

Aos professores Luis César Henriques Lusitano, Jair Araújo Júnior, Nerton Pinto Fernandes Távora e Valmir Laurentino Silva, pelo incentivo e apoio decisivos para que eu pudesse me dedicar, nestes quatro anos, ao meu doutoramento.

Aos professores Drs. Maria Lígia R. Macedo, Wirla M.S.C. Tamashiro, Maria da Guia Silva Lima, Edson Antunes, Stephen Hylosp, Paulo Mazzafera, Valdirene M. Gomes, Olga L.T. Machado, Hernandes Faustino de Carvalho e Tomomasa Yano, por terem aberto as portas de seus laboratórios e dividido comigo um pouco dos seus conhecimentos de forma muito prazerosa.

A Heraldo Negri de Oliveira do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ e a Pedro Carlos Strikis do Departamento de Parasitologia/IB da UNICAMP, pelas fotos inéditas dos insetos.

Ao Dr. Júlio Rodrigues Neto, do Instituto Biológico de Campinas, por ceder as bactérias fitopatogênicas, estudadas neste trabalho, que fazem parte da Coleção de Culturas IBSBF registrada na World Federation for Culture Collections (WFCC).

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB)/UFMS, pela amizade, torcida e colaboração, que com certeza, foi muito importante para vencer esta etapa.

À Ivani Aparecida de Souza e Ana Cláudia Silva, pela companheirismo e colaboração nos experimentos de imunologia.

A todos os colegas e professores do LAQUIP, pela convivência cordial.

A Joaquim Antunes, pela amizade que nasceu nos corredores deste Departamento.

A minha família e a família David Corraes, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

À Mirela Coelho, Gláucia Mello e Beatriz Goulart, pelo apoio que me deram na preparação e apresentação final deste trabalho.

A FAPESP, que disponibilizou os recursos para o desenvolvimento deste projeto.

PREFÁCIO

Para melhor apresentação dos estudos realizados, esta tese foi dividida em três capítulos e um apêndice. Neste último foram inseridos os trabalhos gerados durante sua realização.

CAPÍTULO I: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LECTINA DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* (ST. HIL) RADLK

CAPÍTULO II: O PAPEL DA LECTINA DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* NA DEFESA DE PLANTAS AO ATAQUE DE FUNGOS, BACTÉRIAS E INSETOS

CAPÍTULO III: ESTUDO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGO INDUZIDA PELA LECTINA DE SEMENTES DE *T. esculenta*

APÊNDICE

- **Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth**

Maria das Graças M. Freire , Valdirene M. Gomes , Rosely E. Corsini , Olga L. T. Machado, Salvatore G. De Simone , José C. Novello , Sérgio Marangoni , Maria Lígia R. Macedo. *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 61-68.

- **Isolation and characterization of isolectins from *Talisia esculenta* seeds**

Maria das Graças M. Freire , Olga L.T.Machado , Marcos B. Smolka, José C. Novello, Sérgio Marangoni , José C. Novello, Maria Lígia R. Macedo. *J. Protein Chem.* 20 (6), 2001, 495-500.

- ***Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae)**

Maria Ligia R. Macedo, Maria das Graças Machado Freire, José Camillo Novello and Sérgio Marangoni. *BBA*, 1571,2002, 83-88.

- **Inflammatory responses induced by *Talisia esculenta* seeds lectin in mouse**

M.G.M. Freire, I. A. Desouza, A.C.M. Silva, M.L.R. Macedo, M.S. Lima, W.M.S.C. Tamashiro, E. Antunes and S. Marangoni. *TOXICON*, October, 2003.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xix
ABREVIATURAS	xx
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv

CAPÍTULO I: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LECTINA DE SEMENTE DE *Talisia esculenta* (SI. HIL) RADLK

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais	2
1.2- Subdivisão de lectinas vegetais de acordo com a estrutura	3
1.3- Subdivisão de lectinas vegetais de acordo com a ocorrência estrutura molecular e especificidade	4
1.3.1- Lectinas de leguminosas	5
1.3.2- Lectinas ligantes de quitina	7
1.3.3- Proteínas inativadoras de ribossomos	8
1.3.4- Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose	9
1.3.5- Lectinas relacionadas à jacalina	9
1.3.6- Lectinas do floema de Cucurbitaceae	10
1.3.7- Lectinas de Amaranthaceae	10
1.4- Especificidade de lectinas vegetais por carboidratos	11
1.5- Biossíntese de lectinas vegetais	16
1.6- <i>Talisia esculenta</i> (St. Hil) Radlk- descrição botânica	17

2-OJETIVOS	18
------------	----

3- MATERIAIS	
3.1- Material vegetal	19
3.2- Reagentes	19
4. MÉTODOS	
4.1- Purificação da lectina de <i>Talisia esculenta</i>	
4.1.1- Preparação da farinha	19
4.1.2- Extração de proteínas	19
4.1.3- Determinação de proteínas	20
4.1.4- Atividade hemaglutinante	20
4.1.5- Cromatografia de exclusão molecular	21
4.1.6- Cromatografia de afinidade	21
4.1.7- Isolamento das isoformas de TEL em cromatografia de fase reversa	22
4.1.8- Estimativa da massa molecular por SDS-PAGE	22
4.1.9- Eletroforese bidimensional	23
4.1.10- Determinação da massa molecular por gel filtração	23
4.1.11- Dosagem de carboidratos totais	24
4.1.12- Composição de aminoácidos	24
4.1.13- Eletrotransferência de proteínas	24
4.1.14- Determinação da sequência N-terminal	25
4.2- Caracterização físico-química da lectina de <i>Talisia esculenta</i>	
4.2.1- Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante	25
4.2.2- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante	26
4.2.3- Efeito dos agentes quelantes sobre a atividade hemaglutinante	26
4.2.4- Efeito da deglicolização sobre a estrutura protéica	26
4.2.5- Especificidade da lectina	27

5 RESULTADOS	
5.1- Atividade hemaglutinante	28
5.2- Cromatografia de exclusão molecular	29
5.3- Cromatografia de afinidade em coluna de quitina	30
5.4- Isolamento das isoformas de TEL	31
5.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
5.6- Gel de eletroforese em duas dimensões de TEL e suas isoformas	34
5.7- Análise por filtração em gel das proteínas	36
5.8- Dosagem de carboidratos totais	38
5.9- Composição de aminoácidos	39
5.10- Determinação da sequência N-terminal	40
5.11 - Estabilidade de TEL em relação ao pH	41
5.12- Estabilidade térmica de TEL	42
5.13- Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante	42
5.14- Efeito da enzima endoglicosidase H sobre as estrutura protéica	43
5.15- Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante	44
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

CAPÍTULO II: O PAPEL DA LECTINA DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* NA DEFESA DE PLANTAS AO ATAQUE DE FUNGOS, BACTÉRIAS E INSETOS

1- INTRODUÇÃO	
1.1- Caracterização do problema de armazenagem de grãos	58
1.2- Principais pestes de insetos de grãos armazenados	60
1.2. 1- Morfofisiologia da digestão de insetos	65
1.2. 2- Papel inseticida de lectinas de plantas	68
1.3. Contaminação por fungos	69
1.3.1- Fungos fitopatogênicos	70
1.3.2- Proteínas de ação fungicida	71
1.4- Aspectos gerais da parede bacteriana	73
1.4.1- Interações específicas de lectinas com estruturas específicas de bactérias	77
1.4.1.1- mananas	77
1.4.1.2- quitina	77
1.4.1.3- outros polissacarídeos	77
1.4.1.4- ácidos teicóides	78
1.4.1.5- lipopolissacarídeos	78
1.4.2- Ação das lectinas contra bactérias	78
2- OBJETIVOS	80
3- MATERIAIS	81
4- MÉTODOS	
4.1 - Estudo da atividade fungicida	82
4.1.1- Manutenção dos microorganismos	82
4.1.2- Extração de esporos dos fungos filamentosos	82
4.1.3- Preparo das células de levedura	83
4.1.4- Ensaio de atividade quitinásica	83
4.1.5- Ensaio de inibição do crescimento de fungos	83
4.1.6- Microscopia óptica	84

4.2- Estudo da atividade lectínica sobre o crescimento de bactérias	84
4.3- Estudo da atividade inseticida	
4.3.1- Criação de insetos	85
4.3.2- Efeito da lectina sobre o desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	85
4.3.3- Dissecção das larvas de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	85
4.3.4- Preparo de homogenatos de intestinos médios de larvas de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	86
4.3.5- Estudo da digestibilidade <i>in vitro</i> das enzimas proteolíticas de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i> sobre TEL	86
4.3.6- Estudo da digestibilidade <i>in vitro</i> das enzimas pepsina e papaína sobre TEL	86
4.3.7- Efeito dos carboidratos sobre a ação inseticida da lectina	87
4.3.8- Análise estatística	87
5-RESULTADOS	
5.1- Atividade quitinásica	88
5.2- Efeito da lectina sobre o crescimento de fungos	88
5.3- Microscopia óptica mostrando o efeito de TEL sobre o crescimento de fungos	89
5.4- Estudo da atividade lectínica sobre o crescimento de bactérias	90
5.5- Efeito da lectina sobre o desenvolvimento larval de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	94
5.6- Estudo da digestibilidade <i>In vitro</i> de TEL pelas enzimas proteolíticas de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	98
5.7- Estudo da digestibilidade <i>in vitro</i> de TEL pelas enzimas pepsina e papaína	99
5.8- Efeito dos carboidratos sobre a ação inseticida de TEL	100

6- DISCUSSÃO	103
7- CONCLUSÕES	109
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

CAPITULO III- ESTUDO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA EM CAMUNDONGO INDUZIDA PELA LECTINA DE SEMENTES DE *T. esculenta*

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais do processo inflamatório	120
1.2- A migração de leucócitos e as lectinas vegetais	125

2- OBJETIVOS	127
---------------------	-----

3- MATERIAIS	128
---------------------	-----

4- MÉTODOS

4.1- Efeito da injeção da lectina de <i>T. esculenta</i> em induzir migração de neutrófilos e células mononucleares para bolsa de ar em camundongos	129
4.2- Efeito da injeção intraperitoneal da lectina de <i>T. esculenta</i> em induzir a migração de neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal de camundongos	129
4.3- Efeito da injeção intraplantar subcutânea da lectina de <i>T. esculenta</i> em induzir edema de pata em camundongos	129
4.4- Efeito de açúcares sobre a migração de neutrófilos e edema de pata em camundongos induzido pela lectina de <i>T. esculenta</i>	130
4.5- Produção <i>ex-vivo</i> de óxido nítrico por células peritoneais de camundongo induzidas por lectina de <i>T. esculenta</i>	130
4.5.1- Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos	130
4.5.2- Dosagem <i>in vitro</i> de nitrito	131
4.6-Análise estatística	131

5- RESULTADOS

5.1- Efeito do tratamento intraperitoneal da lectina de <i>T.esculenta</i> sobre a migração de neutrófilos e células mononucleares para diferentes cavidades de camundongos	132
5.2- Efeito da injeção subcutânea intraplantar da lectina de <i>T. esculenta</i> na indução de edema de pata	137
5.3- Efeito de carboidratos sobre a migração de neutrófilos e edema de pata induzidos pela lectina de <i>T. esculenta</i>	138
5.4- Produção <i>ex-vivo</i> de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos induzidas por lectina de <i>T. esculenta</i>	140

6-DISCUSSÃO	141
--------------------	-----

7-CONCLUSÕES	145
---------------------	-----

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	146
-------------------------------------	-----

APÊNDICES	149
------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

1- Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural	4
2- Ligação de uma lectina a diferentes carboidratos	12
3- Frutos e sementes de <i>Talisia esculenta</i>	17
4- Cromatografia de exclusão molecular	29
5- Cromatografia de afinidade em coluna de quitina	30
6- Cromatografia de fase reversa	32
7- Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	33
8- Eletroforese bidimensional	35
9- Análise por filtração em gel das proteínas	36
10- Determinação da massa molecular aparente	37
11- Estabilidade de TEL em relação ao pH	41
12- Estabilidade térmica de TEL	42
13- Efeito da enzima endoglicosidase H sobre as estruturas das lectinas de <i>T. esculenta</i>	43

CAPÍTULO II

1- <i>Callosobruchus maculatus</i> sobre grãos de <i>Vigna unguiculata</i>	61
2- Ovos de <i>C. maculatus</i> sobre grãos de <i>V. Unguiculata</i> e galerias produzidas pelos insetos	62
3- Ovos de <i>Zabrotes subfasciatus</i> sobre grãos de <i>Phaseolus vulgaris</i> e galerias produzidas pelos insetos	62
4- <i>Z. subfasciatus</i> sobre grãos de <i>P. vulgaris</i> (foto: Strikis)	63
5- <i>Z. subfasciatus</i> sobre grãos de <i>P. vulgaris</i> (foto: Negri)	64
6- Diagrama geral do intestino de inseto	67
7- Parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas	75

8- Efeito da lectina sobre o crescimento de fungos	88
9- Microscopia óptica mostrando o efeito de TEL sobre o crescimento de fungos	89
10- Efeito de TEL sobre o crescimento da bactéria <i>P. cichorii</i>	90
11- Efeito de TEL sobre o crescimento da bactéria <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>faccumfaciens</i>	91
12- Efeito de TEL sobre o crescimento da bactéria <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	92
13- Efeito de TEL sobre o crescimento da bactéria <i>X. melonis</i>	93
14- Efeito de TEL sobre larvas de <i>C. maculatus</i> alimentadas com dieta artificial	95
15- Efeito de TEL sobre larvas de <i>Z. subfasciatus</i> alimentadas com dieta artificial	96
16A- Larvas de 4º ínstar de <i>C. maculatus</i> alimentadas com TEL	97
16B- Larvas de 4º ínstar de <i>Z. sub fasciatus</i> alimentadas com TEL	97
17- Eletroforese em PAGE-SDS de TEL incubada com enzimas intestinais de larvas de <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	98
18- Eletroforese em PAGE-SDS de TEL incubada com enzimas intestinais de larvas de <i>Z. subfasciatus</i>	99
19- Eletroforese em PAGE-SDS de TEL incubada com enzimas pepsina e papaína	100
20- Efeito de carboidratos sobre a sobrevivência e peso de <i>C. maculatus</i>	101
21- Efeito inibitório de carboidratos sobre a atividade inseticida de TEL sobre <i>C. maculatus</i>	102

CAPÍTULO III

1- Efeito de TEL sobre a migração de neutrófilos para a bolsa de ar em camundongos	133
2- Efeito de TEL sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em camundongos	134
3- Efeito de TEL sobre a migração de células mononucleares para bolsa de ar em camundongos	135
4- Efeito de TEL sobre a migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal em camundongos	136
5- Edema de pata induzido por TEL em camundongos	137
6- Efeito inibitório de carboidratos na indução de neutrófilos mediada por TEL	139

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

I- Família de lectinas de plantas: ocorrência, estrutura molecular e especificidade	4
II- Especificidade da ligação de lectinas de plantas a carboidratos	14
III- Determinação da atividade hemaglutinante presente no extrato bruto de <i>T. esculenta</i>	26
IV- Dosagem de carboidratos totais de TEL e suas isoformas	37
V- Hemaglutinação e inibição da atividade hemaglutinante de TEL	38
VI- Composição de aminoácidos de TEL e suas isoformas	39
VII- Comparação da seqüência N-terminal de isolectinas de sementes de <i>T. esculenta</i>	40

ABREVIATURAS

ADP- adenosina difosfato
CAPS- 3-ciclohexil-amino-1 -ácido propanosulfônico
¹⁴C-CM-Cys- cisteína marcada radiotivamente com carbono 14
Con A- lectina de *Canavalia ensiformes*
Con Br- lectina de *Canavalia brasiliensis*
CRD- domínio de reconhecimento de carboídrato
DGL- lectina de *Dioclea grandiflora*
DTT- ditionitrito
EDTA - ácido etilenodiamino tetracético
EGTA- ácido etilenoglicol tetracético
GlcNAc- N-acetilgalactosamina
GNA- aglutinina de *Galanthus nivalis*
HPLC- cromatografia líquida de alta pressão
IPG- gradiente de pH imobilizado em fitas
LPS- lipopolissacarídeo de membrana bacteriana
PAA- aglutinina de *Pisum arvense*
PAG- polinucleotídeo adenosina glicosidase
PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida
PHA- aglutinina de *Phaseolus vulgaris*
PNA- aglutinina de *Pisum sativum*
PSA- persulfato de amônio
PTC- feniltiocarbamil
PTH- feniltioidantina
PVDF- membrana de polivinildileno difluoreto
RIP- proteína inativadora de ribossomos
SBA- aglutinina de soja
SDS - dodecil sulfato de sódio
SFB - soro fetal bovino

TEL- lectina de *Talisia esculenta*

TEMED- N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina

TFA- ácido trifluoroacético

TFMS- ácido trifluormetanosulfônico

UDA- aglutinina de *Urtiga dioica*

WGA - aglutinina de germe de trigo

ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviação	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histina	Hys	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-
QUÍMICA DA LECTINA DE SEMENTES DE *Talisia*
esculenta (ST. HIL) RADLK

I- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais

A primeira descrição do que agora conhecemos como lectina, foi dada por Stilmark (1888) quando investigava os efeitos tóxicos de extratos de mamona (*Ricinus communis*) sobre células sangüíneas. Ele mostrou que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína que chamou de ricina, embora agora esteja evidente que o que ele chamou de ricina era uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não tóxicas.

Rüdiger (1997), apontou os requisitos para que uma proteína seja denominada lectina: (a) ser uma proteína ou glicoproteína que se liga a carboidratos e conseqüentemente aglutina hemácias e outras células que possuam um ou mais sítios de ligação para açúcar; (b) ligar-se a carboidratos mas não necessariamente ser glicosilada; (c) ser produzida constitutivamente mas não como resultado de estímulos externos. Peumans & Van Damme (1995) indicaram ainda mais uma exigência: (d) apresentar, no mínimo, um domínio não catalítico de ligação reversível a carboidratos.

Apesar destes requisitos serem amplamente aceitos, alguns aspectos especiais já foram abordados: existem proteínas que por apresentarem um único domínio ligante de carboidrato (merolectinas), são incapazes de aglutinar células devido a sua natureza monovalente (Van Parijs et al., 1991); já é sabido que a inibição da interação entre a lectina e um glicoconjugado por um carboidrato, é uma prova de que esta interação é mediada pela lectina. Entretanto, há casos em que essa interação é evitada ou inibida devido à presença de baixas concentrações de sais (Etzler & Borrebaeck, 1980); algumas plantas respondem a infecções ou a lesões produzindo lectinas (Millar et al., 1992). Sem desconsiderar estas particularidades que fogem à regra geral, Peumans & Van Damme (1995) propuseram a mais recente definição de lectinas de plantas que diz: lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico e que sejam capazes de ligar-se reversível e especificamente a carboidratos. Essa nova definição inclui várias proteínas que se comportam de maneira bastante diferente sob o ponto de vista das propriedades aglutinantes e/ou precipitantes de glicoconjugados e permite

que as lectinas sejam reunidas em quatro grupos de acordo com suas características estruturais: mero, holo, quimero e superlectinas (Peumans & Van Damme, 1995; Van Damme et al., 1998) (figura 1).

1.2-Subdivisão de lectinas vegetais de acordo com a estrutura

- Merolectinas: apresentam um único domínio de ligação a carboidratos. Como são monovalentes, consequentemente não precipitam glicoconjugados nem aglutinam células. Heveína, uma pequena proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é uma típica merolectina (Van Parijs et al., 1991).

- Hololectinas: são compostas de pelo menos dois domínios ligantes de carboidratos, que são idênticos ou muito similares e ambos ligam-se ao mesmo açúcar ou a açúcares estruturalmente similares. Como são multivalentes aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais pertence ao subgrupo das hololectinas.

- Quimerolectinas: são lectinas compostas de um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado com o anterior. Este último pode apresentar atividade enzimática bem definida ou qualquer outra atividade biológica contanto que atue independentemente do(s) domínio(s) de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou como hololectinas. Um representante deste grupo é a ricina (toxina de mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina (Peumans & Van Damme, 1998).

Superlectinas: consistem de pelo menos dois domínios de ligação para carboidratos independentes estrutural e funcionalmente. Como exemplo, pode ser citada a lectina de tulipa (TxLC-I) que consiste de um domínio de ligação para manose, seguido por um domínio não relacionado de ligação a N-acetilgalactosamina (Van Damme et al., 1996).

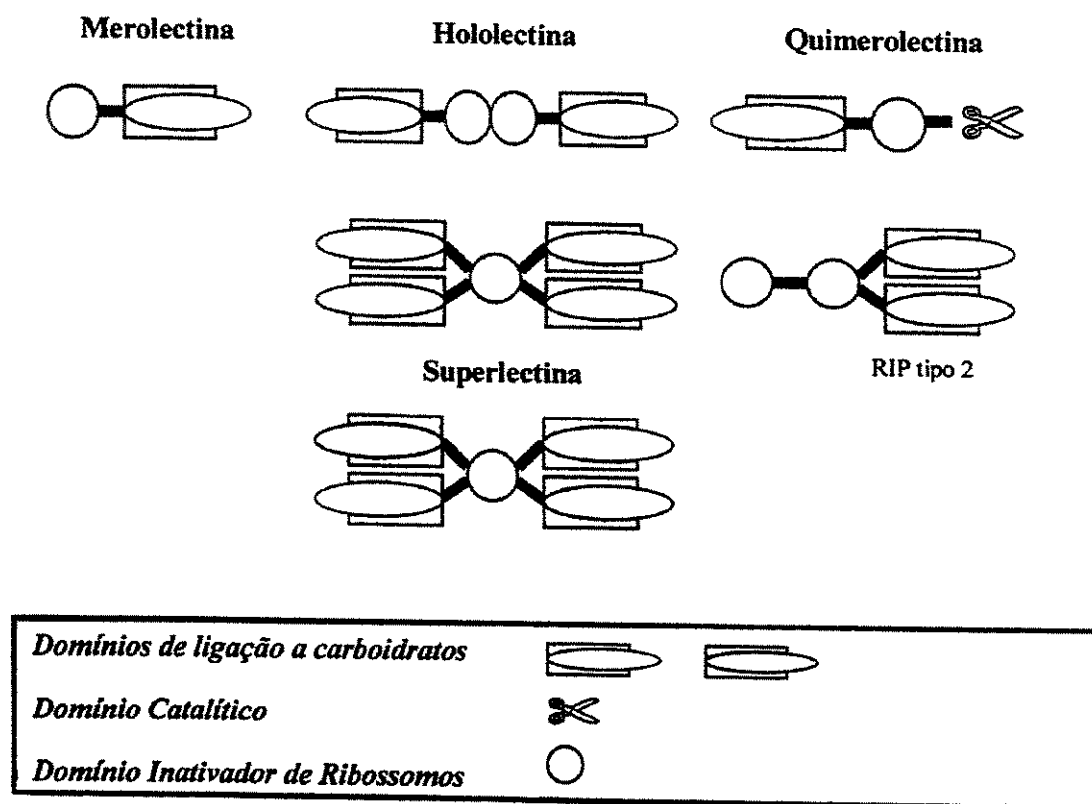


Figura 1: Subdivisão de lectinas de plantas de acordo com a característica estrutural (Adaptado de Van Damme et al., 1998).

1.3- Subdivisão de lectinas vegetais de acordo com a ocorrência, estrutura molecular e especificidade

Como as lectinas formam um grupo de proteínas muito heterogêneas, várias tentativas já foram feitas para agrupá-las de acordo com a estrutura molecular, especificidade para ligação a carboidratos e atividades biológicas. As lectinas de plantas podem ser classificadas em sete grupos de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas (tabela I) (Peumans & Van Damme, 1998).

Tabela I: Famílias de lectinas de plantas: ocorrência, estrutura molecular e especificidade

Lectinas	Ocorrência	Estrutura Molecular	Especificidade	
	<i>Distribuição Taxonômica</i>	<i>Nº de lectinas identificadas</i>	<i>Nº de protômeros</i>	
Legume	Legumes	>100	2 ou 4	Diversa
Mono-cotiledôneas	Liliales	>50	1,2,3 e 4	Manose
Ligantes de quitina	Mono e Dicotiledôneas	>100	1 ou 2	GlcNAc ou (GlcNAc) _n
Tipo 2RIP	Mono e Dicotiledôneas	>20	1,2 ou 4	Gal, GalNAc ou Neu5Acα(2,6)Gal/GalNAc
Floema de Cucurbitaceae	Cucurbitaceae	<10	2	(GlcNAc) _n
Família jacalina	Moraceae	<10	2	Gal
	Convolvulaceae			Manose/Maltose
Amaranthaceae	Amaranthaceae	<10	2	GalNAc

Tabela adaptada de Peumans & Van Damme, 1998.

1.3.1- Lectinas de leguminosas

Esta família de lectinas engloba proteínas encontradas unicamente na família Leguminosae. Mais de 100 lectinas já foram isoladas e cerca de 70 dessas, pertencentes a diferentes subordens e espécies, foram caracterizadas, principalmente aquelas de sementes onde o percentual de lectina varia de 1 a 10% do total de proteínas solúveis, embora em algumas espécies concentrações acima de 50% tenham sido observadas (Sharon & Lis, 1990).

Vários legumes possuem duas ou mais diferentes lectinas numa semente. Embora elas difiram em suas especificidades para carboidratos, são muito semelhantes em suas propriedades físico-químicas. Consistem usualmente de 2 ou 4 subunidades (25-30 kDa), cada subunidade com um sítio de ligação para carboidrato (Sharon & Lis, 1990). Algumas lectinas de legumes são glicosiladas sendo que algumas cadeias podem apresentar alto teor de glicosilação. Muitas lectinas podem ser encontradas em diferentes formas moleculares. A lectina de *Phaseolus vulgaris*

(PHA), por exemplo, é formada por dois tipos de subunidades denominadas E e L, que se associam em várias proporções dando origem a uma família de 5 isolectinas tetraméricas: E4, E3L, E2L2, EL3 e L4 (Felsted et al., 1981). As lectinas de plantas muitas vezes apresentam-se como isolectinas e são muito parecidas ou idênticas na sua especificidade para carboidratos. Existem três razões para a heterogeneidade das lectinas: (1) processos pós-transducionais incompletos, o que acarreta diferenças nas extremidades C e N-terminal (Young et al., 1995); (2) variações na glicosilação da proteína; (3) heterogeneidade genética, isto é, mais de um gene codificando a lectina (Sharon & Lis, 1989; Van Damme et al., 1998).

Este grupo de lectinas requer cátions divalentes para a manutenção de atividade biológica. Os íons Mn^{+2} e Ca^{+2} estabilizam o sítio de ligação a carboidrato bem como fixam as posições dos aminoácidos que interagem com os carboidratos ligantes. Os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são bastante conservados (Weis & Drickamer, 1996).

Estudos das estruturas tridimensionais de lectinas e de complexos lectina-carboidrato têm sido realizados através de sofisticadas técnicas de difração de raio X, ressonância nuclear magnética e, em alguns casos, por modelamento molecular. Através desses estudos é possível caracterizar com mais detalhes essas proteínas e desvendar as mudanças que ocorrem na molécula em resposta à ligação ao carboidrato.

Várias lectinas de leguminosas já têm suas estruturas cristalográficas depositadas nos bancos de proteínas, como PHA (Hamelryck et al., 1996), a lectina de *Lathyrus ochrus* (Rougé & Cavada, 1984), a de amendoim (Banerjee et al., 1994), a de soja (Dessen et al., 1995), e a de *Griffonia simplicifolia* (Delbaere et al., 1993).

Muitas lectinas de leguminosas apresentam atividades biológicas importantes, como a lectina isolada de *Abrus pulchellus* (Ramos et al., 1998), que se mostrou extremamente tóxica quando injetada na cavidade peritoneal de camundongos ou quando testada com o crustáceo *Artemia salina*. Outros exemplos podem ser citados como o efeito inflamatório e anti-inflamatório desempenhado pela lectina de soja (Benjamin et al., 1997), e a atividade inseticida da lectina de *L. ochrus* sobre larvas de *Drosophila melanogaster* (Triguéros et al., 2000).

1.3.2- Lectinas ligantes de quitina

A família das lectinas ligantes de quitina compreende todas as proteínas que contenham pelo menos um domínio heveína. O termo “domínio heveína” refere-se a uma pequena proteína de 43 aminoácidos, extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (Waljuno et al., 1975). Todas as unidades estruturais de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos que exibem seqüência similar à heveína e que possuem capacidade de ligar-se a quitina, são denominadas possuidoras do “domínio heveína”. Deve-se ressaltar que há também lectinas que se ligam à quitina sem apresentarem esse domínio heveína, como por exemplo, as lectinas de Cucurbitaceae (Van Damme et al., 1998).

Esta família compreende mero, holo e quimerolectinas. Heveína é uma merolectina composta de um simples domínio ligante de quitina. As hololectinas apresentam dois domínios ligantes de quitina, como por exemplo a aglutinina de *Urtiga dioica* (UDA) (Beintema & Peumans, 1992). As quitinases de classe I são quimerolectinas compostas de um domínio heveína ligado a um domínio catalítico com atividade quitinásica. Todas as lectinas desta família, incluindo as quitinases de classe I ficam retidas numa coluna de quitina, o que indica a capacidade de interação dessas lectinas com este polissacarídeo. Os sítios de ligação a carboidrato apresentam uma estrutura complexa o que vem explicar o porquê da interação dessas lectinas com carboidratos, não ser inibida por GlcNAc, necessitando de pelo menos um dímero de GlcNAc. São encontradas em cinco famílias não relacionadas taxonomicamente: Gramíneae, Solanaceae, Urticaceae, Papaveraceae e Amaranthaceae. Elas apresentam diferentes atividades: ação fungicida – a UDA atrapalha a síntese e/ou depósito de quitina na parede celular de algumas espécies de fungos (Broekaert et al., 1989); defesa contra bactérias – a lectina de *Datura stramonium* bloqueia a movimentação normal da bactéria (Broekaert & Peumans, 1986); interferência no crescimento e desenvolvimento de insetos – WGA inibe o crescimento e reprodução do inseto *Nilaparvata lugens*, que ataca arroz (Powell et al., 1995).

1.3.3- Proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2

Proteínas que inativam ribossomos (RIP) são comumente conhecidas como proteínas que cataliticamente inativam ribossomos eucarióticos (Barbieri et al., 1993). O mecanismo de ação delas é baseada na remoção enzimática de um resíduo adenina específico de uma região altamente conservada na subunidade maior do RNA ribossomal. A clivagem deste resíduo específico de adenina causa uma mudança conformacional, impedindo a ligação do fator de elongação 2 ao ribossomo. Como resultado, a síntese de proteína é impedida e as células morrem. Durante os últimos anos, têm sido apresentadas evidências de que a atividade enzimática das RIP não é restrita a simples resíduos de adenina de ribossomos eucarióticos ou RNAr. A maioria das RIP são realmente capazes de remover múltiplos resíduos de adenina, e de polinucleotídeos como RNA e DNA.

Várias proteínas inativadoras de ribossomo do tipo 2 têm sido isoladas de plantas pertencentes à famílias não relacionadas taxonomicamente: Euphorbiaceae, Fabaceae, Sambucaceae, Viscaceae, Ranunculaceae, Lauraceae, Passifloraceae, Iridaceae e Liliaceae. Todas as lectinas apresentam alta homologia tanto na cadeia A quanto na B, mas diferem quanto à atividade catalítica, especificidade para substrato e propriedades tóxicas. A maioria liga-se preferencialmente a Gal ou GalNAc. Muitas podem entrar em células intactas por endocitose, depois que sua cadeia B se ligar a glicoreceptores na superfície da célula. Uma vez dentro da célula, a cadeia A pode então chegar ao citosol e inativar os ribossomos, resultando na morte da célula.

Como exemplo de atividade biológica podemos citar a ricina, uma lectina isolada de *R. communis* e a abrina de *Abrus precatorius*, que exercem atividade antitumoral, baseada na inibição de síntese protéica (Lin & Li, 1980). Os insetos, por sua vez, reagem de modo diferente frente às proteínas 2 RIP. A ricina é altamente tóxica para *Callosobruchus maculatus* e *Anthonomus grandis*, mas não apresenta nenhum efeito sobre *Spodoptera littoralis* e *Heliothis virescens*. A ausência de efeito da ricina sobre os lepidópteros pode indicar que estes são capazes de inativar a lectina ou que existe uma carência de receptores específicos para a cadeia B (Gatehouse et al., 1990).

1.3.4- Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose

O termo “lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose” refere-se à superfamília das lectinas estritamente específicas a manose, as quais até agora têm sido exclusivamente encontradas no subgrupo das plantas monocotiledôneas (Peumans & Van Damme, 1996).

Todas as lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose consistem de subunidades com seqüência similar e estrutura tridimensional semelhante. Elas ocorrem em pelo menos cinco famílias diferentes: Amaryllidaceae, Alliaceae, Araceae, Liliaceae e Orchidaceae (Van Damme et al., 1998). A inibição da atividade biológica por carboidratos é exclusiva para manose, com exceção da superlectina TxLC-1 extraída de bulbos de tulipa que não é inibida por nenhum açúcar simples, mas sim pela combinação de manose com GalNAc (Van Damme et al., 1996).

Duas lectinas classificadas neste grupo exercem atividade inseticida sobre o lepidóptero *Maruca vitrata*: a aglutinina purificada de *Listera ovata* (Orchidaceae) e a aglutinina de bulbos de *Galanthus nivalis* (GNA) (Amaryllidaceae) (Machuka et al., 1999).

1.3.5- Lectinas relacionadas à jacalina

O termo “lectinas relacionadas à jacalina” engloba todas as lectinas que são estruturalmente e evolucionariamente relacionadas à lectina da jaca (*Artocarpus integrifolia*). A família da jacalina compreende dois subgrupos de lectinas. O primeiro subgrupo compreende as lectinas de semente da família Moraceae, específicas para N-acetilgalactosamina, as quais são muito similares à lectina de jaca e o segundo que compreende as lectinas da família Convolvulaceae, que apresentam seqüência similar com a lectina de Moraceae, mas exibem especificidade para manose/maltose (Van Damme et al., 1996).

Como exemplo de lectinas do grupo da Moraceae, pode-se citar a lectina de folhas de amora (*Morus alba*), que é capaz de induzir à aglutinação da bactéria fitopatogênica *Phaseolus syringae* pv *mori* (Ratanapo et al., 2001); a lectina *Maclura pomifera* que apresenta um efeito significativo sobre larvas de *C. maculatus* (Murdock

et al., 1990) e jacalina que afeta o desenvolvimento de *Empoasca fabae*, inseto que ataca batata (Habibi et al., 1993). Poucas informações existem do grupo das Convolvulaceae, mas se sabe que podem apresentar atividade mitogênica (Peumans et al., 1997 b).

1.3.6- Lectinas do floema de Cucurbitaceae

Muitas espécies de Cucurbitaceae contêm altas concentrações de lectinas que ligam-se a oligômeros de GlcNAc, mas não apresentam domínios heveína (Wang et al., 1994). Estas são denominadas lectinas do floema de Cucurbitaceae, proteínas diméricas, compostas de duas subunidades não glicosiladas e idênticas de 24 kDa. Apresentam alto grau de homologia entre si, mas nenhuma similaridade seqüencial com qualquer outra proteína ou lectina vegetal. Este grupo de lectinas parece estar envolvido com mecanismos de defesa contra microorganismos (Read & Northeote, 1983).

1.3.7- Lectinas de Amaranthaceae

A clonagem e a análise por difração de raio-X revelaram que a amarantina, lectina de sementes de *Amaranthus caudatus*, não se assemelha a qualquer outra lectina vegetal com relação à seqüência de aminoácidos e estrutura tridimensional, sendo então considerada como o protótipo desta família. Esta lectina é inibida por GalNAc, mas muito mais ainda pelo dissacarídeo Gal β (1,3)GalNAc (Rinderle et al., 1989).

Várias outras espécies de *Amaranthus* contêm lectinas muito similares à amarantina, como *A. spinosus*, *A. leucocarpus* e *A. cruentus* (Peumans et al., 1998). São proteínas que interagem *in vitro* com células humanas e de animais, embora os papéis biológicos dessas lectinas ainda não tenham sido elucidados. Entretanto, devido à alta afinidade que estas proteínas apresentam para antígeno T-dependentes, pode ser que elas estejam envolvidas na defesa de plantas contra predadores (Van Damme et al., 1998).

1.4- Especificidade de lectinas vegetais por carboidratos

A capacidade de aglutinar células, isoladamente, não caracteriza uma lectina, pois outros agentes são capazes de produzir esta reação, como taninos, certos lipídios e cátions divalentes em altas concentrações. Para garantir que a aglutinação está sendo mediada pela lectina exige-se que ocorra a inibição desta atividade por carboidratos. O inverso da menor concentração de carboidrato que inibe a aglutinação oferece uma estimativa da afinidade entre o carboidrato e a lectina (Rüdiger, 1998).

A figura 2 apresenta um esquema dos sítios de ligação de uma lectina hipotética.

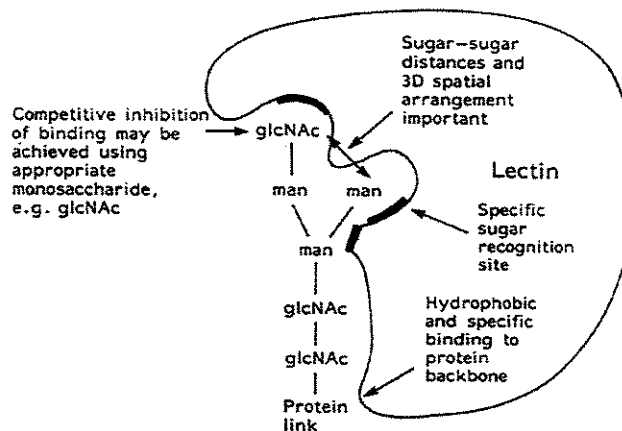


Figura 2: Ligação de uma lectina a diferentes carboidratos (Brooks et al., 1997).

Essa ligação envolve três monossacarídeos, sendo dois terminais (GlcNAc e Man) e outro sub-terminal (Man) na cadeia oligossacarídica, com um arranjo espacial próprio. Por vezes a parte protéica ou lipídica da glicoproteína ou da lipoproteína também interage com a lectina através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas que não estão localizadas nos sítios de ligação a carboidrato, mas que desempenham papel fundamental na interação da lectina com estruturas tissulares (Kennedy et al., 1995).

A especificidade das lectinas por carboidratos é usualmente examinada por técnicas de inibição, nas quais diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas são avaliados em sua capacidade de inibir a hemaglutinação ou a

precipitação de polissacarídeos. Entretanto, este método é semiquantitativo, levando em consideração a variabilidade dos reagentes biológicos e da técnica em si. Para a confirmação da interação lectina-carboídrato, empregam-se hoje várias adaptações do método de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Kojima et al. (1994) utilizaram o método GAS ELISA (GAS = glycoprotein-antibody sandwich) para confirmar a especificidade da *Sophora japonica* aglutinina I (B-SJA-I) por carboidratos, partindo do conhecimento prévio de que lectinas conjugadas com HRP (HRP = horseradish peroxidase) têm sido utilizadas para a detecção e a análise de glicoproteínas. Os autores conjugaram uma glicoproteína (asialofetúina, que reage com *Sophora japonica* aglutinina I) com HRP e utilizaram este conjugado (HRP-GP) para detectar e caracterizar a atividade da lectina. A ligação da B-SJA-I com HRP-asialofetúina e sua inibição competitiva com monossacarídeos foi ensaiada em placas de microtitulação e seguiu o seguinte procedimento: (1) aderência da lectina ou extrato contendo a lectina; (2) adição de BSA para bloqueio dos sítios ligantes de proteína remanescente; (3) adição da HRP-asialofetúina; (4) lavagens para a remoção da HRP-asialofetúina não ligada à lectina; (5) adição do substrato (*o*-feniletilenodiamina em H₂O₂) e (6) análise espectrofotométrica (490 nm) da cor resultante. Nos ensaios de inibição, foram adicionadas soluções de diferentes açúcares antes da incubação com HRP-asialofetúina. Estes experimentos mostraram que: a ligação da B-SJA-I com HRP-asialofetúina foi dose dependente; que esta interação foi inibida por galactose, N-acetilgalactosamina e lactose, resultado coincidente com a inibição da atividade hemaglutinante e que a atividade da lectina foi detectada no extrato bruto na concentração de 5 a 300 µg.ml⁻¹ de proteína.

A especificidade por carboidratos é uma das características utilizadas para classificar as lectinas e, segundo a afinidade por açúcares simples, as lectinas vegetais foram classificados por Makela (1957) em quatro grupos, dependendo da configuração relativa de C3 e C4 do anel piranosídico: grupo I (L-fucose), grupo II (galactose, acetilgalactosamina), grupo III (glicose, manose) e grupo IV (D-idose, L-glicose e L-xilose). Goldstein & Poretz (1986) ampliaram a classificação: grupo I (manose específica), grupo II (manose/glicose), grupo III (manose/maltose), grupo IV (galactose/N-acetilgalactosamina), grupo V (N-acetilglicosamina específica), grupo VI

(L-fucose) e grupo VII (ácido siálico). Recentemente, Peumans & Van Damme (1998) propuseram uma classificação mais abrangente (tabela II).

A afinidade das lectinas por monossacarídeos é geralmente fraca, bastante seletiva, mas não absoluta. Muitas lectinas toleram alguma variação no C-2 do anel piranosídico. Por exemplo, lectinas manose-específicas podem interagir com glicose (seu epímero) e vice-versa. ConA exibe especificidade para manose, mas pode ligar-se a glicose e a N-acetilglicosamina (So & Goldstein, 1967). A maioria das lectinas com especificidade para galactose interage também com N-acetilgalactosamina. Aqui também está incluída a lectina de *Bandeíraea simpliciifolia* I (Hayes & Goldstein, 1974), que é galactopiranosil-ligante.

Geralmente são aceitas pouquíssimas alterações em C-3, embora a lectina de *Vicia faba* apresente uma afinidade bem maior por 3-O-metil-glicose do que por glicose (Alen et al., 1976).

O grupamento OH de C-4 é crítico na interação com a lectina. Por exemplo, lectinas galactose-específicas não reagem com glicose ou manose, nem aquelas manose/glicose ligam-se à galactose, bem como lectinas específicas para N-acetilglicosamina não interagem com N-acetilgalactosamina e vice-versa, embora a aglutinina *Helix pomatia*, ligante de N-acetilglicosamina, também apresente 10% de afinidade para N-acetilgalactosamina (Hammarström & Kabat, 1969).

Alguns açúcares em sua forma furanosídica podem ligar-se a ConA, como por exemplo frutose e arabinose (Goldstein et al., 1965). Algumas lectinas pertencentes a um mesmo grupo demonstram especificidade pelo anômero α ou β -glicosídico do respectivo monossacarídeo, enquanto que outras não fazem essa distinção e interagem igualmente com as duas formas. Algumas outras demonstram preferência por glicosídicos aromáticos ao invés de alifáticos, sugerindo a presença de uma região hidrofóbica próxima ao sítio de ligação a carboidrato (Lis & Sharon, 1998).

Métodos físicoquímicos como espectrofotometria, fluorometria e ressonância magnética nuclear são empregados para determinar a constante de associação e outros parâmetros termodinâmicos e cinéticos da reação de aglutinação, aumentando as informações a respeito do processo de ligação e permitindo especular sobre a natureza dos sítios ligantes das lectinas. As constantes de associação entre lectinas e monossacarídeos ficam na faixa de 10^3 a $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$,

enquanto que para oligossacarídeos estão compreendidas entre 10^4 e 10^7 M^{-1} . Apesar da classificação das lectinas com base na especificidade por monossacarídeos ser amplamente aceita, sabe-se agora que a maioria das lectinas apresenta especificidade por oligossacarídeos, com constantes de associação bem menores que aquelas para monossacarídeos (Rüdiger, 1998).

Tabela II: Especificidade da ligação de lectinas de plantas a carboidratos

ESPECIFICIDADE	LECTINAS
<u>Grupo fucose</u>	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i>
<u>Grupo galactose/N-acetilgalactosamina</u>	
Galactose>>GalNAc	Jacalina (<i>Artocarpus integrifolia</i>)
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	Soja (<i>Glycine max</i>)
<u>Grupo N-acetilglicosamina</u>	
GlcNAc	Gérmen de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i>
<u>Grupo manose</u>	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/Glicose	Con A (<i>Canavalia ensiformes</i>)
Manose/Maltose	<i>Calystegia sepium</i>
<u>Grupo ácido siálico</u>	
Ácido siálico	Gérmen de trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
Neu5Acα(2,6)Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Acα(2,3)Gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
<u>Grupo de glicanos complexos</u>	
Especificidade com complexos conhecidos	PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Especificidade com complexos desconhecidos	<i>Euonymus europaeus</i>

Tabela adaptada de Peumans & Van Damme., 1998.

1.5- Biossíntese de lectinas vegetais

As lectinas são sintetizadas na forma de pró-lectinas no retículo endoplasmático, e após sofrerem processamentos co- e/ou pós-transducionais, originam a proteína madura. Esse processamento envolve: a remoção de um peptídeo sinal de 20-30 aminoácidos, a clivagem proteolítica da cadeia precursora, a perda da extremidade C-terminal, a remoção de carboidrato estrutural e a ligação das extremidades C e N-terminais originais (Loris et al., 1998). Durante ou após o transporte da lectina até os vacúolos de armazenamento, via aparelho de Golgi, podem ocorrer modificações pós-transducionais nas unidades de carboidratos, ocasionando perdas dessas moléculas. Frequentemente, estas clivagens proteolíticas pós-transducionais geram cadeias polipeptídicas. Como exemplo, pode-se citar o que ocorre com a lectina de ervilha, para qual são gerados polipeptídeos de 25 kDa. Nesses polipeptídeos a sequência sinal da extremidade N-terminal é composta de 29 resíduos, seguidos da cadeia β e logo depois da cadeia α . A clivagem da ligação entre a cadeia β e α , originando a lectina madura, acontece nos corpos proteicos, local do último estágio da biossíntese da lectina de ervilha e onde também esta é armazenada (Sharon & Lis, 1990).

Nem todas as lectinas são glicosiladas, embora muitas vezes sejam geradas a partir de precursores glicosilados, como é o caso das lectinas ConA e WGA (Carrington et al., 1985; Mansfield et al., 1988). Apesar da glicosilação não ser uma exigência direta para a atividade biológica da lectina, pode ser um fator importante, pois sabe-se hoje que as cadeias de glicanos conferem solubilidade e estabilidade às lectinas (Peumans & Van Damme, 1998).

A localização intracelular de lectinas vegetais tem sido debatida há muitos anos. Atualmente é aceito que as lectinas vegetais são intracelularmente localizadas em organelas especiais, formadas a partir dos vacúolos, denominados de corpos protéicos, após terem sido produzidas seguindo a via geral de síntese de proteínas de reservas (Baba et al., 1991).

1.6- *Talisia esculenta* (St. Hil) Radlk – descrição botânica

Talisia esculenta (sinonímia botânica – *Sapindus esculentus*, *Sapindus edulis*), ou pitomba (nome vulgar), pertence à família *Sapindaceae*, com ocorrência no Amazonas, Pará e Maranhão até o Rio de Janeiro, nas florestas pluvial amazônica e atlântica. É particularmente freqüente na Amazônia ocidental e no norte do Espírito Santo (Vale do Rio Doce). Seus frutos são comestíveis e muito saborosos (figura 3), sendo inclusive comercializados nas feiras da região norte e nordeste do país. Também são muito procurados por pássaros, que atuam como dispersores dessas sementes (Lorenzi, 1992).

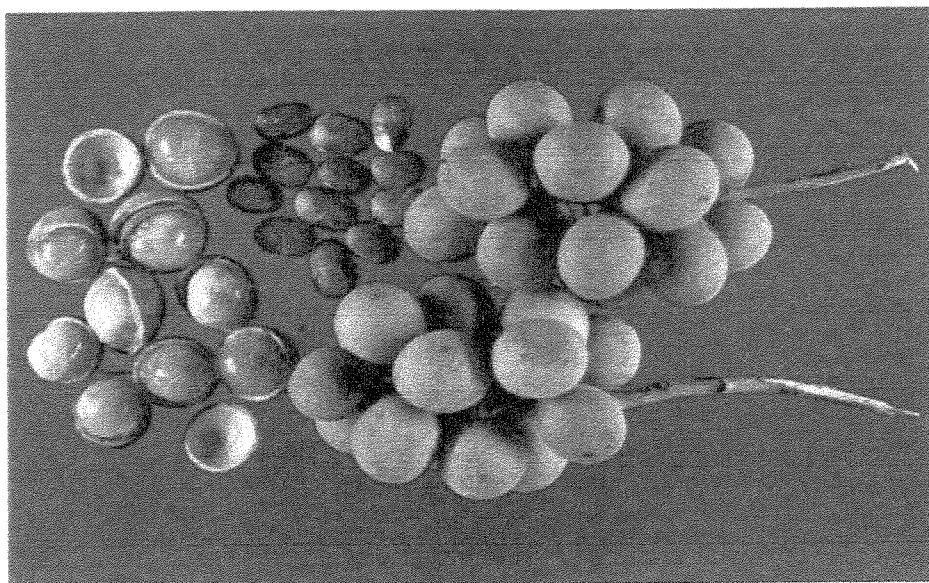


Figura 3: Frutos e sementes de *T. esculenta*

2- Objetivos

Este capítulo tem como objetivos:

- isolar e purificar a lectina presente em sementes de *T. esculenta*
- realizar a caracterização físico-química desta lectina
- determinar a composição e a sequência N-terminal de aminoácidos

3- MATERIAIS

3.1- Material vegetal

As sementes de *Talisia esculenta* (St. Hil) Radlk foram coletadas no Estado do Ceará.

3.2- Reagentes

Todos os reagentes foram de grau analítico ou HPLC. A resina utilizada para a cromatografia de exclusão molecular bem como os padrões de massa molecular foram adquiridos da Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden) e a coluna de fase reversa (sistema HPLC) da Waters (EUA). Os reagentes utilizados na determinação da composição de aminoácidos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA), os do seqüenciamento da região N-terminal da Applied Biosystems (Foster City, EUA) e os para eletroforese da Bio-Rad Laboratories (Richamond, EUA).

4- MÉTODOS

4.1- Purificação da lectina de *Talisia esculenta*

4.1.1- Preparação da farinha

Sementes secas sem cascas foram trituradas em um macro moinho. A farinha de fina granulação foi delipidada com hexano e posteriormente armazenada em frascos hermeticamente fechados a -10° C para posterior utilização.

4.1.2- Extração de proteínas

Proteínas presentes nas sementes de *T. esculenta* foram extraídas da farinha das sementes com tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 12 horas à 4° C. Após a homogeneização manual, o material foi centrifugado a 5.000 x g durante 30 minutos, obtendo-se assim um

precipitado que foi descartado, e um sobrenadante denominado de extrato bruto (E.B.), que foi dialisado, liofilizado e posteriormente utilizado nas etapas de purificação da lectina.

4.1.3- Determinação de proteínas

A concentração de proteína nos extratos e material foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão. O método consiste de 100 µl da amostra e 2,5 ml do reagente de Bradford. A leitura foi feita após 10 minutos de reação em espectrofotômetro a uma absorvância de 595 nm.

4.1.4- Atividade hemaglutinante

Para a dosagem desta atividade, amostras de 1,0 ml de sangue humano e/ou de animais, foram colhidas em solução de Alsever's (2,05 g de glicose; 0,80 g de citrato de sódio; 0,42 g de cloreto de sódio, para 100 ml de água destilada; pH entre 6,1 e 6,5, ajustado com ácido cítrico). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes com salina e alíquotas de 0,5 ml foram padronizadas a 2 % (v/v), mantidas em banho de gelo, para resguardar a integridade das células.

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, que foram preenchidos com 50 µl de salina 0,15M e em seguida acrescidos 50 µl da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila, sendo descartados os 50 µl referentes ao último poço. Após as diluições, foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos a 2% (v/v). As placas foram mantidas em repouso por aproximadamente 1 hora em estufa a 37°C. A mínima concentração (ou maior diluição) que permite visualização dos eritrócitos hemaglutinados foi determinado. Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle.

4.1.5- Cromatografia de exclusão molecular

O empacotamento da coluna de Sephadex G 100 foi feito seguindo a recomendação do fabricante, numa coluna de vidro (2,5cm x 60,0cm) até a altura desejada. Em seguida, a coluna foi equilibrada com o tampão de equilíbrio/eluição fosfato 0,1M, pH 7,6 contendo NaCl 0,1 M. Amostras do EB foram aplicadas e a cromatografia conduzida à temperatura ambiente utilizando-se o tampão anteriormente citado, sob fluxo constante de 35 ml/h, sendo a absorbância do eluato monitorada a 280 nm. Foram coletadas frações de 3,0 ml/tubo. Para certificar-se de que não havia nenhuma proteína presa à matriz, aplicou-se uma solução de HCl 0,1M, após a eluição com o tampão de equilíbrio. As frações protéicas obtidas foram analisadas quanto à sua atividade hemaglutinante através de ensaios de hemaglutinação.

4.1.6- Cromatografia de afinidade

O método utilizado na preparação de quitina foi descrito por Hackman & Goldberg (1964). Carapaças de lagosta foram finamente moídas e cerca de 50 g desta farinha foram suspensas em 1000 ml de HCl 0,1 N. A mistura foi incubada por 24 h e, a seguir, centrifugada à 7500 x g por 20 minutos à 4° C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 500 ml de NaOH 0,1 N. Esta mistura foi aquecida à 100° C por 16 horas, esfriada e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e, ao término, realizou-se uma centrifugação à 7500 x g por 20 minutos à 4° C. O precipitado foi seco e guardado para utilização posterior.

Uma coluna de quitina (2 cm x 6 cm; 20 ml de leito) foi equilibrada com tampão fosfato 0,05 M, pH 7,6 e utilizada numa cromatografia de afinidade. Após a adsorção das proteínas (10 mg de proteína em 1 ml de tampão fosfato), a coluna foi inicialmente eluída com o mesmo tampão até que a leitura da absorbância em 280 nm, retornasse a zero. A lectina adsorvida foi eluída com HCl 0,1 M. Frações de 2 ml foram coletadas e a concentração de proteína foi estimada pela leitura da

absorbância em 280 nm. A atividade hemaglutinante das frações foi determinada após o ajuste de pH para 7,0, quando necessário.

4.1.7- Isolamento das isoformas de TEL em cromatografia de fase reversa

A fração eluída da coluna de quitina foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, sistema HPLC modelo PDA/991, equipado com duas bombas Waters modelo 510 e injetor automático de amostra Waters U6K e uma coluna μ -Bondapack C18 (3,9 x 30 cm). Utilizou-se um gradiente descontínuo de 0 a 100% de solução de acetonitrila 80 % em 0,1% de ácido trifluoroacético pH 2,5. Os passos do gradiente foram: 0-40 % de acetonitrila (15 min), 40-80 % de acetonitrila (de 15 a 45 min), 80-100 % de acetonitrila (de 45 aos 60 min). A seguir, deixou-se lavar a coluna por 5 minutos com 100 % de acetonitrila. A absorbância foi acompanhada em 280 nm.

4.1.8- Estimativa da massa molecular por SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (PAGE-SDS) foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970). A concentração utilizada para o gel de corrida (gel de separação) foi de 12,5% de poliacrilamida e a amostra foi fervida antes de ser aplicada.

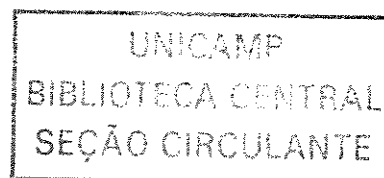
A coloração das proteínas, após a corrida foi feita com solução de Coomassie Blue R-250 0,25%, durante duas horas. A remoção do excesso de corante para melhor visualização das bandas de proteínas foi efetuada por lavagem numa solução descorante, contendo metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v).

4.1.9- Eletroforese bidimensional

Aproximadamente 5 µg de proteína foram adicionadas a 340 µl de tampão de amostra contendo ureia 8 M, CHAPS 4 %, anfólitos 2 % (pH 3-10), DTT 0,07 M e azul de bromofenol 0,001% (todos os reagentes eram da Amersham Pharmacia Biotech, com exceção do DTT que era da Biorad). As amostras foram aplicadas às fitas IPG com faixa de separação de pH entre 3 e 10 (Amersham Pharmacia Biotech). Após 10 min de reidratação, deu-se início à focalização isoeletrica a 20 °C por 1 h a 500 V; 1 h a 1000 V e 10 h a 8000 V no aparelho IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech). A corrente aplicada foi de 50 µA por fita. Após este procedimento as fitas foram então incubadas por 10 min em solução Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8), uréia 6 M, glicerol 30 %, SDS 2 % e DTT 2 %, seguido de incubação no mesmo tampão por 10 min, sendo que foi adicionada iodoacetamida a 2,5 % em vez de DTT. A eletroforese de segunda dimensão (PAGE-SDS) foi realizada num sistema SE-600 conectado a um sistema refrigerador Multitemp II (Amersham Pharmacia Biotech). Depois de colocar as fitas no topo de um gel de poliacrilamida a 12,5% e lacrar com agarose, os géis foram submetidos a uma amperagem constante de 30 mA por 1 h a 90 V (por gel) até que a frente de migração alcançou a parte inferior do gel. As proteínas foram coradas com nitrato de prata (Blum et al., 1987).

4.1.10- Determinação da massa molecular por filtração em gel

As massas moleculares relativas (M_r) das proteínas foram determinadas utilizando-se uma coluna de gel filtração Protein-Pak 300 SW HPLC (10 µm, 7,8 mm x 300 mm) (Waters) equilibrada com tampão PBS 0,1 M, pH 7,4. Os marcadores de massa molecular (Pharmacia) usados foram: albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12,5 kDa).



4.1.11- Dosagem de carboidratos totais

O conteúdo de carboidratos neutros presente nas proteínas foi estimado colorimetricamente pelo método fenol/ácido sulfúrico, usando D-glicose como padrão (Dubois, 1956). A amostra da lectina purificada utilizada no ensaio foi de 1mg/ml.

4.1.12- Composição de aminoácidos

A análise de aminoácidos foi feita em um analisador Pico-Tag (Waters system). A identificação dos aminoácidos das proteínas, obtidos através de hidrólise ácida, foi feita através dos derivados feniltiocarbamil (PTC), provenientes da derivatização com fenilisotiocianato. Um η mol da lectina purificada foi hidrolisada em HCl 6M, fenol 1% à 106° C por 24h. Os hidrolisados foram incubados com 20 μ l de solução fresca de derivatização (metanol:água:triethylamina (2:2:1, v/v) por 1 hora à temperatura ambiente. Depois da derivatização, os PTC-aminoácidos foram identificados em sistema de HPLC, usando coluna C 18- μ Bondapack em cromatografia de fase reversa com gradiente linear de 20 minutos de 0 a 100% de acetonitrila (60%). A indentificação de cada aminoácido foi feita em relação a uma corrida padrão de PTC aminoácidos.

4.1.13- Eletrotransferência de proteínas

Após eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante como descrito no ítem 4.2.5, foi realizada a eletrotransferência das proteínas para uma membrana de PVDF (polivinildifenilfluoreto), em sistema de miniplacas Hoefer SE-250 (Amersham Pharmacia Biotech), usando uma corrente de 400 mA por 60 minutos sob resfriamento à 10°C. O tampão de transferência foi preparado com 2,2 g de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) em 900 ml de água, sendo titulado a pH 11 com NaOH 2N e o volume final elevado a 1L com 100 ml de metanol. Ao final da transferência, a membrana foi corada com Comassie blue R-250 por 2 minutos e descorada em solução descorante, contendo metanol, ácido acético e

água destilada (4:1:5; v:v:v), para evidenciar das bandas protéicas. O material de interesse foi selecionado para posterior seqüência.

4.1.14- Determinação da seqüência N-terminal

Para determinação do N-terminal, foi feita a transferência da proteína da membrana de PVDF para o seqüenciador automático Shimadzu PPSQ-10. Os derivados fenildantoína foram analisados a 269 nm depois da separação em coluna de fase reversa C18 Wakopak Wakosil/HPLC (0,46 cm x 0,25 cm) da Shimadzu, sob condições de isocráticas, usando acetonitrila 40%, ácido acético 20 mM e dodecil sulfato de sódio 0,014% como fase móvel, num fluxo de 1,0 ml/min à 40°C. A pesquisa da homologia sequencial foi realizada utilizando o banco de dados de seqüências de proteínas NCBI-Blast.

4.2- Caracterização físico-química da lectina de *Talisia esculenta*

4.2.1- Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

Para verificar o efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante, a lectina foi tratada com diferentes pHs, variando de 3 a 9, à 37°C por 1 hora. Foram utilizados para isto os seguintes tampões: citrato de sódio 0,1M (pH 2,0 a 5,0), fosfato de sódio monobásico 0,1 M (pH 6,0 a 8,0), bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0 a 10,0). Após incubação, os pHs foram ajustados para as condições do ensaio de hemaglutinação. Foram feitas triplicatas para cada valor de pH, sendo determinada a média dos valores obtidos e o desvio padrão para cada uma delas.

4.2.2- Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

A lectina foi submetida a variação de temperatura (de 37 à 100 °C). Após incubação por 30 minutos em cada temperatura, as amostras foram imediatamente colocadas em banho de gelo e, a seguir, a atividade hemaglutinante foi avaliada. Foram feitas três repetições para cada temperatura, sendo determinada a média e o desvio padrão para cada temperatura.

4.2.3- Efeito de agentes quelantes sobre a atividade hemaglutinante

A necessidade de cátions divalentes para a atividade biológica da lectina foi investigada dissolvendo-se 5 mg da lectina purificada em solução de EDTA 0,025 M (quelante de Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+}) e, a seguir, dialisando-se exaustivamente a amostra contra esta mesma solução durante 48 h, seguida de diálise contra NaCl 0,15 M por 24 h. A atividade hemaglutinante foi ensaiada antes e depois da adição de CaCl_2 e MnCl_2 0,1M, como foi descrito anteriormente.

4.2.4- Efeito da deglicolização sobre a estrutura protéica

TEL e suas isoformas foram deglicosiladas com Endoglicosidase H. Para isto, 15 mg de cada proteína foram incubadas com 1,5 ml de Endoglicosidase H (0,015 unidades) e 5 ml de tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,5. A reação foi processada por 12 h à 37° C e então paralisada com aquecimento à 100° C por 5 min. A seguir, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (12,5%) para que fossem comparados os perfis protéicos antes e após a deglicosilação.

4.2.5- Especificidade da lectina

Em placas de hemaglutinação foram colocadas alíquotas de 50 µl de diferentes carboidratos utilizando-se diluição seriada (concentração inicial de 0,1M em NaCl 0,15 M), seguido de adição de 50 µl de amostra. As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos e adicionou-se 50 µl de uma suspensão de eritrócitos humanos tipo A a 2% em NaCl 0,15 M. Após repouso de 1 hora na temperatura de 37 °C, foi determinado o título hemaglutinante. Os controles do ensaio foram: o controle da integridade dos eritrócitos (50 µl da suspensão de eritrócitos humanos tipo A a 2% em NaCl 0,15 M mais 100 µl de salina 0,15 M) e controle da atividade hemaglutinante (50 µl da suspensão de eritrócitos humanos tipo A a 2% em NaCl 0,15 M, mais 50 µl de salina 0,15 M, mais 50 µl de amostra). Foram testados os seguintes açúcares: D-Sacarose, D-Lactose, D-Maltose, D-Manose, D-Galactose, D-Fructose, D-Glicose, N-Acetil-glicosamina.

5. RESULTADOS

5.1- Atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante do extrato bruto de *T. esculenta* foi avaliada utilizando-se suspensões de eritrócitos de diferentes grupos sanguíneos A,B,O,AB e de várias espécies de animais. O extrato bruto aglutina todos os tipos de eritrócitos em títulos variáveis e apresenta maior seletividade para os grupos sanguíneos A e AB (tabela III). Nos animais, a atividade hemaglutinante foi maior para rato e ovelha, embora também ocorra com eritrócitos de coelho e galinha e hamster.

TABELA III: Determinação da atividade hemaglutinante presente no extrato bruto de *T. esculenta*

Tipos de eritrócitos	Hemaglutinação (Título*)
Humano (Tipo A)	11
Humano (Tipo B)	5
Humano (Tipo AB)	10
Humano (Tipo O)	4
Coelho	3
Ovelha	6
Hamster	3
Rato	10
Galinha	4
Boi	1
Sapo	0

Por título hemaglutinante (*) entende-se o inverso da maior diluição que permite a observação de hemaglutinação visível. Foi utilizado extrato bruto na concentração de 1 mg/ml.

5.2- Cromatografia de exclusão molecular

Amostras de 400 mg de extrato bruto liofilizado foram solubilizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 contendo 0,1M de NaCl e aplicadas à coluna Sephadex G-100. A eluição foi feita com o mesmo tampão coletando-se 3,0 ml por tubo, com um fluxo de 35 ml/h. A atividade hemaglutinante foi detectada nas frações eluídas de número 50 a 75 (figura 4). A figura 4 inserida apresenta o perfil eletroforético da fração SII.

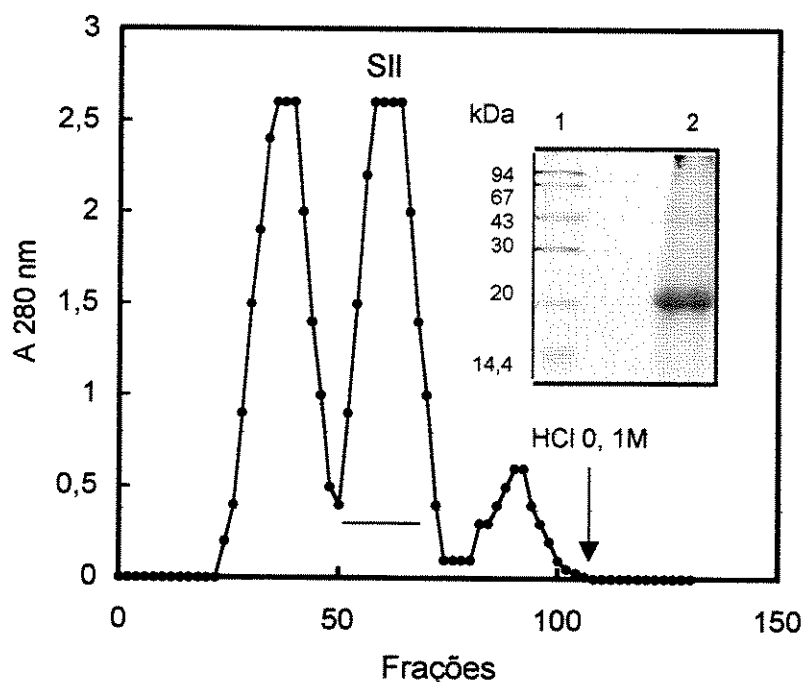


Figura 4 – Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G 100 do extrato bruto de sementes de *T. esculenta*. A coluna (2,5 x 60 cm) foi submetida a um fluxo de 35 ml/h, usando-se tampão fosfato 0,1M pH 7,6 contendo 100 mM de NaCl e foram coletadas frações de 3,0 ml por tubo. Atividade hemaglutinante do pico SII (—). Figura inserida: (1) Padrões de peso molecular; (2) SII.

5.3- Cromatografia de afinidade em coluna de quitina

A fração SII, oriunda da cromatografia de exclusão molecular, foi submetida a uma cromatografia de afinidade em coluna de quitina. Observou-se que todo material aplicado ficou retido mostrando uma grande afinidade deste pela matriz (figura 5). O pico eluído foi denominado TEL e o seu perfil eletroforético está apresentado na figura 5 inserida.

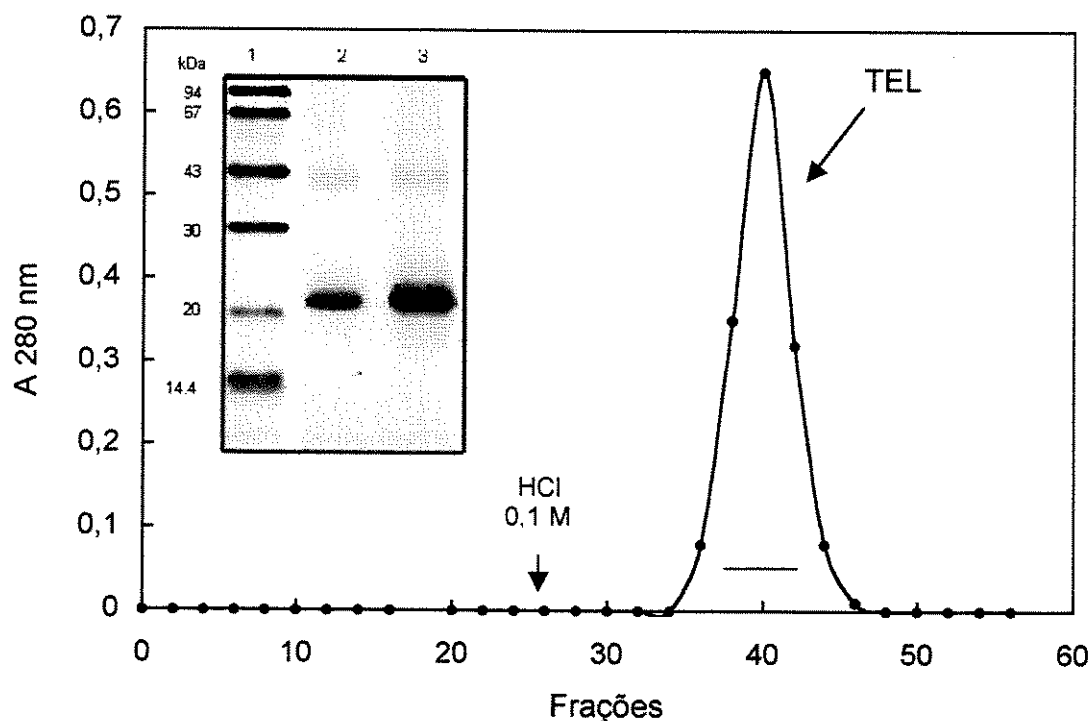


Figura 5- Cromatografia em coluna de quitina da fração SII oriunda de Sephadex G-100. A coluna (2,0 x 6,0 cm) foi submetida a um fluxo de 35 ml/h, eluída inicialmente com NaCl 0,15 M seguido de HCl 0,1 M; foram coletadas frações de 2,0 ml por tubo. (—) Atividade hemaglutinante. Figura inserida: (1) Padrões de peso molecular; (2) TEL; (3) TEL em presença de DTT.

5.4- Isolamento das isoformas de TEL

A fração obtida da cromatografia em coluna de quitina (figura 5) foi concentrada por liofilização e 10,0 mg desse material foi dissolvido em TFA 0,1%, pH 2,5 e logo após submetido a uma cromatografia de fase reversa em coluna μ -Bondapack C18 (3,9 x 300 mm). A cromatografia processou-se a 120 ml/hora num gradiente descontínuo de 0 a 100% de acetonitrila 80% já descrito anteriormente. O monitoramento deu-se a 280 nm, conforme mostra a figura 6.

O perfil cromatográfico representado na figura 6A revela quatro picos principais, sendo que o primeiro pico foi eluído com 37% de acetonitrila (TEL-I), o segundo (TEL-II), o terceiro (TEL-III) e o quarto (TEL-IV) picos foram eluídos com 46%, 48% e 51% de acetonitrila, respectivamente. Todos os picos apresentaram atividade hemaglutinante. Cada pico foi recolhido isoladamente e submetido a uma recromatografia nas mesmas condições e apresentada nas figuras 6B-E. Os picos foram eluídos aos 18, 34, 37 e 42 min, respectivamente.

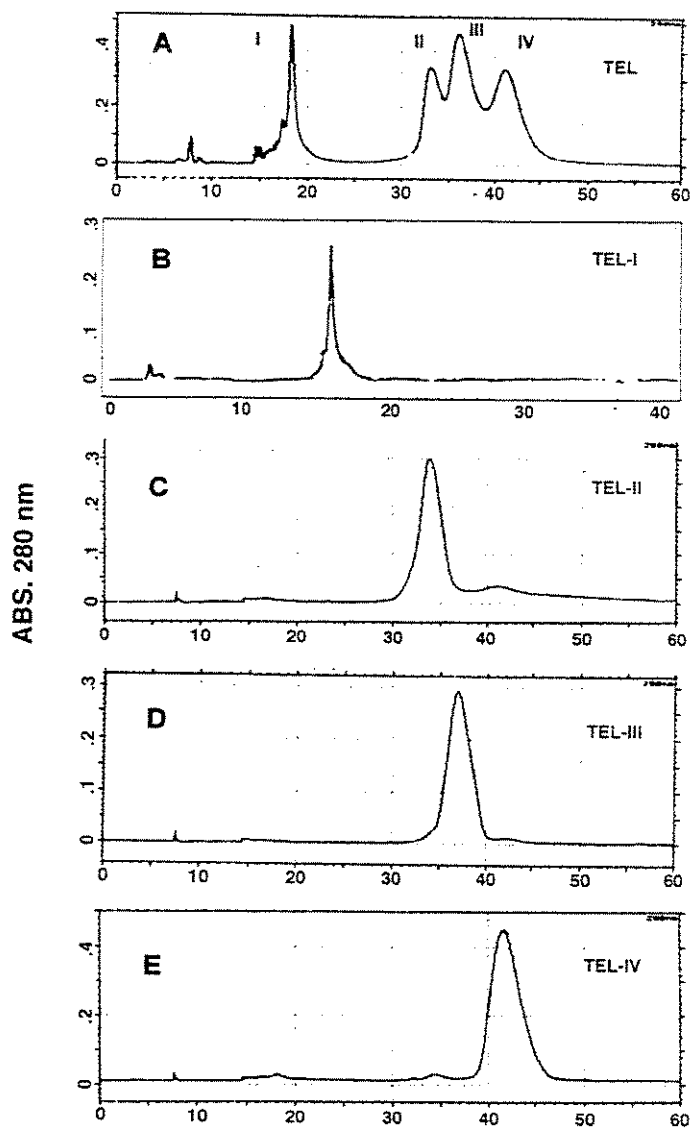


Figura 6 – Cromatografia de fase reversa utilizando coluna μ -Bondapack C18 (3,9 x 300 mm)/HPLC das isolectinas de TEL. A coluna foi equilibrada com TFA 0,1%(solvente A) e eluída com um gradiente descontínuo de 0 a 100% de acetonitrila 66% em TFA 0,1% (solvente B), num fluxo de 2ml/min. O monitoramento deu-se a 280 nm. (A) TEL; (B-E) recromatografias dos picos I a IV nas mesmas condições de A.

5.5- Eletroforese em gel de poliacrilamida ne presença de SDS

A figura 7 representa o perfil de massa molecular (PAGE-SDS 12,5%) mostrando as frações obtidas após as recromatografias dos picos de I a IV na coluna de fase reversa anteriormente descrita. Todos os picos obtidos apresentaram o mesmo perfil de migração, demonstrando a presença das subunidades de 20 e 40 kDa.

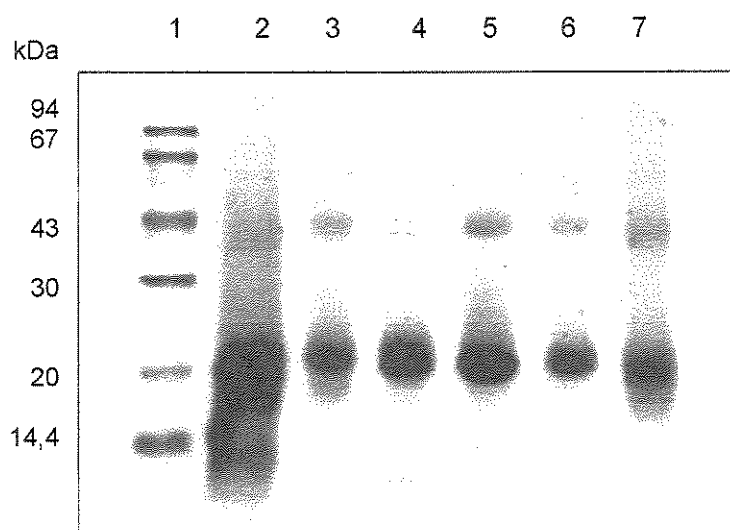
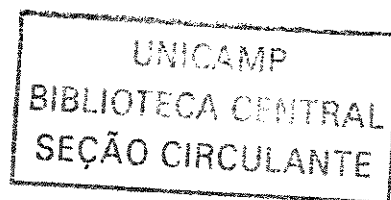


Figura 7: Eletroforese de TEL em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS. (1) Padrões de peso molecular; (2) extrato bruto; (3) TEL; (4) TEL-I; (5) TEL-II; (6) TEL-III; (7) TEL-IV.



5.6- Gel de eletroforese em duas dimensões de TEL e suas isoformas

Com o objetivo de determinar os pontos isoelétricos (pI) das proteínas obtidas na cromatografia de fase reversa/HPLC, as frações TEL I-IV foram aplicadas em eletroforese de duas dimensões.

As manchas principais foram focalizadas em pI 5,18-5,34 (figura 8 A,B,E) e pI 6,28-6,62 (figura 8 C,D) relativo à subunidade de 40 kDa. As manchas secundárias foram localizadas em pI 5,98 – 7,51 (figura 8 B,C,D), 5,18-5,34 (figura 8 A) e 5,34-7,51 (figura 8 E) relativo à subunidade de 20 kDa. A focalização isoelétrica indicou a presença de um grande número de pontos na faixa de pH 5,18-6,28 (subunidade de 40 kDa de TEL-I e TEL-IV) sugerindo a presença de cargas negativas nestas frações, e na faixa de pH 6,28-6,62 (subunidade de 40 kDa de TEL-II e TEL-III) indicando a presença de aminoácidos neutros.

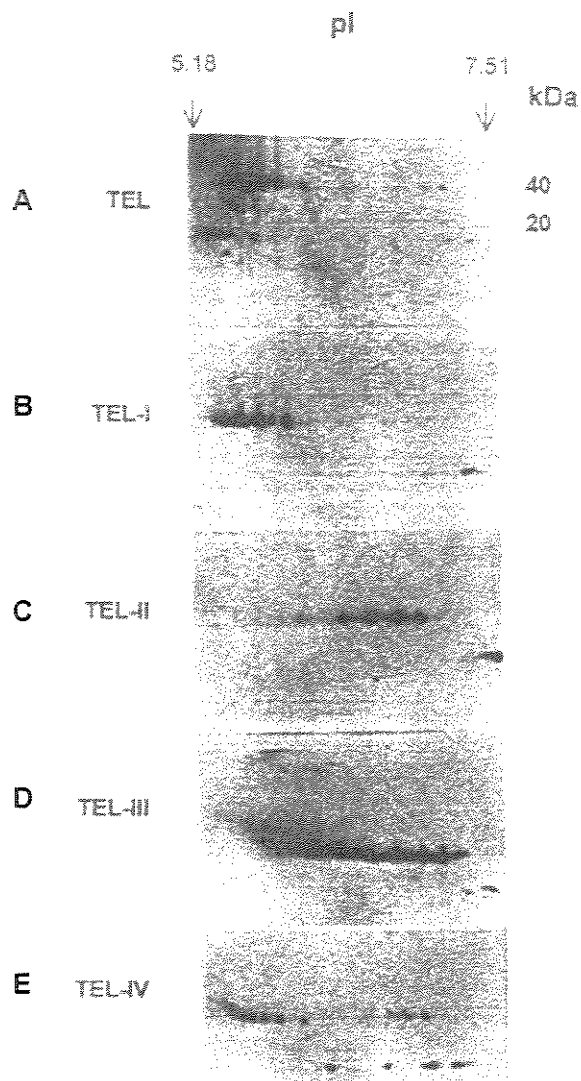


Figura 8- Eletroforese em duas dimensões das isolectinas de *T. esculenta* recromatografadas em HPLC/C₁₈ . Os componentes de TEL e de suas isoformas foram separados utilizando-se um gradiente de pH (3,0 a 10,0) na primeira dimensão e PAGE-SDS (12,5%) na segunda dimensão.

5.7- Análise por filtração em gel das proteínas

Para determinar a massa molecular aparente de TEL e suas isoformas, as proteínas foram analisadas por filtração em gel (Protein Pak 300 SW). A M_r de TEL e de suas isoformas foi de 20 e 40 kDa (figuras 9 e 10).

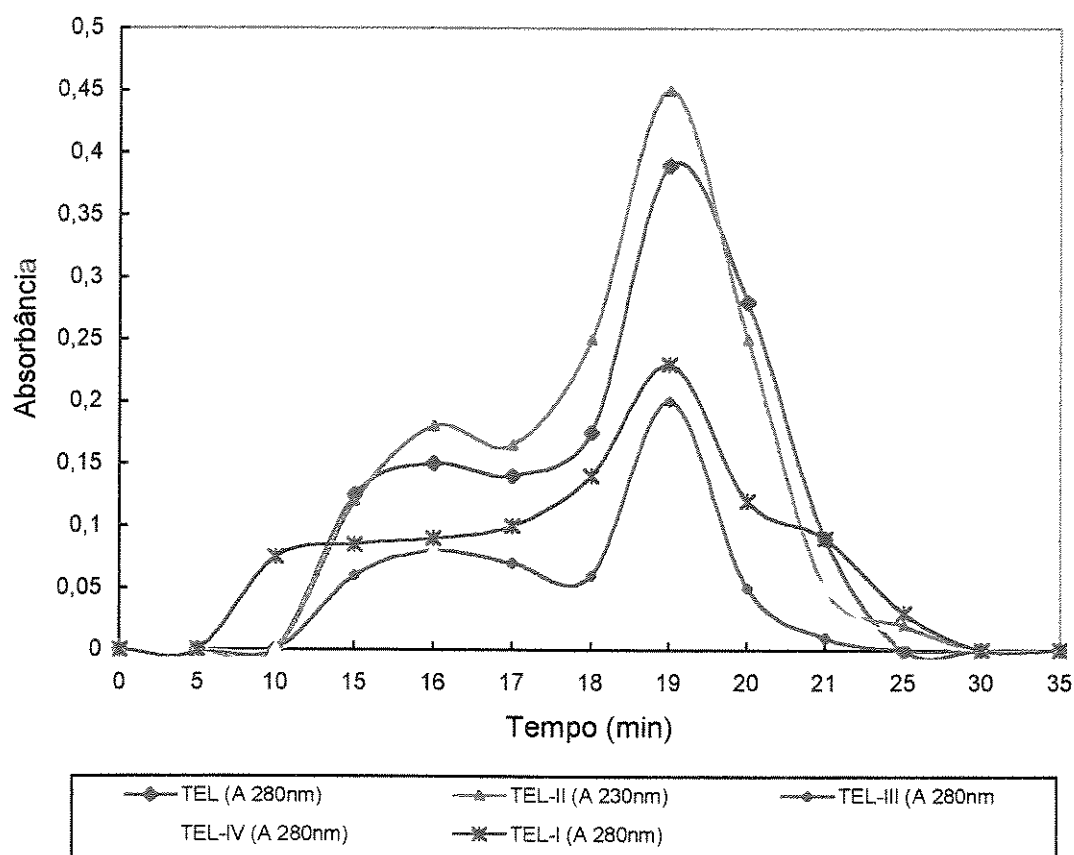


Figura 9- Perfil de TEL e suas isoformas em filtração em gel. A coluna Protein Pak 300 SW (7,8 x 300 mm) foi equilibrada com PBS 0,1 M, pH 7,4. Fluxo 0,3 ml/min.

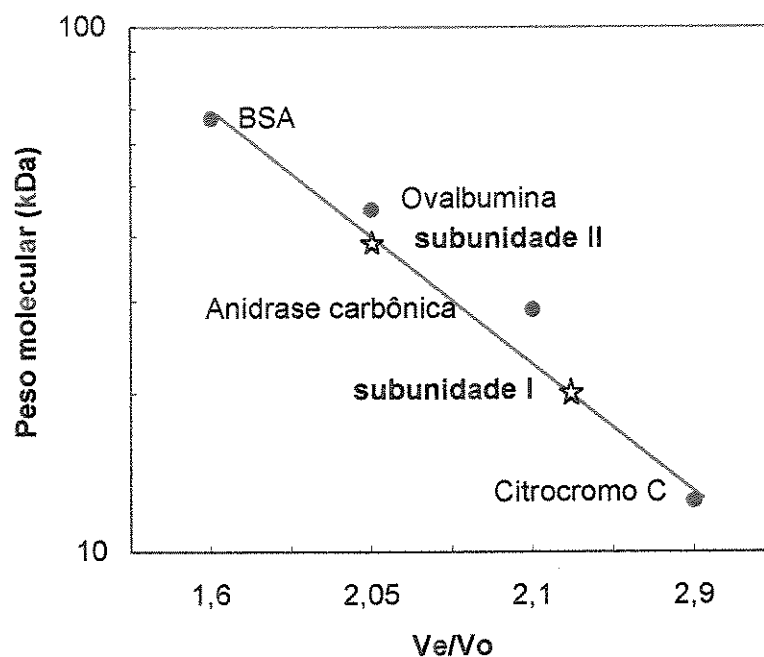


Figura 10- Determinação da massa molecular aparente de TEL e suas isoformas por filtração em gel. A coluna Protein Pak 300 SW (7,8 x 300 mm) foi equilibrada com PBS 0,1 M, pH 7,4. Fluxo 0,3 ml/min. Padrões de massa molecular: albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo c (12,5 kDa).

5.8- Dosagem de carboidratos totais de TEL e suas isoformas

O percentual de açúcar neutro de TEL e suas isoformas varia entre 12-18,8% (tabela IV).

Tabela IV- Dosagem de carboidratos totais de TEL e suas isoformas

Proteínas	Carboidratos totais (%)
TEL	18,8
TEL-I	12
TEL-II	17,4
TEL-III	18
TEL-IV	17,7

5.10- Composição de aminoácidos de TEL e suas isoformas

Os resultados da análise da composição de aminoácidos são apresentados na tabela V. A metodologia empregada não permitiu quantificar os resíduos de cisteína e triptofano. Esta análise deixa evidente que TEL e suas isoformas apresentam caráter bastante hidrofóbico, uma vez que cerca de 40 a 50% de seus aminoácidos são apolares.

Tabela V- Composição de aminoácidos de TEL e suas isoformas (%)

Aminoácido	TEL	TEL-I	TEL-II	TEL-III	TEL-IV
Asx	9,2	11,2	9,8	8,9	11,0
Glx	9,6	6,1	6,5	6,7	6,2
Ser	6,8	6,1	8,7	8,3	6,0
Gly	11,1	11,2	13,0	12,8	11,8
His	1,0	5,6	2,2	2,2	0,6
Arg	2,4	4,3	4,9	5,0	4,5
Thr	3,8	4,0	4,3	5,0	5,1
Ala	8,2	8,0	8,7	5,6	5,6
Pro	18,8	7,8	8,2	8,3	7,9
Tyr	2,4	5,0	3,8	4,4	5,1
Val	6,3	7,3	7,6	6,7	7,3
Met	4,8	1,7	1,6	2,8	1,7
Cys	0	0	0	0	0
Ile	3,4	4,5	4,9	5,0	5,1
Leu	5,8	6,0	6,5	7,2	8,5
Phe	3,0	5,1	4,9	5,6	6,8
Lys	3,4	6,1	4,4	5,6	6,8
Trp	ND	ND	ND	ND	ND

ND = não determinado

5.10- Determinação da sequência N-terminal das isoformas de TEL

As seqüências N-terminal das isoformas de TEL (tabela VI) apresentam um alto grau de homologia entre si, mas nenhuma homologia com outras lectinas, de acordo com a pesquisa realizada no banco de dados de proteínas NCBI-Blast.

Tabela VI- Comparação da sequência N-terminal de isolectinas de sementes de *Talisia esculenta*

Frações	Posição inicial	Seqüência
TEL	1	SEPLYDINGDEVTTTSXIYYI
TEL-I	2	SEPLYDING
TEL-II	2	SEPLYDINGDKVVTGXKEY
TEL-III	1	SEPLYDINGDESTTGXXYXX
TEL-IV	1	SEPLYDINGDEPNT

5.11- Estabilidade de TEL em relação ao pH

A lectina foi submetida a diferentes pHs (3 a 9), de acordo com o método descrito anteriormente. TEL mostrou-se estável numa ampla faixa de pH (3-9), apresentando um máximo de atividade hemaglutinante entre pH 7,0 e 8,0 (figura 11).

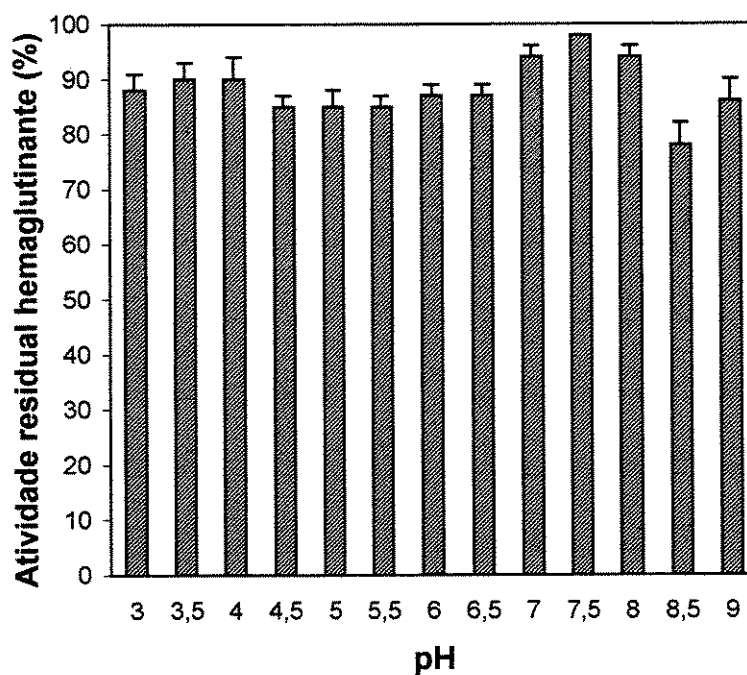


Figura 11- Efeito do pH na atividade hemaglutinante de TEL. A atividade hemaglutinante da lectina foi verificada após 30 minutos de incubação em tampões com diferentes pHs.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

5.12- Estabilidade térmica de TEL

O efeito das diferentes temperaturas na atividade hemaglutinante de TEL (figura 12) evidencia que esta lectina é bastante estável e somente a partir de 80°C houve decréscimo em cerca de 50% da atividade hemaglutinante.

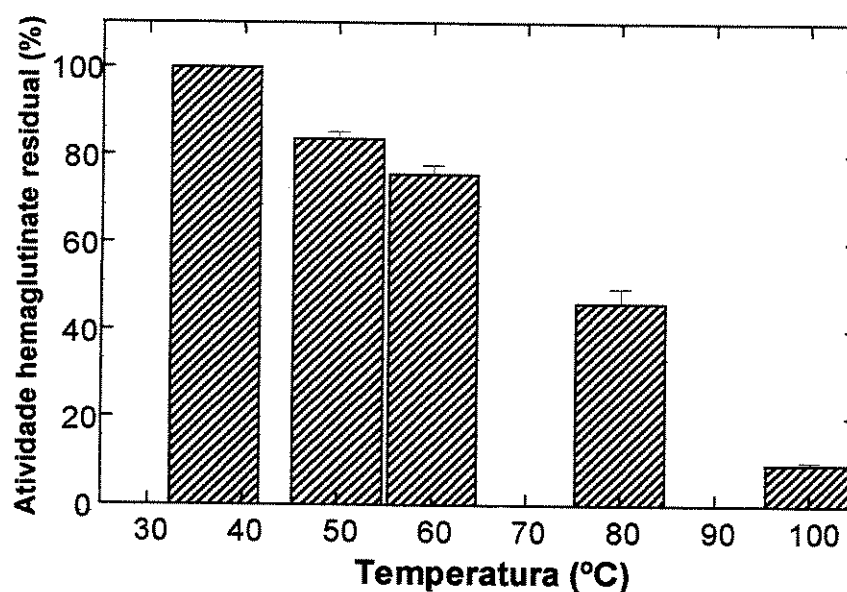


Figura 12- Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante de TEL. A atividade hemaglutinante foi determinada após 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas.

5.13- Efeito do EDTA na atividade hemaglutinante

Amostras de TEL submetidas a tratamento com EDTA 0,025 M mostraram considerável perda da atividade biológica mas a adição de Ca^{2+} (10 mM) restaurou totalmente a atividade hemaglutinante.

5.14- Efeito da enzima endoglicosidase H sobre as estruturas das lectinas de *T. esculenta*

Após digestão com endoglicosidase H, a fim de serem removidos glicanos N-ligados possivelmente presentes nas estruturas das proteínas, TEL e suas isoformas foram examinadas por PAGE-SDS (figura 13B). Comparadas com amostras não tratadas (figura 13A), a mobilidade eletroforética das cinco proteínas deglicosiladas foi a mesma.

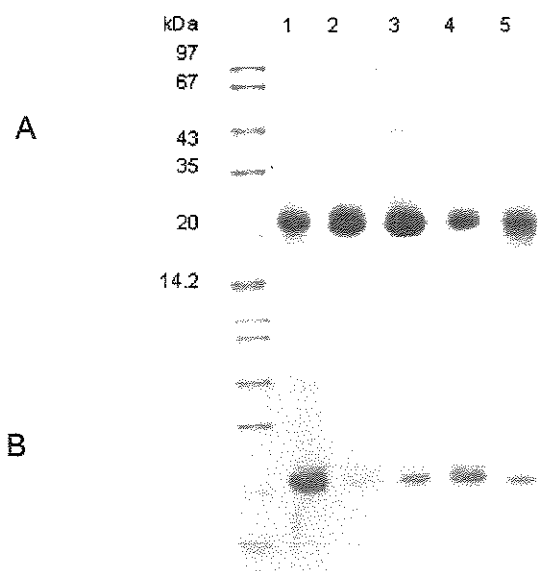


Figura 13- PAGE-SDS (12,5%) das isolectinas de TEL antes (A) e após (B) tratamento com endoglicosidase H.

5.15- Ação inibitória de carboidratos sobre a atividade hemaglutinante

A tabela VII mostra a atividade hemaglutinante de TEL e suas isoformas e o efeito da ação de vários carboidratos sobre esta atividade.

Os monossacarídeos que apresentaram maior efeito inibitório foram os seguintes: D-glicose para TEL-I e TEL-III; D-manose, D-glucose e N-acetil-glicosamina para TEL-II e D-manose para TEL-IV.

Tabela VII: Hemaglutinação e inibição da atividade hemaglutinante da lectina de *T. esculenta* e suas isoformas por carboidratos

Eritrócitos e Carboidratos	Hemaglutinação e Inibição por carboidratos (IC ₅₀)*				
	TEL	TEL-I	TEL-II	TEL-III	TEL-IV
Eritrócitos humanos (tipo A)	6	4	5	5	4
Eritrócitos de rato	10	1	2	1	1
D - Sacarose	> 100	12,5	12,5	12,5	12,5
D - Lactose	> 100	12,5	12,5	6,2	25
D - Maltose	12,5	12,5	50	12,5	12,5
D - Galactose	100	12,5	25	12,5	25
D - Manose	0,39	25	12,5	12,5	12,5
D - Frutose	25	12,5	25	12,5	25
D - Glicose	3,5	6,2	12,5	6,2	25
N-Acetil-glicosamina	6,2	12,5	12,5	12,5	50

*IC₅₀: concentração necessária para inibir 50% da atividade hemaglutinante (mM). Em cada ensaio foram utilizadas 25 µg das diferentes isolectinas.

6- DISCUSSÃO

A grande ocorrência, alta estabilidade térmica e, principalmente, propriedades bem definidas em ligação a carboidratos tornam as lectinas ferramentas importantes no campo da glicociência. As funções biológicas dessas proteínas são motivo de debate há décadas. Entretanto, para perceber a abrangência de suas funções biológicas é preciso entender a multiplicidade de interações nas quais as lectinas são capazes de engajar-se, tornando-as proteínas multifuncionais (Peumans & Van Damme, 1995). É improvável que já tenham sido investigados os possíveis papéis biológicos de todas as lectinas até hoje identificadas. É fato que a natureza emprega as lectinas de diferentes maneiras, dependendo do local onde se encontram, do tempo no qual elas se apresentam e das diferentes especificidades que exibem (Rüdiger, 1998).

Dois passos cromatográficos, filtração em gel (figura 4) e cromatografia de afinidade em coluna de quitina (figura 5) foram suficientes para purificar a lectina presente em sementes de *T. esculenta* (TEL). Esse processo de purificação também foi utilizado por Yamaguchi et al. (1996) para isolar a lectina-D de raízes de *Phytolacca americana*. O perfil eletroforético em SDS-PAGE das frações oriundas da Sephadex G-100 e da cromatografia de afinidade mostraram o mesmo comportamento (figura 4 e figura 5 inseridas). TEL consiste de duas subunidades de 20 e 40 kDa, ligadas não covalentemente, como mostra a eletroforese na presença de DTT (figura 5 inserida). Mostra-se estável entre os pHs 3,0 e 9,0 (figura 11), na faixa de temperatura entre 37^o e 60^o C (figura 12) e requer Ca⁺² para a sua atividade biológica. Comportamento semelhante foi observado para a lectina antifúngica isolada de *Gastrodia elata* (Xu et al., 1998).

A recromatografia de TEL em coluna de fase reversa, sistema HPLC, originou quatro isolectinas (TEL-I, II, III e IV) (figura 6). Tal método foi anteriormente utilizado por Eloumami et al. (1990) para purificar lectinas ligantes de heparina, isoladas de cérebro humano. A análise através de PAGE-SDS das quatro isoformas de TEL revelou a presença de duas subunidades com massas moleculares de 20 e 40 kDa, semelhantes as de TEL, característica marcante de isolectinas (figura 7). Este comportamento eletroforético foi confirmado por gel em duas dimensões (figura 8).

TEL apresentou várias manchas distribuídas entre pI 5,18 a 6,62 (40 kDa) e 5,18 a 7,51 (20 kDa). As isolectinas foram localizadas em dois pHs distintos, com valores ligeiramente mais ácidos que outros, devido a pequenas diferenças na composição de aminoácidos das mesmas. O pI de TEL-I e TEL-IV (5,18-6,28 para a subunidade de 40 kDa) apresentou-se ligeiramente mais alto que o pI de KM+, uma lectina isolada de *Artocarpus integrifolia* (4,0-5,2) (Santos-de-Oliveira et al., 1994), enquanto que o pI de TEL-II e TEL-III (6,28-6,62, subunidade de 40 kDa) foi semelhante ao encontrado para *Dioclea lehmanni* (6,55-6,60) (Pérez, 1998).

As massas moleculares aparentes (M_r) de TEL e suas isoformas, calculadas por filtração em gel, indicaram que as isolectinas foram eluídas com 40 kDa e 20 kDa o que sugere que todas as lectinas interagiram com a matriz cromatográfica (figura 9 e 10). A M_r das proteínas determinados na presença dos açúcares específicos (glicose e manose), foi de 40 kDa (dado não mostrado), o que sugere que esta lectina seja um dímero de 20 kDa. Resultados semelhantes foram relatados por Animashaun et al. (1994) que caracterizaram isolectinas de *Tetracarpidium conophorum* e por Wongkham et al. (1995) que estudaram isolectinas de sementes de *Artocarpus lakoocha*. Após deglicosilação com endoglicosidase H, não houve mudança na massa molecular das isolectinas mostradas por SDS-PAGE, o que sugere que a digestão efetuada por esta enzima foi inefetiva para a remoção da porção glicídica dessas moléculas (figura 13). Os percentuais de açúcar neutro de TEL e das quatro isoformas foram estimados aproximadamente entre 12 e 18% (tabela IV), valores mais altos que o determinado para a lectina de *Vatairea macrocarpa* (7,9%) (Cavada et al., 1998) e de *Araucaria brasiliensis* (6,3%) (Datta et al., 1993), semelhante ao da lectina isolada do látex de *Euphorbia characias* (11,3%) (Barbieri et al., 1983) e muito inferior àquele encontrado para a lectina de batata (52,3%) (Allen & Neuberger, 1973).

Wang et al. (1996) estudaram a influência dos carboidratos na estabilidade de cinco glicoproteínas (invertase de bactéria, fetuína bovina, glicoamilase de *Aspergillus niger*, ovotransferrina e avidina) e observaram que a deglicosilação diminuiu a estabilidade térmica dessas proteínas. Esses estudos sugerem que a porção glicídica de TEL e de suas isoformas possam contribuir para a estabilidade estrutural e, portanto, para a manutenção da atividade biológica, nos vários pHs e

temperaturas testadas. Estes resultados são compatíveis com algumas lectinas de plantas, como a lectina de *Saraca indica*, que é estável até 95°C (Ray & Chatterjee, 1995); a lectina de *Vatairea macrocarpa* (Cavada et al., 1998) que ainda mantém 55% de sua atividade após 5 minutos de exposição à 100°C; a lectina da casca de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul et al., 1998) estável até 80°C.

As quatro isoformas foram capazes de hemaglutinar eritrócitos humanos do tipo A bem como os de rato, em diferentes níveis (tabela VII). Observações similares foram feitas por Ooi et al., (2000), quando isolaram isolectinas manose-específicas a partir de folhas de *Narcissus tazetta* e estas apresentaram diferentes títulos hemaglutinantes. Essa observação sugere que pode haver diferenças funcionais bem como estruturais entre as isolectinas. Essa possibilidade também foi discutida por Pratt et al. (1990) para lectinas isoladas de feijão. A atividade hemaglutinante das isoformas foi inibida por diferentes carboidratos (tabela VII) podendo indicar que estas proteínas apresentem diferentes domínios de reconhecimento para carboidratos, como também já foi visto por Anismashaum et al. (1994). Os aminoácidos que compõem essas proteínas podem influenciar as interações lectina-receptor e as suas subsequentes bioatividades.

A composição de aminoácidos de TEL e de suas isoformas (tabela V) revelou o caráter hidrofóbico desta proteína. Além disso, pode-se observar que estas proteínas apresentam um alto conteúdo de Asp/Asn ou Glu/Gln e que são ricas em prolina, serina, glicina e alanina. Essa composição é similar à da lectina isolada de *Solanum tuberosum* (Allen & Neuberger, 1973). Dados semelhantes podem ser observados para TEL (pI 5,18 a 6,62 - 40 kDa e 5,18 a 7,51 - 20 kDa) quando comparados com a lectina isolada de sementes de *Dioclea lehmanni* (Fabaceae), pI 6,55-6,60, que apresenta ao mesmo tempo caráter hidrofóbico e alto conteúdo de aminoácidos ácidos, além da ausência de cisteína (Pérez, G., 1998). Os resíduos de metionina, histidina e arginina entretanto são minoritários como descrito por Kang et al. (1990), quando estudaram a lectina de *Crotalaria striata*. Asparagina e glutamina bem como triptofano não foram detectados pois são susceptíveis à hidrólise ácida. As proteínas não apresentaram resíduos de cisteína, fato já observado por Khang et al. (1990), que relataram que a ausência de cisteína é uma característica de lectinas de leguminosas, do mesmo modo que baixas ou nulas concentrações de metionina e

histidina são comuns nas proteínas de origem vegetal (Kortt & Caldwell, 1990). Ao caracterizarem a lectina de *Galanthus nivalis*, Van Damme et al. (1987) observaram alto conteúdo de asparagina/ácido aspártico, glicina, serina e leucina, mas nenhum resíduo de metionina. A determinação da sequência N-terminal das isoformas de TEL (tabela VI) mostra um alto grau de homologia entre as proteínas, mas nenhuma homologia com outras lectinas de plantas até hoje relacionadas no banco de dados (NCBI-Blast). TEL apresenta sequência similar com proteínas de reserva como SPRB e SPR1, precursores de sporamina A e B de batata doce (Hattori et al., 1997); MIR, que são glicoproteínas presentes em batatas (Sarroch et al., 1989); ASP, precursor de uma proteína de 21 kDa presente em sementes de *Theobroma cacao* (Tai et al., 1991); KPI, um inibidor de Kunitz presente em sementes de *Psophocarpus tetragonolobus* (Manen et al., 1991) e RAGI, um inibidor de alfa-amilase e subtilisina de *Oryza sativa* (Ohtsubo & Richardson, 1992). A homologia que ocorre entre proteínas de reserva e inibidores de tripsina já foi observada anteriormente. Tai et al. (1991) compararam a sequência obtida para a proteína de reserva de 21 kDa de sementes de cacau com a sporamina B e com o inibidor de alfa-amilase e subtilisina de cevada, e observaram 28% de identidade entre eles, apesar de que tanto a sporamina quanto a proteína de 21 kDa de cacau não terem apresentado atividade anti-trípica. Sarroch et al. (1989), ao estudarem uma glicoproteína básica denominada de miraculina, presente em *Richadella dulcifica*, um arbusto do oeste da África, constataram que esta não apresentava homologia com outras proteínas modificadoras de sabor tais como taumatina e monelina. Entretanto, exibia 36,3% de homologia com inibidores A e C do tipo Kunitz. Recentemente, Wang & Ng (2001) mostraram uma nova lectina isolada de raízes de *Pseudostellaria heterophylla*, cuja sequência N-terminal é similar ao inibidor de Kunitz presente em sementes de soja.

7- CONCLUSÕES

- A lectina presente em sementes de *Talisia esculenta* é uma glicoproteína com 18,8% de carboidratos totais, dependente de íons Ca^{+2} para exercer sua atividade hemaglutinante;
- É uma lectina estável numa ampla faixa de pH (3-9) e de temperatura (37° - 60°C);
- A proteína não mostra especificidade para eritrócitos humanos sendo inibida preferencialmente por D-manose, D-glicose e N-acetilglicosamina;
- Apresenta quatro isoformas, todas constituídas de duas cadeias polipeptídicas (20 e 40 kDa), ligadas não covalentemente;
- O pI das isoformas TEL-I e TEL-IV varia de 5,18-6,28 (subunidade de 40 kDa) enquanto que para TEL-II e TEL-III fica na faixa de 6,28-6,62 (subunidade de 40 kDa).
- A análise da composição global de aminoácidos revela que a proteína e suas isoformas apresentam cerca de 40 a 50% de aminoácidos hidrofóbicos;
- A sequência N-terminal de TEL apresenta homologia com as proteínas de reserva SPRB e SPR1 (precursores de sporamina A e B de batata-doce); MIR (glicoproteínas presentes em batatas); ASP (precursor de uma proteína de 21 kDa presente em sementes de *Theobroma cacao*); KPI (inibidor de Kunitz presente em sementes de *Psophocarpus tetragonolobus*) e RAGI (inibidor de alfa-amilase e subtilisina de *Oryza sativa*).

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Animashaun, T., Togun, R. A., Hughes, R.C., 1994. Characterization of isolectins in *Tetracarpidium-conophorum* seeds (Nigerian walnut). *Glycoconjugate J.* 11, 299-303.
- Allen, A. K., Desai, N. N., Neuberger, A., 1976. Purification of glycoprotein lectin from broad bean (*Vicia faba*) and a comparison of its properties with lectins of similar specificity. *Biochem. J.* 155, 127-135.
- Baba, K., Ogawa, M., Nagano, A., Kuroda, H., Sumiya, K., 1991. Development changes in the bark lectins of *Sophora japonica*. *Planta* 181, 462-470.
- Banerjee, R., Das, K., Ravishankar, R., Suguna, K., Suroliya, A., Vijayan, M., 1996. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. *J. Mol. Biol.* 259, 281-296.
- Barbieri, L., Falasca, A., Franceschi, C., Licastro, F., Rossi, C.A., Stirpe, F., 1983. Purification and properties of 2 lectins from the latex of the Euphorbiaceae plants *Hura crepitans* (sand-box tree) and *Euphorbia characias* L (Mediterranean spurge). *Biochem. J.* 215, 433-439.
- Beintema, J.J., 1994. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.* 350, 159-163.
- Benjamin, C. F., Figueiredo, R. C.; Henriques, M. G. M. O. and Barja-Fidalgo, C., 1997. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 873-881.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Broekaert, W. F., Peumans, W. J., 1996. Lectin release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. In: TC Bog-Hansen, e Van Driessche, eds, *Lectins, Biology, biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol 5. Walter de Gruyter, Berlin, pp 57-65.
- Broekaert, W.F., Parijs, J.V., Leyns, F., Joos, H., Peumans, W.J., 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties, *Science* 245, 1100-1102.

- Brooks, A.S.; Leathem, A.J.C., Schumacher, U. L., 1997. An Introduction of the field
In: Brooks, A.S.; Leathem, A.J.C., Schumacher, U. L (Eds). *Lectin Histochemistry: a concise practical handbook*. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK pp. 1-17.
- Carrington, D.M., Auffret, A., Hanke, D.E., 1985. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of Concanavalin A. *Nature*, 313, 64-67.
- Cavada, B. S., Santos, C. F., Granjeiro, T. B., Nunes, E. P., Sales, P. V. P., Ramos, R. L., De Souza, F. A. M., Crisostomo, C. V., Calvete, J. J., 1998. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*. 49, 675-680.
- Datta, P.K., Figueroa, M.O.R., Lajolo, F.M., 1993. Chemical modification and sugar binding-properties of 2 major lectins from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1851-1855.
- Delbaere, L.T.J., Vandonselaar, M., Prasad, L., Quail, J.W., Wilson, K.S., Dauter, Z., 1993. Structures of the lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b human blood group determinant at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 230, 950-965.
- Dessen, A., Gupta, D., Sabesan, S., Brewer, C.F., Sacchettini, J.C., 1995. X-ray crystal structure of soybean agglutinin cross-linked with a biantennary analog of blood group I carbohydrate antigen. *Biochemistry*, 34, 4933-4942.
- Dubois, M., Giles, K. A., Hamilton, J. K. and Rebers, P. A., 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28: 350-6.
- Eloumani, H., Bladier, D., Caruelle, D., Courty, J., Joubert, R., Caron, M., 1990. *Int. J. Biochem.* 22, 539-544.
- Etzler ME, Borrebaeck, C., 1980. Carbohydrate binding activity of a lectin-like glycoprotein from stem and leaves of *Dolichos biflorus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:92-97.
- Felsted, R.L., Leavitt, R.D., Chen, C., Bachur, N.R., Dale, R.M.K., 1981. Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochim. Biophys. Acta.* 668, 132-140.
- Gatehouse, A.M.R., Barbieri, L., Stirpe, F., Croy, R.R.D., 1990. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development – differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 54, 43-51.

- Goldstein, I.J., Hollerma, C.E., Smith, E.E., 1965. Protein-carbohydrate interaction 2. Inhibition studies on interaction of concanavalin A with polysaccharides. *Biochemistry* 4, 876-880.
- Hackman R.H., Goldberg M., 1964. New substrates for use with chitinases, *Anal. Biochem.*, 8, 397-401.
- Hammarström, S., Kabat, E. A., 1969. Purification and characterization of a blood-group a reactive hemagglutinin from snail helix pomatia and a study of its combining site. *Biochemistry* 8, 2696-2705.
- Hamelryck, T.W., Dao-Thi, M., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyny, L., Loris, R., 1996. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J. Biol. Chem.* 271, 20479-20485.
- Hayes, C. E., Goldstein, J. J., 1974. Alpha-D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea-Simplicifolia* seeds – isolation by affinity chromatography and characterization. *J. Biol. Chem.* 249, 1904-1914.
- Hattori, T., Yoshida, N., Nakamura, K., 1997. Structural relationship among the members of a multigene family coding for sweet potato tuberous root storage protein. *Plant. Mol. Biol.* 13: 563-572.
- Khang, N. Q., Jean-Luc G., Johan, H., 1990. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochim. Biophys. Acta* 1033, 210-213.
- Kennedy, J. F., Palva, P.M.G., Corella, M.T.S., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., 1995. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polym.* 26, 219-230.
- Kojima, K., Matsu-Ura, Y., Ogawa, H., Seng, N., Matsumoto, I., 1994. Detection of a lectin activity in plant bark extracts: solid phase assay involving horseradish peroxidase-conjugated glycoproteins. *Plant Physiol. Biochem.* 32, 217-224.
- Kortt, A. A., Caldwell, J.B., 1990. Low molecular weight albumins from sunflower seeds: identification of a methionine rich albumin. *Phytochemistry* 9, 2805-2810.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lin, T. T. -S., Li, S. S. -L., 1980. Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. *Eur. J. Biochem.* 105, 453-459.

- Lis, H., Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.*, 98, 637-674.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L., 1998. Legume lectins structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1383, 9-36.
- Lorenzi, H., 1992. Árvores Brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Harri Lorenzi (Ed.), Editora Plantarum LTDA, 1, 322.
- Machuka, J. S., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Jackai, L. E. N., 1999. Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. *Entomol. Exp. Appl.* 93: 179-187.
- Makela, O., 1957. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. *Ann. Med. Exp. Biol.*, 35, 1-156.
- Manen, J.F., Simon, P., Van Slooten, J.C., Osteras, M., Frutiger, S., Hughes, G.J., 1991. A nodulin specifically expressed in senescent nodules of winged bean is a protease inhibitor. *Plant Cell* 3: 259-270.
- Mansfield, M.A., Peumans, W.J., Raikhel, N.V., 1988. Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosylated precursor. *Planta* 173, 482-489.
- Millar, D.J., Allen, A.K., Smith, C.G., 1992. Chitin-binding proteins in potato (*Solanum tuberosum*) tuber. Characterization, immunolocalization and effects of wounding. *Biochem. J.* 283: 813-21.
- Murdock, L. L., Huesing, J. E., Nielsen, S. S., Pratt, R. C, Shade, R. E., 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. *Phytochemistry* 29: 85-89.
- Ooi, L.S.M., Ng, T.B., Sun, S.S.M., Ooi, V.E.C., 2000. Mannose-specific isolectins with different hemagglutinating potencies isolated from Chinese daffodil (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) leaves. *J. Protein Chem.* 19, 163-168.
- Ohtsubo, K. I., Richardson, M., 1992. The amino acid sequence of a 20 kDa bifunctional subtilisin/alpha-amylase inhibitor from bran of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. *FEBS Lett.* 309: 68-72.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., 1995. The role of lectins in plant defence. *Histochem. J.* 27: 253-271.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1996. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends Food Sci.Tecnol.* 7, 132-138.
- Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M., 1998. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15:199-229,1998

- Peumans, W.J., Winter, H., C. Bemer, V., Van Leuven, F., Goldstein, I.J., Truffa-Bachi, P., Van Damme, E.J.M., 1997. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. *Glycoconjugate J.*, 14, 259-265.
- Pérez, G., 1998. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 843-853.
- Powell, K.S., Gatehouse, A M.R., Hilder, V. A, Gatehouse, J.A., 1995. Antifeedant effects of plant lectins and na enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Entomol. Exp. Appl.* 75, 51-59.
- Pratt, R.C., Singh, N.K., Shade, R.E., Murdock, L.L., Bressan, R.A., 1990. Isolation and partial characterization of a seed from terapy bean that delays bruchid beetle development. *Plant Physiol.* 93, 1453-1459.
- Ramos, M. V., Mota, D. M., Teixeira, C. R., Cavada, B. S. and Moreira, R. A., 1998. Isolation and partial characterization of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. *Toxícon* 36: 477-489.
- Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M., 2001. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. *Plant Scie.* 160: 739-744.
- Ray, S., Chatterjee, B. P., 1995. Saracin: A lectin from *Saraca indica* seed integument recognizes complex carbohydrates. *Phytochemistry* 40, 643-649.
- Read, S. M., Northeote, D. H., 1983. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). *Eur. J. Biochem.* 134, 561-569.
- Rinderle, S. J., Goldstein, I. J., Matta, K. L., Ratcliffe, R. M., 1989. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. *J. Biol. Chem.* 264, 16123-16131.
- Rougé, P., Cavada, B. S., 1984. Isolation and partial characterization of two isolectins from *Lathyrus ochus* L. (DC). *Plant Sci Lett.* 32, 21-27.
- Rüdiger, H., 1998. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* 161, 130-152.
- Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M.O., Beltramini, L.M., Roque-Barreira, M.C. ,1994. *J. Immunol.* 22, 1798-1807.
- Sarroch, T., Hitotsuya, H., Nakajo, S., Nakaya, K., Nakamura, Y., Kurihara, Y.,1989. Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying protein, miraculin. *J. Biol. Chem.* 264, 6655-6659.

- Sharon, N., Lis, H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246, 227-234.
- Stillmark, H., 1888. Über ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceae. Inaugural Dissertation Dorpat, Tartu.
- So, L.L., Goldstein, I.J., 1967. Protein-carbohydrate interaction.9. Application of quantitative hapten inhibition technique to polysaccharide-concanavalin A interaction. Some comments on forces involved in concanavalin A-polysaccharide interaction. *J. Immunol.* , 158-162.
- Tai, H., McHenry, L., Fritz, P.J., Furtek, D.B., 1991. Nucleic acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. *Plant. Mol. Biol.* 16, 913-915.
- Triguerós, V., Wang, M., Pére, D., Paquereau, L., Chavant, L. and Fournier, D., 2000. Modulation of a lectin insecticidal activity by carbohydrates. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 45, 175-179.
- Van Damme, E. J. M., Allen, A. K. and Peumans, W. J., 1987. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Lett.* 215, 140-144.
- Van Damme, E. J. M., Briké, F., Winter, H.C., Van Leuven, F., Goldstein, I.J., Peumans, W. J., 1996. Molecular cloning of two different manose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur. J. Biochem.* 236,419-427.
- Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Barre, A., Rougé, P., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Plant Sci.* 17, 575-692.
- Van Parijs, J., Broekaert, W. F., Goldstein, I.J., Peumans, W.J., 1991. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* 183, 258-262.
- Waljuno, K. Scholma, R. A., Beintema, J. Mariono, A., Hahn, A. N., 1975. Amino acid sequence of hevein. *Proc. Int. Rubber Conf. Kuala Lumpur* 2, 518-531.
- Wang, C., Eufemi, M., Turano, C., Giartosio, A., 1996. Influence of carbohydrate moiety on the stability of glycoprotein. *Biochemistry* 35, 7299-7307.
- Wang, M. B., Boulter, D., Gatehouse, J. A., 1994. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*. *Plant Mol. Biol.* 24, 159-170.
- Wang, H.X., Ng, T.B., 2001. A novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots with sequence similarity to Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. *Life Sci*, 69, 327-333.

- Weis, W.I., Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 65, 441-473.
- Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul, D., Chanchai, S., 1998. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*, 47(2), 183-187.
- Wongkham, S., Wongkham, C., Boonsiri, P., Simasathiansophon, S., Trisonthi, C., Atisook, K., 1995. Isolectins from seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Phytochemistry* 40, 1331-1334
- Yamaguchi K., Mori A., Funatsu G., 1996. Amino acid sequence and some properties of lectin-D from roots of pokeweed (*Phytolacca americana*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1380-1382.
- Xu Q., Liu Y., Wang X., Gu H., Chen Z., 1998. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, *Plant Physiol. Biochem.* 36, 899-905.

CAPÍTULO II

O PAPEL DA LECTINA DE SEMENTES DE *Talisia esculenta* NA DEFESA DE PLANTAS AO ATAQUE DE FUNGOS, BACTÉRIAS E INSETOS

I- INTRODUÇÃO

As lectinas são as únicas proteínas de plantas com capacidade de reconhecer e ligar-se a glicoconjugados presentes na superfície externa de microorganismos, como bactérias e fungos ou glicoconjugados expostos ao longo do trato intestinal de insetos fitófagos. São diversos os glicanos reconhecidos pelas lectinas. Podem ser homopolímeros compostos de monossacarídeos, como a quitina presente na parede celular dos fungos, ou complexos oligossacarídeos, presentes nas mucinas estomacais e intestinais. A preferência das lectinas vegetais para a ligação com carboidratos não encontrados em plantas e a alta afinidade por glicoproteínas animais são determinantes para os vários papéis biológicos que estas proteínas possam desempenhar (Peumans & Van Damme, 1995 a).

1.1- Caracterização do problema de armazenagem de grãos

Os insetos constituem a espécie mais diversificada de animais. Excetuando-se o oceano aberto, estes podem ser encontrados em todos os habitats: pântanos, selvas, desertos e até mesmo em ambientes altamente estéreis como poços de petróleo (Imms, 1964). São, sem dúvida alguma, a forma mais adaptável de vida. Mbata (1994) mostrou que menos de 0,5% do número total de espécies de insetos conhecidos são considerados pragas, e só alguns destes podem ser uma ameaça séria às pessoas. Entretanto, Gallo et al. (2002) afirmou que este percentual pode chegar a 10%. O termo "inseto praga" foi definido por Williams (1947) como qualquer inseto no lugar errado. Dependendo da estrutura do ecossistema em uma determinada área e do ponto de visão do homem, um certo inseto pode ou não ser considerado uma praga.

Insetos herbívoros são os responsáveis por destruir um quinto da colheita total de grãos do mundo, anualmente. A principal causa do surgimento das pragas é a interferência desordenada do homem na natureza, criando agro-ecossistemas onde são seleccionadas grandes colheitas de alto rendimento e valor nutritivo, reunidas numa área limitada, o que provê ao mesmo tempo um ambiente altamente benéfico

ao ataque de insetos. Na tentativa de selecionar colheitas satisfatórias para o consumo humano são também selecionadas plantas altamente suscetíveis à infestações por insetos. Muitas colheitas que foram desenvolvidas durante os últimos 30 anos produziram altos rendimentos no campo, mas, apresentaram também poucas características de armazenamento (Kerin, 1994).

Os grãos são armazenados por períodos variados de tempo, que dependem da demanda de mercado, tamanho da produção e das necessidades do produtor. O armazenamento é a operação pós-colheita mais importante e crítica. A deterioração da qualidade do grão durante o armazenamento pode ser devida às condições impróprias de estocagem, que conduzem à contaminação por fungos ou infestação por insetos, sendo que o primeiro local de infestação é o campo.

Alguns insetos alimentam-se do endosperma, o que causa perda de peso e qualidade da semente, enquanto outros atacam o gérmen, resultando na diminuição da capacidade de germinação da semente, tornando-a menos viável (Santos et al., 1990). Assim, devido aos danos causados por insetos, os grãos perdem valor para comercialização, consumo e plantio. Além do consumo direto dos grãos, os insetos contaminam o ambiente com produtos de excreção, de mastigação e com a própria presença tornando o produto comercialmente indesejável. Os danos causados pelos insetos oferecem condições favoráveis à infecção por bactérias e fungos (Dunkel et al., 1982). A presença de insetos também aumenta a temperatura do produto, devido a sua alimentação, o que resulta em "manchas" quentes. Estas manchas concentram a umidade dentro do produto, acarretando a deterioração da semente e estimulando a atividade fúngica. Mbata (1994) mostrou que infestações de *Vigna subterranea* com *Callosobruchus maculatus* reduziram a viabilidade das sementes e aumentaram os níveis de ácidos graxos livres e peróxidos, que são índices usados para medir a deterioração bioquímica.

1.2- Principais pragas de grãos armazenados

Dois grupos principais de insetos pós-colheita são economicamente importantes: Coleoptera (besouros) e Lepidoptera (traças). Várias espécies de coleópteros e lepidópteros destroem sementes no campo e quando estocadas. Os danos de colheita causados por lepidópteros só acontecem por larvas. Várias dessas emaranham a alimentação com uma secreção sedosa construindo grandes quantidades de casulos. Nos casos de coleópteros, larvas e adultos freqüentemente alimentam-se na colheita e as duas fases são responsáveis pelo dano.

A ordem Coleoptera é a maior ordem de insetos e nela se concentram as pragas de produto armazenadas mais comuns e importantes. Nesta ordem estão inclusos os besouros *Zabrotes subfasciatus*, inseto cosmopolita geralmente restrito a feijões secos (*P. vulgaris*) e *Callosobruchus* spp., geralmente restritos a outros grãos, especialmente caupi e feijão mungo (*Vigna* spp).

C. maculatus (Fabricius) é uma peste importante que ataca principalmente feijões de várias espécies do gênero *Vigna*, principalmente caupi (Lienard & Seck, 1994). Esta espécie originou-se na África, mas é encontrada agora nas regiões tropicais e sub-tropicais. Os adultos medem de 2-4 mm, são de cor castanha com manchas pretas e têm um tempo de vida pequeno, de cerca de 12 dias, não se alimentando neste período. Foram identificadas duas formas desta espécie; a ativa (voadora) e a forma incapaz de voar. A forma voadora dispersa e coloniza campos de caupi. Fêmeas de adulto põem aproximadamente 100 ovos na superfície de sementes ou de vagens de leguminosas. As larvas escavam dentro da semente onde o desenvolvimento inteiro acontece. Esta espécie causa problemas principalmente na Nigéria, onde a maioria do caupi da África é produzida (Van Alebeek et al., 1996), e no nordeste brasileiro (figuras 1 A,B).

Quase 80% das colheitas de grãos produzidos por pequenos produtores são armazenadas na mesma propriedade (Wongo, 1996). Devido às estruturas pobres de armazenamento, são severas as perdas na qualidade e quantidade de grãos armazenados anualmente. Na África Ocidental, até 100% de danos no caupi pode ocorrer em alguns meses de armazenamento, devido à infestação de *C. maculatus* (Lienard & Seck, 1994). Níveis altos de perdas continuam acontecendo devido a

técnicas atrasadas de beneficiamento, limpeza, secagem e armazenamento. Levantamentos recentes realizados no Brasil indicam que as pragas e patógenos podem ser responsáveis por perdas na ordem de 2,2 bilhões de dólares anuais para as principais culturas brasileiras (Bento, 1999).

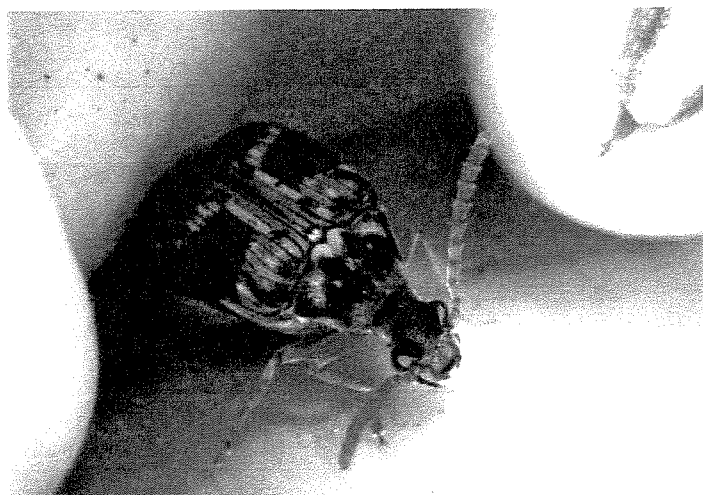
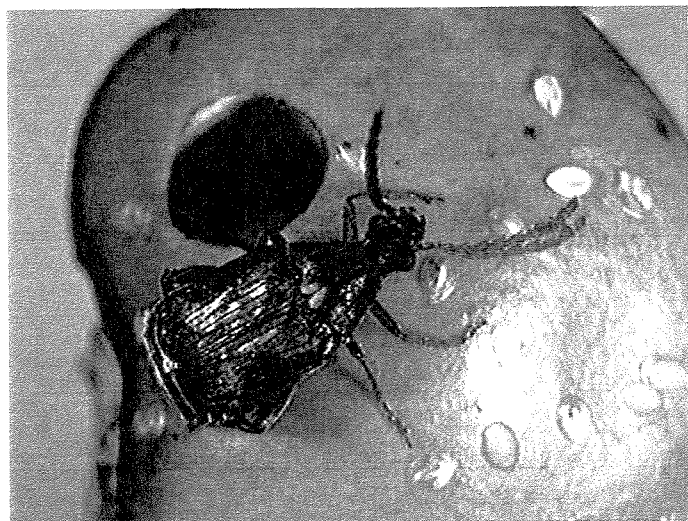


Figura 1: *Callosobruchus maculatus* sobre grãos de feijão *Vigna unguiculata*
(A- foto P.C. Strikis, B- foto Negri)

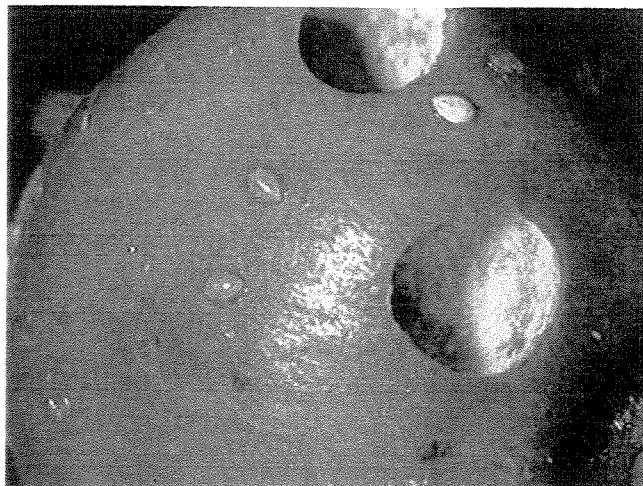


Figura 2: Ovos de *C. maculatus* sobre grãos de feijão *Vigna unguiculata* e galerias produzidas pelos insetos (foto: P.C. Strikis)

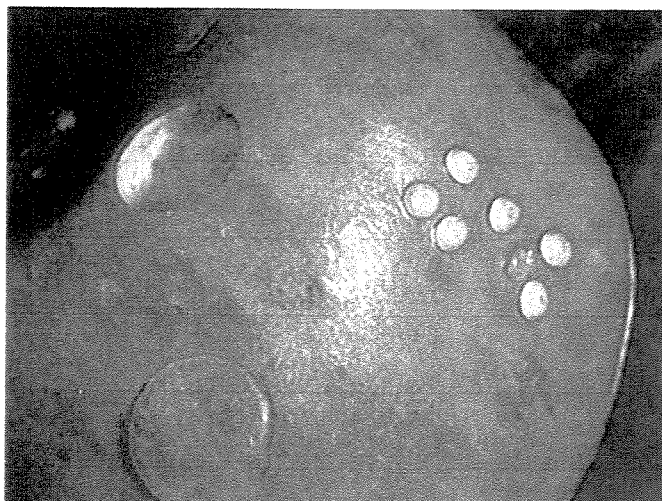


Figura 3: Ovos de *Z. subfasciatus* sobre grãos de feijão *Phaseolus vulgaris* e danos causados nos grãos pelos insetos (foto: P.C. Strikis)

O centro de origem de *Z. subfasciatus* é a América Central e do Sul, expandindo-se daí para todo o mundo. Sua ocorrência em *Phaseolus vulgaris* L. é comum na África, sudeste asiático, Índia e Europa (Ferreira, 1960). No Brasil, está presente em todos os estados produtores de feijão, sendo encontrado principalmente nos Estados da Bahia, Amazonas, Espírito Santo, Pará, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo (Silva et al., 1968). Este bruquídeo apresenta, na fase adulta, 1,8 a 2,5 mm de comprimento e de 1,4 a 1,8 mm de largura e tem coloração castanho-escuro com manchas claras. O dimorfismo sexual é bem nítido, permitindo a separação dos sexos. As fêmeas são maiores que os machos, além de apresentarem uma mancha clara triangular na parte posterior da cabeça (Ferreira, 1960). O ciclo biológico dura cerca de 25 dias a 32,5° C e 70% de U.R.

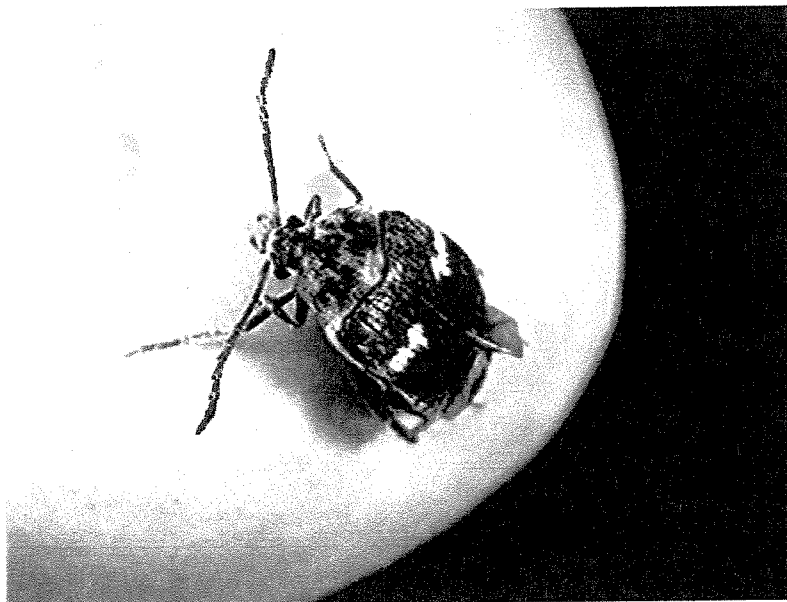


Figura 4: *Z. subfasciatus* (macho) sobre grãos de feijão *Phaseolus vulgaris* (foto: P.C. Strikis)



Figura 5: *Z. subfasciatus* (fêmea) sobre grãos de feijão *Phaseolus vulgaris* (foto: Negri)

As perdas de grãos devido aos danos causados por *Z. subfasciatus* chegam a atingir 35% no México, América Central e Panamá e ficam em torno de 7 a 15% no Brasil (Van Schoonhoven & Cardona, 1982). No sudeste e sul do Brasil, as perdas chegam a 20% (Wiendl, 1975) e no nordeste a 40% (Oliveira et al., 1977).

Os prejuízos causados pelos insetos em grãos e outros produtos armazenados, podem ser resumidos nos seguintes itens:

1. Perda no peso dos produtos pela destruição do endosperma;
2. Perda no valor nutritivo pela destruição do amido e do germe;
3. Perda de germinação pela destruição do germe;
4. Perda qualitativa pela presença de grãos e produtos bichados e a disseminação dos fungos e ácaros que provocam odores estranhos e toxinas prejudiciais à saúde dos consumidores;

5. Perda na qualidade de panificação das farinhas pela destruição do glúten;
6. Perda de produtos já elaborados, pela presença de insetos vivos e destruição e/ou avaria das embalagens.

Atualmente, a forma de controle de grãos armazenados é, a química, incluindo expurgo com fosfina ou brometo de metila (prestes a sair do mercado por problemas de resíduo de brometo) e polvilhamento ou pulverização com fosforados e piretróides. Embora sejam mais eficientes, as aplicações sistemáticas de medidas preventivas e tratamentos químicos, são medidas perigosas de prevenção, já que os inseticidas podem contaminar os alimentos, solo, água e animais, levar à intoxicação de agricultores, causar o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e matéria orgânica e a eliminação de organismos benéficos, entre outros efeitos (Saito & Lucchini, 1998). Problemas de resistência desenvolvidas aos diversos compostos químicos utilizados como inseticidas são também motivos pelos quais sua utilização deve ser evitada e/ou reduzida (Lara, 1991), sem destacar que a cada dia torna-se mais caro (US\$ 100 a 150 milhões) e mais longo o tempo necessário para o desenvolvimento de um novo agrotóxico (10 a 15 anos) (Gallo et al., 2002).

1.2.1- Morfofisiologia da digestão de insetos

De acordo com o diagrama geral do canal alimentar de um inseto (figura 6) proposto por Terra & Ferreira (1994), o Intestino Anterior (IA) é constituído pela boca onde encontramos as glândulas salivares, faringe, esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração em alguns insetos e em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio, principal local da digestão e absorção de nutrientes.

O Intestino Médio (IM) consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico. Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos, o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Na região do esfíncter, separando o intestino médio do

posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de Malpighi. O Intestino Posterior (IP) inclui o íleo e o reto, envolvidos na absorção de água e íons, terminando no ânus.

A membrana peritrófica é um finíssimo envelope membranoso que cobre o bolo alimentar no intestino dos membros da maioria dos filos animais, incluindo o dos insetos. Ela está organizada num arranjo de quitina (4 –13%) em uma matriz de proteína (21 – 51%) e carboidrato (Richards & Richards, 1977). Poucas ordens não possuem esta membrana e muitas vezes sua presença está associada com a idade do inseto como nos Siphonaptera, onde sua ocorrência é apenas no estágio larval (Peters, 1992). Nos coleópteros da família Bruchidae não existe uma membrana peritrófica bem definida. Acredita-se que esta família apresente estruturas quitinosas (Firmino et al., 1996). Nos lepidópteros a membrana peritrófica é do tipo I, ou seja, formada pelo intestino médio, ou por parte dele (região anterior ou posterior). Durante a formação da membrana do tipo I, precursores de quitina são secretados pelas células do intestino médio, sendo depois organizados em forma de fibras intercaladas por moléculas de proteínas (Tellmam et al., 1999). As principais funções atribuídas a esta estrutura são: proteção mecânica contra injúria às células do IM; barreira física contra microorganismos; barreira de seletividade para enzimas digestivas e produtos da digestão; e atuação no mecanismo de conservação das enzimas digestivas (Terra, 2001).

Segundo Terra & Ferreira (1994), vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de determinar os valores de pH nas diferentes regiões da estrutura digestiva, com a finalidade de confirmar a correlação entre o pH ótimo da enzima e pH do lúmen de insetos, pois as variações de pH afetam a atividade das enzimas digestivas.

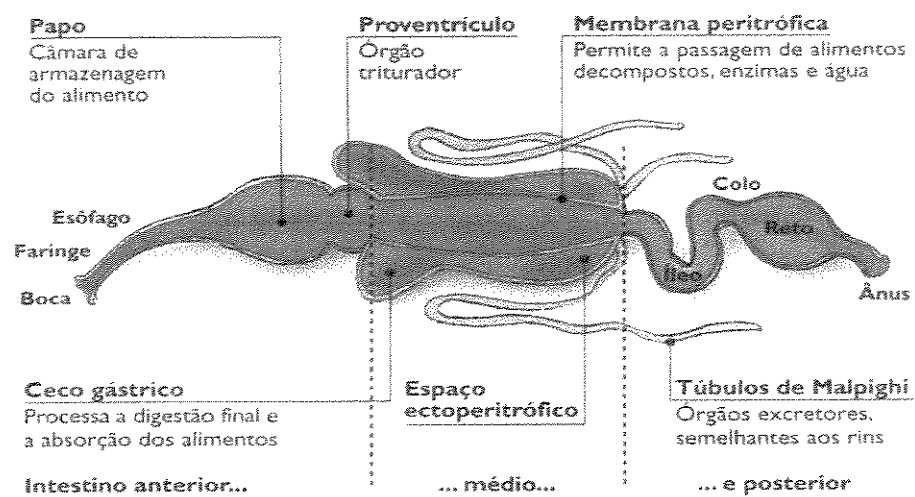


Figura 6- Diagrama geral do intestino de inseto
(adaptado de Terra & Ferreira, 1994).

A compartimentalização das enzimas é outra propriedade importante. Aquelas envolvidas na digestão inicial são encontradas no espaço endoperitrófico o qual é envolvido pela membrana peritrófica, cuja capacidade em compartimentalizar as enzimas digestivas depende de sua permeabilidade (Terra & Ferreira, 1994). Portanto, a integridade desta membrana quando afetada pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, causar danos no desenvolvimento do inseto (Habibi et al., 2000; Paes et al., 2000).

1.2.2- Papel inseticida de lectinas de plantas

O possível papel das lectinas na defesa das plantas contra insetos foi observado quando Jansen (1976) mostrou que PHA apresentava ação inseticida sobre *C. maculatus*. Apesar de ter sido relatada como a primeira lectina a apresentar propriedade inseticida sobre as larvas desse bruquídeo, PHA teve o seu efeito tóxico questionado anos mais tarde, quando se observou que esta atividade biológica foi devida à contaminação com um inibidor de α -amilase (Huesing et al., 1991b). Entretanto outros estudos comprovaram o efeito inseticida de outras lectinas vegetais tais como a de germe de trigo (WGA), a de tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*), a de sementes de estramônio (*Datura stramonium*), a de arroz (*Oryza sativa*), a de rizoma de urtiga (*U. dioica*) e a de *Maclura pomifera* (Murdock et al., 1990; Huesing et al., 1991a). WGA e a lectina de sementes de *Bauhinia purpurea* (BPL) foram letais para larvas neonatas de *Ostrinia nubilalis*, quando incorporadas na dieta na concentração de 2% (Peumans & Van Damme, 1998). Dietas com lectinas purificadas de *Galanthus nivalis* (GNA) e alho (*Allium sativum*) indicaram que essas são moderadamente tóxicas a insetos predadores, como o besouro do feijão e o inseto do tabaco (*Spodoptera littoralis*) (Peumans & Van Damme., 1995b). Além de GNA apresentar alta toxicidade a insetos sugadores em experimentos com dietas artificiais, também se mostrou efetiva quando expressas em plantas transgênicas (Hilder et al., 1995). PHA apresentou propriedades inseticidas contra *Z. subfasciatus*, bem como a arcelina (proteína de reserva presente em sementes de *Phaseolus vulgaris*, possuidora de discreta atividade hemaglutinante) e inibidores de α -amilase,

proteínas membro de uma mesma família de lectina, que sob o ponto de vista genético, é altamente conservada (Paes et al., 2000). Embora seja muito provável que a toxicidade exercida por lectinas seja baseada na ligação específica a glicoconjugados presentes em alguma região do intestino médio dos insetos, o mecanismo exato de ação dessas proteínas não é totalmente conhecido.

1.3- Contaminação por fungos

Outra causa importante de deterioração de grãos é a infecção transmitida por fungos. Da mesma maneira que os insetos, a infecção fúngica começa no campo e é levada para locais de estocagem. A umidade relativa alta é um fator crucial para a infecção por fungos. O aumento no grau de umidade nos locais de armazenagem pode ocorrer por diversos fatores: se o produto não secou suficientemente depois da colheita, se ocorreu infestação por insetos, que resulta em manchas quentes e umidade aumentada, ou se foi empregada técnica de armazenamento imprópria que permite contato com água de chuva ou condensação de umidade. A infecção fúngica resulta na redução da qualidade do grão, mudança na coloração, gosto, cheiro, valor nutricional, aumento do teor de ácidos graxos livres e redução da capacidade de germinação (Santoso et al., 1996).

A presença de insetos pode ter um efeito profundo na disseminação de doenças causadas por fungos, pois podem transmitir os esporos aumentando a área susceptível à infecção fúngica, o que eventualmente pode acarretar o aumento da produção de micotoxinas, substâncias tóxicas produzidas por estes durante o crescimento e desenvolvimento. Como as micotoxinas são substâncias bastante estáveis e não são destruídas durante o processamento dos alimentos, o único meio de evitá-las é prevenir o crescimento dos fungos (Sallam, 2000).

Dunkel et al. (1982) mostraram que algumas espécies de insetos de armazenagem são disseminadoras de fungos, enquanto outros são exterminadoras; alguns fungos de armazenagem atraem insetos e promovem o aumento da população desses, enquanto outros os repelem, ao secretar toxinas prejudiciais aos insetos. Portanto, o conhecimento das relações biológicas básicas

entre insetos e fungos no ecossistema do grão armazenado é importante para o manejo destes. Vários estudos demonstram a importância dos insetos como facilitadores da infecção fungal. Na Nigéria, Acholo et al. (1997) mostraram que o besouro de inhame, *Heteroligus meles*, maior causador de danos aos tubérculos, facilita a expansão de diferentes espécies de *Fusarium*, bem como de outros fungos menos abundantes.

1.3.1- Fungos fitopatogênicos

Os fungos são organismos eucarióticos e em sua maioria filamentosos, que ocorrem no solo como células ou estruturas de repouso (esporos), como hifas (filamentos microscópicos) ou micélio (conjunto de hifas). Eles não possuem clorofila, sendo portanto heterotróficos, obtêm energia e carbono de compostos orgânicos. Embora não sejam predominantes em termos numéricos, os fungos representam 70-80% da biomassa microbiana da maioria dos solos e sua ocorrência está diretamente relacionada ao teor de matéria orgânica, sendo também influenciada pelo pH e umidade do solo. Eles predominam em solos ricos em matéria orgânica e com pH na faixa ácida e milhares de espécies, pertencentes a todas as classes, já foram isoladas do solo, sendo a maioria pertencente à classe *Deuteromycetes*. Os fungos mais representativos do solo são espécies do gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phytium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Phycomyces*, *Verticillium*, *Pilobulus*, *Humicola*, *Gaeumannomyces* e *Chaetomium* (Siqueira & Franco, 1988).

A principal função dos fungos resulta da sua atividade heterotrófica sobre restos vegetais depositados no solo e a formação de relações simbióticas mutualistas (micorrizas) e parasíticas (doenças) com as plantas. São importantes agentes de controle biológico de outros fungos e nematóides fitopatogênicos.

A unidade propagativa dos fungos, o esporo, tem função semelhante à de uma semente, diferindo dela por não conter um embrião pré-formado. Os esporos germinam, sob condições favoráveis, emitindo o tubo germinativo ou hifa primária, que se ramifica formando o micélio. Hifas especializadas para a nutrição, chamadas

hifas vegetativas, penetram no substrato em busca de alimento, enquanto que hifas reprodutivas ou aéreas, especializam-se na produção de esporos (Tortora et al., 2000).

A parede celular dos fungos é altamente versátil, sendo continuamente expandida durante o crescimento e extensivamente remodelada durante o desenvolvimento. Quimicamente, a parede contém 80 a 90% de políssacarídeos, sendo o restante constituído de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies são encontrados quantidades apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos. Fisicamente, a parede celular é formada por microfibrilas entrelaçadas, embebida numa matriz amorfa. Quitina e celulose são os principais componentes microfibrilantes da maioria dos fungos filamentosos, enquanto que nas leveduras ou fungos unicelulares, a parede contém principalmente glucanas não celulósicas. Proteínas e vários políssacarídeos (glicanas, mananas, galactanas e heteropolíssacarídeos) são as principais substâncias cimentantes. Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados na parede celular dos fungos são: D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glicosamina, xilose e ácido D-glicurônico. Desses, glicose, N-acetil-D-glicosamina e manose são encontrados na maioria dos fungos. Ocasionalmente ramnose, ribose e arabinose podem ser observados (Bartnicki-Garcia, 1968).

1.3.2- Proteínas e ação fungicida

O mecanismo de ação fungicida de proteínas de plantas pode ser dividido em três tipos:

- **primeiro: proteínas ligantes de quitina sem atividade enzimática**

Como exemplos podem ser citadas a heveína (4,7 kDa), proteína rica em cisteína, extraída do látex da *Hevea brasiliensis* (Archer, 1960) e que apresenta homologia com outras proteínas ligantes de quitina como a WGA (36 kDa) (Wright et al., 1985); e a UDA de peso molecular de 8,5 kDa (Chapot et al., 1986) e outras quitinases de plantas (Boller, 1988).

Dentre as lectinas vegetais envolvidas nos mecanismos de defesa contra fungos destaca-se a WGA, que se mostrou capaz de inibir a germinação e o crescimento de colônias de *Trichoderma viridae* (Mirelman et al., 1975). Esta proteína interage especificamente com oligômeros de quitina (Alen et al., 1973) e pode ligar-se às extremidades de hifas e esporos jovens, além de possuir afinidade por zigósporos. Cíopruga et al. (1999) estudaram o efeito da WGA sobre *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* e mostraram que a ligação dessa lectina à parede celular dos fungos afetou o compartimento interno e o crescimento dos germens, o que pôde ser comprovado pelas mudanças drásticas na morfologia dos fungos, tais como a lise das hifas e o extravasamento do conteúdo celular. Essas observações são consistentes com o papel de proteção contra fungos das lectinas ligantes de quitina, que poderiam diminuir o desenvolvimento da parede celular por ligar-se aos polímeros de n-acetilglicosamina, desestabilizando assim o equilíbrio entre a hidrólise e a síntese de quitina da parede celular dos fungos (Bartniki-Garcia, 1973).

- segundo: ação das tioninas

Tioninas são pequenas proteínas presentes no endosperma de muitas sementes de plantas, muito ricas em cisteína, com potente ação antimicrobiana, capazes de penetrar a parede dos fungos através das extremidades das hifas, causando poros na membrana e o conseqüente extravasamento de material citoplasmático (Florack & Stiekema, 1994).

- terceiro: ação de quimerolectinas

Quimerolectinas são proteínas que possuem um ou mais domínios ligantes de carboidrato (estruturalmente arranjados um após aos outro) e um outro domínio catalítico com função enzimática bem definida (Van Damme et al., 1998).

As quimerolectinas com ação fungicida pertencem à classe das quitinases de classe I que possuem na região N-terminal um domínio ligante de quitina e na região C-terminal um domínio do tipo quitinase. Este último domínio, que confere atividade enzimática à proteína, é o responsável pela ação fungicida das quimerolectinas (Beintema, 1994).

Já foi demonstrado que lectinas não podem penetrar o citoplasma das células de fungos graças à existência de uma espessa e rígida parede celular. A interferência que essas proteínas podem causar no desenvolvimento desses organismos, como alteração na estrutura, na permeabilidade da membrana ou alterações nos processos intracelulares, parece pouco provável. Entretanto, é possível que ocorram efeitos indiretos baseados na ligação das lectinas aos carboidratos expostos na superfície da parede celular (Peumans & Van Damme, 1995 b).

1.4- Aspectos gerais da parede bacteriana

Um dos grandes interesses na biologia de plantas é o estudo das interações entre plantas e microorganismos. Dentre as bactérias, cerca de 1600 espécies são fitopatogênicas, destacando-se entre as gram-negativas *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Xylella* e *Agrobacterium* e dentre as gram-positivas, *Clavibacter* e *Streptomyces*.

A parede celular bacteriana é composta de uma rede macromolecular denominada peptídeoglicana, que consiste de um dissacarídeo repetitivo unido por polipeptídeos para formar uma rede que circunda e protege toda a célula (figura 7a). A porção dissacarídica é composta por uma unidade de N-acetilglicosamina e outra de N-acetilmurâmico (Rogers et al., 1980). Na maioria das bactérias gram-negativas (figura 7c) a parede celular consiste de muitas camadas de peptídeoglicana, formando uma estrutura espessa e rígida. Em contraste, as paredes celulares de gram-positivas (figura 7b) contêm somente uma camada fina de peptídeoglicana. Além disso, as paredes celulares das bactérias gram-positivas contêm ácidos teicóicos, que consistem primariamente de um álcool (como glicerol ou ribitol) e fosfato (Davis & Dulbecco, 1979). Devido à carga negativa dos grupos fosfato, os ácidos teicóicos podem ligar e regular o movimento de cátions para dentro e fora da célula; podem também assumir um papel no crescimento da célula, impedindo a ruptura extensa da parede e possível lise celular e finalmente, fornecem boa parte da especificidade antigênica da parede.

As paredes celulares das bactérias gram-negativas (figura 7c) consistem de uma ou algumas camadas de peptidoglicana e uma membrana externa. A camada peptidoglicana é fina e portanto mais susceptível ao rompimento mecânico. As paredes celulares dessas bactérias não apresentam ácidos teicóicos. A membrana externa consiste de lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos.

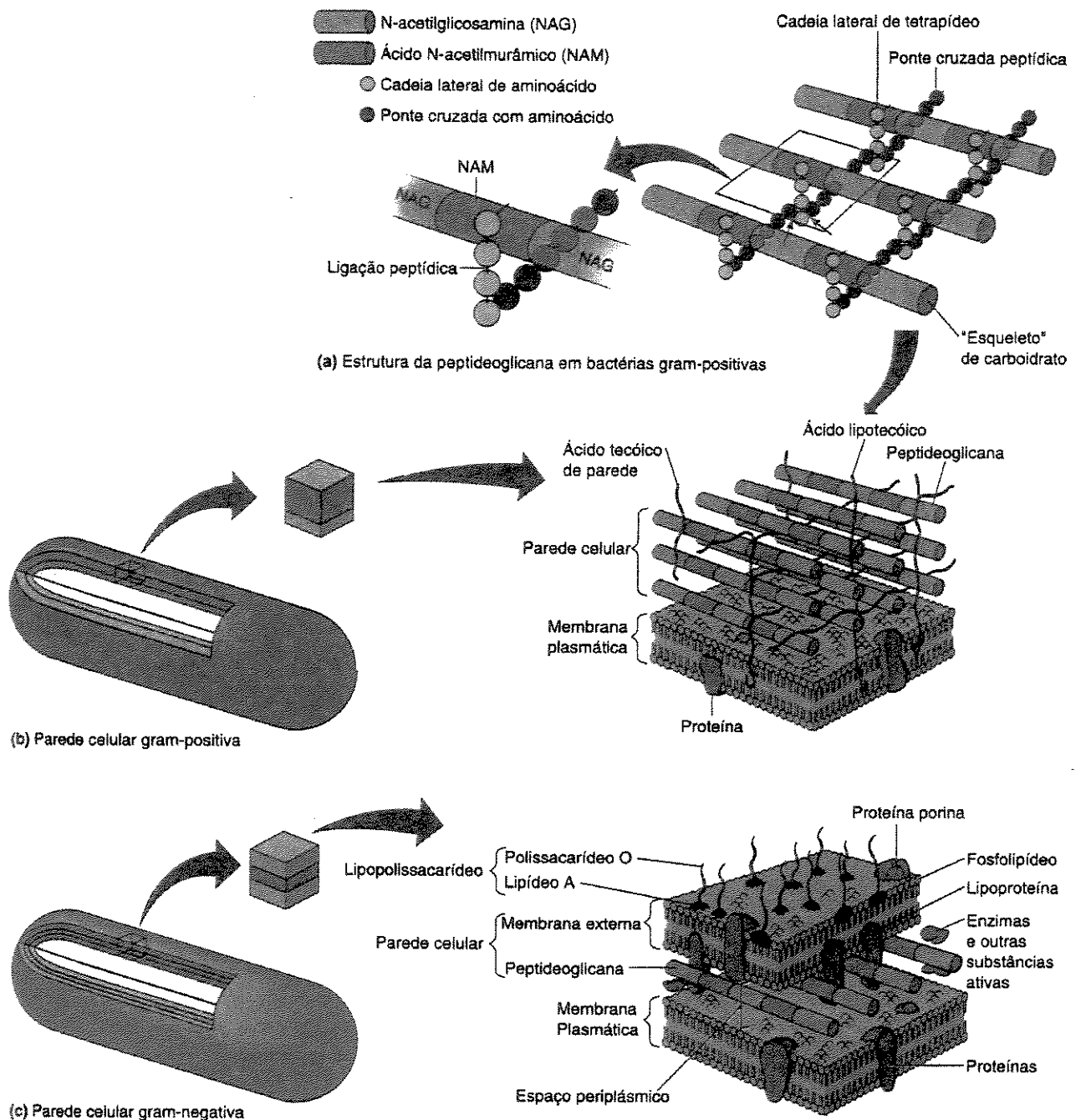


Figura 7- Parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

(Adaptada de Tortora et al., 2000)

A membrana externa apresenta várias funções especializadas: sua forte carga negativa é um fator importante para a evasão da fagocitose e da ação do complemento (dois componentes do sistema de defesa do hospedeiro); fornece boa barreira para certos antibióticos (penicilina), enzimas digestivas (lisozima), detergentes, metais pesados e certos corantes. Entretanto, é permeável aos nutrientes que mantêm o metabolismo celular. Parte da permeabilidade da membrana externa é devida a proteínas na membrana denominadas porinas, que formam canais, e permitem a passagem de moléculas como nucleotídeos, dissacarídeos, peptídeos e aminoácidos. Contudo, elas também podem tornar as bactérias vulneráveis ao ataque, fornecendo locais de fixação de vírus e substâncias nocivas (Tortora et al., 2000).

O componente LPS da membrana externa fornece duas características importantes das bactérias gram-negativas. Primeiro, a porção polissacarídica é composta de açúcares, denominados polissacarídeos O, que atuam como antígenos e são usados para diferenciar as espécies de bactérias gram-negativas. Segundo, a porção lipídica do polissacarídeo, denominada lipídeo A, é uma endotoxina, tóxica quando presente na corrente sanguínea do hospedeiro ou no trato gastrointestinal, causando febre e choque (Tortora et al., 2000).

A virulência de bactérias fitopatogênicas é frequentemente correlacionada com a produção de polissacarídeos extracelulares (EPS). EPSs de vários patógenos são causadores de sintomas tais como encharcamento e murcha. EPSs e polissacarídeos associados com as células bacterianas também promovem colonização e facilitam a sobrevivência de bactérias dentro dos tecidos do hospedeiro. A função de polissacarídeos "gomosos" em doenças de plantas parece ser particularmente importante nas murchas causadas por patógenos que invadem o sistema vascular. Nas murchas vasculares, moléculas grandes de polissacarídeos liberadas pelo patógeno no xilema podem ser suficientes para causar um bloqueio mecânico dos vasos e induzir o sintoma (Denny, 1995).

1.4.1- Interações de lectinas com estruturas específicas de bactérias

O conhecimento prévio do carboidrato que causa inibição da atividade hemaglutinante possibilita sugerir quais estruturas presentes nos microorganismos que poderão agir como receptores para lectinas (Lotan et al., 1975).

1.4.1.1- Mananas

Três tipos de polissacarídeos são encontrados na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*: glucana, manana e quitina (em menor quantidade). Dentre esses, apenas manana (homopolímero de D-manose) é capaz de ligar-se a ConA (Tkacz et al., 1971).

1.4.1.2- Quitina

Este polímero é encontrado na maioria dos fungos, micélios bacterianos, algumas algas, em cutículas de artrópodes, anelídeos e moluscos (BeMiller, 1965). Estudos utilizando lectinas como ferramentas localizaram quitina na parede celular de bactérias (Horisberger & Vonlanthen, 1977). A lectina mais utilizada para a detecção de quitina é a WGA; outras lectinas como a PNA (*Pisum sativum*) e a SBA (aglutinina de soja) também interagem com este polímero. Existem evidências que ConA pode interagir com quitina, embora a especificidade desta lectina para açúcares não sugira esta possibilidade (Barkai-Golan et al., 1978)

1.8.1.3- Outros polissacarídeos

Galactomanana, polímero de D-Gal e manana, presentes em *Schizosaccharomyces* sp. podem ser detectados por lectina extraída de *B. simpliflora* (BSI) (Horisberger & Rosset, 1977). Glicogênio, um homopolissacarídeo de cadeia ramificada, constituído exclusivamente de α -D-Glc unidas por ligações α -

(1→4) sendo que a cada oito a dez resíduos glicosil ocorre uma ramificação contendo uma ligação α -(1→6), presente, entre outras, em *S. cerevisiae* (Manners & Wright, 1962) pode mediar a reação de precipitação induzida por Con A.

1.4.1.4- Ácidos teicóides

Estes ácidos, componentes comuns de paredes bacterianas, citoplasma e ocasionalmente de cápsulas de bactérias gram-positivas, podem interagir com lectinas devido à presença de resíduos de D-Glc ou GlcNAc encontrados em algumas formas desse polímero. Tanto Con A quanto WGA podem interagir com algumas formas desse ácido (Lotan et al., 1975).

1.4.1.5- Lipopolissacarídeos

Não há dúvidas sobre a enorme variação na porção polissacarídica das estruturas celulares, entretanto, diferentes lectinas podem interagir com uma ou mais formas de LPS. Dentre elas pode-se citar Con A, SBA e PHA (Warren & Kowalski, 1977).

1.4.2- Ação de lectinas contra bactérias

O reconhecimento de carboidratos expostos na superfície de micróbios por lectinas de plantas possibilita utilizá-las como ferramentas para identificação de bactérias patogênicas, através de reações de aglutinação (Slifkin & Doyle, 1990). Outros estudos relatam a inibição da motilidade e da multiplicação de algumas bactérias patogênicas para plantas causadas por lectinas (Broekaert & Peumans, 1986).

Lectinas de plantas podem reagir especificamente com estreptococos do grupo C, tais como as de *Dolichos biflorus* (Kahane & Tully, 1976) e de soja (SBA) (Olson & Liener, 1967). Provavelmente estas lectinas exercem efeito sobre esta bactéria, por ligar-se a resíduos de N-acetil-D-galactosamina encontrados nas suas estruturas externas.

Aglutininas de plantas medicinais da África do Sul foram examinadas com relação à interação com duas bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. As aglutininas de *Hypoxis hemerocallidea* e *Combretum mkhuzense* agregaram *S. aureus* na concentração de 4-5 µg/ml, enquanto que as aglutininas *C. mkhuzense*, *Kniphofia spp.* e *Tulbaghia violacea* aglutinaram *B. subtilis* na concentração de 33,7 µg/ml (Gaidamashvili & van Staden, 2002).

Hynes et al (1999) utilizaram lectinas vegetais, de *Anguilla anguilla* (AAA), *Eritrina cristagali* (ECA), *Lotus tetragonolobus* (Lotus A), *Ulex europaeus* (UEA) e *Triticum vulgaris* (WGA) para tipar 36 linhagens isoladas de *Helicobacter pylori*. Através de análises de eletroforese e imunoblotting observou-se que as lectinas interagiram basicamente com a porção polissacarídica do LPS de *H. pylori*.

Duas linhagens de *Corynebacterium diphtheriae* foram analisadas por ensaios envolvendo lectinas fluorescentes (Mattos-Guaraldi et al., 1999). Das vinte e duas lectinas testadas, apenas sete, que exibiam afinidade para N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, galactose, manose e ácido siálico foram capazes de ligar-se a *C. diphtheriae*, enquanto que a maior reatividade foi observada para WGA e *B. simplicifolia II* (BS-II), que reconhecem resíduos de ácido siálico e/ou β-D-GlcNAc e β-D-GlcNAc, respectivamente, presentes na linhagem de *C. diphtheriae* fermentadora de sacarose. A ligação de WGA decresce significativamente quando é feito um tratamento com neuraminidase, sugerindo a presença de um resíduo de ácido siálico na superfície celular dessa bactéria. Utilizando WGA marcada foi possível indentificar os diferentes carboidratos presentes na superfície de celular das linhagens de *C. diphtheriae* fermentadora e não fermentadora de sacarose (Mattos-Guaraldi et al., 1999).

2- OBJETIVOS

Avaliar a atividade biológica da lectina de *T. esculenta* em relação a:

- insetos (*C. maculatus* e *Z. subfasciatus*);
- fungos fitopatogênicos (*Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*)
- levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)
- bactérias fitopatogênicas (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas cichorii*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas melonis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrii*)

3- MATERIAIS

3.1- Fungos

Os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* foram cedidos pelo CNPF/EMBRAPA. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

Colletotrichum lindemuthianum é responsável pela antracnose do feijoeiro. Esta doença provoca manchas necróticas, queima e queda de flores, podridão e queda de frutos, cancro e secamento de ramos e tombamento de plantas jovens.

Fusarium oxysporum ataca as folhas de cana-de-açúcar, café e feijão além de causar murchamento da bananeira.

3.2- Bactérias

As bactérias *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Pseudomonas cichorii*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, *Xanthomonas melonis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Acidovorax avenae* subsp. *citri* foram cedidas pelo Instituto Biológico de Campinas e todas fazem parte da Coleção de Culturas IBSCF registrada na World Federation for Culture Collections (WFCC) sob o número 110.

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Gram +) é causadora da murcha no feijoeiro. Nas murchas vasculares, moléculas grandes de polissacarídeos liberadas pelo patógeno no xilema podem ser suficientes para causar um bloqueio mecânico dos vasos e induzir o sintoma de murcha.

Xanthomonas campestris pv *campestris* (Gram -) é causadora da podridão negra em agrião, brócolis e couve-flor.

Xanthomonas melonis (Gram -) provoca o apodrecimento no fruto do melão

Erwinia chrysanthemi (Gram -) é causadora da infecção dos tubérculos e hastes da batateira conhecida como canela preta.

Acidovorax avenae subsp. *citri* (Gram -) é responsável pela mancha-bacteriana no fruto da melancia e melão.

Pseudomonas cichorii (Gram -) é causadora da mancha-bacteriana em alface.

3.3- Insetos

Os insetos foram cedidos pelo Laboratório de Purificação Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB)/ UFMS

Zabrotes subfasciatus: inseto cosmopolita geralmente restrito a feijões secos (*Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*).

Callosobruchus maculatus: inseto mais restrito, ataca várias espécies de feijões do gênero *Vigna*.

4- MÉTODOS

4.1- Estudo da atividade fungicida

4.1.1- Manutenção dos microrganismos

Cepas de *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* foram inicialmente postas para crescer em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud, durante 10 dias à temperatura ambiente. Após este período, inóculos desse material (em forma de disco) foram transferidos para solução salina 0,15 M e estocados a 4 °C por até seis meses.

Células de *S. cerevisiae* crescidas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud por três dias, foram transferidas para ágar Sabouraud inclinado e armazenadas a 4 °C por até três meses.

4.1.2- Extração de esporos dos fungos filamentosos

Inóculos dos fungos foram colocados para crescer no centro de placas de Petri contendo ágar Sabouraud e deixados a temperatura ambiente por 10 dias. Após esse período, 10 ml de salina estéril 0,15 M foram vertidos sobre o crescimento micelial e a liberação de esporos feita com o auxílio de uma alça de Drigalski. Os

esporos extraídos foram recuperados e quantificados em câmara de Neubauer com o uso de microscópio.

4.1.3- Preparo das células de levedura

Inóculos das células de *S. cerevisiae* foram retirados dos tubos contendo ágar Sabouraud inclinado e transferidos para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As células foram deixadas crescer por um período de três dias à temperatura ambiente. Após crescimento, um novo inóculo foi retirado das placas e transferido para solução salina 0,15 M para quantificação das células em câmara de Neubauer.

4.1.4- Ensaio da atividade quitinásica

A atividade da quitinase foi determinada pelo método de Hackman & Goldberg (1964) que utiliza quitina azure como substrato. Uma alíquota de 5 mg de quitina azure foi incubada com uma solução protéica onde se investigava a presença da enzima quitinase, num volume final de 3 ml em tampão acetato de sódio 0,08 M pH 4,5. Depois da incubação à 37°C por 48 horas, sob agitação constante, o sobrenadante foi recolhido por centrifugação (5000 x g, 5 min) e a absorbância lida a 575 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a concentração de quitinase que produziu uma absorbância diferente de 0,001.

4.1.5- Ensaio de inibição do crescimento dos fungos

Esporos de *C. lindemuthianum* e *F. oxysporum* (4×10^3) e células de *S. cerevisiae* foram incubados em 200 µl de caldo Sabouraud contendo 280 µg/ml de proteínas (lectinas). O ensaio foi realizado em placas de cultura de células (96 poços), à temperatura ambiente por um período de 60 horas. A determinação da densidade ótica (reflexo do crescimento micelial e celular) foi feita de 6 em 6 horas em um "leitor de ELISA", a 620 nm. Todo o procedimento de preparo do ensaio foi feito em condições estéreis em capela de fluxo laminar. Os experimentos

aconteceram em triplicata e os desvios não ultrapassaram 20% (foram omitidos do gráfico para melhor visualização dos resultados).

4.1.6- Microscopia óptica

Após 60 h de crescimento, fungos filamentosos e leveduras foram retirados das placas de culturas de células e, com a ajuda de uma pipeta colocados sobre a lâmina de vidro, cobertos com lâminula e utilizados para observações em microscópio óptico.

4.2- Estudo da atividade lectínica sobre o crescimento de bactérias

O estudo da ação da lectina de *T. esculenta* sobre o crescimento de bactérias foi baseado no método desenvolvido por Yamaoka-Yano & Mazzafera, 1998. As bactérias foram colocadas para crescer em meio líquido Luria Broth (LB) por 12h a 28°C. A seguir, alíquotas de 20 µl de cada suspensão bacteriana foram inoculadas em tubos estéreis rosqueáveis contendo 3 ml de meio líquido LB e 100 µg/ml da lectina de *T. esculenta*. Outros tubos contendo a mesma mistura com excessão da lectina representaram o controle do crescimento bacteriano. Os tubos foram colocados inclinados num agitador orbital a 120 rpm, 28°C e após diferentes períodos de incubação (de 2 a 48 h) foram levados a um colorímetro e o crescimento bacteriano foi estimado pela leitura das absorbâncias a 600 nm. Foram realizadas três replicatas para cada concentração de lectina bem como para os controles.

4.3- Estudo da atividade inseticida

4.3.1- Criação de insetos

Os bruquídeos das espécies *C. maculatus* (Figura 1) e *Z. subfasciatus* (Figura 4 e 5) foram mantidos sobre sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* respectivamente, em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tampas metálicas perfuradas. As colônias foram mantidas em B.O.D (câmaras de criação) à temperatura de 28-30 °C e umidade relativa em torno de 65-70%. A cada geração fez-se a infestação de novas sementes com fêmeas de 2 dias de idade, por um período de postura de 1 dia (24 horas). Após um período de aproximadamente 28 dias, uma nova geração de insetos foi obtida.

4.3.2- Efeito da lectina sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus* e sobre *Z. subfasciatus*

Sementes artificiais (400 mg) foram preparadas pela mistura da farinha de feijão (*V. unguiculata*) da variedade EPACE-10 (cultivar susceptível) com a lectina que foi investigada. A lectina foi homogenizada com a farinha de EPACE-10 num gral, transferidos para um molde de latão e prensados com auxílio de uma prensa manual. A pressão exercida permitiu consistência e dureza que possibilitou a postura e desenvolvimento das larvas (Macedo et al., 1995).

As sementes artificiais, na ausência e na presença de lectina nas concentrações de 0, 0,25, 0,5, 1 e 2%, foram oferecidas às fêmeas de *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* com 2 dias de emergência para ovoposição. Após 24 horas de infestação, os ovos que excediam a três foram retirados. Passados 20 dias, as sementes artificiais foram abertas e analisadas quanto ao número de larvas e ao peso médio. Foram realizadas 25 repetições de cada experimento.

4.3.3- Dissecção das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

Os intestinos médio de larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* foram preparados de acordo com Macedo et al. (2000). As larvas de 16-18 dias,

mergulhadas em solução de NaCl 0,15 M, foram dissecadas a frio com auxílio de pinças e sob lupa estereoscópica. Exposto o trato intestinal, os intestinos médios foram isolados, seccionando-se a região de passagem do esôfago para o ventrículo e a região de inserção dos tubos de Malpighi.

4.3.4- Preparo de homogenatos de intestinos médios de larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

Os intestinos médios (I.M.) dos bruquídeos foram homogeneizados em Potter contendo tampão Tris/HCl 0,05M, pH 8,0, durante 10 minutos, em banho de gelo, obtendo-se um extrato dos mesmos (200 I.M./ml). Este extrato foi transferido para um tubo de Eppendorf e a suspensão foi centrifugada a 5.000 x g durante 30 minutos a 6°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado imediatamente.

4.3.5- Estudo da digestibilidade *in vitro* das enzimas proteolíticas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* sobre TEL

Homogenatos de intestino larval foram preparados como descrito por Macedo et. al. (2000). Foram dissecados intestinos de 200 larvas de 4^o instar, de cada espécie e a seguir extraídos em 1 ml de tampão acetato 0,1 M, pH 5,6, contendo cisteína 0,001 M e EDTA 0,003 M. TEL foi incubada com os intestinos (2 mg/ml) em tampão acetato 0,001 M, pH 5,6, contendo cisteína 0,001 M e EDTA 0,003 M durante 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h a 37° C. A digestão foi paralisada em água fervente por 2 min. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS.

4.3.6- Estudo da digestibilidade *in vitro* das enzimas pepsina e papaína sobre TEL

TEL foi digerida pela mistura das enzimas pepsina e papaína (1:1) conforme Macedo et al. (2002). A relação enzima /substrato será 1:20 por 10 min, 30 min, 1, 2, 4, 8 e 16 horas à temperatura de 37 °C em tampão fosfato 0,001 M, pH 6,0, contendo cisteína

0,001 M e EDTA 0,003 M. A digestão foi paralisada em água fervente por 2 min. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS.

4.3.7- Efeito dos carboidratos sobre a ação inseticida da lectina

Para estudar a influência dos carboidratos sobre a atividade inseticida da lectina de *T. esculenta*, amostras de TEL foram dissolvidas em soluções de D-glicose ou D-manose ou em solução contendo os dois açúcares, incubada por 1 h a 37 °C e em seguida dialisadas e liofilizadas. O material obtido foi usado para os testes biológicos. Os carboidratos foram utilizados na concentração 10 vezes maior que o empregado para a inibição da atividade hemaglutinante da lectina. Foram feitas sementes artificiais tendo como controle o feijão Epace-10 na ausência da lectina, sementes com lectina a 1% e lectina incubada com os carboidratos citados. As sementes artificiais foram oferecidas para *C. maculatus* conforme descrito no item 4.3.2.

4.3.8 - Análise estatística

A partir dos dados experimentais foram calculadas as médias e o erro padrão em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e teste de Duncan para múltiplas comparações. O $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

5- RESULTADOS

5.1- Atividade quitinásica

Não foi observada atividade quitinásica na solução de lectina até a concentração de 1mg/ml.

5.2- Efeito da lectina sobre o crescimento de fungos

A ação de TEL sobre o crescimento dos fungos *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *S. cerevisiae* (figura 8) mostra que houve cerca de 44% de inibição quando incubados na presença da lectina.

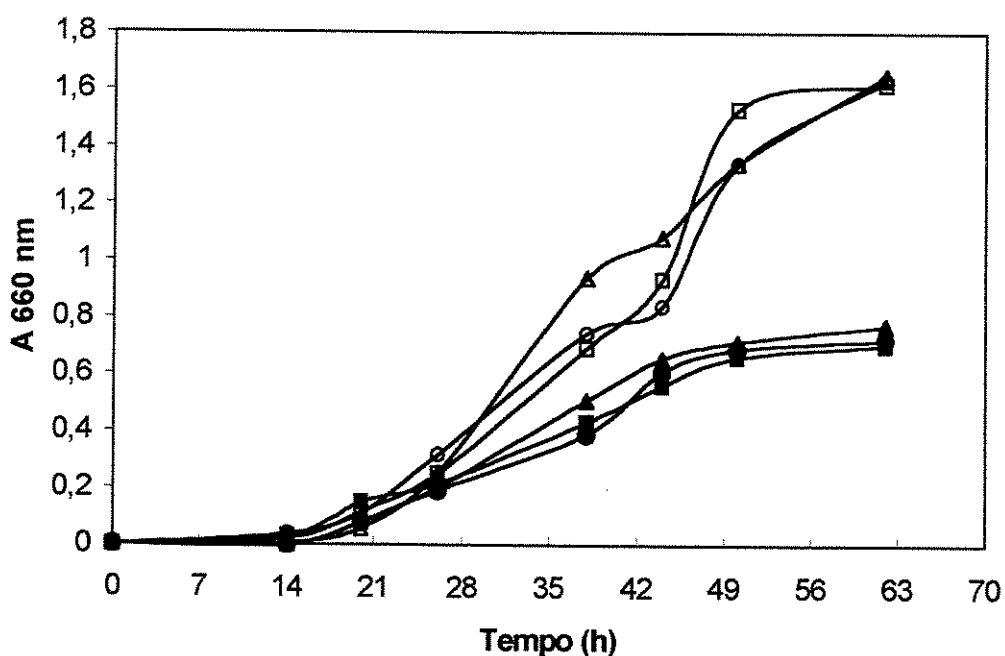


Figura 8- Efeito de TEL sobre o crescimento de fungos. Crescimento dos fungos *F. oxysporum* (■), *S. cerevisiae* (▲) e *C. lindemuthianum* (●) na presença de TEL (280 µg/ml) e (□, △, ○) na ausência da lectina.

5.3. Microscopia óptica mostrando o efeito de TEL sobre o crescimento de fungos

Fotos de microscopia óptica dos fungos *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* depois de 60 h de crescimento, mostram o desenvolvimento normal de hifas nos controles (figuras 9A e B) e uma inibição de *F. oxysporum* (figuras 9C e E) e de *C. lindemuthianum* (figuras 9D e F)

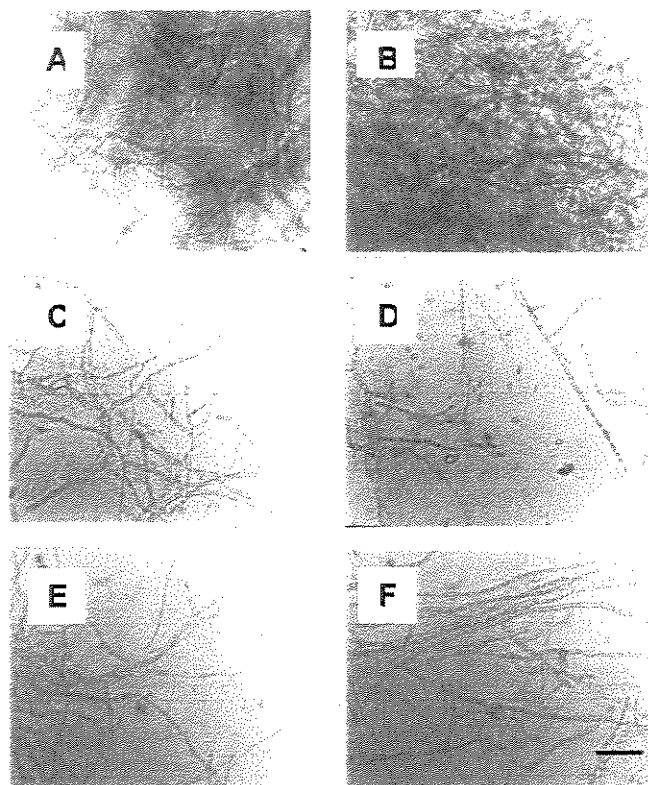


Figura 9- Microscopia óptica de *F. oxysporum* (A,C,E) e *C. lindemuthianum* (B,D,F) depois de 92 horas de crescimento dos fungos em presença do meio de controle (A,B) e em presença de TEL (C-F). Amplitude = 15,6 μm .

5.4- Estudo da atividade lectínica sobre o crescimento de bactérias

Os estudos mostraram que TEL não exibiu efeito sobre as bactérias *E. chrysanthemi*, *A. avenae* subsp. *citruli*, entretanto inibiu o crescimento de *P. cichorii* em 86 % depois de 3 horas (figura 10); *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em 42 % depois de 18 h (figura 11); *X. campestris* pv *campestris* em 16 % depois de 32 h (figura 12) e *X. melonis* em 60 % depois de 12 horas de incubação (figura 13).

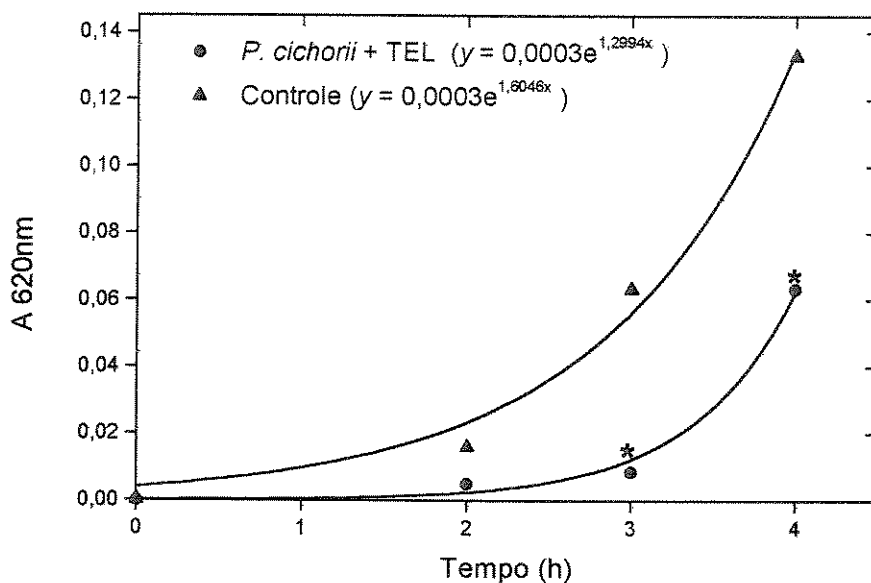


Figura 10 - Efeito de TEL sobre o crescimento bactéria *P. cichorii*.

(▲) controle; (●) bactéria + TEL (100 µg), (*) denota diferença significativa entre o controle e o tratamento com a lectina (ANOVA, n=3, p < 0,05).

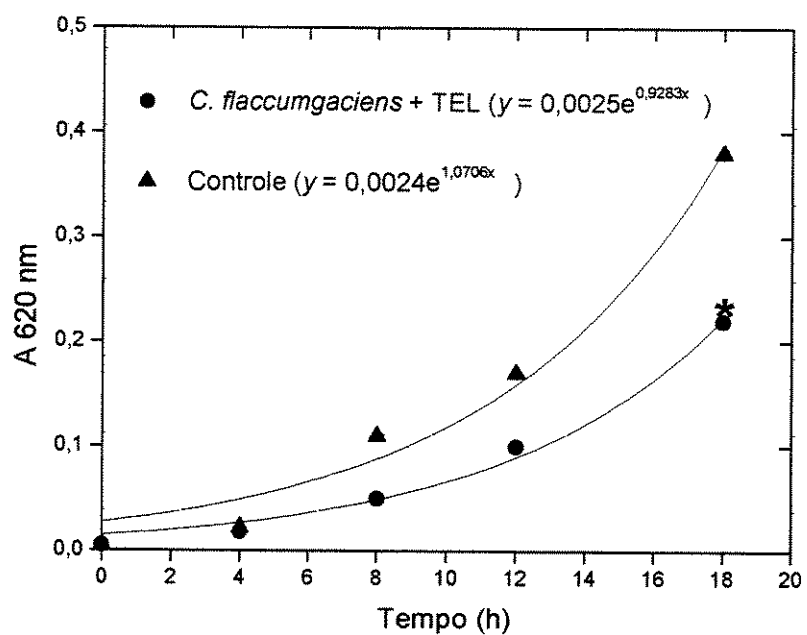


Figura 11- Efeito de TEL sobre o crescimento bactéria *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. (▲) controle; (●) bactéria + TEL (100 µg), (*) denota diferença significativa entre o controle e o tratamento com a lectina (ANOVA, n=3, p < 0,05).

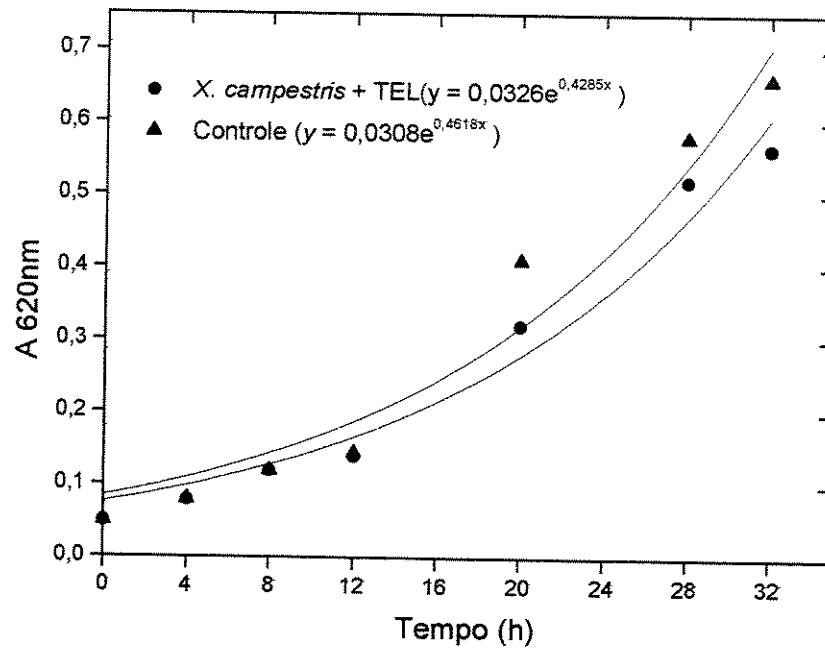


Figura 12- Efeito de TEL sobre o crescimento bactéria *X. campestris* pv. *campestris* (▲) controle; (●) bactéria + TEL (100 µg), (*) denota diferença significativa entre o controle e o tratamento com a lectina (ANOVA, n=3, p < 0,05).

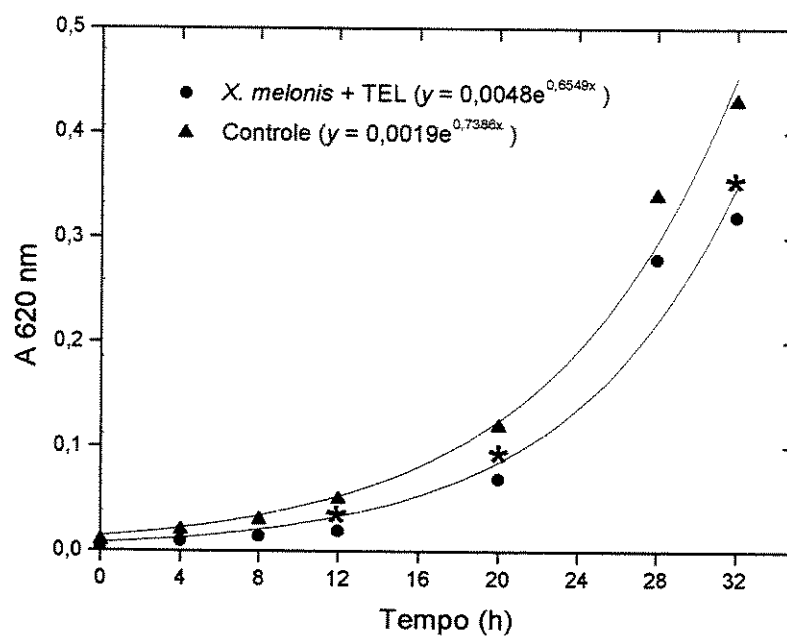


Figura 13- Efeito de TEL sobre o crescimento bactéria *X. melonis*. (▲) controle; (●) bactéria + TEL (100 µg), (*) denota diferença significativa entre o controle e o tratamento com a lectina (ANOVA, n=3, p < 0,05).

5.5- Efeito da lectina sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

O danos causados por TEL no desenvolvimento e mortalidade de larvas de 4^o instar de *C. maculatus* são apresentados nas figuras 14A, 14B e 16A. A mortalidade e o peso das larvas controle alimentadas na ausência da lectina (representada pela intercessão com o eixo Y) foi ca 9,7% e 2,7 mg, respectivamente, enquanto que as sementes artificiais contendo 1,0% de TEL produziu cerca de 50% de mortalidade (LD₅₀) e um decréscimo de 50% no peso (ED₅₀). Análises de regressão mostraram que para cada aumento de 0.1% na dose de TEL ocorre um aumento de 3,95 % na mortalidade com um R² igual a 0,98 enquanto que este mesmo aumento na concentração de TEL acarretou um decréscimo de 0,1 mg no peso (R² = 0,92).

Os efeitos causados por TEL no desenvolvimento e mortalidade de larvas de 4^o instar de *Z. subfasciatus* são apresentados nas figuras 15A, 15B e 16B. A mortalidade e o peso das larvas controle foi ca 12,3% e 3,8 mg, respectivamente, enquanto que as sementes artificiais contendo 0,94% de TEL produziram cerca de 50% de mortalidade (LD₅₀) e um decréscimo de 50% no peso (ED₅₀), na concentração de 1,1%. Análises de regressão mostraram que para cada aumento de 0,1% na dose de TEL havia um aumento de 4,14 % na mortalidade com um R² igual a 0,99. Para cada aumento de 0,1% na concentração de TEL houve decréscimo de 0,16 mg no peso (R² = 0.98).

TEL produziu ca 90% de mortalidade quando incorporada a 2%, com uma LD₅₀ de ca. 1% para as duas espécies. As figuras 14B e 16B apresentam o peso dos insetos sobreviventes contra diferentes concentrações de TEL na mesma dieta. TEL apresentou um forte efeito sobre o peso das larvas de *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*, sendo que para este último este efeito foi mais evidente na concentração de 1,0%.

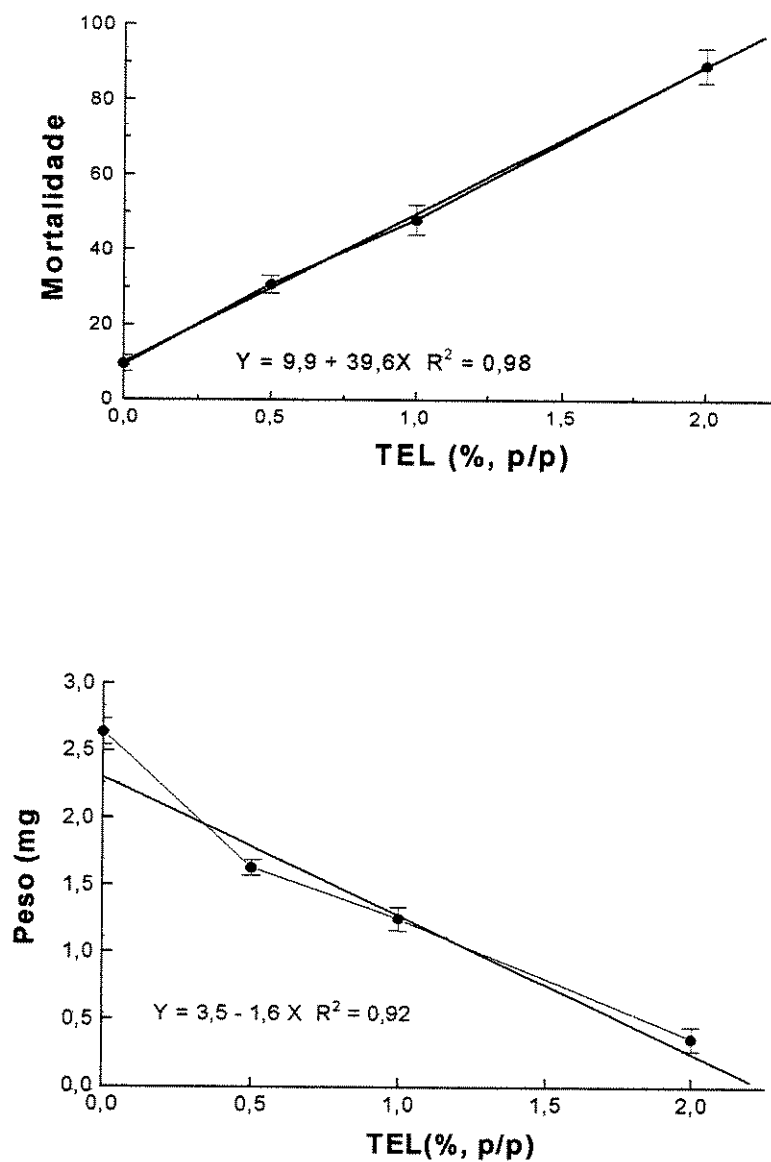


Figura 14 - Efeito de TEL sobre larvas de 20 dias de *C. maculatus* alimentadas com dieta artificial. (A) mortalidade (B) peso médio. Cada ponto representa um $n \geq 75$. As barras indicam a média dos erros.

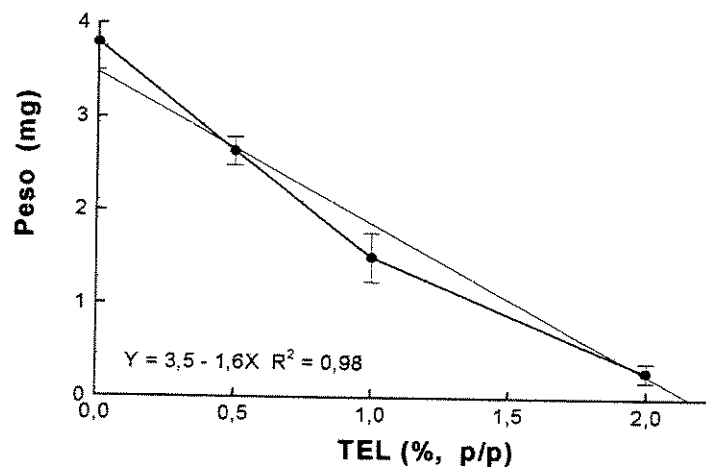
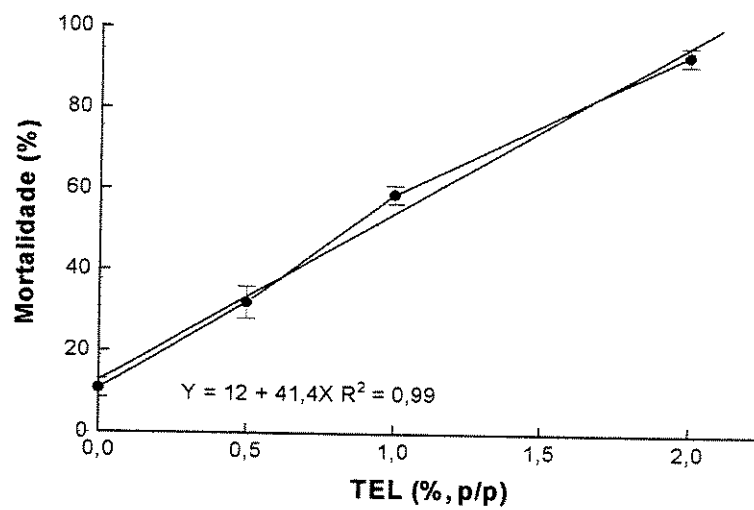


Figura 15 - Efeito de TEL sobre larvas de 20 dias de *Z. subfasciatus* alimentadas com dieta artificial. (A) mortalidade (B) peso médio. Cada ponto representa um $n \geq 75$. As barras indicam a média dos erros.

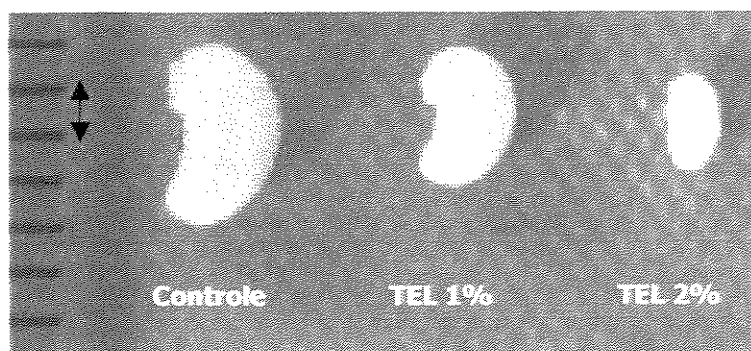


Figura 16A - Larvas de 4^o instar de *C. maculatus* alimentadas com TEL em diferentes concentrações (↔ representa 1 mm).

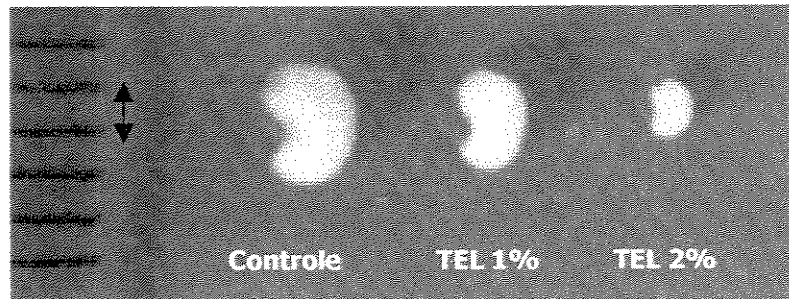


Figura 16B - Larvas de 4^o instar de *Z. subfasciatus* alimentadas com TEL em diferentes concentrações (↔ representa 1 mm).

5.6- Estudo da digestibilidade *in vitro* de TEL pelas enzimas proteolíticas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* sobre TEL

Os resultados do ensaio de digestibilidade de TEL (figuras 17 e 18) por proteinases intestinais de larvas de 4^o instar de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, respectivamente, foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Observou-se que não houve digestão de TEL até 48 horas para ambos os insetos. A partir de 72 a subunidade de 40 kDa começou a sofrer uma pequena hidrólise por parte das enzimas digestivas dos bruquídeos.

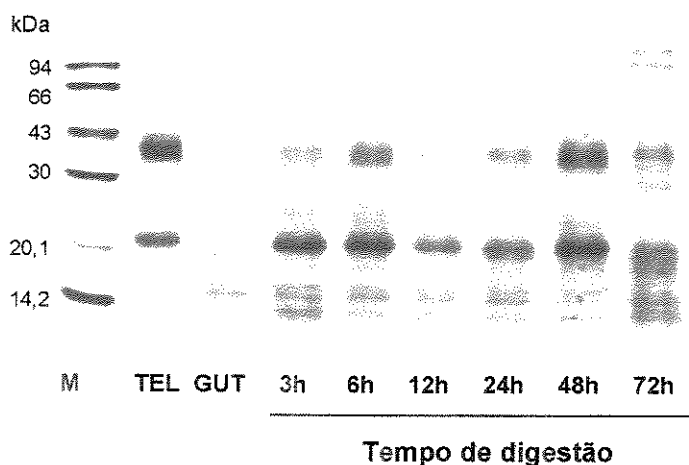


Figura 17- Eletroforese em PAGE-SDS de TEL incubada com enzimas do homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus*, em diferentes intervalos de tempo. (M) padrão de peso molecular; (GUT) homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus*.

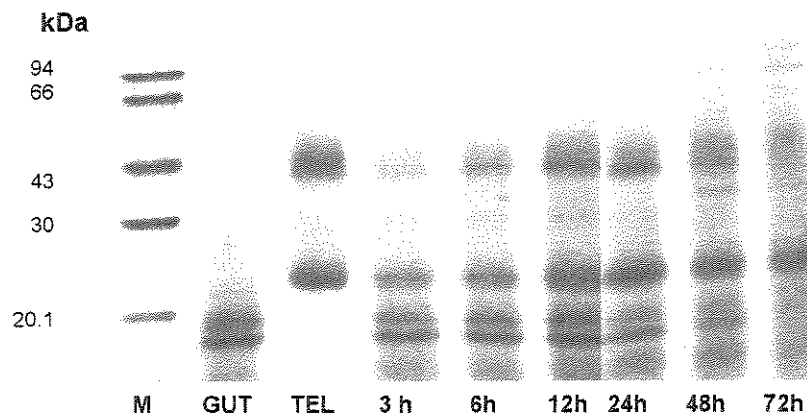


Figura 18- Eletroforese em PAGE-SDS de TEL incubada com as enzimas do homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus*, em diferentes intervalos de tempo. (M) padrão de peso molecular; (GUT) homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus*.

5.7- Estudo da digestibilidade *in vitro* de TEL pelas enzimas pepsina e papaína

A fim de estudar o possível efeito inseticida de TEL sobre os bruquídeos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* simulou-se a digestão *in vitro* de duas classes de enzimas que fazem parte do trato digestivo destes dois bruquídeos sobre TEL.

Os resultados do ensaio de digestibilidade de TEL (figura 19) por pepsina e papaína foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS. Observou-se que a banda de aproximadamente 20 kDa sofre a ação proteolítica dessas enzimas a partir dos 10 minutos primeiros minutos de incubação enquanto que a banda de aproximadamente 40 kDa é mais resistente, sendo digerida após 8 horas de contato com as enzimas.

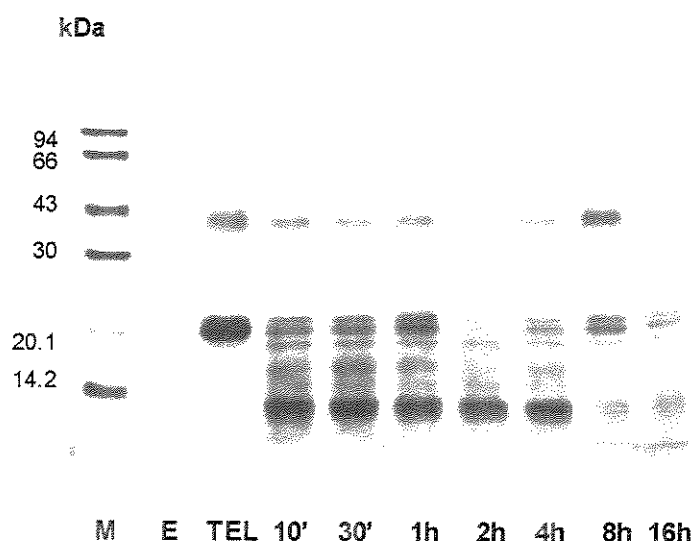


Figura 19: Eletroforese em PAGE-SDS de TEL incubada com as enzimas pepsina e papaína em diferentes intervalos de tempo. (E) mistura das enzimas pepsina e papaína; (M) padrão de peso molecular; os números na horizontal referem-se aos tempos de digestão.

5.8- Efeito dos carboidratos sobre a ação inseticida de TEL

Os açúcares manose, glicose e glicose + manose, na concentração final de 1%, não apresentaram ação inseticida para *C. maculatus* (figura 20). A lectina, previamente incubada com manose e glicose, carboidratos que inibem a sua atividade hemaglutinante, (0,39 mM e 3,5 mM respectivamente) foi oferecida para o inseto. Observou-se que a atividade inseticida de TEL (figura 21A) foi inibida cerca de 100% na presença de manose, já que a mortalidade foi praticamente nula. A glicose não conseguiu inibir totalmente a atividade inseticida já que houve um decréscimo aproximado de 25% na sobrevivência. Já os dois açúcares em conjunto reverteram totalmente a atividade inseticida. Com relação ao efeito de TEL sobre o peso de *C. maculatus* observou-se que manose consegue praticamente anular o efeito da lectina, glicose reverte 62,5% do efeito e glicose junto com manose inibem totalmente a ação inseticida.

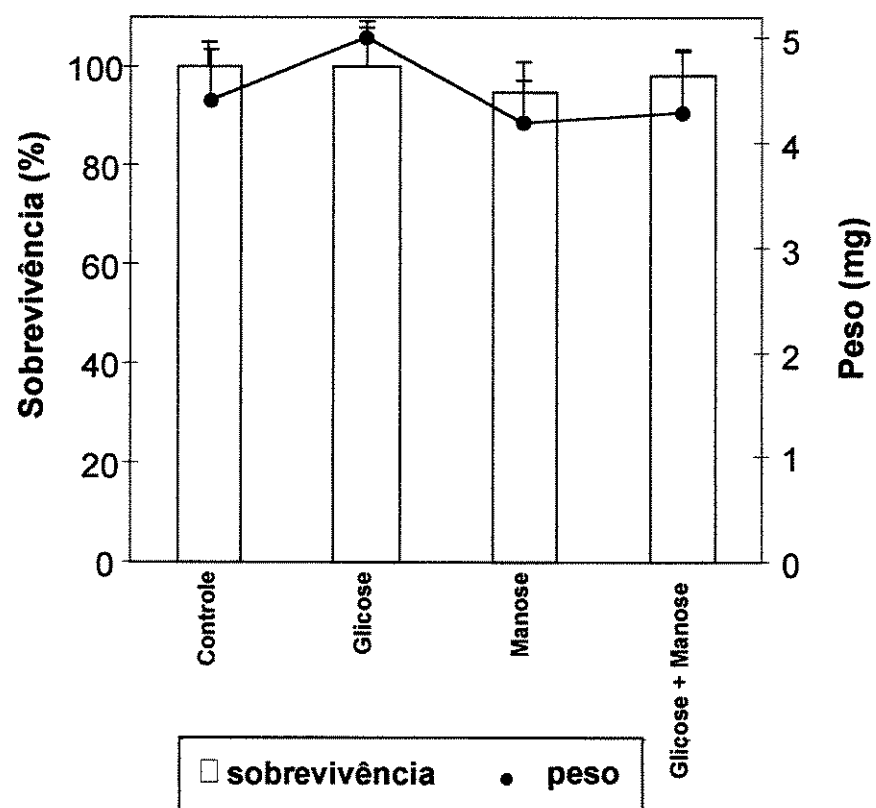


Figura 20- Efeito de carboidratos na sobrevivência e peso de *C. maculatus*.

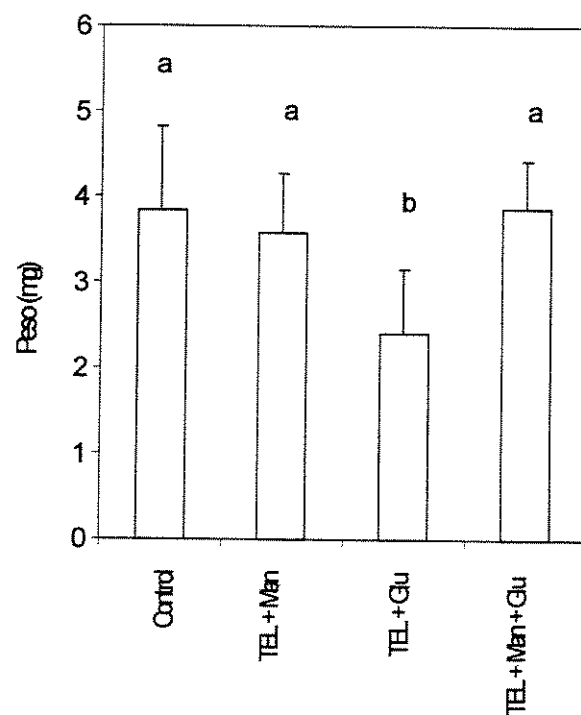
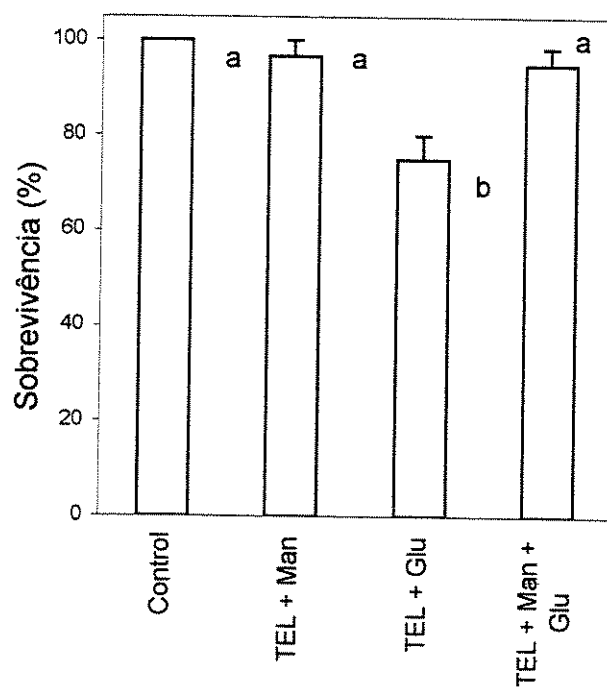


Figura 21- Efeito inibitório de carboidratos sobre a atividade inseticida de TEL. Efeito sobre a sobrevivência (A) e peso médio (B) de larvas de *C. maculatus* alimentadas com TEL a 1%.

6- DISCUSSÃO

Proteínas que se ligam à quitina, um polímero de N-acetilgalactosamina, apresentam um efeito inibitório sobre o crescimento de patógenos e pragas que possuem este polissacarídeo em sua estrutura, como é o caso de fungos e insetos (Chrispeels & Raikhel, 1991). Como UDA (Van Parijs et al., 1992), WGA (Ciopraga et al., 1999) e GAFP-1 (lectina isolada de *Gastrodia elata*) (Xu et al., 1998), TEL liga-se à quitina e causa inibição no crescimento dos fungos *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *S. cerevisiae* (figuras 8 e 9) numa concentração de $280 \mu\text{g/ml}^{-1}$, dado similar obtido com a lectina GAFP-1 que mostrou forte atividade inibitória *in vitro* contra *Valsa ambiens*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae*, *Ganoderma lucidum* and *Botrytis cinerea*, numa concentração de $360 \mu\text{g/ml}^{-1}$ (Xu et al., 1998).

Broekaert et al., (1989) sugeriram que o mecanismo de ação fungicida da UDA deve-se à perturbação na síntese de quitina, por ligar-se diretamente ou por fazer um “crosslinking” entre as cadeias. O pequeno tamanho da cadeia confere a UDA (8,5 kDa) maior capacidade de inibição do crescimento de hifas quando comparada a outras lectinas fungicidas de maior massa molecular como WGA (36 kDa) e a lectina de tomate (100 kDa). A UDA, por seu tamanho peculiar, pode ter um efeito direto nos sítios ativos de morfogênese da parede celular.

Ciopraga et al., (1999) estudaram os efeitos da WGA através de microscopia ótica sobre algumas espécies de *Fusarium* e observaram que a ligação de WGA com a parede dos fungos afeta o compartimento interno e o crescimento dos tubos do germe, o que pode ser observado pela alteração drástica na morfologia dos fungos como lise das hifas, intumescimento e formação de vacúolos com o conteúdo celular.

A inibição do crescimento de fungos causada por TEL pode estar associada a sua interação com quitina, manana e outros açúcares presentes nas paredes celulares de fungos, entretanto é necessária a busca de evidências claras dessas interações com o objetivo de revelar o mecanismo de ação dessa proteína.

A parede das bactérias não somente previnem qualquer interação entre glicoconjugados de suas membranas e proteínas que se ligam a carboidratos, mas também evita que estas proteínas penetrem no citoplasma. Desta maneira, lectinas de plantas não podem alterar a estrutura e/ou permeabilidade da membrana, ou

alterar o processo intracelular normal de invasão desses micróbios. Entretanto, se algumas lectinas podem estar envolvidas no mecanismo de defesa de plantas contra bactérias, deve ser através de um mecanismo indireto, que se baseia na interação com carboidratos da parede celular ou glicanos extracelulares (Peumans & Van Damme, 1995 b). Isto tem sido sugerido, por exemplo, para a lectina de batata que imobilizou, *in vitro*, cepas avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* (Sequeira & Graham, 1977). Uma lectina N-acetilglicosamina específica de *Cyphomandra betaceae* mostrou inibir o crescimento de algumas bactérias fitopatogênicas (Nieva-Moreno et al., 1997). A aglutinação e/ou precipitação de bactérias por lectinas, influência na motilidade e multiplicação destes microorganismos ((Broekaert & Peumans, 1986; Gaidamashvili & Van Staden, 2002). Recentemente foram descobertas duas lectinas ácido N-glicolilneurâmico específicas, de folhas de amora, capazes de aglutinar a bactéria patogênica *P. syringae* pv *mori* (Ratanapo et al., 2001). Outras lectinas vegetais têm efeito sobre esta bactéria, como a lectina de *G. simplicifolia* (GS I), Con A, WGA, a lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) e a lectina de lentilha (*Lens culinaris*).

Um atraso no crescimento bacteriano foi observado quando diferentes suspensões bacterianas foram incubadas com TEL (100 µg/ml) (figuras 10 a 13). Para *P. cichori* houve uma inibição do crescimento depois de 3 horas de incubação com a lectina, na fase lag de crescimento bacteriano, indicando que a inibição aconteceu nos primeiros estágios de multiplicação, diferentemente dos resultados encontrados para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. melonis* onde a inibição aconteceu depois de 18, 32, 12 horas de incubação, respectivamente.

O fato de lectinas vegetais serem extraídas de partes da planta com características de reserva, sugere a possibilidade da contribuição das lectinas no mecanismo de defesa, inclusive contra microorganismos patogênicos. Entretanto, no futuro, deverão ser realizados outros experimentos com o objetivo de revelar por qual(is) mecanismos de ação, TEL está causando inibição no crescimento dessas bactérias.

Os grãos de legumes como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) são fontes importantes de proteínas dietéticas e carboidratos. A resistência em

plantas produtoras de grãos pode ser mediada por um grande número de produtos metabólitos e podem ser classificados em primários (inibidores de proteinases, inibidores de amilase e lectinas) e secundários (alcalóides, taninos e rotenóides). Foi demonstrado que vicilina, proteína de defesa presente em leguminosas, foi capaz de conferir proteção contra *C. maculatus* em alguns cultivares de feijão de corda (Macedo et al., 1995). Canatoxina, uma proteína tóxica isolada de *Canavalia ensiformis*, também se mostrou altamente tóxica para *C. maculatus* (Carlini et al., 1997). Zeatoxina, uma glicoproteína isolada de sementes de *Zea mays* mostrou-se tóxica a *C. maculatus* quando incorporada à dieta na forma de sementes artificiais (Macedo et al., 2000). Arcelina apresentou propriedades inseticidas contra *Z. subfaciatus*, da mesma forma que a fitohemaglutinina (PHA) e um inibidor de alfa-amilase (α AI), todos membros de uma mesma família de lectina-like presentes em feijões (Paes et al., 2000).

Muitas evidências comprovam que lectinas podem proteger a planta contra insetos e outros herbívoros (Machuka et al., 2000). As lectinas formam um grupo grande de proteínas de heterogêneas que se ligam a carboidratos na superfície de células epiteliais de insetos (Vilalobo & Gabius, 1998). Lectinas com especificidade para resíduos de manose parecem ser tóxicas para muitos insetos, inclusive homópteros, coleópteros e lepidópteros (Foissac et al., 2000). Powell et al., (1993) usaram dietas artificiais para testar uma série de lectinas contra *Nilaparvata lugens*, importante peste de arroz da Ásia. Contra este homóptero, a GNA (manose específica) causou 80% de mortalidade. Esta lectina também promoveu uma significativa redução no crescimento de *Myzus persicae* (homóptero, vulgarmente conhecido como pulgão-verde, de ocorrência freqüente em solanáceas) e reduziu significativamente a fecundidade das fêmeas sobreviventes (Sauvion et al., 1996). A lectina de *G. nivalis* também apresentou efeito inseticida contra larvas de *Lacanobia oleraceae*, membro economicamente importante da família dos lepidópteros, também conhecida como mosca do tomate (Gatehouse et al., 1999). Entretanto contra o coleóptero *C. maculatus*, a GNA exibiu um efeito moderadamente tóxico quando incorporada a 2% (p:p) (Peumans et al., 1995b).

TEL é um dímero contendo cadeias de aproximadamente 20 e 40 kDa, inibida por manose e glicose e ligante em coluna de quitina. Os níveis de quitinase

mostraram-se desprezíveis em testes realizados com 1 mg/ml de proteína. O efeito de TEL sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* foi mensurado através da determinação do número e peso de larvas de 4^o instar em dietas artificiais contendo diferentes concentrações de proteína. O efeito dose-resposta de TEL no crescimento e mortalidade das larvas dos insetos está mostrado nas figuras 14, 15 e 16. A concentração usada da lectina, 0,5 – 2,0% (w/w) ocorre naturalmente em sementes de leguminosas sendo similar àquelas utilizadas em outros trabalhos (Murdock et al., 1990). TEL exibiu um efeito inseticida tanto para larvas de *C. maculatus* quanto para *Z. subfasciatus*, mais marcadamente a 1% de proteína. A LD₅₀ para 1% é compatível com as concentrações utilizadas de WGA e para a lectina de arroz (0,1-1,0%) que causaram 51,7% e 58,5% de mortalidade, respectivamente, sendo as duas lectinas ligantes de quitina e danosas para *C. maculatus* (Huesing et al., 1991a). Outras lectinas de plantas, como a lectina de sementes de laranja, a de amendoim e a de tubérculos de batata, também inibem o desenvolvimento de *C. maculatus* quando incorporadas em sementes artificiais, com concentrações de proteína variando entre 0,1% e 1,0% (Murdock et al., 1990). A aglutinina de *Urtiga dioica*, N-acetilglicosamina específica, também é tóxica para este bruquídeo quando incorporada a 1% em dietas artificiais (Huesing, 1991b).

Na incorporação de 1,0%, o peso das larvas de *Z. subfasciatus* decresceu cerca de 50%. Enquanto outros trabalhos relatam o efeito de lectinas sobre o desenvolvimento de *C. maculatus*, até agora apenas a arcelina, uma lectina-like, foi apresentada uma inibidora do desenvolvimento larval de *Z. subfasciatus* (Cardona et al., 1990; Osborn et al., 1988).

A atividade inseticida de TEL foi totalmente inibida na presença de manose, seu carboidrato mais específico enquanto que a glicose inibiu 25% da sobrevivência e 33% do peso (figura 17), sugerindo que a ligação da lectina-carboidrato seja importante para efeito tóxico observado. Triguéros et al., (2000) recentemente chegou a esta mesma conclusão, quando incubou a lectina de *Lathyrus ochrus* com glicose, seu açúcar específico, e observou um decréscimo na toxicidade contra *Drosophila melanogaster*.

Os mecanismos pelos quais as lectinas exercem efeitos tóxicos sobre insetos estão pouco esclarecidos, mas se sabe que as primeiras moléculas que se ligam a

“receptores” no epitélio do intestino médio, são as responsáveis pelos efeitos sistêmicos subseqüentes (Powell et al., 1998). Outra possibilidade é que as lectinas podem ligar-se a membrana peritrófica na região do intestino médio dos insetos. Essa membrana existe em quase todos os insetos fitófagos e é composta principalmente de resíduos de N-acetilglicosamina e proteínas (Richards & Richards., 1997) e tem como função formar uma barreira de proteção para o epitélio do intestino médio protegendo-o contra partículas abrasivas. As lectinas podem ligar-se a esta membrana e impedir a movimentação de substâncias entre o espaço endo e exoperitrófico ou evitar a formação da própria membrana (Czapla, 1998). As lectinas também podem interferir com as enzimas digestivas acarretando a inibição da digestão dos alimentos e conseqüente absorção (Zhu et al., 1996).

Dependendo de sua resistência à proteólise pelas enzimas intestinais dos insetos e da sua especificidade por receptores de carboidratos, as lectinas podem ligar-se a diferentes partes do intestino médio e causar várias mudanças na função e morfologia (Pusztai et al., 1990). Diante deste fato, foi estudada a susceptibilidade de TEL à ação de papaína, pepsina e enzimas proteolíticas ácidas de homogenatos de intestinos médios de insetos. A digestão de TEL por pepsina (proteínase aspártica) e por papaína (proteínase cisteínica) em pH 6,0 foi estudada como modelo de ação para as proteinases intestinais aspárticas e cisteínicas presentes em *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* alimentados em sementes artificiais feitas com *V. unguiculata* (Lemos et al., 1991). A subunidade de TEL de 40 kDa foi hidrolisada depois de 16 h de incubação com a mistura de pepsina e papaína (1:1) enquanto que a subunidade de 20 kDa foi hidrolisada a partir dos primeiros 16 minutos sob as mesmas condições (figura 19). Os produtos da digestão apresentaram massa molecular relativa entre 4,2 kDa e 20 kDa. Quando incubada com enzimas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* não houve digestão das subunidades de TEL até 16 horas de incubação (figuras 17 e 18), mostrando que as enzimas digestivas desses insetos não são efetivas para essa proteína.

TEL é a primeira lectina da família Sapindaceae que apresenta efeito inibitório para o desenvolvimento de *C. maculatus* sendo também a primeira lectina vegetal a apresentar inibição para *Z. subfasciatus*. A ação de TEL sobre larvas desses dois insetos pode envolver: 1) ligação a glicoconjugados na superfície de células epiteliais

ao longo do trato intestinal, 2) ligação às enzimas glicosiladas provavelmente inibindo sua ação, 3) ligação às estruturas quitinosas do intestino médio dos insetos (Firmino et al., 1996), e 4) a forte resistência de TEL à digestão de proteinases cisteínas e aspárticas presentes em *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.

O rápido desenvolvimento de novas tecnologias na incorporação de genes em uma variedade de cultivares, tem aumentado o interesse na identificação de genes de plantas que conferem resistência à insetos, e na manipulação desses genes para aumentar a capacidade de defesa de plantas contra insetos (Macedo et al., 2000). Assim, o emprego de lectinas para obtenção de plantas transgênicas visando o controle de pragas, seria uma alternativa para o uso de pesticidas químicos (Jouanin et al., 1998).

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que TEL possa ser alvo de estudos mais aprofundados que envolvam sua clonagem e expressão em culturas que sejam atacadas por insetos sobre os quais a lectina de *Talisia esculenta* tenha potencial inseticida. Assim, estaríamos criando biotecnologia para nosso país produzindo vegetais transgênicos e substituindo o tratamento químico, tão nocivo e oneroso ao meio ambiente.

7- CONCLUSÕES

- A lectina de *T. esculenta* inibe *in vitro* o crescimento dos fungos *F. oxysporum* e *C. lindemuthianum* e da levedura *S. cerevisiae*.
- TEL inibe o crescimento *in vitro* das bactérias fitopatogênicas, *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *P. cichorii*, *X. campestris* pv *campestris*, *X. melonis* mas não exibe nenhum efeito sobre *E. chrysanthemi*, *A. avenae* subsp. *citruli*.
- TEL incorporada em dieta artificial reduz a sobrevivência e peso larval de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.
- A atividade inseticida da lectina é totalmente inibida na presença de manose, enquanto que na presença de glicose o efeito inibitório é mais moderado.
- TEL é resistente à digestão enzimática pela ação das enzimas pepsina-papaína e pelas enzimas presentes no intestino médio de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acholo M., Morse S., Macnamara N., Flegg L., Oliver R.P., 1997. Aetiology of yam (*Dioscorea rotundata*) tuber rots held in traditional stores in Nigeria: Importance of *Fusarium* spp. and yam beetle. *Microbiol. Res.* 152 (3): 293-298.
- Allen, A. K., Neuberger, A, Sharon, N., 1973. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.*, 1 31, 155-1 62.
- Archer, B.L., 1960. The proteins of *Hevea brasiliensis* latex. Isolation and characterization of crystalline hevein. *Biochem. J.* 75, 236-240.
- Barkai-Golan, R., Sharon, N., 1978. Lectins as a tool for study of yeast-cell walls. *Exp. Mycol.* 2(1), 110-113.
- Bartnicki-Garcia, S., 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Ann. Ver. Microbiol.* 22,87-107.
- Bartnicki-Garcia, S., 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis *Symp. Soc. Microbiol.* 23, 245-267.
- Beintema, J.J., 1994. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.* 350, 159-163.
- Bento, J. M., 1999. Perdas por insetos na agricultura. *Ação Ambiental* II, 19-21.
- BeMiller, J. N., 1965. Chitin. In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York, v. 5, 103-106.
- Boller, T., 1988. Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants In: *Oxford surveys of plant molecular and cell biology*, Miflin, B.J (ed), Oxford University Press, Oxford, v.5, 145-174.
- Broekaert, W. F., Peumans, W.J., 1986. Lectin release from seed of *Datura stramonium* and interference of *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. In: Bog-Hansen, T.C., Van Driessche, E. (Eds), *Lectin, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 5, Walter de Gruyter, Berlin, pp. 57-65
- Broekaert, W. F., Van Parijs, J., Leyns, F., Joos, H. and Peumans, W J., 1989. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science.* 245: 1100-1102.

- Cardona, C. Kornegay, Posso, J.C.E., Morales, F., Ramirez, H., 1990. Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil, *Entomol. Exp. Appl.*, 56, 197-206.
- Carlini, C.R. & Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40, 1515-1539.
- Carlini, C.R., Oliveira, A.E.A., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., Welis, M. A., 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. *J. Econ. Entomol.*, 90, 340-348.
- Ciopraga, J., Gozia, O., Tudor, R., Brezuica, L., Doyle, R.J., 1999. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochim Biophys Acta*. 1428, 424-432.
- Chapot, M. P., Peumans, W.J., Strosberg, A.D., 1986. Extensive homologies between lectins from non-leguminous plants. *FEBS Lett.* 195, 231-234.
- Chrispeels, M. J., Raikhe, 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defence. *Plant Cell* 3, 1-19.
- Czapla, T. H., 1998. Plant lectins as insect control agents in transgenic plants, In: Taylor and Francis (eds.), *Advances in insect control: the role of transgenic plants*, London, pp. 123-138.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., 1979. *Microbiologia de Davis – fisiologia e genética bacteriana*, vol. 1, 2ª Ed. Editora Harper & Row do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil, 421p.
- Denny, T. P., 1995. Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:173-197.
- Dunkel, F., Lung, P.Z., Chuan, L., Yin, H.F., 1982. Insect and fungal response to sorbic acid-treated wheat during storage in South-China. *J. Econ. Entomol.* 75 (6), 1083-1088.
- Ferreira, A.M., 1960. Subsídios para o estudo de uma praga do feijão (*Zabrotes subfasciatus* Boh. — Coleoptera, Bruchidae) dos climas tropicais. *Garcia de Orta* v.8 (3), 559-581.
- Foissac, X., Loc Thi, N., Christou, P., Gatehouse, A. M. and Gatehouse, J. A., 2000. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *J. Insect Physiol.* 46, 573-583.

- Firmino, F., Fernandes, K.V.S., Sales, M.P., Gomes, V.M., Miranda, M.R.A., Domingues, S.J.S., Xavier-Filho, J., 1996. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structure in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfascitus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 749-756.
- Florack, D.E. A., Stiekema, W.J., 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. Plant. Mol. Biol. 26, 25-37.
- Gaidamashvili, M., van Staden, J., 2002. Lectin-like proteins from South African plant species used in tradicional medicine. South Afric. J. Botany 68, 36-40.
- Gallo, D Nakano, O., Neto, S.S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G. C., Filho, E.B., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C. Lopes, J. R.S, Omoto, C., 2002. Entomologia Agrícola, v 10, FEALQ.
- Gatehouse, A.M.R., Davison, G.M., Stewart, J.N., Gatehouse, L.N., Kumar, A., Geoghegan, I.E., Birch, N.E., Gatehouse, J.A., 1999. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Mysus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. Mol. Breeding. 5, 153-165.
- Habibi, J., Backus, E.A., Huesing, J.E., 2000. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. J. Insect Physiol., 46, 611-619.
- Hackman, R.H., Goldberg, M., 1964. New substrates for use with chitinases. Anal. Biochem. 8, 397-401.
- Hilder V A., Powell, K. S., Gatehouse. A. M. R., Gatehouse, J. A, Gatehouse, L. N, Shi, Y., Hamilton, W. D. O., Merryweather, A., Newell, O., Timans, J. O., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. and Boulter, D., 1995. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. Transgenic. Res. 4, 18-25.
- Hynes, S. O., Hirno, S., Wadström, T., Moran, A.P., 1999. Differentiation of *Helicobacter pylori* isolates based on lectin binding of cell extracts in an agglutination assay. J. Clin. Microbiol. 37(6), 1994-1998.
- Horisberger, M., Rosset, J., 1977. Localization of alpha-galactomannan on surface of *Schizosaccharomyces pombe* cells by scanning electronmicroscopy. Arch. Microbiol. 112 (2), 123-126.

- Horisberger, M., Vonlanthen, M., 1977. Location of mannan and chitin on thin-sections of budding yeasts with gold markers. *Arch. Microbiol.* 115 (1), 1-7.
- Huesing, J. E., Mudock, L.L. Shade, R.E., 1991a. Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin, *Phytochemistry*, 30, 3565-3568.
- Huesing, J. E., Shade, R. E., Chrispeels, M. J., Mudock, L. L., 1991 b. α -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant. Physiol.* 96, 993-996.
- Imms, A.D., 1964. *Outlines of Entomology*. 5th ed. pp. 224. Methuen. London, UK.
- Jansen, O.H., 1976. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black bean on a bruchid beetle. *Science*, 192, 795-796.
- Jouanin, L, Bonade-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Giband, M., 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* 131 1-11.
- Kahane, I., Tully, J.G., 1976. Binding of plant lectins to *Mycoplasma* cells and membranes. *J. Bacteriol.* 128, 1-7.
- Kerin, J., 1994. Opening address. *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*, 17-23, v. 1, 19-20. Canberra, Australia.
- Lara, E. M. *Princípios de resistência de plantas a insetos*, 1991. Ícone Editora LTDA, 2a edição, São Paulo.
- Lemos, F.J.A., Campos, F.A P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1991 Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp Appl.*, 56, 21 9-227.
- Lienard, V., Seck, D., 1994. Review of control methods against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae), a pest of grains of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in tropical Africa. *Insect Sci. Appl.* 15, 3, 301-311.
- Lotan, R., Sharon, N., Mirelman, D., 1975. Interaction of wheat-germ agglutinin with bacterial-cells and cell-wall polymers. *Eur. J. Biochem.* 55 (1), 257-262.
- Mbata, G.N. (1994). Effect of infestation of cultivars of bambarra groundnuts (*Vigna subterranea* (L.) Verde) by *Callosobruchus subinnotatus* (Pic.) (Coleoptera: Bruchidae) on biochemical deterioration and germination of the seeds. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 101: 4, 350-356, citado por Sallam, M.N., 2000. Insect Damage: Damage on Post-harvest In: Mejia, D., Lewis, B., Bothe, C., (Eds.), *Compendium on Post-harvest Operations*, AGSI/FAO.

- Macedo, M.L.R., Fernandes, K.V., Sales, M.P., Xavier-Filho, J., 1995. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*, Braz. J. Med. Biol. Res., 28, 183-190.
- Macedo, M L R., Coelho, M.B., Freire, M.G.M., Machado, O. L.T, Marangoni, S., Novello, J.C., 2000. Effect of a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, Protein Peptide Lett., 17, 25-31.
- Machuka, J.S., Okeola, O.G., Chrispeels, M.J., Jackai, L.E.N., 2000. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer, Phytochemistry, 53, 667-674.
- Manners, O. J., Wright, A., 1962. Alpha-1-4-glucosans - interaction of Concanavalin-A with glycogens. J. Chem. Soc., Pt. 4, 4592.
- Mattos-Guaraldi, A.L., Cappelli, E. A., Previato, J.O., Formiga, L.C., Andrade, A. F., 1999, Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. FEMS Microbiol. Lett. 170(1), 159-166
- Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N., Lotan, R., 1975. inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. Nature, 256, 414-416
- Murdock, L. L., Huesing, J. E , Nielsen, S. S., Pratt, R. C., Shade, R. E. 1990. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. Phytochemistry, 29, 85-89.
- Nieva-Moreno, M. I., Isla, M. I., Sampietro, A. R. And Vattuone, M. A., 1997. Biological activity of the lectin from mature *Cyphomandra betacea* Sendt fruits. Eur. J. Cell. Biol. 74 (suppl 46): 35.
- Oliveira, J.V., Ramalho, M. A.P., Bardin, D., 1977. Avaliação dos prejuízos em feijões *Vigna sinensis* (L). Savi e *Phaseolus vulgaris* (L.) devido ao ataque de *Zabrotes ufascitus* (Boh., 1833) (Coleoptera, Bruchidae). Ecossistema, 2, 19-22.
- Osborn, T.C., Alexander, D. C., Sun, S.S.M., Cardona, Bliss, C.F.A., 1988. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein, Science 240, 207-210.
- Olson, M.O., Liener, I.E., 1967. The association and dissociation of the Concanavalin A, the phytohemagglutinin of jack bean. Biochemistry, 6 (12), 380 1-8
- Paes, N. S., Gerhardt, I.R., Coutinho, M.V., Yokoyama, M., Santana, E., Harris, N., Chrispeels, M.J., Grossi-De-Sá, M.F., 2000. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. J. Insect Physiol., 46: 393-402.

- Peters, W, 1992. Peritrophic membranes. In Zoo Physiology, v. 30, Springer-Verlag, Berlin, Heideiberg.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995 a. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol. 109, 347-352.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1995 b. The role of lectins in plant defence Histochem. J. 27: 253-271.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., 1998. Plant lectins: Versatile proteins with important perspectives in biotechnology. Biotech. Genetic Eng. Rev. 15, 199-229.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Gatehouse, J.A., 1993. Antimetabolic effects of plant lectins and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pest, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. Entomol. Exp. Appl. 66, 119-126.
- Powell, K.S., Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A., Gatehouse, J.A., 1995. Antifeedant effects of plant lectins and enzyme on the adult stage of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Entomol. Exp. Appl. 75, 51-59.
- Powell, K.S, Spence, J., Bharati, J.M., Gatehouse, J. A., Gatehouse, A. M. R., 1998. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal.), J. Insect Physiol., 44 , 529-539.
- Pusztai, A., Ewen, S.W.B., Grant, G., Peumans, W.J., Van Damme, E.J. M., Rublo, L.S., Bardocz, S., 1990. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors. Digestion, 46, 308-316.
- Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W. and Chulavatnatol, M., 2001. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. Plant Science. 160: 739-744.
- Richards, A.G., Richards, P.A., 1997. The peritrophic membranes of insects. Ann. Rev. Entomol., 22: 219-240.
- Rogers, H.J., Perkins, H.R., Ward, J.B., 1980. Microbial cell walls and membranes. Chapman and Hall Ltd., New York, USA.
- Saito, M.L., Lucchini, F., 1998. Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. EMBRAPA.

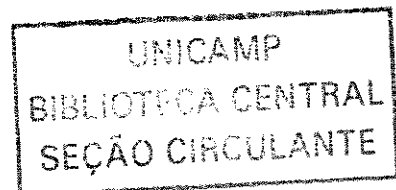
- Sallam, M.N., 2000. Insect Damage: Damage on Post-harvest In: Mejia, D., Lewis, B., Bothe, C., (Eds.), Compendium on Post-harvest Operations, AGSI/FAO (Internet).
- Santos, J.P., Maia, J.D.G and Cruz, I., 1990. Damage to germination of seed corn caused by maize weevil (*Sitophilus zeamais*) and Angoumois grain moth (*Sitotroga cerealella*). Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 25 (12), 1687-1692.
- Santoso, T., Sunjaya, Dharmaputra O.S., Halid, H., Hodges, R.J., 1996. Pest management of psocids in milled rice stores in the humid tropics. Int. J. Pest Man. 42 (3), 189-197.
- Sauvion, N., Rahbe, Y., Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M., Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R., 1996. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Mysus persicae*. Entomol. Appl. 79, 285-293.
- Sequeira, L., Graham, T. L., 1977. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. Physiol. Plant. Pathol. 11: 43-54.
- Siqueira, J.O., Franco, A.A., 1988. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Nagy Ltda, São Paulo, 236 p.
- Silva, A. G. d' A., Gonçalves, C.R., Galvão, D.M., Gonçalves, A.J.L., Gomes, J., Silva, M.N., Simoni, L., 1968. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil: seus parasitas e predadores. Laboratório Central de Patologia Vegetal, v. 1, pt. 2, 381.
- Slifkin, M., Doyle, R.J., 1990. Lectins and their application in clinical microbiology. Clin. Microbiol. Rev. 3,197-218.
- Tellman, R.L., Wijffels, G., Willadsen, P., 1999, Peritrophic matrix proteins. Insect. Biochem. Mol. Biol., 29, 87-101.
- Terra, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 47-61.
- Terra, W.R, Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109B: 1-62.
- Tkacz, J.S., Cybulska, E.B., Lampen, J.O., 1971. Specific staining of wall mannan in yeast cells with fluorescein-conjugated concanavalin-A. J. Bacteriol. 105, 1- 5.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C. L., 2000. Microbiologia 6ª ed., Porto Alegre, Artes Gráficas, 827 p.

- Triguéros, V., Wang, M., Pére, D., Paquereau L., Chavant L., Fournier, D., 2000. Modulation of a lectin insecticidal activity by carbohydrates. Arch. Insect. Bioch. Physiol. 45: 175-179.
- Vilalobo, A., Gabius, H.J., 1998. Signaling pathway for transduction of the initial message of the glycoside into celular responses. Acta Anat., 161, 110-129.
- Van Alebeek F.A.N., Koning C.M., de Korte E.A.P., van Huis A., 1996., Egg-limited functional response of *Uscana lariophaga*, egg parasitoid of bruchid beetle pests in stored cowpea. Entomol. Exp. App. 81 (2): 215-225.
- Van Damme, E.J.M; Peumans, W. J.; Barre, A and Rougé, P., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. Plant Sciences, 17(6): 575-692.
- Van Parijs, J., Joosen, H.M., Peumans, W. J., Geuns, J. M., Van Laere, A. J., 1992. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeen*. Arch. Microbiol. 158, 19-25
- Van Schoonhoven, A., Cardona, C., 1982. Low levels of resistance to the Mexican bean weevil in dry beans. J. Econ. Entomol., 75(4), 567-569.
- Warren, J.R., Kowalski, M.M., 1997. Inhibition of ConA erythroagglutination by alkali-treated lipopolysaccharide. Exp. Cell Res. 107, 462-66.
- Wiendl, F.M., 1975. A desinfestação de grãos e produtos armazenados por meio de radiação ionizante. Piracicaba: CENA, Boletim informativo 18, 0-26.
- Williams, C.B., 1947. The field of research in preventive entomology. Annals of Applied Biology. 34:2, 175-85.
- Wongo, L., 1996. Review of Kenyan Agricultural Research. Post Harvest Technology.v. 11, 30.
- Wright, H.T., Brooks, D.M., Wright, C.S., 1985. Evolution of the multidomain protein wheat germ agglutining. J. Mol. Evol. 21, 133-138.
- Xu, Q., Liu, Y., Wang, X., Gu, H., Chen, Z., 1998. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, Plant Physiol. Biochem. 36, 899-905.

- Yamaoka-Yano, D.M., Mazzafera, P., 1998. Degradation of caffeine by *Pseudomonas putida* isolated from soil under coffee cultivation. *Allelopathy J.* 5(1), 23-34.
- Zhu, K, Huesing, J.E., Shade, R.E., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. , L. L., Murdock, L.L., 1996. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae), *Plant Physiol.* 110, 195-202.

CAPÍTULO III

ESTUDO DA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA
EM CAMUNDONGO INDUZIDA PELA LECTINA DE
SEMENTES DE *T. esculenta*



1- INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais do processo inflamatório

A inflamação é fundamentalmente uma resposta de proteção, cujo objetivo é livrar o organismo tanto da causa inicial da agressão celular (ex., micróbios, toxinas) quanto das conseqüências desta agressão – as células e os tecidos necróticos (Sedgwick & Wiloughby, 1985).

A inflamação é dividida em padrões agudo e crônico. A inflamação aguda tem uma duração relativamente curta, de minutos, algumas horas ou alguns dias, e suas principais características são a exsudação de líquido e de proteínas plasmáticas (edema) e a emigração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos (Williams, 1985). A inflamação crônica, por outro lado, tem uma duração maior e associa-se, em termos histológicos, com a presença de linfócitos e de macrófagos e com proliferação de vasos sangüíneos e de tecido conjuntivo.

As respostas vascular e celular, tanto da inflamação aguda quanto da crônica, são mediadas por fatores químicos derivados do plasma ou de células e desencadeadas pelo estímulo inflamatório. Os mediadores atuam isoladamente, associadamente ou em seqüência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução. A inflamação fica concluída quando o estímulo agressor é removido e os mediadores se dissipam ou são inibidos (Sedgwick & Wiloughby, 1985).

A inflamação aguda é a resposta imediata e inicial a um agente agressor. Uma vez que dois componentes defensivos principais – os anticorpos e os leucócitos – são normalmente transportados na corrente sangüínea, fica claro que os fenômenos vasculares desempenham um papel destacado na inflamação aguda. A inflamação aguda compreende três componentes principais: (1) alterações no calibre vascular, que conduzem a um aumento do fluxo sangüíneo; (2) alterações estruturais na microvascularização, que permitem que as proteínas plasmáticas e os leucócitos deixem a circulação; e (3) emigração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo

nos focos de agressão (Williams et al., 1985; Ricevut & Mazzone, 1987; Moncada et al., 1991).

Uma das funções cruciais da inflamação é a de levar leucócitos à região agredida. Os leucócitos ingerem os agentes agressores, destroem as bactérias e outros micróbios e degradam o tecido necrótico e os antígenos estranhos. Infelizmente, os leucócitos também podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual mediante a liberação de enzimas, de mediadores químicos e de radicais livres do oxigênio (Dale & Foreman, 1989).

A seqüência de eventos na jornada dos leucócitos da luz do vaso para a tecido intersticial, denominada de extravasamento, pode ser dividida nas seguintes etapas: (1) intraluminais: marginação, rolagem e adesão; (2) transmigração através do endotélio (também denominada de diapedese); e (3) migração nos tecidos intersticiais na direção do estímulo quimiotático (Rossi & Hellewell, 1994).

No sangue que está fluindo normalmente, os eritrócitos e os leucócitos ficam confinados a uma coluna axial central e deixam em contato com o endotélio uma camada de plasma pobre em células. À medida que o fluxo torna-se lento no início da inflamação (como decorrência do aumento da permeabilidade vascular), os leucócitos saem da coluna central e assumem uma posição periférica, passando a margear a superfície endotelial. Este processo inicial, denominado marginação, é causado em grande parte por alterações nas condições hemodinâmicas geradas pela baixa e lenta circulação sangüínea. Posteriormente, leucócitos isolados e, em seguida, fileiras de leucócitos deslocam-se lentamente ao longo do endotélio e aderem transitoriamente (um processo denominado de rolagem) e, finalmente, interrompem seu trajeto em algum ponto onde possam aderir firmemente. Com o tempo, o endotélio pode ser praticamente recoberto por leucócitos e adquire um aspecto "pavimentado". Após a fase de adesão firme, o leucócito insere pseudópodos nas junções entre as células endoteliais, se espreme através das junções endoteliais e passa a se posicionar entre as células endoteliais e a membrana basal. Por fim, atravessa a membrana basal e escapa para o espaço extravascular. Tanto neutrófilos quanto monócitos, linfócitos e eosinófilos e basófilos empregam este trajeto (Butcher, 1991).

O tipo de leucócitos que emigra varia com a idade da lesão inflamatória e com o tipo do estímulo. Na maioria das formas de inflamação aguda, predominam neutrófilos no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 h, mas estes são substituídos em 24 a 48 h pelos monócitos. Além disso, os neutrófilos, que têm uma sobrevivência curta, desintegram-se e desaparecem após 24 a 48 h, enquanto os monócitos sobrevivem por mais tempo. A melhor forma de explicar esta sequência seria pela ativação de diferentes pares de moléculas de adesão e fatores quimiotáticos nas várias fases da inflamação (Dale & Foreman, 1989).

O recrutamento de leucócitos para os sítios de inflamação aguda envolve uma ação combinada de múltiplas famílias de moléculas de adesão celular (CAMs) envolvidas na ligação de leucócitos com outros leucócitos, células endoteliais e ainda com componentes da matriz extracelular. As CAMs envolvidas nas interações adesivas entre células no processo inflamatório foram classificadas em três famílias distintas: integrinas, imunoglobulinas e selectinas (Cronstein & Weissmann, 1993). A família das selectinas (L-, E- e P-selectina) é constituída de proteínas de superfície celular que interagem com carboidratos presentes em leucócitos e/ou células endoteliais, possibilitando a interação adesiva dos leucócitos com o endotélio vascular ativado. Devido ao fato de todos os membros desta família apresentarem um domínio lectínico N-terminal, são capazes de mediar a adesão entre células, através do reconhecimento específico de um carboidrato na superfície celular da célula alvo (Tedder et al., 1995). A regulação na expressão das moléculas de adesão e de sinalização pode modular o recrutamento e ativação dos leucócitos em tecidos inflamados (Chao et al., 1997).

Após o extravasamento, os leucócitos emigram nos tecidos em direção à região da agressão por um processo denominado quimiotaxia, definido como a locomoção orientada através de um gradiente químico. Todos os granulócitos, monócitos e, em grau menor, linfócitos respondem a estímulos quimiotáticos com taxas variáveis de velocidade (Dale & Foreman, 1989).

Tanto substâncias exógenas quanto endógenas podem atuar como quimioatratores. Suas substâncias são denominadas mediadores da inflamação e podem ser formadas concomitantemente ou sequencialmente e atuam amplificando e influenciando a evolução da resposta inflamatória. Os agentes exógenos mais

comuns são os produtos bacterianos. Como exemplos de mediadores químicos endógenos, podemos citar os fatores químicos derivados do plasma - componentes do sistema complemento, em especial C5a e bradicinina - ou de células - histamina, serotonina, prostaglandinas, PAF (platelet-activating factor), produtos da via da lipoxigenase, basicamente o leucotrieno B₄ (LTB₄), citocinas (principalmente IL-1, TNF α , IL-8) (Bauhmann & Gauldie, 1994; Ferencík & Stvrtinová, 1996). O óxido nítrico (NO), gás solúvel de radical livre, produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios é um potente mediador da inflamação, desempenhando papéis importantes, entre os quais estão a redução da agregação plaquetária, vasodilatação e citotoxicidade para determinados micróbios e células tumorais (Moncada et al., 1991).

Mas, de que forma o leucócito identifica os agentes quimiotáticos e como estas substâncias induzem um movimento celular dirigido? Muito embora nem todas as respostas sejam conhecidas, já foram identificadas várias etapas importantes. A ligação de agentes quimiotáticos a receptores específicos nas membranas celulares leucocitárias resulta na ativação da fosfolipase C (mediada por proteínas G peculiares), que conduz à hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) até inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) e à liberação de cálcio, inicialmente a partir de locais de armazenamento intracelulares e, posteriormente, mediante o ingresso de cálcio extracelular. É o aumento do cálcio no citossol que desencadeia a agregação de elementos contráteis responsáveis pelo movimento celular (Collins, 1995).

A fagocitose e a liberação de enzimas por macrófagos e por neutrófilos constituem dois dos principais benefícios derivados do acúmulo de leucócitos no foco inflamatório. A fagocitose envolve três etapas distintas, porém inter-relacionadas: reconhecimento e acoplamento da partícula a ser ingerida pelo leucócito; seu englobamento com subsequente formação de um vacúolo fagocitário; e destruição ou degradação de material ingerido (Maldonado et al., 1998).

De um modo geral, a inflamação aguda pode apresentar um dentre quatro desfechos (Wahl, 1997):

1. Espera-se que, todas as reações inflamatórias, uma vez que tenham tido êxito na neutralização do estímulo agressor terminem com a restauração à normalidade da região de inflamação aguda (resolução) que é o desfecho habitual quando a agressão é limitada e de curta duração, ou quando ocorre um grau pequeno de destruição tecidual. A resolução envolve a neutralização dos mediadores químicos e um posterior retorno à normalidade da permeabilidade vascular bem como a interrupção da cessação da infiltração leucocitária e, finalmente, a remoção do líquido de edema e de proteínas, de leucócitos, corpos estranhos e restos necróticos do local da inflamação.

2. A cura por substituição da região inflamada por tecido conjuntivo (fibrose), que ocorre quando o grau de destruição tecidual tiver sido significativo, quando a agressão inflamatória incidir sobre tecidos que não se regenerem ou quando existir uma exsudação fibrinosa abundante. Quando o exsudato fibrinoso no tecido ou em cavidades serosas (pleura, peritônio) não é absorvido adequadamente, o tecido conjuntivo cresce na região do exsudato, convertendo-a em uma massa de tecido fibroso – um processo também denominado de organização.

3. Formação de abscesso, que ocorre especialmente nas infecções por organismos piogênicos.

4. A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica que ocorre quando não é possível resolver a resposta inflamatória aguda, seja pela persistência do agente agressor, seja por alguma interferência no processo normal de cura.

1.2- A migração de leucócitos e as lectinas vegetais

Algumas lectinas vegetais podem mimetizar a ação das lectinas endógenas de mamíferos e induzir a migração de neutrófilos e células mononucleares tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Bento et al., 1993; Santos de Oliveira et al., 1994). Lectinas isoladas de *Dioclea grandiflora* (Moreira et al., 1983), *Canavalia brasiliensis* (Moreira et al., 1984) e aglutinina de soja (Benjamin et al., 1997) induzem inflamação *in vivo* caracterizada por exsudação de proteína e migração de neutrófilos, em ratos, de modo dose-dependente (Bento et al., 1993). Outros estudos têm demonstrado que diferentes lectinas de plantas são potentes mitógenos, induzindo a proliferação *in vitro* de linfócitos humanos independentemente da produção de citocinas (Borreback & Carlson, 1989). Em camundongos, a lectina isolada de *D. grandiflora* induz uma reação inflamatória cutânea acompanhada de influxo de leucócitos polimorfonucleares (Silva Lima et al., 1993).

A migração de neutrófilos para o tecido afetado é a marca da inflamação aguda. O recrutamento dessas células envolve um processo complexo e multi-mediado que inclui interações seqüenciais entre células, células endoteliais e componentes da matriz extracelular (Malik & Lo, 1996). O controle desses mecanismos envolve tanto a ativação dos receptores de adesão presente nas células endoteliais como nas células sangüíneas, bem como a expressão de novas moléculas de adesão na superfície celular. O passo crucial na migração de neutrófilos depende da ligação destes às selectinas expressas tanto por eles próprios quanto pelas células endoteliais ativadas por mediadores inflamatórios (Kansas, 1996).

Asseury et al., (1997), propuseram que a atividade competitiva de lectinas de plantas com as selectinas, por sítios de ligação glicosilados na superfície de células endoteliais, membranas de leucócitos e/ou componentes da matriz extracelular pode expandir as investigação sobre o emprego de lectinas vegetais com funções análogas às selectinas. Santos de Oliveira et al., 1994 sugeriram que KM+, lectina manose-ligante extraída de *Artocarpus integrifolia*, pode, através de um sítio ligante de carboidrato interagir com um açúcar presente na superfície de neutrófilos e com outro, ligar-se a glicoconjugados na matriz extracelular. A interação de KM+ com a

matriz extracelular, pode gerar um gradiente de substrato necessário ao direcionamento de neutrófilos para o sítio de inflamação.

Já foi demonstrado que o efeito inflamatório e antiinflamatório induzido por lectinas vegetais pode ser revertido seletivamente por açúcares específicos, reforçando desta forma a importância dos carboidratos nos processos inflamatórios leucócito-dependente (Santos de Oliveira, 1994; Assreuy et al., 1997).

Pelo fato das selectinas apresentarem um domínio lectínico, sugere-se que a resposta inflamatória possa ser controlada pela competição entre lectinas vegetais e selectinas por glicoconjugados, inibindo ou controlando a migração de leucócitos para o local da inflamação. Estas abordagens acarretam a investigação do possível efeito pró-inflamatório da lectina manose/glicose-ligante extraída de sementes de *T. esculenta*.

2- OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1- Avaliar o efeito de TEL sobre a migração de neutrófilos e células mononucleadas bem como sobre a formação de edema de pata em camundongo.
- 2- Verificar o efeito de resíduos de monossacarídeos sobre o efeito pró-inflamatório e edematogênico em camundongo.
- 3- Verificar a possibilidade de TEL induzir a produção de óxido nítrico por células mononucleares de camundongo.

3- MATERIAIS

As sementes de *Talisia esculenta* foram coletadas no Estado de Ceará. Os açúcares D-glicose e D- galactose foram obtidos da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.1- Animais

Foram usados camundongos Swiss, machos, pesando 25 a 30 g, provenientes do Centro Multi-Institucional de Bioterismo da UNICAMP. Esses animais foram transferidos para o Biotério de Departamento de Farmacologia, pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos a 24 °C, com iluminação diária de 12h, com água e alimentação.

4- MÉTODOS

4.1- Efeito da injeção da lectina de *T. esculenta* em induzir migração de neutrófilos e células mononucleares para bolsa de ar em camundongos

Foram produzidas bolsas de ar subcutânea em camundongos como descrito previamente (Edwards et al., 1981). Para isso, os animais foram anestesiados com éter, tiveram o seu dorso raspado e 5 ml de ar estéril foram injetados. Três dias após, a cavidade formada foi mantida injetando-se mais 2,5 ml de ar estéril. Seis dias depois da injeção de ar, os animais tratados receberam 0,1 ml de soluções de TEL (10- 40 µg) enquanto que os animais controle receberam 0,1 ml de PBS estéril. A migração de neutrófilos e células mononucleares foi avaliada 8, 16, 24, 48 e 72 h depois da injeção dos estímulos. Para isso, os animais foram sacrificados, sendo a cavidade peritoneal lavada em seguida com 3 ml de PBS contendo heparina (5UI/ml) e soro albumina bovina a 0,1%. Após leve massagem, retirou-se o maior volume possível do lavado.

A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando-se 20 µl do lavado, diluídos em 400 µl de solução de Turk. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada após a confecção de lâminas, sendo que para

isto 80 µl do lavado foram centrifugados em citocentrífuga. As lâminas foram coradas a seguir, com corante May-Grünwalds e a leitura feita em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes (objetiva de imersão em óleo). Em cada lâmina foram contadas as células, diferenciando neutrófilos e células mononucleares. O número de cada tipo celular foi calculado a partir da porcentagem encontrada, em relação ao número total de células.

4.2- Efeito da injeção intraperitoneal da lectina de *T. esculenta* em induzir migração de neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal de camundongos

A migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos foi avaliada de acordo com técnica descrita por Souza et al., 1988. Para isto, os animais foram divididos em grupos (n=5), sendo que o grupo controle recebeu injeção peritoneal de 0,1 ml do veículo (PBS) e os grupos tratados receberam 0,1 ml de soluções de TEL (5-100 µg/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4, 8, 16, 24 e 48, 72 e 96 h após a injeção da lectina, seguindo a metodologia descrita no item 4.1.

4.3- Efeito da injeção intraplantar subcutânea da lectina de *T. esculenta* em induzir edema em pata em camundongos

A lectina de *T. esculenta* (12,5 - 200 µg em 0,1 ml) ou salina estéril (0,1 ml) foram injetadas por via intraplantar subcutânea. Após 4 horas, os animais foram sacrificados, as patas amputadas e pesadas numa balança analítica. O edema, expresso em mg, foi avaliado como a diferença de peso entre a pata da direita (tratada com lectina) e a esquerda (controle).

4.4- Efeito de açúcares sobre a migração de neutrófilos e edema de pata em camundongos, induzido pela lectina de *T. esculenta*

TEL foi administrada pelas vias intraperitoneal (i.p.) e intraplanar subcutânea, isoladamente ou em associação com 0,1 M de açúcares específicos (D-glicose e D-manose) e não específico (D-galactose). A lectina foi incubada com os diversos açúcares por 2 horas, a 37 °C e logo após injetada nos animais. Foram feitos quatro grupos controle: um que recebeu PBS estéril i.p. (100 µl) e outros três que receberam carboidratos isolados i.p. (100 µl). A migração foi avaliada 4 horas após os tratamentos.

4.5 - Produção *ex vivo* de NO por células peritoneais de camundongo induzidas por lectina de *T. esculenta*

A produção de NO por células peritoneais de camundongo, induzidas por TEL foi avaliada de acordo com a técnica descrita Andrade et al., 1999.

4.5.1- Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Grupos de 3 a 5 camundongos foram injetados ip com 12,5, 25, 50 e 100 µg de lectina diluída em PBS, com PBS sozinho como controle negativo e com LPS (5 µg/camundongo) como controle positivo. O pool de cels peritoneais foi obtido depois de 2 dias da inoculação.

As células foram obtidas por lavagem da cavidade peritoneal (2 vezes com 5 ml de solução salina 0,9% estéril) de animais pré-tratados com a lectina. O lavado peritoneal foi centrifugado (1500 rpm/min) e o sobrenadante descartado. As células foram então lavadas por 3 vezes com solução salina e ressuspensas em RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio) contendo 10% de soro fetal bovino, 10 nM de HEPES (SIGMA), 100 UI/ml de penicilina (SIGMA) e 100 ug/ml de streptomicona (SIGMA) num volume fixo (1 ml). A seguir realizou-se a contagem total, determinando-se o número de células por ml. A partir desse dado foram feitas diluições para a obtenção de 10⁶ células/ml.

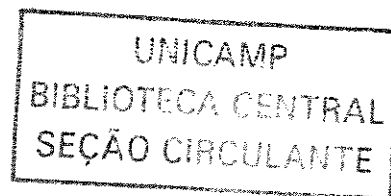
4.5.2- Dosagem *in vitro* de nitrito (NO_2^-)

Amostras de 0,5 ml da suspensão celular (1×10^6 células/ml) foram dispensados em cada poço de placas de cultura de plástico de 24 poços, colocadas para aderir por 48 horas, em câmara de cultura a 37°C , em ambiente umidificado, sem a adição de nenhum estímulo.

Após este período de incubação, alíquotas de 50 μl dos sobrenadantes foram transferidos para uma placa de leitura (96 poços) onde adicionou-se o Reagente de Griess na proporção de 1:1 (v/v). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica em leitor de Elisa a 546 nm. Os valores de leitura foram comparados com os da curva padrão de NaNO_2 (5-80 μM) e os resultados expressos em μM de nitrito liberados por 1×10^6 macrófagos.

4.6- Análise estatística

A partir dos dados experimentais foram calculadas as médias $\pm$ EPM de um certo número de eventos (n) em cada grupo. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) e teste "t" Student para múltiplas comparações. O $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.



5- RESULTADOS

5.1- Efeito do tratamento intraperitoneal da lectina de *T. esculenta* sobre a migração de neutrófilos e células mononucleares para diferentes cavidades de camundongo

Injeções de TEL (10 a 40 μ g) em bolsa de ar produziram o acúmulo de neutrófilos de modo dose-dependente (figura 1 A), com o máximo de resposta em 16 horas, retornando aos níveis de controle após 72 horas (figura 1B). A lectina, nas mesmas concentrações, induziu um acúmulo dose-dependente de células mononucleares para bolsa de ar (figura 3A) com um efeito máximo depois de 24 horas (figura 3B).

A figura 2A apresenta o efeito de TEL (5-100 μ g) induzindo a migração de neutrófilos de forma dose-dependente, quando injetada na cavidade peritoneal de camundongos, sendo que o máximo da migração ocorreu 16 horas após a administração da lectina, retornando aos níveis de controle após 48 horas (figura 2B). Também foi observado o efeito dose-resposta de TEL sobre a migração de células mononucleares nesta mesma cavidade (figura 4A), com um máximo de resposta após 48 horas (figura 4B).

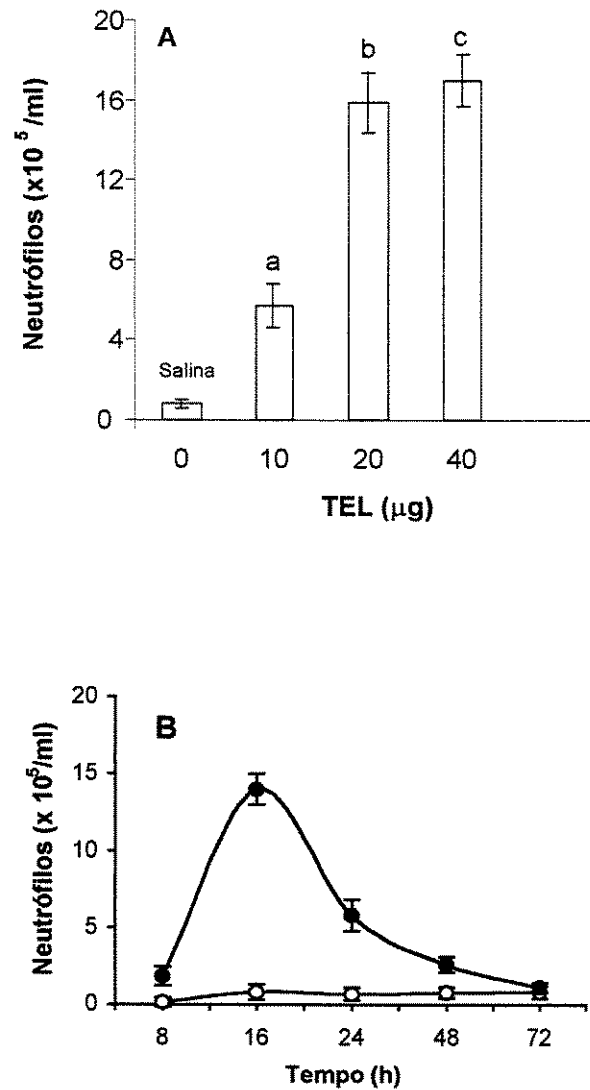


Figura 1 - Efeito de TEL sobre a migração de neutrófilos para bolsa de ar em camundongos. (A) curva dose-resposta da migração de neutrófilos induzida por TEL 16 horas após a adição do estímulo; (B) cinética da migração de neutrófilos induzida por TEL (20 μg, símbolos fechados) ou por salina (símbolos abertos). Cada barra representa a média de 5 animais. As letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$ Test "t" Student).

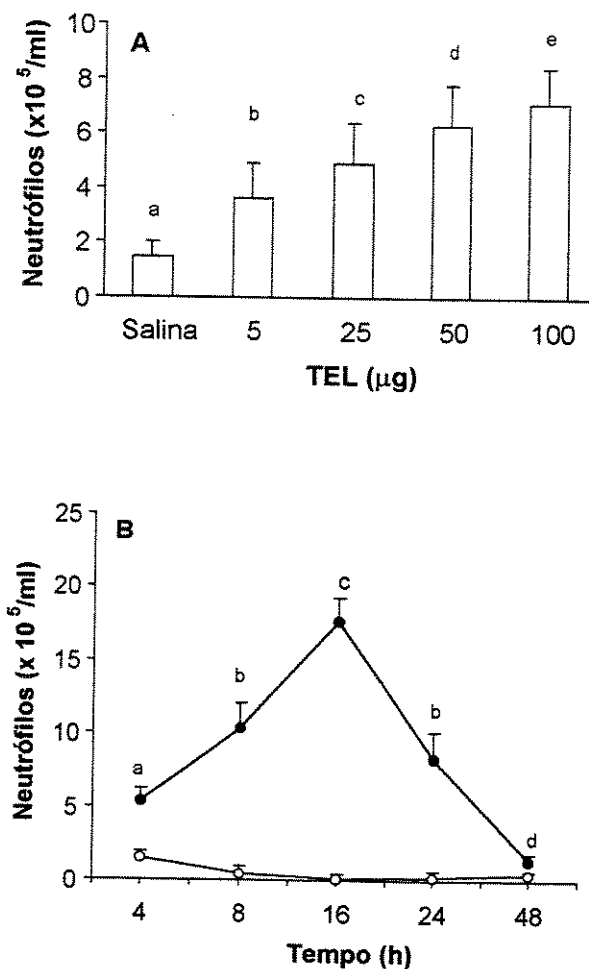


Figura 2- Efeito de TEL sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos. (A) curva dose-resposta da migração de neutrófilos induzida por TEL 4 horas após a adição do estímulo; (B) cinética da migração de neutrófilos induzida por TEL (20 µg, símbolos fechados) ou por salina (símbolos abertos). Cada barra representa a média de 5 animais. As letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$ Test "t" Student).

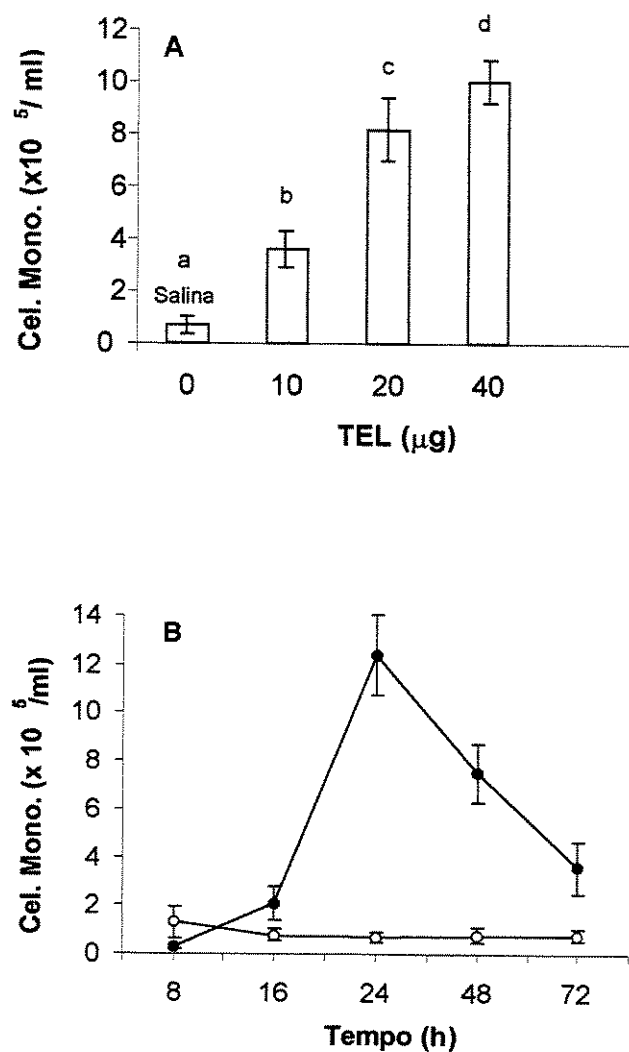


Figura 3 - Efeito de TEL sobre a migração de células mononucleares para bolsa de ar em camundongos. (A) acúmulo dose-dependente de células mononucleares induzidas por TEL após 24 horas das injeções; (B) cinética da migração de células mononucleares induzidas por TEL (50 μg , símbolos fechados) ou por salina (símbolos abertos). Cada barra representa a média de 5 animais. As letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$ Test "t" Student).

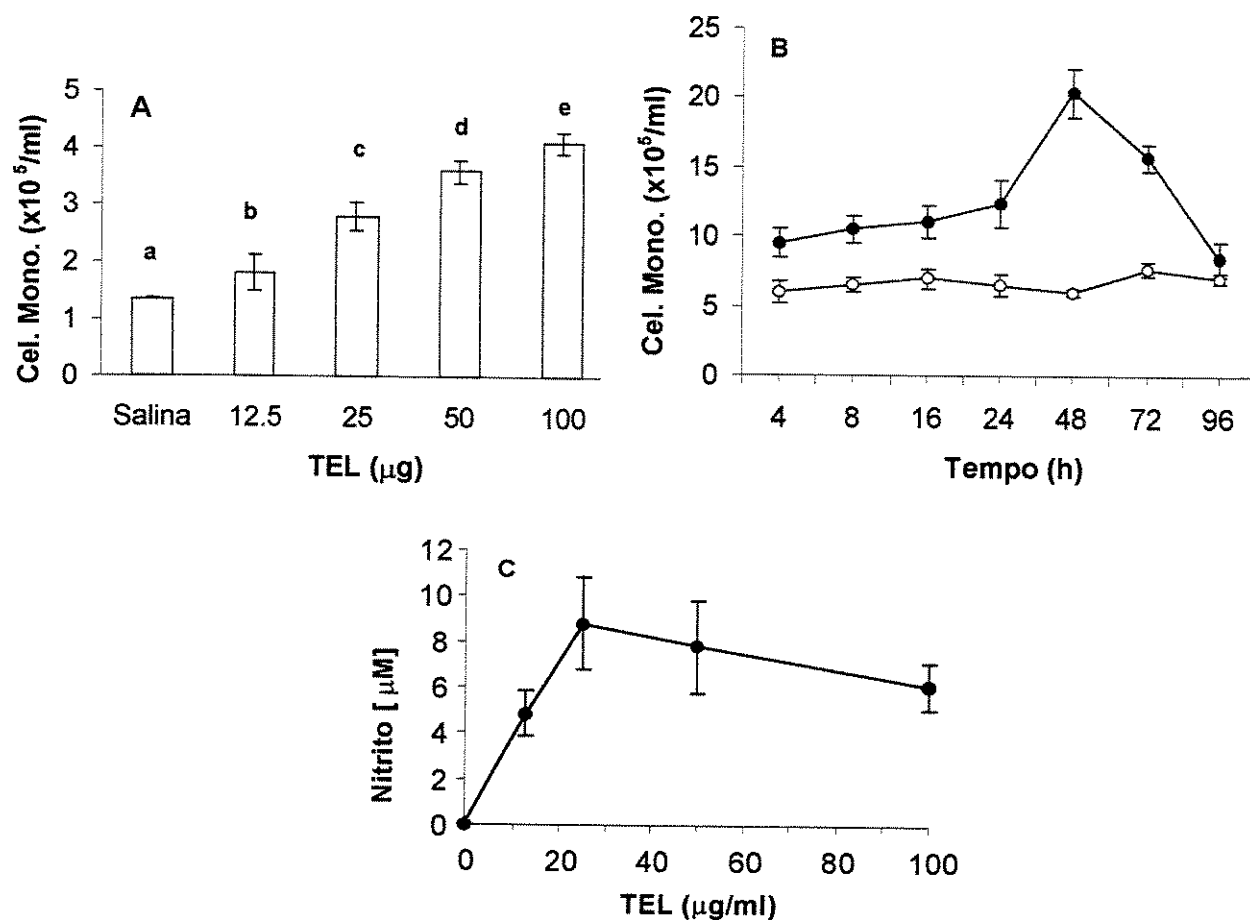


Figura 4. Efeito de TEL sobre a migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal de camundongos. (A) efeito dose-resposta de TEL após 48 horas da injeção do estímulo. (B) cinética de acúmulo de macrófagos induzidos por TEL (50 μg , símbolos fechados) ou por salina (símbolos abertos). (C) produção ex vivo de NO por células mononucleares estimuladas por TEL: um pool de células peritoneais foi coletado e cultivado *in vitro*, por 48 horas, sem novos estímulos. O controle positivo (LPS) e o negativo (PBS) não estão mostrados na figura. Cada barra representa a média de 5 animais. As letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$ Test "t" Student).

5.2- Efeito da injeção subcutânea intraplantar da lectina de *T. esculenta* na indução de edema de pata

A figura 5A mostra o efeito edematogênico de TEL, com doses variando de 12,5 a 200 $\mu\text{g/pata}$, avaliado 4 horas depois da injeção da lectina.

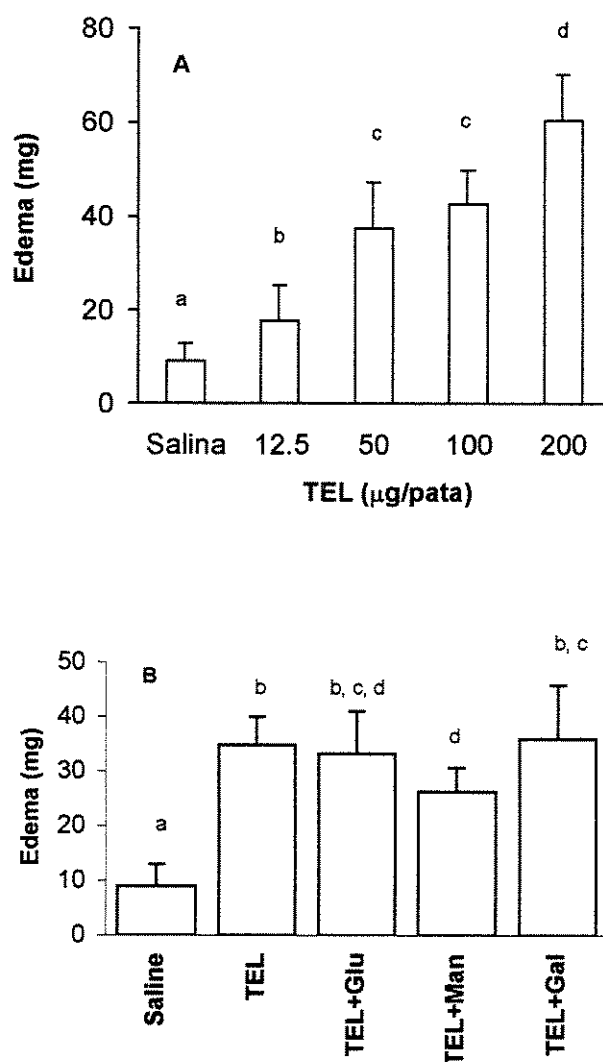


Figura 5- Edema de pata induzido por TEL. (A) edema causado por doses variando de 12,5 a 100 $\mu\text{g/pata}$ analisado 4 horas após o estímulo. (B) efeito inibitório de carboidratos (0,1 M) sobre o edema de pata. As letras iguais indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$ Test "t" Student).

5.3- Efeito de carboidratos sobre a migração de neutrófilos e edema de pata induzidos pela lectina de *T. esculenta*

D-manose, mais intensamente que D-glicose, inibiu acentuadamente a migração de neutrófilo na cavidade peritoneal (figura 6A). Resultados de inibição semelhantes foram obtidos para o modelo de bolsa de ar (figura 6B). O carboidrato D-galactose (Gal) não apresentou efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos para as duas cavidades (figura 6A,B). Quando injetados isoladamente, os três carboidratos não causaram aumento significativo na migração de células.

Injeções intraplantar dos três carboidratos isolados (0,001 M) não causaram edema de pata significativo. Quando TEL (50 μ g) foi co-injetado com D-manose, observou-se pequena inibição do edema. D-glicose nem D-galactose (figura 5B) diminuíram de forma significativa o edema.

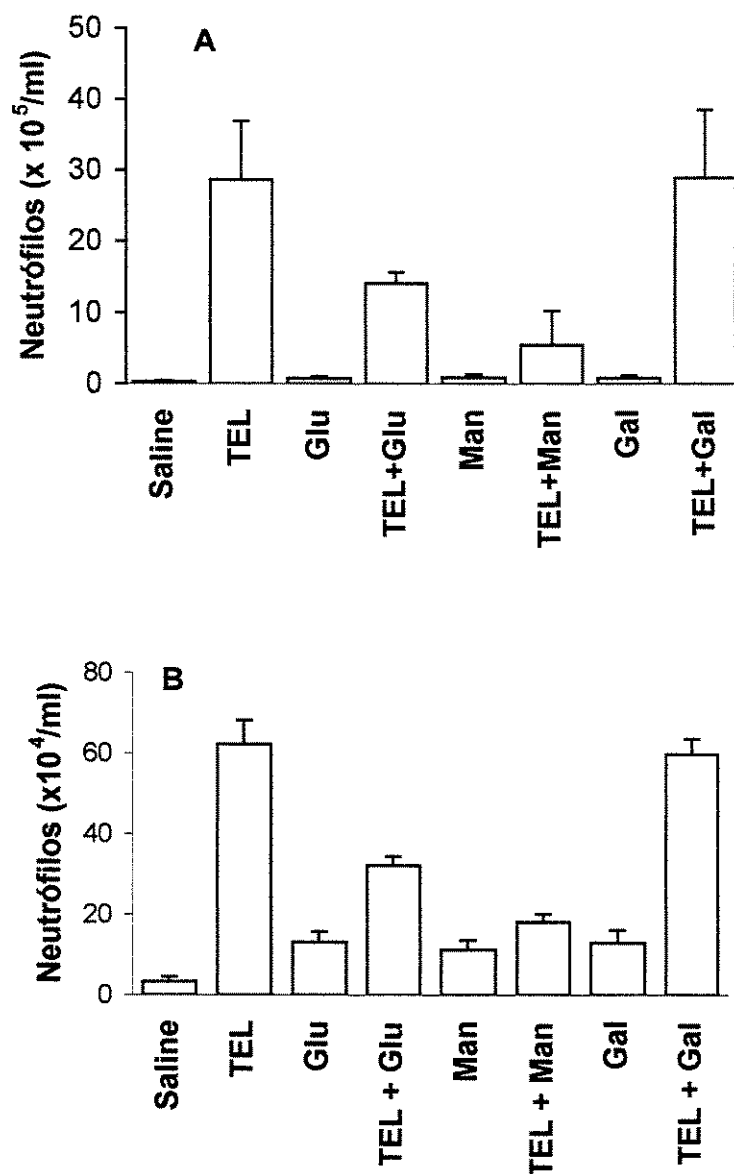


Figura 6. Efeito inibit3rio de carboidratos na indu33o de neutr3filos mediada por TEL. (A) migra33o de neutr3filos para a cavidade peritoneal; (B) ac3mulo de neutr3filos em bolsa de ar. A migra33o foi avaliada 4 horas ap3s a inje33o de TEL simultaneamente ou/n3o com diferentes carboidratos. As letras iguais indicam que n3o h3 diferen3a significativa ($p < 0,05$ Test "t" Student).

5.4- Produção *ex vivo* de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos induzidas por lectina de *T. esculenta*

TEL (12,5–100 µg) estimulou as células mononucleares a produzirem NO de forma dose-dependente (figura 4C) quando investigadas 48 horas após o estímulo. Os níveis de NO produzidos em resposta a 20 ng de LPS (controle positivo) foram de 6,12 µM.

6- DISCUSSÃO

A lectina de *T. esculenta* foi capaz de estimular a migração de neutrófilos em camundongos, quando injeções de 20 a 50 µg TEL foram aplicadas tanto em bolsa de ar quanto em cavidade de peritoneal de camundongo, induzindo $14,1 \pm 1,0 \times 10^5$ e $17,7 \pm 1,6 \times 10^5$ neutrófilos/ml, respectivamente. Comportamento semelhante foi encontrado para a lectina de sementes de *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* (Moraes et al., 1996) e *Artocarpus integrifolia* (KM+) (Santos-de-Oliveira et al., 1994), primeira lectina de planta conhecida por ser um agente quimioatraente para neutrófilos. TEL também se mostrou capaz de induzir a migração de células mononucleares de forma dose dependente, tanto em bolsa de ar ($12,5 \pm 2$) quanto em cavidade peritoneal de camundongos ($20,0 \pm 1,0$), nas concentrações de 20 µg e 50 µg, respectivamente. A ligação da lectina a carboidratos específicos na superfície de neutrófilos, provavelmente, não é apenas o sinal para o mecanismo de migração mas também para a atração de neutrófilos (Dias-Baruffi et al., 1994). Santos-de-Oliveira et al., (1994) sugeriram que uma lectina poderia interagir ao mesmo tempo com um carboidrato na superfície de neutrófilo e com um glicoconjugado na matriz de extracelular, possibilitando desta forma a movimentação do neutrófilo do vaso até o sítio da inflamação.

O efeito inibitório de carboidratos co-injetados com lectinas, mostra que a ação pró-inflamatória destas proteínas, está relacionada às propriedades específicas de ligação a açúcar (Ofek et al., 1996). A atividade aglutinante de TEL foi inibida preferencialmente, por D-manose (concentração inibitória mínima igual a 0,39 mM), seguida de D-glicose e N-acetilglicosamina (3,5 e 6,2 mM, respectivamente), enquanto que a D-galactose não apresentou nenhum efeito inibitório (Freire et al., 2002). A migração de neutrófilos e de células mononucleares foi significativamente inibida por D-manose (80%) e um pouco menos por D-glicose (51%). Resultados similares foram encontrados com as lectinas de *Canavalia ensiformes* (ConA) e *Dioclea grandiflora* (DGL) que sofreram bloqueio da atividade próinflamatória quando incubadas com carboidratos específicos (Bento et al., 1993). Benjamim et al. (1997) também estudaram uma reação inflamatória aguda induzida por lectina de feijão-soja (SBA) em cavidade peritoneal de rato. Esta reação foi caracterizada por intensa

migração de neutrófilos e extravasamento de fluido e foi inibida por um pré-tratamento com glicocorticóides, por um antagonista de PAF (fator de ativação plaquetária) ou através de inibidores de lipoxigenase. Este efeito foi completamente bloqueado quando a lectina foi injetada com seus carboidratos específicos. Os autores sugeriram que o acúmulo de neutrófilos induzido por SBA, foi dependente de suas propriedades ligantes de carboidrato, que provavelmente ativam leucotrienos e a biossíntese de PAF, podendo contribuir para a migração.

A habilidade comprovada de algumas lectinas para ativar mecanismos de defesa confirmam a hipótese que as interações de lectina-carboidrato podem causar imunomodulação (Rosen, 1993). O aumento no espriamento de macrófagos, o crescimento da produção de H_2O_2 (Rodriguez et al., 1992) e de óxido nítrico, são três parâmetros de ativação de macrófagos (Andrade et al., 1999). Rodriguez et al., (1992), mostraram que Con Br (*Canavalia brasiliensis* lectin) e DGL provocam estimulação peritoneal de macrófagos caracterizada por rápido espriamento em superfície de vidro e produção de peróxido de hidrogênio bem como o acúmulo de leucócitos (Rodriguez et al., 1992). Células mononucleares obtidas de camundongos pré-tratados com TEL, foram estimuladas a produzir óxido nítrico. Os níveis de NO produzidos em resposta aos estímulos de TEL (8,8 μM) foi ligeiramente menor aos encontrados para DLG (12 μM), ConA (14 μM) e ConBr (20 μM), mas bastante inferior ao induzido por PAA (*Pisum arvense* lectin), 45 μM , em resposta a 25 μg de cada lectina/animal (Andrade et al., 1999). Esses autores mostraram que os níveis de NO induzidos por PAA, ConA e ConBr aumentaram significativamente quando células aderentes e não aderentes foram cultivadas em conjunto. O mecanismo sugerido neste experimento pode envolver ao mesmo tempo o $INF\gamma$ e o $TNF\alpha$ e/ou produtos bacterianos como o LPS, capazes de promover a ativação de genes que induzam a expressão da NO sintase induzida (iNOS) (Oswald et al., 1994).

O edema de pata induzido por TEL foi dose-dependente com um máximo de efeito após quatro horas. D-manose reduziu o efeito edematogênico induzido por TEL em 24% e glicose um pouco menos D-glicose. Esse resultado sugere que as diferenças na atividade inibitória possam estar relacionadas à diferença de afinidade de TEL por grupos glicosilados presentes na superfície celular. Bento et al., (1993), estudaram a capacidade das lectinas DGL e ConBr de induzir edema de pata em

ratos, fenômeno que também foi bloqueado por açúcares. Esses autores propuseram que a atividade edematogênica causada por lectinas poderia ser um fenômeno mediado, nos primeiros minutos, por histamina e serotonina e durante o decorrer do processo, por metabólitos do ácido araquidônico.

TEL apresentou efeito edematogênico, dose-dependente, afetado diferentemente por seus açúcares específicos. Esse resultado sugere que essa diferença possa estar relacionada à diferenças de afinidade de TEL por grupos glicosil presentes na superfície celular.

A atividade biológica que certas lectinas apresentam de ativar certos mecanismos de defesa, sugere a hipótese que interações lectina-carboidrato podem causar imunomodulation (Rosen, 1993). O aumento no espriamento de macrófagos, o crescimento na produção de H_2O_2 e de óxido nítrico (NO) (Rodriguez et al., 1992) são os três parâmetros de ativação (Andrade et al., 1999). Recentemente, Lima et al. (1999), depois incubar, *in vitro*, células de baço de ratos por 24 h com *Pisum sativum* agglutinin (PSA), adicionaram o sobrenadante dessa cultura sobre culturas de macrófagos e observaram a produção de NO por estas células, de modo dose-dependente. Experimentos *ex vivo* com Con A, Con Br, DGL e PAA mostraram que células de animais pré tratados com lectina sustentam, *in vitro*, a produção de NO, sem estímulos adicionais. Baseando-se nos dados de literatura, deu-se início a investigação de TEL com relação à produção de NO por células peritoniais de camundongo e observou-se que a produção de NO (9 μM) foi ligeiramente menor a que encontrada para Con A (14 μM), Con Br (20 μM) e DLG (12 μM), quando 25 μg de cada lectina foram administrados por animal (Andrade et al., 1999).

A ativação de macrófagos induzida por lectinas de planta pode ser atribuída a $INF\gamma$ produzidos por linfócitos T (Buchmuller & Mael, 1979). $INF\gamma$ agindo sinergicamente com $TNF\alpha$ e/ou outros produtos bacterianos (LPS), promovem a expressão do gene de iNOS (Oswald et al., 1994). Andrade et al., (1999), afirmaram que a produção de NO por células aderentes estimuladas por lectinas de planta era significativamente diminuída em comparação com a produção de células totais da cavidade peritonal, sugerindo uma combinação de incentivos diretos da lectina e a ação de linfócitos T sobre macrófagos.

Em conclusão, os dados obtidos mostram que TEL induz migração de neutrófilo e células mononucleares tanto em cavidade peritoneal de camundongo quanto em bolsa de ar; é capaz de induzir edema de pata e ativar macrófagos à produção de NO. Os mecanismos pelos quais TEL estimula estes fenômenos, ainda deverão ser estudados.

7- CONCLUSÕES

- A lectina de *T. esculenta* (TEL) estimula a migração de neutrófilos, quando aplicada tanto em bolsa de ar quanto em cavidade de peritoneal de camundongo;
- TEL induz a migração de células mononucleares de forma dose dependente, tanto em em bolsa de ar quanto em cavidade de peritoneal de camundongos;
- A migração de neutrófilos e de células mononucleares é inibida por D-manose (80%) e um pouco menos por D-glicose (51%);
- O edema de pata induzido por TEL é dose-dependente com um máximo de efeito após quatro horas. D-manose preferencialmente reduz o efeito edematogênico induzido por TEL e glicose um pouco menos;
- TEL estimula a produção de NO, por células mononucleares de camundongo, na presença de células peritoneais totais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade et al., 1999. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell. Immunol.*, 194, 98-102.
- Assreury, A.M.S., Shibuya, M.D., Martins, G.J., de Souza, M.L.P., Cavada, B.S., Moreira, R.A, Oliveira, J.T.A., Ribeiro, R.A., Flores, C.A., 1997. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brasilian beans. *Mediators of Inflammation*, 6: 1-10.
- Bauhmnn, H., Gauldie, J., 1994. The acute phase response. *Immunology today*, 15(2): 74-80, 1994.
- Benjamin, C.F., Figueiredo, R.C., Henriques, M.G.M.O., Barja-Fidalgo, C., 1997. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 873-881.
- Bento, C.A.M., Cavada, B.S., Oliveira, J.T.A., Moreira, R. A. and Barja-Fidalgo, C., 1993. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents Actions* 38, 48-54.
- Borreback, C.A.K., Carlson, R., 1989. Lectins as mitogens. *Adv. Lectin Res.* 2, 10-27.
- Buchmuller, Y. & Mauel, J., 1979 . *J. Experim. Med.* 150, 359-364.
- Butcher, E.C., 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-1037.
- Collins, T., 1995. Adhesion molecules in leukocyte emigration. *Scientific American (Science & Medicine)*, 2(6), 28-37.
- Chao, C., Jensen, R., Dailey, M.O., 1997. Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J. Immunol.* 159, 1686-1694.
- Cronstein, B.N., Weissman, G., 1993. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritides and Rheumatism*, 136(2), 142.
- Dale, M.M., Foreman, J.C., 1989. Introduction to immunology and pathology of host defence mechanisms. In: Dale, M.M., Foreman, J.C. (eds.), *Textbook of Immunopharmacology*. Blackwell Scentific Publications, 401-411.
- Dias-Baruffi, M., Roque-Barreira, M.C., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1995. Biological characterization of purified macrophage-derived neutrophil chemotactic factor. *Mediators Inflamm.* 4, 263-269.
- Edwards, J.C.W., Sedgewick, A.D., Willoughby, D.A., 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* 153,147-156.

- Ferencík, M., Stvrtinová, V., 1996. Endogenous control and modulation of inflammation. *Folia Biol. Praha* 42, 47-55.
- Freire, M.G.M., Gomes, V.M., Corsini, R. E., Machado, O.T., De Simone, S.G., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 61-68.
- Kansas, C.L., 1996. Selectins and their ligands. Current concepts and controversies. *Blood*, 88, 3259-3287.
- Lima, J.E., Sampaio, A.L.F., Henriques, M.G.M.O., Barja-Fidalgo, C., 1999. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) in vivo and in vitro. *Immunopharmacol.* 41, 147-155.
- Maldonado, G., Gorocica, P., Agundis, C., Pérez, A., Molina, J., Zenteno, E., 1998. Inhibition of phagocytic activity by N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from *Amaranthus leucocarpus*. *Glycoconjugate J.*, 15, 615-622.
- Malik, A.B., Lo, S.K., 1996. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol. Rev.* 48, 213-229.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E. A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.
- Moraes, S.M.D., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Roque-Barreira, M.C., Santos-de-Oliveira, R., Pinto, V.P.T., Oliveira, J.T.A., 1996. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* seeds. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 977-985.
- Moreira, R. A. and Cavada, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.) 1984. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol. Plantarum* 26 (2), 113-120.
- Moreira, R.A., Barros, A.C.H., Stewart, J.C., Pusztai, A., 1983. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Planta* 158, 63-69.
- Ofek, I., Kahane, I., Sharon, N., 1996. Toward antiadhesion therapy for microbial diseases. *Trends Microbiol.* 4, 297-299.
- Oswald, I.P., Wynn, T. A., Sher, A., James, S.L., 1994. NO as effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp. Biochem. Physiol.* C 108, 11-18.

- Ricevuti, G., Mazzone, A., 1987. Clinical aspects of neutrophil locomotion disorders. *Biomed. Pharmacoth.* 41, 355-367.
- Rodriguez, D., Cavada, B.S., Abreu-de-Oliveira, J.T., de-Azevedo-Moreira, R., Russo, M., 1992. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 823-826.
- Rosen, S.D., 1993. Cell surface lectins in the immune system. *Semin. Immunol.* 5, 237-247.
- Rossi, A.G., Hellewell, P.G., 1994. Mechanism of neutrophil accumulation in tissues. In: Hellewell, P.G., Williams, T.J. (eds.). Academic Press, Loondon, 223-243.
- Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M.O., Beltrami, L.M., Roque-Barreira, M.C., 1994. Neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.* 153, 1798-1807.
- Sedgwick, D., Willoughby, D. A., 1985. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: Bonta, I.L., Bray, M.A., Parnham, M.J. (eds.). Handbook of inflammation, Elsevier, v 5, 27-47.
- Silva Lima, M., Albuquerque D. A., Ibañez, O.M., Sant'anna, O., 1993. Inflammatory cutaneous reaction induced by the lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88, 599-603.
- Souza, G.E.P., Cunha, F.Q., Mello, R., Ferreira, S.H., 1988. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents Actions*, 24, 377-380.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., 1995. Engel, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB Journal*, 9, 866-873.
- Wahl, S.M., 1997. Inflammation and growth factors. *J. Urol.* 157 (1), 303-5.
- Williams, T.J., 1985. Vascular responses and their suppression in vasodilation and edema. In: In: Bonta, I.L., Bray, M.A., Parnham, M.J. (eds.). Handbook of inflammation, Elsevier, v 5, 49-59.

APÊNDICES

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ARTIGO PUBLICADO

Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth

Maria das Graças M. Freire , Valdirene M. Gomes , Rosely E. Corsini , Olga L. T. Machado, Salvatore G. De Simone , José C. Novello , Sérgio Marangoni , Maria Lígia R. Macedo. **Plant Physiol. Biochem.** 40 (2002) 61-68.

Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth

Maria das Graças M. Freire ^a, Valdirene M. Gomes ^b, Rosely E. Corsini ^c,
Olga L.T. Machado ^b, Salvatore G. De Simone ^d, José C. Novello ^a, Sérgio Marangoni ^a,
Maria Lígia R. Macedo ^{a,c,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), C.P. 6109,
CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^bUniversidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Biotecnologia e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cLaboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
Avenida Capitão Olinho Mancini, 1662, Colinas C.P. 210, 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil

^dDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 7 December 2000; accepted 7 August 2001

Abstract

A novel plant lectin has been isolated from the seeds of *Talisia esculenta* and partially characterized. The purified lectin showed two protein bands in SDS-PAGE (20,000 and 40,000 kDa) and agglutinated human and animal erythrocytes. Of the various sugars tested, the lectin was best inhibited by mannose. A search of sequence databases showed that the N-terminal sequence had no homology to any known protein. The lectin inhibited the growth of the fungi *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Saccharomyces cerevisiae*.
© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Colletotrichum lindemuthianum*; *Fusarium oxysporum*; Lectin; *Saccharomyces cerevisiae*; Sapindaceae; Seed; *Talisia esculenta*

1. Introduction

Fungi are widely distributed in nature and many are frequently pathogens of different plant species. As such, fungi represent one of the main causes of crop losses for cultivated plants [30].

Lectins are naturally occurring proteins and glycoproteins which bind selectively and non-covalently to carbohydrate residues [27]. The main characteristic of this class of

protein is their ability to interact specifically with carbohydrates and to combine with glyco-components of the cell surface [31]. Following their discovery in various plant seeds [7,21,23,24], lectins were thought to be involved in plant defense by offering resistance to insects, bacteria and fungi [1,14]. In particular, chitin-binding lectins seemed to have a role in defending plants against fungi (and insects). Studies in vitro demonstrated that lectins from the stinging nettle *Urtica dioica* inhibited the growth of *Botrytis cinerea*, *Trichoderma hamatum* and *Phycomyces blakesleanus* [3]. The mechanism by which the nettle lectin acts has not yet been elucidated, although the synthesis of cell wall components appears to be affected because of disturbed chitin synthesis and/or deposition [29]. Several other chitin-binding proteins have been isolated from plant seeds and their chitin-binding ability has been associated with defense mechanisms against fungal infection [4,8,11,13,17,26].

Talisia esculenta (St. Hil.) Radlk., locally known as pitomba, belongs to the family Sapindaceae and occurs in northern and northeastern Brazil. The fruit of *T. esculenta* is

Abbreviations: ASP, *Theobroma cacao* 21 kDa seed protein precursor; BSA, bovine serum albumin; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; GAFF-1, *Gastrodia* anti-fungal protein; HPLC, high performance liquid chromatography; KPI, *Psophocarpus tetragonolobus* Kunitz protease inhibitor; MIR, *Synsepalum dulcificum* taste-modifying protein; Mr, relative molecular mass; PBS, phosphate-buffered saline; RAGI, *Oryza sativa* subtilisin, alpha-amylase inhibitor; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SPR1, sweet potato sporamin A precursor; SPRB, sweet potato sporamin B precursor; TEL, lectin of *Talisia esculenta*; UDA, *Urtica dioica* agglutinin; WGA, wheat germ agglutinin

* Corresponding author. Fax: +55 67 5211228.

E-mail address: bioplant@terra.com.br (M.L.R. Macedo).

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.
PII: S0981-9428(01)01342-0

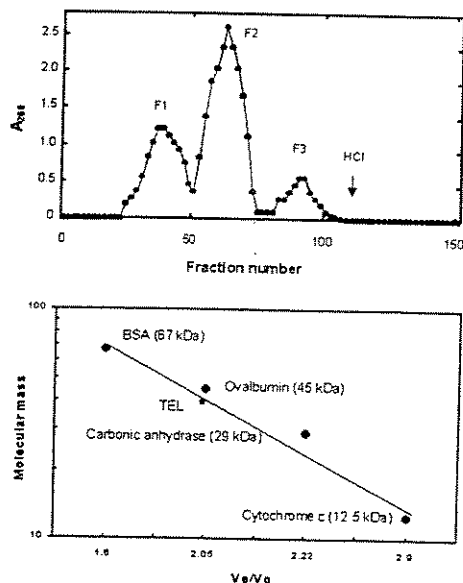


Fig. 1. Sephadex G-100 elution profile of TEL. A, Gel filtration chromatography of *T. esculenta* lectin on Sephadex G-100. The column was loaded with 0.35 g of the crude extract and initially eluted with 150 mM NaCl followed by 100 mM HCl. Fractions (2.5 ml per tube) were collected at a flow rate of 30 ml h⁻¹. The elution profile was monitored by following the absorbance at 280 nm (A_{280}). B, Determination of the molecular mass of TEL by gel filtration. V_e , elution volume; V_o , void volume.

consumed by humans and also by birds, the latter acting as dispersers for the seeds. In this paper, we describe the isolation and characterization of a novel lectin from *T. esculenta* plant seeds, the first of its kind from the family Sapindaceae, and report on its action against *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Saccharomyces cerevisiae*, three pathogenic species of fungi.

2. Results

2.1. Isolation of the lectin

Pure *T. esculenta* lectin (TEL) was obtained in two chromatographic steps. A crude extract was applied to a Sephadex G-100 column equilibrated with 0.15 M NaCl and eluted with the same solution followed by 0.1 M HCl (Fig. 1A). This resulted in three peaks (F1, F2 and F3), the first two showing hemagglutinating activity. The second of these was chosen for subsequent experiments because of its better yield.

After dialysis against water, centrifugation and lyophilization, peak F2 was dissolved in 50 mM phosphate buffer, pH 7.6 and the protein solution then loaded onto a column of chitin. All of the material applied bound to the matrix and was eluted with 100 mM HCl (Fig. 2). SDS-PAGE of the fraction eluted with HCl (Fig. 2, insert) showed the same profile as F2 from the Sephadex G-100 column (Fig. 3).

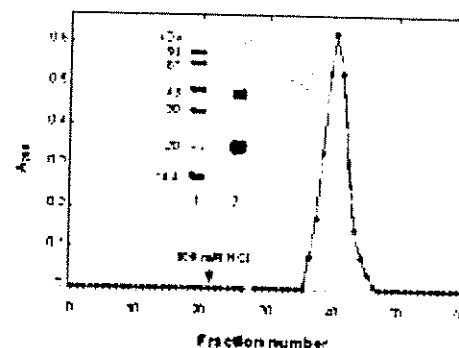


Fig. 2. Elution profile of TEL from a chitin column. Fraction F2 (30 mg) was applied to a column (2 cm × 10 cm) which was initially eluted with 150 mM NaCl followed by 100 mM HCl. Fractions (2.0 ml per tube) were collected at a flow rate of 35 ml h⁻¹ and the elution profile was monitored at 280 nm (A_{280}). The insert shows the material bounded to chitin column analyzed on SDS-PAGE (2); lane 1 contains molecular markers.

2.2. Molecular properties of TEL

Approximately 0.5 g of purified TEL was obtained from 1 kg of seeds after chitin chromatography. The purity of TEL (fraction F2) was analyzed by SDS-PAGE with and without 2% β -mercaptoethanol. In both cases, the lectin migrated in two bands with an apparent M_r of about 20,000 and 40,000 (Fig. 3). The molecular mass of the native protein, determined by gel filtration in the presence of D-glucose and both D-glucose and D-mannose, was 40,000 kDa (Fig. 1B). The homogeneity of the purified TEL was confirmed by native PAGE which showed only one band (data not shown). TEL also showed components with distinct isoelectric points between 6.55 and 5.2, suggesting the existence of isoforms.

2.3. Agglutination of human and animal erythrocytes

T. esculenta lectin strongly agglutinated hamster erythrocytes, but produced weak agglutination of rabbit, sheep, cow and chicken erythrocytes, and no agglutination of toad

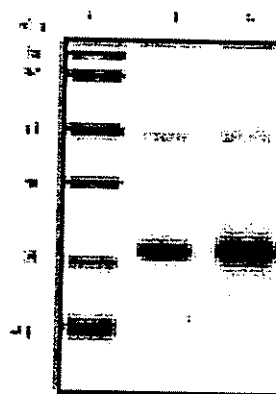


Fig. 3. SDS-PAGE of TEL (20 μ g protein) in the presence (lane 2) and absence (lane 3) of β -mercaptoethanol. Lane 1 contains marker proteins whose size is indicated on the left. The gel was stained with Coomassie brilliant blue R 250.

Table 1

Hemagglutinating activity of TEL against human and animal erythrocytes. *Titer is defined as the reciprocal of the end-point dilution which caused detectable agglutination of erythrocytes. The final lectin concentration was 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in the first well of the multiwell plate

Erythrocyte source	Hemagglutination (titer*)
Human (type A)	11
Human (type B)	5
Human (type AB)	10
Human (type O)	4
Rabbit	3
Sheep	6
Hamster	3
Rat	10
Chicken	4
Cow	1
Toad	0

erythrocytes. Human erythrocytes of all blood groups were agglutinated, although the effect was more pronounced with erythrocytes from blood types A and AB (Table 1). Trypsinizing the erythrocytes had no effect on the hemagglutination.

2.4. Carbohydrate specificity of TEL

The carbohydrate-binding specificity of TEL was evaluated by the ability of sugars to inhibit the agglutination of human erythrocytes. As shown in Table 2, the best inhibitor was D-mannose followed by D-glucose and N-acetylglucosamine.

2.5. Physicochemical properties of TEL

Periodic acid/Shiff staining indicated that TEL had a carbohydrate moiety (data not shown) [37]. The sugar content of TEL was 18.8% as determined by the phenol-sulfuric acid method [10].

The hemagglutinating activity of the purified lectin decreased appreciably after metal removal by prolonged dialysis against 25 mM EDTA, followed by dialysis against 150 mM NaCl. Full activity was restored by adding Ca^{2+} .

Table 2

Inhibition of the hemagglutinating of TEL. * IC_{50} : concentration required to inhibit hemagglutinating activity by 50%. The amount of TEL used in these assays was 25 μg

Sugar	* IC_{50} (mM)
D-sucrose	> 100
D-lactose	> 100
D-maltose	12.5
D-galactose	100
D-mannose	0.39
D-fructose	25
D-glucose	3.5
N-Acetyl-glucosamine	6.2

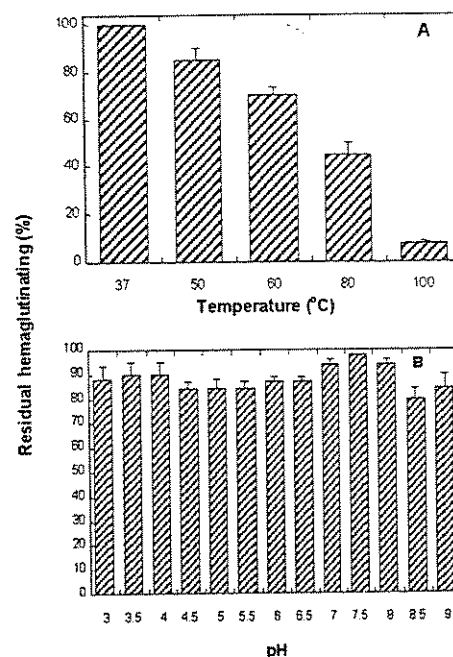


Fig. 4. Thermal (A) and pH (B) stability of TEL. The bars represent the average of five replicates. Full (100%) activity corresponded to a titer of 6.

The optimum Ca^{2+} concentration for maximum hemagglutination was between 2.5 and 10 mM.

TEL was heat-stable up to 70 °C, but a sharp decrease in activity occurred between 70 and 90 °C (Fig. 4A). Hemagglutination was not markedly affected by pH, with maximum activity being retained at pH 5.0–9.0 (Fig. 4B).

2.6. Anti-fungal activity of TEL

Fig. 5 shows the growth of *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* and *S. cerevisiae* in the presence of TEL (at a concentration of 280 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and in control medium. TEL exerted an inhibitory effect on the growth of all three fungi. Photomicrographs of the mycelia of *F. oxysporum* and *C. lindemuthianum* fungi taken after 60 h of growth showed normal hyphal development (Fig. 6A, B) in the control cultures but inhibition of hyphal development in the presence of TEL (Fig. 6C–F).

The inhibitory effects of TEL on the growth of the fungi could be due the interaction of lectin with chitin and with fungal structures. Further studies on the biochemical basis of these findings are demanded in order to unravel the mechanisms of action of these proteins.

2.7. Amino acid composition and N-terminal sequence

The partial NH_2 -terminal sequence of 20 amino acids of TEL indicates no homology with others lectins. However, others proteins are similar in their N-terminal regions to TEL (Fig. 7).

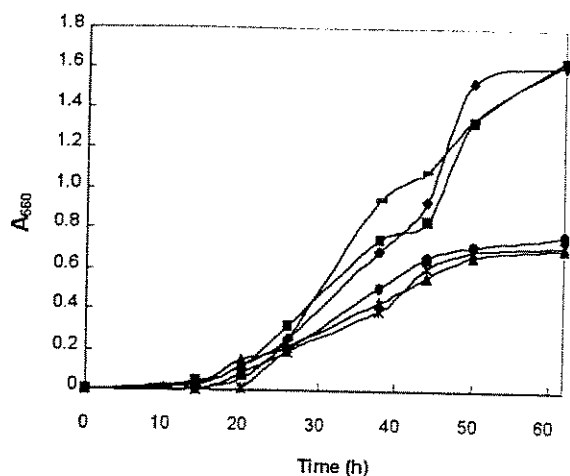


Fig. 5. The effect of TEL on fungal growth. The absorbance at 660 nm was used as a measure of fungal growth. (♦) Control *F. oxysporum*; (■) control *C. lindemuthianum*; (○) control *S. cerevisiae*; (▲) *F. oxysporum* plus TEL; (*) *C. lindemuthianum* plus TEL; (○) *S. cerevisiae* plus TEL. The experiments were carried out in triplicate. The standard error bars (coefficients of variation < 20%) have been omitted for clarity.

3. Discussion

Two chromatographic steps (gel filtration and chitin affinity chromatography) were sufficient to purify the lectin from *T. esculenta* seeds. These two methods were also used by Yamaguchi et al. [35] to isolate a lectin-D from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*) and by Sasmal et al. [25] who purified a hemagglutinin from a strain of *Vibrio cholerae*. SDS-PAGE of the fractions from affinity chromatography and Sephadex G-100 (F2) showed the same profile (Figs 2, 3, insert).

TEL consisted of two subunits of 20,000 and 40,000 kDa, non-covalently bound, as shown by the unaltered electrophoretic profile in the presence of β -mercaptoethanol (Fig. 3). The M_r of TEL was also estimated by gel filtration on a Protein Pak 300 SW HPLC column in the presence of D-glucose (100 mM) or D-glucose and D-mannose (100 mM each) to prevent possible interaction of the lectin with the gel matrix. One major peak with a molecular mass of around 40,000 kDa was obtained (Fig. 1B), suggesting that the electrophoretic bands of 20,000 and 40,000 kDa correspond to the monomeric and dimeric forms of the protein (Fig. 3).

TEL showed no specificity in its ability to hemagglutinate rabbit, sheep, hamster, rat, chicken, cow and human (A, B, AB and O) erythrocytes. However, TEL did not hemagglutinate toad erythrocytes although the activity against cow erythrocytes was low (Table 1). The agglutinating activity of TEL was inhibited by sugars containing D-glucose residues (Table 2). Of these, D-mannose was the most potent inhibitor (the minimum inhibitory concentration was 0.39 mM), followed by D-glucose and N-acetylglucosamine (3.5 and 6.2 mM, respectively). This inhibitory profile was similar to that of D-glucose- and D-mannose-binding lectins, such as the lectin from *Pisum sativum* [27].

The homogeneity of purified TEL was confirmed by native-PAGE (data not shown), which yielded a single band. Periodic acid/Schiff staining showed two bands (20,000 and 40,000 kDa) indicating that TEL was a glycoprotein. This was confirmed using the method of Dubois et al. [10], which showed a carbohydrate content of 18.8%. This carbohydrate content of TEL is higher than that of lectins from *Vatairea macrocarpa* (7.9%) [5], *Araucaria brasiliensis* (6.3%) [9], *Dioclea lehmanni* (4.1%) [20] and *Sphenostyles stenocarpa* (4.26%) [19].

Isoelectric focusing of TEL showed a broad band with a pI value between 5.2 and 6.55, which suggested the occurrence of isoforms. This value was lower than that for GAFF-1 (pI 8.5) [34] but similar to the lectin from *Dioclea lehmanni* (pI 6.55–6.60) [20]. TEL was stable between 37 and 60 °C, but hemagglutinating activity decreased markedly at 80 °C (Fig. 4A). The pH gradient test showed that TEL has the highest stability at pH 7.0–8.0 (Fig. 4B). The lectin required Ca^{2+} (2.5–10 mM) for activity. A similar behavior has been reported for the antifungal lectins isolated from *Gastrodia elata* [34] and *Sphenostyles* sp. [19].

TEL inhibited the growth of *F. oxysporum*, *C. lindemuthianum* and *S. cerevisiae*. Other lectins that also have a potent inhibitory activity on several fungi in vitro include hevein (4.7 kDa) from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex [28], UDA (8.5 kDa) from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes [29] and GAFF-1 (10 kDa) from *Gastrodia elata*, a plant parasitic on the fungus *Armillaria mellea* [34]. The concentration of TEL necessary to inhibit fungal growth was $280 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figs 5, 6). Vicilin (150 kDa), a 7S storage protein with a defensive function [18], also inhibited growth and spore germination in the fungus *F. oxysporum*, and led to abnormal development of *S. cerevisiae* cells at a concentration of $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ [12]. GAFF-1, a lectin-like protein, also showed strong inhibitory activity against *Valsa ambigua*, *Rhizoctonia solani*, *Gibberella zeae*, *Ganoderma lucidum* and *Botrytis cinerea* in vitro at a concentration of $360 \mu\text{g ml}^{-1}$ [34].

Like UDA, WGA [7] and GAFF-1, TEL bound to chitin (Fig. 3A). Chrispeels and Raikhel [6] suggested that these small chitin-binding proteins cross-linked chitin preventing cell expansion at the tip of the growing hyphae. This binding could slow hyphal growth, as the first line of an integrated defense mechanism.

Mannan, chitin and other saccharides are important components of most fungal cell walls, and TEL may inhibit fungal growth by interacting with these carbohydrates. However, direct evidence of an interaction between TEL and cellular components is necessary in order to unravel the mechanisms of action of this protein.

When TEL was compared to all others lectins sequenced thus far from animal and plant origin using the NCBI-Blast data bank, it turned out that none of these lectins showed any similarity to the sequence described here. However, others proteins are similar in their N-terminal regions to TEL: sweet potato sporamin A precursor (SPRB), *Theo-*

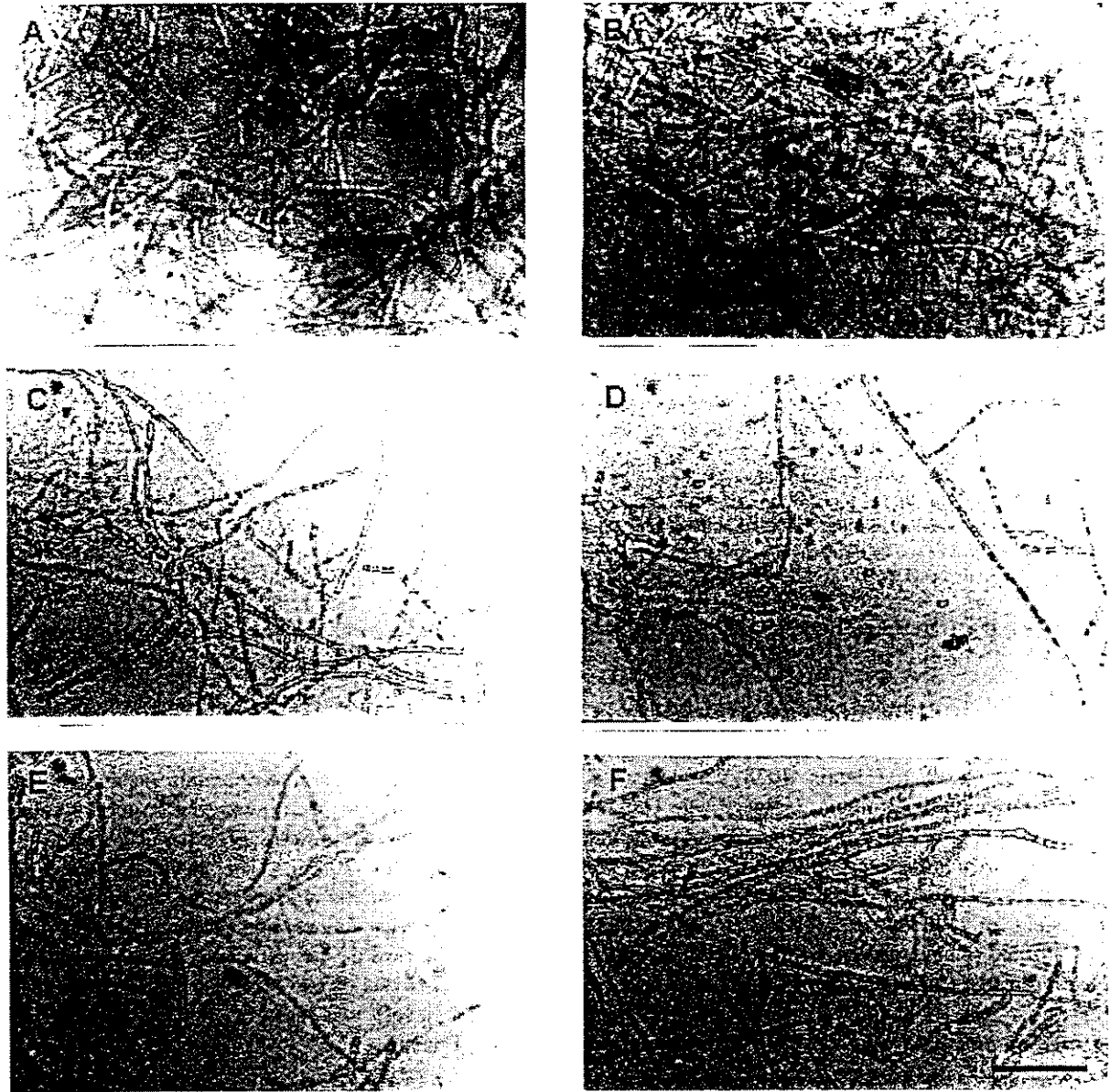


Fig. 6. Light micrographs of *F. oxysporum* (A, C and E) and *C. lindemuthianum* (B, D and F) mycelia after 92 h of growth in control medium (A, B) and in the presence of TEL (C–F). Bar = 15.6 μ m.

broma cacao 21 kDa seed protein precursor (ASP), *Oryza sativa* subtilisin/alpha-amylase inhibitor (RAGI), *Synsepalum dulcificum* taste-modifying protein (MIR) and *Psophocarpus tetragonolobus* Kunitz protease inhibitor (KPI) (Fig. 7). These proteins presented in common the similarity with the ancestral gene of the Kunitz family protease inhibitor. These facts substantiate the previously suggested idea that TEL, SPRB, SPR1, ASP, RAGI, KPI and MIR can be encoded by a family of related genes [15,36]. Thus far, several members of a plant serine proteinase family, including the soybean trypsin inhibitor (Kunitz-type) and cowpea (Bowman-Birk family) as well as inhibitors I (PI-I) and II (PI-II) from potato have been implicated in providing a defensive mechanism because of their ability to inhibit insect digestive enzymes [12,22,36]. These observations suggested that TEL gene might be able to provide a viable

alternative in designing transgenic crops to control insect pests and fungi.

4. Methods

4.1. Materials

Talisia esculenta (St. Hil.) Radlk seeds were collected in the State of Ceará (Brazil). Sephadex G-100 was from Pharmacia (Uppsala, Sweden), acrylamide and methylene bis-acrylamide were from Sigma (St. Louis, MO, USA); molecular mass markers for SDS-PAGE and other electrophoresis reagents, ampholine (pH range 3.5–9.5) and pI markers were from Pharmacia; sugars were from Sigma. All

	Position of the first amino acid sequence	Sequence	Identity (%)	Positives (%)
TEL	1	SEPLYDINGDEVTT SXIYYI	7	
SPRB	40	PVL D I N G D E V R A G E N Y Y I	61	66
SPR1	42	PVL D I N G D E V R A G G N Y Y M	55	66
ASP	28	<i>NSPVLDTGGDELQITGVQYYV</i>	38	61
RAGI	4	<i>PVYDTEGHEL</i> S A D G S Y Y V	38	61
KPI	21	<i>QPVYDTNGNQLRNNGEYYI</i>	42	73
MIR	35	PVL D I D G E K L R I G T N Y Y I	44	72

Fig. 7. Partial sequence of the TEL aligned with different regions of known proteins. SPRB: sweet potato sporamin B precursor – sp | P109651; SPR1: sweet potato sporamin A precursor – sp | P14751; ASP: *Theobroma cacao* 21 kDa seed protein precursor – sp | P327651; RAGI: *Oryza sativa* subtilisin/alpha-amylase inhibitor – sp | P294211; KPI: *Psophocarpus tetragonolobus* Kunitz protease inhibitor – sptrembl | Q433251; MIR: *Synsepalum dulcificum* taste-modifying protein – sp | P130871. Letters in bold represent completely conserved residues and letters in italics represent incompletely conserved residues. The number after each protein corresponds to a number in protein data bank.

other chemicals were of reagent grade obtained from local suppliers.

4.2. Fungi

Saccharomyces cerevisiae strain 1038 was obtained from the Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil. *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum lindemuthianum* were kindly supplied by CNPF/EMBRAPA, Goiânia, Goiás, Brazil. *C. lindemuthianum* (the agent for anthracnose, a disease of many plants) and *F. oxysporum* (which causes wilting in beans) were isolated from cowpea (*Vigna unguiculata*) plants.

4.3. Hemagglutination assay

Hemagglutinating activity was assayed in V-bottomed 96-well microtiter plates in a final volume of 100 μ l containing 50 μ l of a 2% suspension of erythrocytes of human and/or animals previously washed three times in saline solution, and 50 μ l of a two-fold serial dilution of lectin solution. Agglutination was scored after 1 h at 37 °C as the reciprocal of the highest lectin dilution giving detectable agglutination [33]. Inhibition of hemagglutinating activity by several sugars (D-glucose, D-mannose, D-maltose, D-lactose, D-sucrose, D-galactose, D-fructose and N-acetyl-D-glucosamine) was examined by adding the sugars at final concentration of 100 mM to the incubation mixture above mentioned and scoring the hemagglutination after 1 h.

4.4. Protein assay

Protein concentrations were determined as described by Bradford [2], using BSA as a standard. Absorbance at

280 nm was also used to determine the protein content of column eluates and to monitor elution profiles during chromatography.

4.5. Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was performed in 12.5% polyacrylamide gel as described by Laemmli [16].

4.6. Detection of sugars

Sugars were detected using Schiff's reagent as described in Zacharius et al. [37]. The total neutral sugar content of lectin was estimated colorimetrically by the phenol/H₂SO₄ method [10], using D-glucose as a standard.

4.7. Isoelectric focusing

Isoelectric focusing was done on a flat bed apparatus (LKB/ Uppsala, Sweden). Ampholine solutions (40% v/v) in the pH range 3.5–9.5 and pI standards (3.5–10) were used and the gels were stained with Coomassie brilliant blue-R as described previously [32].

4.8. Effect of pH and temperature

The effect of pH and temperature on the hemagglutinating activity of the lectin was determined by incubating lectin samples at various pHs for 1 h or at a defined temperature for 30 min. The residual hemagglutinating activity was assayed after adjusting the mixtures to pH 7.0 or 4 °C. At least five replicates were done for each test to confirm the results. The means of these were compared by one-way analysis of variance test. Duncan's multiple range test (5% level) was used to determine the significance between means.

4.9. Effect of EDTA, Ca²⁺ and Mn²⁺

Partially purified lectin (5 mg) was dissolved in 1 ml of 150 mM NaCl and dialyzed exhaustively (48 h) against 0.2 M EDTA to remove any metals associated with the lectin. This was followed by dialysis (molecular mass cut-off of tubing—12,000 kDa) against 0.15 M NaCl for 24 h. At the end of this period, hemagglutinating activity was assayed in the absence and presence of added CaCl₂ and MnCl₂.

4.10. Purification of the lectin

Dehulled *T. esculenta* seeds were ground finely and extracted with five volumes of 150 mM NaCl for 24 h at 4 °C followed by centrifugation at 10 000 g, for 30 min at 4 °C. The clear supernatant (crude extract) was diluted in 150 mM NaCl and applied to a column (2.5 cm (ID) × 80 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with the

same solvent. The column was initially eluted with 150 mM NaCl followed by 100 mM HCl. Hemagglutinating activity was measured in the resulting fractions and the active fractions were pooled, dialyzed and freeze-dried. A chitin column (2 cm × 6 cm; 20 ml bed volume), prepared as described by Hackman and Goldberg [37], was equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.6, and used for affinity chromatography. After adsorption of the proteins (10 mg of protein in 1 ml of phosphate buffer), the column was washed with the same buffer until the absorbance at 280 nm returned to 0, after which the adsorbed lectin was eluted with 100 mM HCl. Fractions (2 ml) were collected and the protein concentrations were estimated based on the absorbance at 280 nm. Hemagglutinating activity was measured in the fractions after adjusting the pH to 7.0 as necessary.

4.11. Molecular mass determination by gel filtration

The M_r of the native lectin was determined using a Protein-Pak 300 SW HPLC column (10 μ m, 7.8 mm (ID) × 300 mm) equilibrated with 100 mM PBS, pH 7.4, containing 100 mM D-glucose or 100 mM each of D-glucose and D-mannose. The M_r standards (Pharmacia/Uppsala, Sweden) used were BSA (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa) and cytochrome c (12.5 kDa).

4.12. Effect of the lectin on fungal growth

To examine the effect of the lectin on the growth of fungi, 200 μ l of cells (*S. cerevisiae*) and spores (*F. oxysporum* and *C. lindemuthianum*) (20,000 ml⁻¹ of Sabouraud broth) were placed in multiwell plates at 28 °C followed by the addition of the lectin solution (800 μ g ml⁻¹). Optical readings were taken at 660 nm at time zero and every 6 h for the following 60 h. A control without the addition of protein was also used. The readings were taken against a blank containing only culture medium. After 60, the cells were separated from the growth medium by centrifugation (3 000 g), washed once in 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 to remove excess medium and processed for observation by light microscopy at magnification 400×. All the experiments were run in triplicate and the averages of the readings, the standard errors and coefficients of variation were calculated.

4.13. Protein sequencing

The partial N-terminal sequence was analyzed on a Shimadzu PPSQ-10 automated protein sequencer performing Edman degradation. Phenylthiohydantoin amino acids (PTH-AA) were detected at 269 nm after separation on a reverse phase C₁₈ Wakopak Wakosil HPLC column (4.6 mm × 25 mm) from Shimadzu, under isocratic conditions, using 40% acetonitrile, 20 mM acetic acid and 0.014% sodium dodecyl sulfate as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ at 40 °C. The sequence was

submitted to automatic alignment, which was performed using the NCBI-Blast search system.

Acknowledgements

This work was financed by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- [1] A. Ayoub, H. Causse, E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, Y. Bourne, C. Cambillau, P. Rougé, Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan, *Biochem. Syst. Ecol.* 22 (1994) 153–159.
- [2] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [3] W.F. Broekaert, J.V. Parijs, F. Leyns, H. Joos, W.J. Peumans, A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties, *Science* 245 (1989) 1100–1102.
- [4] W.F. Broekaert, W. Mariën, F.R.G. Terras, M.F.C. De Bolle, P. Proost, J. Van Damme, Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin binding proteins, *Biochemistry* 31 (1992) 4308–4314.
- [5] B.S. Cavada, C.F. Santos, T.B. Granjeiros, E.P. Nunes, P.V.P. Sales, R.L. Ramos, F.A.M. Sousa, C.V. Crisostomo, J.J. Calvete, Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke, *Phytochemistry* 49 (1998) 675–680.
- [6] M.J. Chrispeels, N.V. Raikhel, Lectins, lectin genes and their role in plant defence, *Plant Cell* 3 (1991) 1–19.
- [7] J. Ciopraga, O. Gozia, R. Tudor, L. Brezuica, R. Doyle, *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin, *Biochim. Biophys. Acta* 1428 (1999) 424–432.
- [8] B.J.C. Cornelissen, L.S. Melchers, Strategies for control of fungal disease with transgenic plants, *Plant Physiol.* 101 (1993) 709–712.
- [9] P.K. Datta, M.O.R. Figueroa, F.M. Lajolo, Chemical modification and sugar binding properties of two major lectins from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 1851–1855.
- [10] M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.
- [11] V.M. Gomes, M. Da Cunha, F.C. Miguens, K.V.S. Fernandes, T.L. Rose, J. Xavier-Filho, Ultrastructure and immunolabelling of fungi cells treated with *Vigna unguiculata* vicilins (7S storage proteins), *Plant Sci.* 138 (1998) 81–89.
- [12] T.R. Green, C.A. Ryan, Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects, *Science* 175 (1972) 776–777.
- [13] R.H. Hackman, M. Goldberg, New substrates for use with chitinases, *Anal. Biochem.* 8 (1964) 397–401.
- [14] N.T. Keen, The molecular biology of disease resistance, *Plant Mol. Biol.* 19 (1992) 109–122.
- [15] Y. Kouzuma, M. Suetake, M. Kimura, N. Yamasaki, Isolation and primary structure of proteinase inhibitors from *Erythrina variegata* (LINN.) var. *Orientalis* seeds, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (1992) 1819–1824.
- [16] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage, *Nature* 227 (1970) 680–689.

- [17] R. Leah, H. Tommerup, I. Svendsen, J. Mundy, Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 1564–1573.
- [18] M.L.R. Macedo, L.B.S. Andrade, R.A. Moraes, J. Xavier-Filho, Vicilins variant and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*), *Comp. Biochem. Physiol.* 105C (1993) 89–94.
- [19] J.S. Machuka, O.G. Okeola, J.M. Van Damme, M.J. Chrispeels, F.V. Leuven, W.J. Peumans, Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms, *Phytochemistry* 5 (1999) 721–728.
- [20] G. Pérez, Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 843–853.
- [21] W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiol.* 109 (1995) 347–352.
- [22] T. Rohrmerier, L. Lehle, A wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitor, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993) 783–792.
- [23] H. Rüdiger, Structure and function of plant lectins, in: H.J. Gabius, S. Gabius (Eds.), *Glycosciences, Status and Perspectives*, Vol. 2, Chapman & Hall, Weinheim, 1997, pp. 415–438.
- [24] H. Rüdiger, Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins, *Acta Anat.* 161 (1998) 130–152.
- [25] D. Sasmal, B. Guhathakurta, A.N. Ghosh, C.R. Pal, A. Datta, Purification of a mannose/glucose-specific hemagglutinin/lectin from a *Vibrio cholerae* O1 strain, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23 (1999) 221–227.
- [26] P.R. Shewry, J.A. Lucas, Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens, *Adv. Bot. Res.* 26 (1997) 135–192.
- [27] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (1998) 575–692.
- [28] J. Van Parijs, W.F. Broekaert, I.J. Goldstein, W.J. Peumans, Hevein: An anti-fungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex, *Planta* 183 (1991) 258–262.
- [29] J. Van Parijs, W.F. Broekaert, W.J. Peumans, J.M. Geuns, A.J. Van Laere, Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeana* Burgeff, *Arch. Microbiol.* 158 (1992) 19–25.
- [30] L. Vu, Q.K. Huynh, Isolation and characterization of a 27 kDa antifungal protein from the fruits of *Diospyros texana*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202 (1994) 666–672.
- [31] W.I. Weis, K. Drickamer, Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, *Annu. Rev. Biochem.* 65 (1996) 441–473.
- [32] R. Westermeier, Gel electrophoresis, in: R. Westermeier (Ed.), *Electrophoresis in Practice*, VCH Publishers Inc., Weinheim, 1993, pp. 210–212.
- [33] R. Witisuwanakul, D. Witisuwanakul, C. Sakulborirug, A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*), *Phytochemistry* 47 (1998) 183–187.
- [34] Q. Xu, Y. Liu, X. Wang, H. Gu, Z. Chen, Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, *Plant Physiol. Biochem.* 36 (1998) 899–905.
- [35] K. Yamaguchi, A. Mori, G. Funatsu, Amino acid sequence and some properties of lectin-D from roots of pokeweed (*Phytolacca americana*), *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (1996) 1380–1382.
- [36] K.W. Yeh, J.C. Chen, M.I. Lin, Y.M. Chen, C.Y. Lin, Functional activity of sporamin from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.): a tuber storage protein with trypsin inhibitory activity, *Plant Mol. Biol.* 33 (1997) 565–570.
- [37] R.M. Zacharius, T.E. Zell, J.H. Morrison, J.J. Woodlock, Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels, *Anal. Biochem.* 30 (1969) 148–152.

ARTIGO PUBLICADO

Isolation and characterization of isolectins from *Talisia esculenta* seeds

Maria das Graças M. Freire , Olga L.T.Machado , Marcos B. Smolka, José C. Novello, Sérgio Marangoni , José C. Novello, Maria Lígia R. Macedo. **J. Protein Chem.** 20 (6), 2001, 495-500.

Isolation and Characterization of Isolectins from *Talisia esculenta* Seeds

Maria das Graças M. Freire,¹ Olga L. T. Machado,² Marcos B. Smolka,¹ Sérgio Marangoni,¹ José C. Novello,¹ and Maria Ligia R. Macedo^{2,3}

Received June 26, 2001

Four isolectins (TEL-I, TEL-II, TEL-III and TEL-IV) were isolated from seeds of *Talisia esculenta* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. RP-HPLC was performed on a u-Bondapak C18 column (0.78 cm × 30 cm) (Waters 991-PDA system) at room temperature. Rechromatography of the four fractions on a C18 column under the same conditions yielded lectins with two dissimilar subunits (M_r 20 kDa and 40 kDa) bound noncovalently. The isolectins showed very similar characteristics, such as molecular masses, N-terminal sequences, and hemagglutinating activity, but differed in their isoelectric points and in inhibition by carbohydrates.

KEY WORDS: Isolectin; reverse-phase HPLC; *Talisia esculenta* seeds.

1. INTRODUCTION

Proteins or glycoproteins exhibiting specific interactions with saccharide residues are associated with the seeds of several plant lectins. The hemagglutinating activity associated with such lectins has generally been the basis for their detection and purification and has led to their exploitation as probes for the study of different biological functions (Rüdiger, 1997, 1998).

Recently, we purified and partially characterized a lectin from the seeds of *Talisia esculenta* (Sapindaceae) (Freire *et al.*, in press). This lectin (TEL)⁴ showed two protein bands in SDS-PAGE (M_r 20 kDa and 40 kDa) and agglutinated human and animal erythrocytes. Of the various sugars tested, the lectin was best inhibited by mannose. A search of sequence databases showed that the N-terminal sequence had no homology to any known protein.

Many lectins have been purified by affinity chromatography on immobilized carbohydrates. However, the lectins thus obtained are not always homogenous and can be a mixture of isolectins (Matsumoto *et al.*, 1987). For the purification of isolectins, methods such as gel filtration, ion-exchange chromatography, chromatofocusing, and high-performance hydrophobic interactions have been used (Suzuki *et al.*, 1990; Anuradha and Bhide 1999; Kilpatrick *et al.*, 1983; Abrecht *et al.*, 2000).

The presence of isolectins has been reported in plants (Machuka *et al.*, 1999; Anuradha and Bhide, 1999; Harata and Muraki, 2000). Because TEL was purified by chitin affinity chromatography, we decided to investigate the presence of isolectins in the seeds of *T. esculenta* in order to better understand the physiological roles and structure-function relationships of these proteins. This is the first report to describe the isolation and characterization of isolectins from the family Sapindaceae.

¹ Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brazil.

² Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

³ To whom correspondence should be addressed at Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Capitão Olinto Mancini, 1662, Colinos, Caixa Postal 210, CEP 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil. Fax: +55 67 5211228; e-mail: bioplant@bestway.com.br

⁴ Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; DTT, dithiothreitol; HPLC, high performance liquid chromatography; M_r , relative mass; PVDF, polyvinylidene difluoride membrane; RP-HPLC, reverse-phase high-performance liquid chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TEL, lectin of *Talisia esculenta*; TFA, acetonitrile and trifluoroacetic acid; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant Material

T. esculenta (St. Hil.) Radlk., known locally as pitomba, belongs to the family Sapindaceae and occurs in north and northeastern Brazil. The fruit of *T. esculenta* is consumed by humans and birds, the latter acting as seed dispersers. The seeds used in this study were collected in the State of Ceará, northeastern Brazil.

2.2. Isolation of Isolectins

Twenty milligrams of lyophilized TEL, prepared as described by Freire *et al.* (in press), were dissolved in 250 μ L of 0.1% (v/v) trifluoroacetic (solvent A). The resulting solution was clarified by centrifugation at 10,000 g for 3 minutes and the supernatant applied to a μ -Bondapak C18 column (0.78 cm $\times$ 30 cm) (Waters 991-PDA system). The column was eluted with a linear gradient (0–100%, v/v) of acetonitrile (solvent B) at a flow rate of 2.0 mL/min. The elution profile was monitored at 280 nm and fractions were collected, lyophilized, and rechromatographed on a C18 column under the same conditions. Four major peaks were identified as being lectins based on their agglutinating activity.

2.3. Hemagglutination and Carbohydrate Inhibition

Hemagglutinating activity was assayed using rat erythrocytes washed three times with 0.85% NaCl and resuspended to give a 2% (v/v) suspension. Serial two-fold dilutions of the sample (50 μ L) with saline solution were done in microtitre plates, and 50 μ L of the erythrocyte suspension was then added to each well. Hemagglutinating activity was expressed as the reciprocal of the highest dilution showing positive agglutination after incubation at room temperature for 1 hour.

The inhibitory activity of carbohydrates was examined by adding 50 μ L of serial two-fold dilutions of a sugar solution (100 mM) to an equal volume of lectin. After a 30-minute incubation, 50 μ L of the erythrocyte suspension were added and the hemagglutinating activity was scored after 1 hour. The maximum dilution of the test solution capable of inhibiting hemagglutination was recorded. The lowest concentration of sugar blocking hemagglutination was expressed as the 50% inhibitory concentration.

2.4. Two-Dimensional Gel Electrophoresis

Approximately 5 μ g of protein was added to 340 μ L of sample buffer containing 8 M urea, 4% CHAPS, 2%

carrier ampholytes pH 3–10, 70 mM DTT, and 0.001% bromophenol blue (all reagents were from Amersham Pharmacia Biotech, except for DTT, which was from Biorad). The samples were applied to IPG strips with a pH 3–10 nonlinear separation range (catalog number 17-1235-01, Amersham Pharmacia Biotech). After a 10-hour rehydration, isoelectric focusing was done, at 20°C for 1 hour at 500 V, 1 hour at 1000 V, and 10 hours at 8000 V in an IPGphor apparatus (Amersham Pharmacia Biotech). The limiting current was 50 μ A per strip. Strips were then soaked for 10 minutes in a solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, and 2% DTT, followed by an additional 10 minutes in the same solvent containing 2.5% iodoacetamide instead of DTT. Second dimension electrophoresis (SDS-PAGE) was done in an SE-600 system connected to a Multitemp II refrigerating system (Amersham Pharmacia Biotech). After laying the strip on the top of a 12.5% polyacrylamide gel and sealing it with agarose, the gels were run for 1 hour at 90 V, after which a constant amperage of 30 mA per gel was applied until the migration front reached the lower end of the gel. Proteins were detected by a standard silver nitrate staining protocol (Blum *et al.*, 1987).

2.5. Neutral Sugar Content

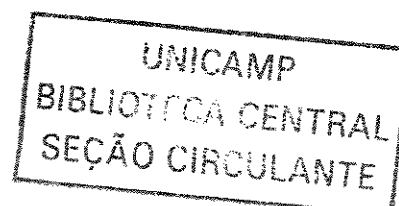
Estimation of the carbohydrate content of the lectin samples was done by the phenol sulphuric acid method (Dubois *et al.*, 1956), using D-glucose as a standard.

2.6. Molecular Mass Determination by Gel Filtration and Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

The M_r of the native lectin was determined using a Protein-Pak 300 SW HPLC column (10 μ m, 0.78 cm $\times$ 30 cm) equilibrated with 100 mM PBS, pH 7.4. The M_r standards (Pharmacia) used were bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), and cytochrome c (12.5 kDa). SDS-PAGE was done in 12.5% polyacrylamide gel, as described by Laemmli (1970).

2.7. Deglycosylation with Endoproteinase H

The isolectins were deglycosylated with endoglycosidase H. For this, 15 μ g of each protein was incubated with 1.5 mL of endoglycosidase H (0.015 U) and 5 mL of 100 mM sodium citrate buffer, pH 5.5. The reaction was allowed to proceed for 12 hours to 37°C and then stopped by heating to 100°C for 5 minutes.



2.8. Protein Sequencing

For N-terminal sequence determination, Coomassie blue-stained gels were electroeluted onto PVDF membranes (Pharmacia). The protein bands were excised from a single membrane and then analyzed with a Shimadzu PPSQ-10 automated protein sequencer using Edman degradation. Phenylthiohydantoin amino acids (PTH-AA) were detected at 269 nm after separation on a reverse phase C18 Wakopak Wakosil HPLC column (0.46 cm × 0.25 cm) (Shimadzu) under isocratic conditions, using 40% acetonitrile, 20 mM acetic acid, and 0.014% sodium dodecyl sulfate as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min at 40°C. The sequence alignment and homologies were obtained using the NCBI-Blast search system.

3. RESULTS

RP-HPLC chromatography of TEL resulted in four major peaks—TEL-I, TEL-II, TEL-III, and TEL-IV—which were eluted with 37%, 46%, 48%, and 51% of acetonitrile, respectively (Fig. 1A). Figure 1B shows the rechromatography on a C18 column with a 0–100% acetonitrile gradient; peaks I–IV eluted at 18, 34, 37 and 42 minutes, respectively. All four peaks were capable of agglutinating human A and rat erythrocytes (Table I). Hemagglutination by the isoforms was best inhibited by carbohydrates as follows: D-galactose and D-glucose for TEL-I; D-sucrose, D-lactose, D-mannose D-glucose, and N-acetyl-glucosamine for TEL-II; D-lactose and D-glucose for TEL-III; and D-sucrose, D-maltose, and D-mannose for TEL-IV.

TEL I–IV were not homogenous, but all components in the preparations could be separated by two-dimensional PAGE (1 st; isoelectric focusing, 2 nd; SDS-PAGE). The major spots were located at pI 5.18–5.34 (Fig. 2A,B,E) and pI 6.28–6.62 (Fig. 2C,D) at about 40 kDa. The minor spots were located at pI 5.98–7.51 (Fig. 2B,C,D), 5.18–5.34 (Fig. 2A) and 5.34–7.51 (Fig. 2E) at about 20 kDa. Isoelectric focusing indicated the presence of a large number of species in the pH range of 5.18–6.28 (40 kDa subunit of TEL-I and TEL-IV), suggesting the presence of negative charges in these fractions, and in the pH range 6.28–6.62 (40 kDa subunit of TEL-II and TEL-III), indicating the presence of neutral amino acids.

The total neutral sugar content of *T. esculenta* isolectins was around 16%.

To determine the molecular structure of the isolectins, the purified proteins were analyzed by SDS-PAGE and gel filtration. The apparent molecular mass of

all four isolectins determined by gel filtration was 20 and 40 kDa (Fig. 3A); gel electrophoresis confirmed that the isolectins consisted of two non-covalently bound subunits (20 and 40 kDa) (Fig. 3B).

After exhaustive digestion of the Endo H to remove the N-linked glycans, the isoforms were examined by SDS-PAGE (Fig. 3C). The mobility of the four deglycosylated proteins was the same as the untreated samples. The N-terminal sequence of the first nine amino-acids in the 20 kDa subunit (SEPLYDING) was identical in all of the isolectins (Table II).

4. DISCUSSION

The rechromatography of TEL by RP-HPLC yielded four peaks (isolectins) with hemagglutinating activity. This method was also used by Eloumami *et al.* (1990) to purify soluble heparin-binding lectins from human brain.

The four major peaks, TEL-I, TEL-II, TEL-III and TEL-IV, were able to agglutinate human A and rat erythrocytes, although there were differences in potency. This observation suggests that there may be functional as well as structural differences among these isolectins. This possibility was also discussed by Pratt *et al.* (1990) for lectins isolated and characterized from beans. When the biological activity of the isoforms (Table I) was compared with that of the native protein, a great loss of activity was noted, probably because of the purification method (RP-HPLC on C18) used.

The carbohydrate binding specificity of the TEL isoforms was assessed by hapten inhibition assays. The agglutinating activity of TEL-I, TEL-II, TEL-III, and TEL-IV in rat erythrocytes was inhibited to different extents by various carbohydrates. This finding indicated that isolectins had distinct carbohydrate-binding properties, as also shown by others (Animashaun *et al.*, 1994). The amino acids present in the isolectins contribute to the overall charge of the molecule, and this may influence lectin-receptor interactions and subsequent bioactivity. Similar observations were made by Ooi *et al.* (2000), who isolated mannose-specific isolectins with different hemagglutinating potencies from *Narcissus tazetta* leaves.

Two-dimensional gel analysis of the four purified TEL fractions revealed the presence of four heterodimeric lectins made up of subunits with molecular masses of 20 kDa and 40 kDa. The mobility in the second dimension of the gel showed several spots distributed over a pI of 5.18 to 6.28 (40 kDa) and 6.28 to 6.62 (20 kDa). The isolectins were located in two distinct pH ranges, with the average values being slightly more acidic

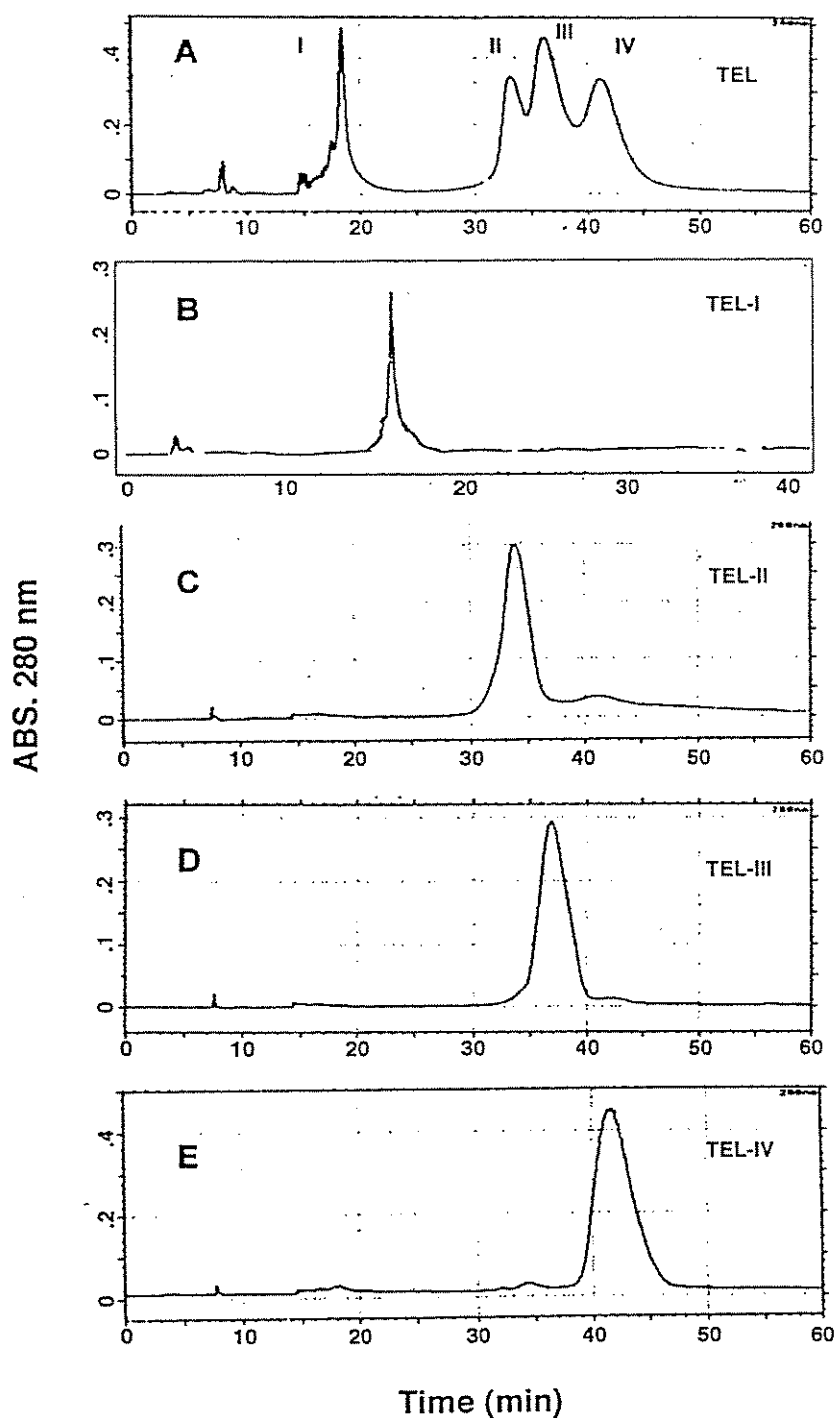


Fig. 1. (A) Elution profile of *T. esculenta* isolectins at 280 nm following RP-HPLC on a preparative μ -Bondapak C_{18} column; (B-E) Following the first run (A), the conditions were optimized for the separation of isolectins I, II, III, and IV by a second run on the same column.

because of small differences in their amino acid composition. The PI of TEL-I and TEL-IV (5.18–6.28, 40 kDa subunit) was slightly higher than that of KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia* (4.0–5.2) (Santos-de-Oliveira *et al.*, 1994), whereas the PI of TEL-II and TEL-

III (6.28–6.62, 40 kDa subunit) was similar to that of *Dioclea lehmanni* (6.55–6.60) (Pérez, 1998).

The neutral sugar content of the four isolectins was around 16%, which is higher than that of lectins from *Vatairea macrocarpa* (7.9%) (Cavada *et al.*, 1998) and

Table I. Hemagglutination and Carbohydrate Inhibition of Lectins from *T. esculenta* Seeds

Hemagglutination (T) ^a or carbohydrate inhibition (IC ₅₀) ^b	Isolectins from <i>T. esculenta</i> seeds				
	TEL	TEL-I	TEL-II	TEL-III	TEL-IV
Human erythrocytes (type A)	6	4	5	5	4
Rat erythrocytes	10	1	2	1	1
D - Sucrose	> 100	12.5	12.5	12.5	12.5
D - Lactose	> 100	12.5	12.5	6.2	25
D - Maltose	12.5	12.5	50	12.5	12.5
D - Galactose	100	6.2	25	12.5	25
D - Mannose	0.39	25	12.5	12.5	12.5
D - Fructose	25	12.5	25	12.5	25
D - Glucose	3.5	6.2	12.5	6.2	25
N-Acetyl-glucosamine	6.2	12.5	12.5	12.5	50

^aTitre is defined as the reciprocal of the endpoint dilution which caused detectable agglutination of erythrocytes. The final lectin concentration was 25 µg/mL in the first well of the multiwell plate.

^bIC₅₀: concentration required to inhibit hemagglutinating activity by 50%. The amount of isolectin used in these assays was 25 µg.

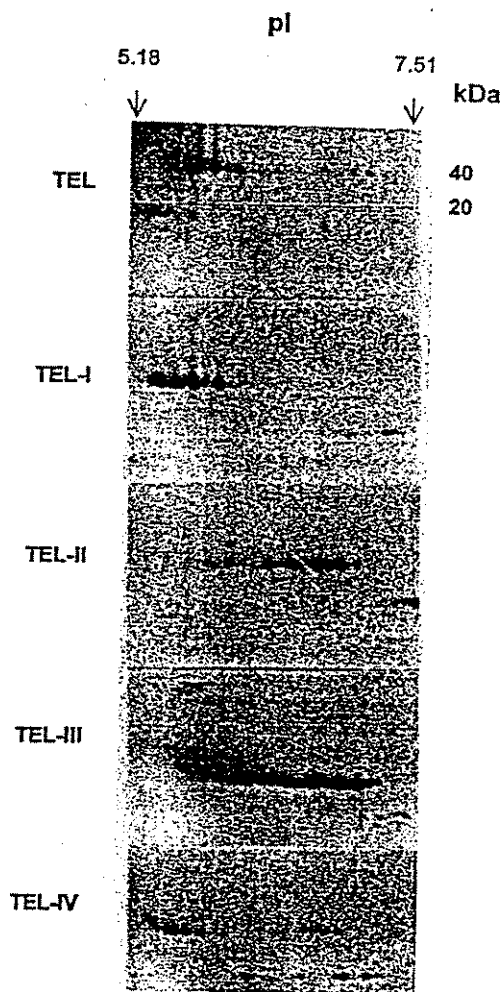


Fig. 2. Two-dimensional gel electrophoresis of the isolectins purified by RP-HPLC chromatography. The components of TEL and the isolectins I, II, III, and IV were separated using a pH gradient from 3.0 to 10.0 in the first direction and then by SDS-PAGE (12.5%) in the second direction.

Araucaria brasiliensis (6.3%) (Datta *et al.*, 1993) but similar to the lectin from latex from *Euphorbia characias* (11.3%) (Barbieri *et al.*, 1983).

The M_r of TEL, estimated by gel filtration on a Protein Pak 300 SW HPLC column, indicated that the isolectins eluted with molecular masses 40 kDa and 20 kDa, indicating that all the lectins interacted with the chromatographic matrix. These results were similar to those reported by Animashaun *et al.* (1994), who characterized isolectins from *Tetracarpidium conophorum* seeds, and by Wongkham *et al.* (1995), who studied isolectins in *Artocarpus lakoocha* seeds.

Gel electrophoresis of the isolectins rechromatographed on a C18 column under the same conditions as the initial RP-HPLC revealed two protein bands of 20 kDa and 40 kDa, respectively, under reducing and nonreducing (data not shown). After deglycosylation with endoglycosidase H, there was no change in the molecular mass of the isolectins in SDS-PAGE. This observation suggests that endo-H digestion was ineffective in removing the carbohydrate units.

The N-terminal amino acid sequences of the isolectins showed a high degree of homology among themselves, but no homology to other lectins.

Table II. Comparison of the N-Terminal Sequences of Isolectins from *T. esculenta* Seeds

Fractions	Position initial	Sequence
TEL	1	SEPLYDINGDEVTTXSIYYI
TEL-I	2	SEPLYDING
TEL-II	2	SEPLYDINGDKVVTGXKEY
TEL-III	1	SEPLYDINGDESTTGXXYXX
TEL-IV	1	SEPLYDINGDEPNT

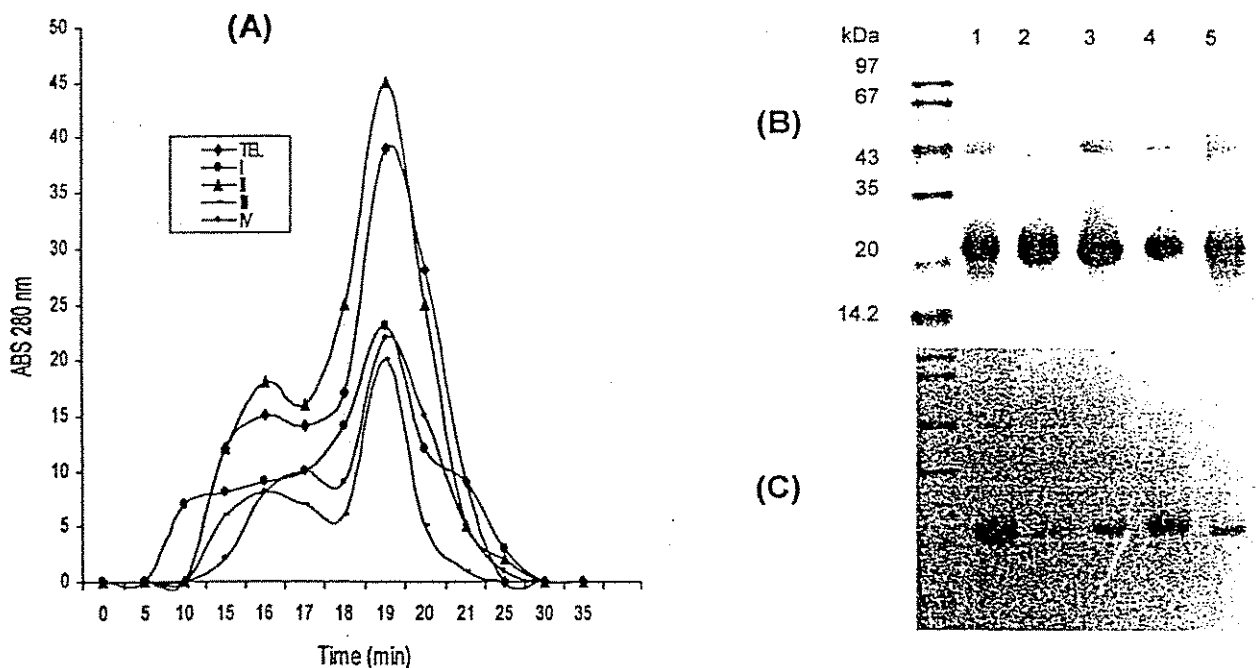


Fig. 3. (A) Purified protein fractions analyzed by gel filtration on a Protein Pak 300 SW HPLC column; (B) SDS-PAGE (12.5%) of purified fractions of TEL; Lane 1, TEL; Lanes 2–5, the isolectins I, II, III, and IV, respectively. (C) SDS-PAGE (12.5%) of TEL isolectins after endoglycosidase H treatment.

This is the first report of isolectins in the family Sapindaceae. The four isolectins showed very similar molecular masses, N-terminal sequences, and hemagglutinating activity, but differed in their isoelectric points and in their inhibition by carbohydrate.

REFERENCES

- Abrecht, H., Wattiez, R., Ruyschaert, J.-M., and Homblé, F. (2000). *Plant Physiol.* 124, 1181–1190.
- Animashaun, T., Togun, R. A., and Hughes, R. C. (1994). *Glycoconjugate J.* 11, 299–303.
- Anuradha, P. and Bhide, S. V. (1999). *Phytochemistry* 52, 751–758.
- Barbieri, L., Falasca, A., Franceschi, C., Licastro, F., Rossi, C. A., and Stirpe, F. (1983). *Biochem. J.* 215, 433–439.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987). *Electrophoresis* 8, 93–99.
- Cavada, B. S., Santos, C. F., Granjeiros, T. B., Nunes, E. P., Sales, P. V. P., Ramos, R. L., Sousa, F. A. M., Crisostomo, C. V., and Calvete, J. J. (1998). *Phytochemistry* 49, 675–680.
- Datta, P. K., Figueroa, M. O. R., and Lajolo, F. M. (1993). *J. Agric. Food Chem.* 41, 1851–1855.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F. (1956). *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Eloumani, H., Bladier, D., Caruelle, D., Courty, J., Joubert, R., and Caron, M. (1990). *Int. J. Biochem.* 22, 539–544.
- Freire, M. G. M., Gomes, V. M., Corsini, R. E., Machado, O. L. T., De Simone, S. G., Novello, J. C., Marangoni, S., and Macedo, M. L. R. (in press). *Plant Physiol. Biochem.*
- Harata, K. and Muraki, M. (2000). *J. Mol. Biol.* 297, 673–681.
- Kilpatrick, D. C., Weston, J., and Urbaniak, S. J. (1983). *Anal. Biochem.* 134, 205–209.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227, 680–689.
- Machuka, J. S., Okeola, O. G., Van Damme, J. M., Chrispeels, M. J., Leuven, F. V., and Peumans, W. J. (1999). *Phytochemistry* 51, 721–728.
- Matsumoto, I., Koyama, T., Kitagaki-Ogawa, H., and Seno, N. (1987). *J. Chromatog.* 400, 77–81.
- Ooi, L. S. M., Ng, T. B., Sun, S. S. M., and Ooi, V. E. C. (2000). *J. Protein Chem.* 19, 163–168.
- Pérez, G. (1998). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 843–853.
- Pratt, R. C., Singh, N. K., Shade, R. E., Murdock, L. L., and Bressan, R. A. (1990). *Plant Physiol.* 93, 1453–1459.
- Rüdiger, H. (1997). In H.-J. Gabius and S. Gabius (Eds): *Glycosciences, status and perspectives* (vol. 2) London, Chapman & Hall, Weinheim, pp. 415–438.
- Rüdiger, H. (1998). *Acta Anat.* 161, 130–152.
- Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S. M. O., Beltramini, L. M., and Roque-Barreira, M. C. (1994). *J. Immunol.* 22, 1798–1807.
- Suzuki, T., Takagi, T., Furukohri, T., Kawamura, K., and Nakauchi, M. (1990). *J. Biol. Chem.* 265, 1274–1281.
- Wongkham, S., Wongkham, C., Boonsiri, P., Simasathiansophon, S., Trisonthi, C., and Atisook, K. (1995). *Phytochemistry* 40, 1331–1334.

ARTIGO PUBLICADO

***Talisia esculenta* lectin and larval development of
Callosobruchus maculatus and *Zabrotes subfasciatus*
(Coleoptera: Bruchidae)**

Maria Ligia R. Macedo, Maria das Graças Machado Freire, José Camillo Novello and
Sérgio Marangoni. **BBA, 1571,2002, 83-88.**

Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae)

Maria Ligia R. Macedo^{a,b,*}, Maria das Graças Machado Freire^a,
José Camillo Novello^a, Sérgio Marangoni^a

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^bDepartamento de Ciências Naturais, CEUL, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Capitão Olineto Mancini, 1662, Colinos C.P. 210, 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil

Received 11 July 2001; received in revised form 13 December 2001; accepted 10 January 2002

Abstract

Bruchid larvae cause major losses in grain legume crops throughout the world. Some bruchid species, such as the cowpea weevil and the Mexican bean weevil, are pests that damage stored seeds. Plant lectins have been implicated as antibiosis factors against insects, particularly the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Talisia esculenta* lectin (TEL) was tested for anti-insect activity against *C. maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* larvae. TEL produced ca. 90% mortality to these bruchids when incorporated in an artificial diet at a level of 2% (w/w). The LD₅₀ and ED₅₀ for TEL was ca. 1% (w/w) for both insects. TEL was not digested by midgut preparations of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*. The transformation of the genes coding for this lectin could be useful in the development of insect resistance in important agricultural crops. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Talisia esculenta* lectin; *Callosobruchus maculatus*; *Zabrotes subfasciatus*; Resistance

1. Introduction

The grains of legumes such as the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) are important sources of dietary proteins and carbohydrates in many countries, especially in sub-Saharan Africa and elsewhere in the tropics. Cowpea is also a source of animal fodder and income for many poor families. The cowpea plant has a low level of resistance to insects and microorganisms, and consequently produces very low crop yields [1]. A grain potential of over 1500 kg/ha is never obtained without the use of synthetic insecticides [2]. One of the most important insect pests of the cowpea is the bruchid weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera), which attacks the seeds during storage, severely affecting the quality and storability of the produce. In severe periods of infestation, post-harvest seed losses caused by *C. maculatus* can reach 100% within a period of 6 months [3].

The Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus* (Boh.), is widespread throughout the tropics and subtropics, as a major pest of legumes [4] such as *Phaseolus vulgaris* (L.), *P. lunatus* (L.) [5–7] and *V. unguiculata* (L.) Walp. (cowpea) seeds [8]. This bruchid develops well in *C. maculatus* (F.) with resistant cowpea seeds [9]. Controlling these Bruchidae generally requires the use of chemical insecticides which are toxic to humans and domestic animals and harmful to the environment [10]. Several environmentally acceptable control measures, mostly based on plant-derived products, have been suggested [11].

Resistance in crop plants can be mediated by a wide range of metabolic products, including primary (e.g. proteinase, amylase inhibitors and lectins) and secondary metabolites (e.g. alkaloids, tannins and rotenoids). Modified forms of the 7S storage proteins (vicilins), have been implicated in protection against *C. maculatus* in some cowpea cultivars [4,9]. Canatoxin, a toxic protein isolated from *Canavalia ensiformis*, was also shown to be highly toxic when fed to *C. maculatus* [12]. Zeatoxin, a glycoprotein isolated from *Zea mays* seeds, was toxic to *C. maculatus* when supplied as a diet of artificial seeds [13]. Arcelin has insecticidal properties against *Z. subfasciatus*, as do phytohemagglutinins (PHA)

* Corresponding author. Departamento de Ciências Naturais, CEUL, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Capitão Olineto Mancini, 1662, Colinos C.P. 210, 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil. Fax: +55-67-521-1228.

E-mail address: bioplant@terra.com.br (M.L.R. Macedo).

and α -amylase inhibitors (α AI), all of which are members of the bean lectin-like protein family [14].

Several studies have indicated the importance of bioassays for assessing the ability of plant compounds to impart resistance [15–17].

There is increasing evidence that lectins can protect against insects and other herbivores [18,19]. Lectins form a large group of heterogeneous proteins that bind carbohydrates on the surface of responsive cells, including the epithelial cells of animal digestive tracts [20]. Lectins with specificity for mannose residues appear to be insecticidal for many insects, including homopterans, coleopterans and lepidopterans [21]. The inclusion of lectins in artificial diets or in their topical application to these arthropods has shown that these proteins may be insecticidal [22].

Talisia esculenta (St. Hil.) Radlk., locally known as pitomba, belongs to the family Sapindaceae and occurs in northern and northeastern Brazil. The fruit of *T. esculenta* is consumed by humans and also by birds, the latter acting as dispersers for the seeds. Popular information mentions that chickens die after ingesting the fruit. Recently we purified and characterized [23] a novel lectin from *T. esculenta* seeds (TEL), the first of its kind from the family Sapindaceae. TEL showed two protein bands in SDS-PAGE (M_r = 20,000 and 40,000 kDa) and agglutinated human and animal erythrocytes. Of the various sugars tested, the lectin was best inhibited by mannose. The lectin inhibited the growth of the fungi *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* and *Saccharomyces cerevisiae* [24].

In this work, we investigated the ability of a lectin from *T. esculenta* (TEL) to inhibit the larval growth of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* and evaluated the susceptibility of this protein to digestion by papain, pepsin and proteolytic enzymes present in the midgut of these two weevil species.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

T. esculenta seeds were collected in the State of Ceará (Brazil). Cowpea (*V. unguiculata*) seeds of the cultivar Epacé 10 were supplied by the Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, where they were developed.

2.2. Preparation of TEL

T. esculenta lectin was prepared according to Freire et al. [23]. Dehulled *T. esculenta* seeds were finely ground and extracted (1:5 meal to buffer ratio) with a 150 mM NaCl solution for 24 h at 4 °C and then centrifuged at $10,000 \times g$, for 30 min at the same temperature. The clear supernatants (= crude extracts or CE) were used to determine the protein content and hemagglutinating activity. The CE was diluted in 150 mM NaCl and applied to a Sephadex G-100 column

(2.5×80 cm) equilibrated with the same solution. The lectin-rich fraction was recovered and applied to a chitin column (20 ml) equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.6, and eluted with 100 mM HCl. The purified lectin were dialyzed and lyophilized.

2.3. Chitinase activity

Chitinase activity was measured with chitin azure (Sigma Chemicals, St. Louis) as substrate employing the colorimetric assay as described by Hackman and Lafon [25]. One unit of activity was defined as the concentration of chitinase that produces an absorbance difference of 0.001.

2.4. Assay of inhibitory activity determination

Trypsin inhibitory activity was determined by measuring the remaining hydrolytic activity of trypsin towards the substrate BAPNA at pH 8.0 after pre-incubation with inhibitor [26]. The ability to inhibit other proteinases such as chymotrypsin and papain were assayed as described by Xavier-Filho et al. [27]. The inhibition of porcine pancreatic α -amylase was measured according to the method in Bernfeld [28]. The assay employed soluble starch (1%) as the substrate.

2.5. Insects

The colonies of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* utilised were originally supplied by Dr. J.H.R. Santos (Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil). The insects were housed at 28 ± 1 °C, a relative humidity of 65–75%, and were fed the seeds of a susceptible cowpea cultivar (Epacé-10).

2.6. Insect bioassays

To examine the effects of TEL on *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* development, the artificial seed system previously developed by Macedo et al. [4] was used. Artificial seeds (ca. 400 mg each) were made from finely ground cowpea seeds (Epacé 10 cultivar) using a cylindrical brass mal and a hand press. Artificial seeds containing TEL at concentrations of 0.25%, 0.5%, 1%, and 2% (w/w) were obtained by thoroughly mixing the lectin with cowpea seed meal and pressing as described above. Each treatment had five artificial seeds and were replicated three times for each of the above concentrations. After a 48-h period for adjustment in the growth chamber, the seeds were offered to nine 2–3-day-old fertilized females. After allowing 24 h for oviposition, the number of eggs per seed was reduced to five ($n = 25 \times 3$). Following incubation for 20 days at 28 °C and 70–75% relative humidity, the seeds were opened and the weight and number of larvae were determined. Control artificial seeds were made with Epacé-10 cultivar meal containing no added lectin.

Linear regression analysis was used to describe the response of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* to a series of doses of TEL. Effective doses for 50% response (ED_{50}) are the concentrations fractions that decrease the mass of the larvae to 50% of the mass of the control. Lethal doses (LD_{50}) are the concentrations of the fractions that protein the number of larvae to 50% of the number found in control seeds. X =dose and Y mean weight or percentage mortality. Because of the range in mortality percentages (9.7–88.9% and 12.3–95.5% for *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*, respectively) for the TEL regression analysis, percentages were not transformed.

2.7. Digestion of TEL

Larval gut homogenates were prepared as described by Macedo et al. [13]. For this, the midguts of 200 larvae from each species were dissected and extracted in 1 ml 0.1 M acetate buffer pH 5.6, 1 mM cysteine and 3 mM EDTA. TEL was incubated with the midgut (2 mg/ml) in 100 mM acetate buffer, pH 5.6, containing 1 mM cysteine and 3 mM EDTA for 3, 6, 12, 24, 48 and 72 h at 37 °C. The digestion was stopped by immersing the tubes in boiling water for 2 min.

TEL was also digested with pepsin and papain at a substrate/proteinase ratio of 20:1, for 10 min, and 0.5, 1, 2, 4, 8 and 16 h at 37 °C in 0.01 M phosphate buffer, 1 mM cysteine, 3 mM EDTA, pH 6. The digestion was stopped as described above [29].

2.8. Gel electrophoresis

The relative molecular weights of the digestion products were estimated by polyacrylamide gel electrophoresis [30]. The proteins used as molecular weight standards for SDS-PAGE were phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa) and α -lactoglobulin (14.2 kDa).

2.9. Statistical analysis

All data were examined using one-way analysis of variance (ANOVA) (General Linear Models on GLM procedure). The Student–Neuman–Keul's test was used to identify the means which differed if the ANOVA test indicated significance. A p value <0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

Several lectins with detrimental effects on the growth of insects have been isolated from plants, especially their seeds [31–34]. The present study was done to examine the action of a *T. esculenta* lectin (TEL), with chitin-binding proper-

ties, on the growth of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* larvae, and to assess the susceptibility of TEL to digestion by papain and pepsin and by acidic proteolytic enzymes from the midgut of the two weevils. TEL is a dimer containing chains of approximately 20 and 40 kDa, which is inhibited by mannose and glucose and also binds to a chitin affinity column [24].

The levels of trypsin-, chymotrypsin-, papain, and α -amylase inhibitors and also chitinase in the TEL were found to be negligible when the proteins were at a concentration of 1–3 mg/ml.

The effect of TEL on the development of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* were assessed by determining the number and the mass of surviving larvae 20 days after oviposition in artificial seeds containing increasing amounts of TEL. The dose–response effect of TEL on the growth and mortality of the weevil larvae is shown in Figs. 1 and 2. The concentration of the lectin used (0.5–2.0% (w/w) occur naturally in legume seeds and were similar to the concentrations used by other workers [32]. The effect of dietary TEL on cowpea weevil mortality and weight at day 20 is presented in Fig. 1a and b. The mortality and weight of cowpea weevil larvae feeding on control seeds (represented by the Y -intercept value) was ca. 9.7% and 2.4 mg, respectively, while a seed containing 1.0% TEL produced an estimated 50% mortality (LD_{50}) and a decrease of 50%

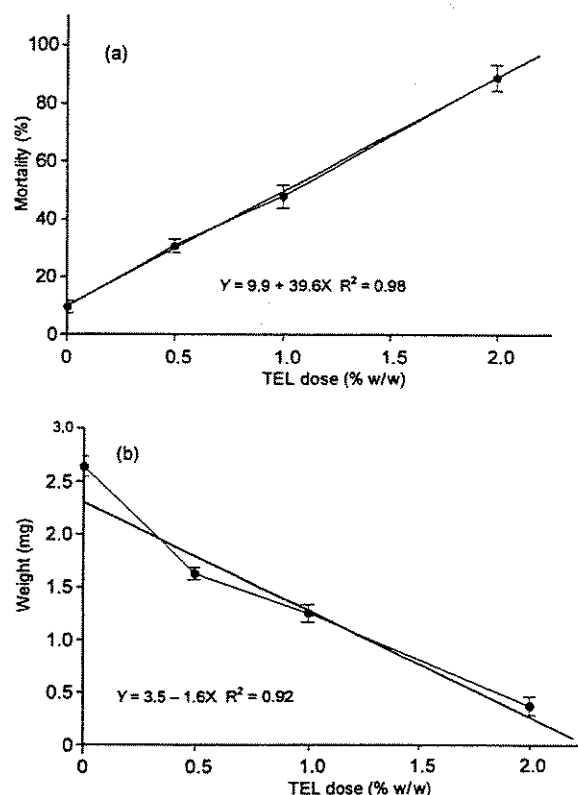


Fig. 1. Effect of dietary TEL on *C. maculatus* within-seed artificial larval (a) mortality and (b) weight, using an artificial seed bioassay. Y -intercept in (a) is mortality and (b) is weight of larvae in control seeds. Each point has an $n \geq 25$. Error bars indicate standard error of the mean.

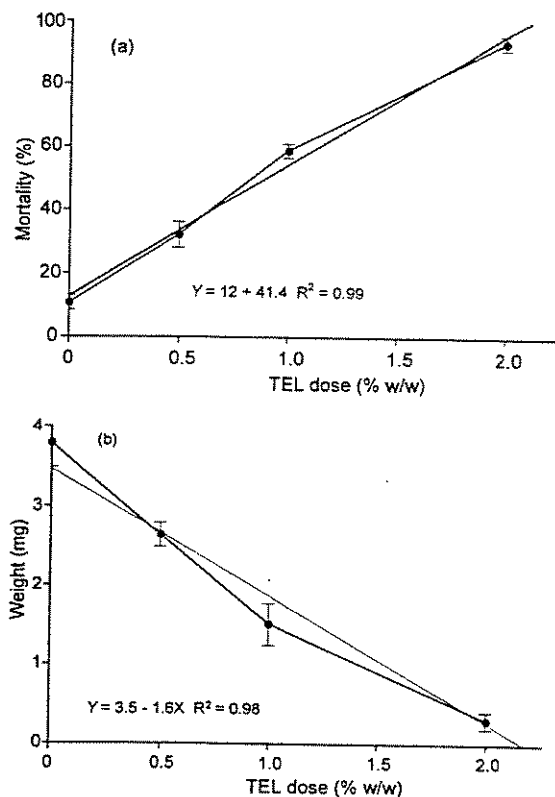


Fig. 2. Effect of dietary TEL on *Z. subfasciatus* within-seed artificial larval (a) mortality and (b) weight, using an artificial seed bioassay. Y-intercept in (a) is mortality and (b) is weight of larvae in control seeds. Each point has an $n \geq 25$. Error bars indicate standard error of the mean.

weight (ED_{50}). Regression analysis showed that for every 0.1% increase in TEL dose, there was a 3.95% increase in mortality with an R^2 value 0.98. For each increase in dose of 0.1% TEL, there was a 0.1 mg decrease in weight: the R^2 value was 0.92.

The effect of dietary TEL on *Z. subfasciatus* mortality and weight at day 20 is presented in Fig. 2a and b. The mortality

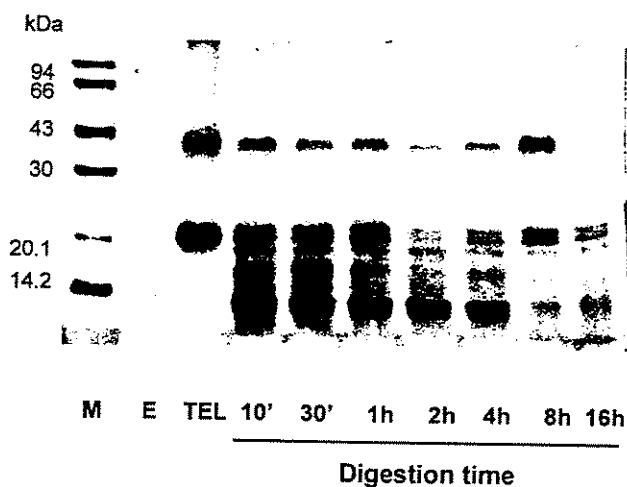


Fig. 3. SDS-PAGE patterns of TEL digested by a mixture of pepsin and papain. (E) pepsin+papain; (M) molecular mass markers.



Fig. 4. SDS-PAGE patterns of TEL digested by a midgut preparation of *C. maculatus* (GUT); (M) molecular mass markers.

and weight of *Z. subfasciatus* larvae feeding on control seeds was ca. 12.3% and 3.6 mg, respectively, while a seed containing 0.94% TEL produced an estimated 50% mortality (LD_{50}) and an decrease of 50% weight (ED_{50}) at 1.1%. Regression analysis showed that for every 0.1% increase in TEL dose, there was a 4.14% increase in mortality with an R^2 value 0.99. For each increase in dose of 0.1% TEL, there was a 0.16 mg decrease in weight: the R^2 value was 0.98.

TEL produced ca. 90% mortality at the 2% level, with an LD_{50} of ca. 1% for the two species. Figs. 1b and 2b show a plot of the mass of surviving larvae vs. TEL concentrations in the same artificial seeds. TEL had a strong negative effect on the weight of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* larvae which was particularly evident for the former species at 1.0% TEL. The LD_{50} of 1.0% for TEL was comparable to the concentrations (0.1–1.0%) at which wheat germ agglutinin and rice and stinging nettle lectins caused 51.7%, 58.5% and 65% mortality, respectively, all of these chitin-binding proteins are detrimental to *C. maculatus* [35].

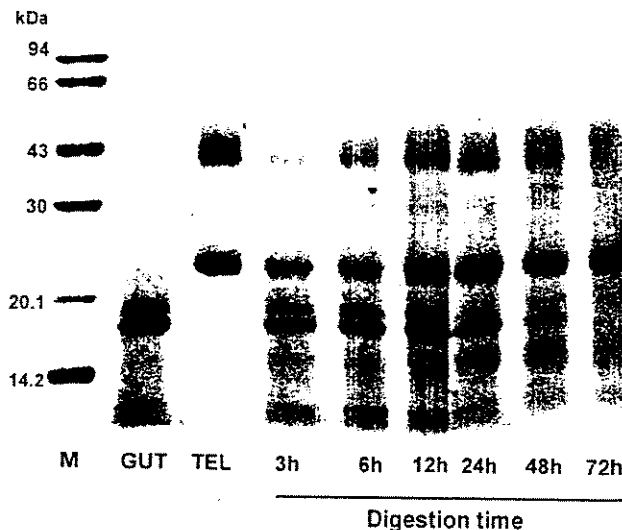


Fig. 5. SDS-PAGE patterns of TEL digested by a midgut preparation of *Z. subfasciatus* (GUT); (M) molecular mass markers.

At 1.0% TEL, the weight of *Z. subfasciatus* larvae decreases by about 50%. While several reports have shown the effect of lectins on the development of *C. maculatus*, to date, only arcelins have been reported to inhibit the larval growth of *Z. subfasciatus*; this inhibition could account for the resistance of arcelin-containing seeds to attack by weevils [16,31]. A comparison of the amino acid sequences of arcelins with other seed proteins showed that they belong to the bean lectin family that includes phytohemagglutinin and α -amylase inhibitor. Arcelins have weak lectin activity [31].

The mechanism by which lectins exert their toxic effects in insects are poorly understood, but the molecules first have to bind to 'receptors' on the midgut epithelium, resulting in subsequent systemic effects [36,37]. Another possibility is that the lectins may bind to the peritrophic membrane in the midgut region. This membrane exists in most phytophagous insects and is composed primarily of chitin (containing *N*-acetylglucosamine residues) and proteins [38]. The peritrophic membrane forms a barrier to protect the midgut epithelium from abrasive food particles. Lectins may bind to this membrane and prevent or enhance movement between the endo- and exoperitrophic space or prevent the formation of the membrane itself [39]. Lectins can also interfere with digestive enzymes and assimilatory proteins, thereby inhibiting food digestion and absorption. This action may contribute to the overall detrimental effect of lectins on nutrient absorption [40].

Depending on their resistance to gut proteolysis and on their specificity for carbohydrate receptors, lectins may bind to different parts of the small intestine to cause various changes in function and morphology [41]. We therefore examined the susceptibility of TEL to the action of papain and pepsin and to acidic proteolytic enzymes from weevil midgut homogenates. The digestion of TEL by pepsin (aspartic proteinase) and papain (cysteine proteinase) at pH 6.0 was studied as a model for the action of midgut aspartic and cysteine proteinases in *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* reared on the seeds of *V. unguiculata* [42]. After 16 h of incubation with a mixture of pepsin and papain (1:1) a 40-kDa subunit of TEL was hydrolyzed. In contrast, 20 kDa subunit began to be hydrolyzed in the first 10 min of incubation (Fig. 3). The digestion products had relative molecular masses ranging from 4.2 to 20 kDa. When incubated with the enzymes of *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*, there was virtually no digestion of TEL after 48 h of incubation (Figs. 4 and 5).

The action of TEL on *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* larvae may involve: (1) binding of TEL to glycoconjugates on the surface of epithelial cells along the digestive tract, (2) binding of TEL to glycosylated digestive enzymes, thereby inhibiting their activity, (3) binding to chitin component of the peritrophic membrane (or equivalent structures) in the weevil midgut [43], and (4) a strong resistance of TEL to digestion by midgut aspartic and cysteine proteinases in *C. maculatus* and *Z. subfasciatus*.

In conclusion, TEL is the first lectin of the family Sapindaceae to show a strong inhibitory effect on the development of *C. maculatus* and is also the first vegetable lectin to exert similar inhibition on the *Z. subfasciatus*.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, CNPq and PROPP/UFMS.

References

- [1] A.O. Latunde-Dada, Genetic manipulation of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) for enhanced resistance to fungal pathogens and insect pests, *Adv. Agron.* 44 (1990) 133–154.
- [2] O.G. Omitogun, L.E.N. Jackai, G. Thottappilly, Isolation of insecticidal lectin-enriched extracts from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) and other legume species, *Entomol. Exp. Appl.* 90 (1999) 301–311.
- [3] A.E. Hall, B.B. Singh, J.D. Ehlers, Cowpea breeding, *Plant Breed. Rev.* 15 (1997) 217–274.
- [4] M.L.R. Macedo, K.V.S. Fernandes, M.P. Sales, J. Xavier-Filho, Vicilins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*), *Comp. Biochem. Physiol.* 105C (1993) 89–94.
- [5] J.A. McFarlane, A.J.S. Wearing, A means of differentiating between *Acanthoscelides obtectus* (S.) and *Zabrotes subfasciatus* (B.) (Coleoptera: Bruchidae) in white haricot beans at the pupal stage, *J. Stored Prod. Res.* 3 (1967) 261–262.
- [6] M.P. Pimbert, Reproduction and oviposition preferences of *Zabrotes subfasciatus* stocks reared from two host plant species, *Entomol. Exp. Appl.* 38 (1985) 273–276.
- [7] J. Meik, P. Dobie, The ability of *Zabrotes subfasciatus* to attack cowpeas, *Entomol. Exp. Appl.* 42 (1986) 151–158.
- [8] J.C. Davies, A note on the occurrence of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) on legumes in Uganda, East Afr., *Agric. For. J.* 71 (1972) 294–299.
- [9] M.L.R. Macedo, K.V. Fernandes, M.P. Sales, J. Xavier-Filho, Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28 (1995) 183–190.
- [10] R.A. Daoust, D.A. Roberts, B.P. Neves, Distribution, biology and control of cowpea pests in Latin America, in: S.R. Singh, K.O. Rachie (Eds.), *Cowpea Research, Production and Utilization*, Wiley, London, 1985, pp. 249–264.
- [11] B.B. Singh, S.R. Singh, O. Adjadi, Bruchid resistance in cowpea, *Crop. Sci.* 25 (1985) 736–739.
- [12] C.R. Carlini, A.E.A. Oliveira, P. Azambuja, J. Xavier-Filho, M.A. Wells, Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes, *J. Econ. Entomol.* 90 (1997) 340–348.
- [13] M.L.R. Macedo, M.B. Coelho, M.G.M. Freire, O.L.T. Machado, S. Marangoni, J.C. Novello, Effect of a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, *Protein Pept. Lett.* 17 (2000) 25–31.
- [14] N.S. Paes, I.R. Gerhardt, M.V. Coutinho, M. Yokoyama, E. Santana, N. Harris, M.J. Chrispeels, M.F.G. de Sá, The effect of arcelin-I on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein, *J. Insect Physiol.* 46 (2000) 393–402.
- [15] A.M.R. Gatehouse, S.J. Shackley, K.A. Fenton, J. Bryden, A. Pusztai, Mechanism of seed lectin tolerance by a major insect storage pest of

- Phaseolus vulgaris*, *Acanthoscelides obiectus*, J. Sci. Food Agric. 47 (1989) 269–280.
- [16] C. Cardona, J. Kornegay, C.E. Posso, F. Morales, H. Ramirez. Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil, Entomol. Exp. Appl. 56 (1990) 197–206.
- [17] A. Pusztai, S.W.B. Ewen, G. Grant, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, L. Rubio, S. Bardocz. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinating and other *N*-acetylglucosamine-specific lectins, Br. J. Nutr. 70 (1993) 313–321.
- [18] W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme. Lectins as plant defence proteins, Plant Physiol. 109 (1995) 347–352.
- [19] J.S. Machuka, O.G. Okeola, M.J. Chrispeels, L.E.N. Jackai. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer, Phytochemistry 53 (2000) 667–674.
- [20] A. Vilalobo, H.J. Gabius. Signaling pathway for transduction of the initial message of the glycoside into cellular responses, Acta Anat. 161 (1998) 110–129.
- [21] X. Foissac, N.T. Loc, P. Christou, A.M.R. Gatehouse, J.A. Gatehouse. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA), J. Insect Physiol. 46 (2000) 573–583.
- [22] T.H. Czapla. Plant lectins as insect control agents in transgenic plants. In: Taylor and Francis (Eds.), Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants, London (1998) pp. 123–138.
- [23] M.G.M. Freire, O.L.T. Machado, M.B. Smolka, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L.R. Macedo. Isolation and characterization of isolectins from *Talisia esculenta* seeds, J. Protein Chem. 20 (2001) 495–500.
- [24] M.G.M. Freire, V.M. Gomes, R.E. Corsini, S.G. De Simone, J.C. Novello, S. Marangoni, M.L.R. Macedo. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with growth fungi, Plant Physiol. Biochem. (in press).
- [25] R.H. Hackman, L. Lafon. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*, Phytochemistry 34 (1993) 1473–1475.
- [26] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin, Arch. Biochem. Biophys. 95 (1961) 271–278.
- [27] J. Xavier-Filho, F.A.P. Campos, M.B. Ary, C.P. Silva, M.M.M. Carvalho, M.L.R. Macedo, F.J.A. Lemos, G. Grant. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*, J. Agric. Food Chem. 37 (1989) 1139–1143.
- [28] Bernfeld, P., Amylases, α and β . In: Colowick and Kaplan (Eds.), Methods in Enzymology, New York (1955) pp. 149–158.
- [29] M.P. Sales, M.L.R. Macedo, J. Xavier-Filho. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid midgut proteinases, Comp. Physiol. Biochem. 103B (1992) 945–950.
- [30] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, Nature 227 (1970) 680–685.
- [31] T.C. Osborn, D.C. Alexander, S.S.M. Sun, C. Cardona, F.A. Bliss. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein, Science 240 (1988) 207–210.
- [32] L.L. Murdock, J.E. Huesing, S.S. Nielsen, R.C. Pratt, E.E. Shade. Biological effects of plant on the cowpea weevil, Phytochemistry 29 (1990) 85–89.
- [33] N. Sauvion, Y. Rahbé, W.J. Peumans, E. Van Damme, J.A. Gatehouse, A.M.R. Gatehouse. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*, Entomol. Exp. Appl. 79 (1996) 285–293.
- [34] M.S. Harper, T.L. Hopkins, T.H. Czapla. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of the peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) larvae, Tissue Cell 30 (1998) 166–176.
- [35] J.E. Huesing, L.L. Mudock, R.E. Shade. Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin, Phytochemistry 30 (1991) 3565–3568.
- [36] C.H. Eisemann, R.A. Donaldson, R.D. Pearson, L.C. Cadagon, T. Vacuolo, R.L. Tellman. Larvicidal activity of lectins on *Lucilia cuprina*: mechanism of action, Entomol. Exp. Appl. 72 (1994) 1–11.
- [37] K.S. Powell, J. Spence, M. Bharati, J.A. Gatehouse, A.M.R. Gatehouse. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal.), J. Insect Physiol. 44 (1998) 529–539.
- [38] A.G. Richards, P.A. Richards. The peritrophic membranes of insects, Annu. Rev. Entomol. 22 (1977) 219–240.
- [39] T.H. Czapla, B.A. Lang. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), J. Econ. Entomol. 83 (1990) 2480–2485.
- [40] K. Zhu, J.E. Huesing, R.E. Shade, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, L.L. Murdock. An insecticidal *N*-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae), Plant Physiol. 110 (1996) 195–202.
- [41] A. Pusztai, S.W.B. Ewen, G. Grant, W.J. Peumans, E.J.M. Van Damme, L. Rubio, S. Bardocz. Relationship between survival and binding of plant lectins during small intestinal passage and their effectiveness as growth factors, Digestion 46 (1990) 308–316.
- [42] F.J.A. Lemos, F.A.P. Campos, C.P. Silva, J. Xavier-Filho. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds, Entomol. Exp. Appl. 56 (1991) 219–227.
- [43] F. Firmino, K.V.S. Fernandes, M.P. Sales, V.M. Gomes, M.R.A. Miranda, S.J.S. Domingues, J. Xavier-Filho. Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*, Braz. J. Med. Biol. Res. 29 (1996) 749–756.

ARTIGO *in press*

**Inflammatory responses induced by *Talisia*
esculenta seeds lectin in mouse**

M.G.M. Freire, I. A. Desouza, A.C.M. Silva, M.L.R. Macedo, M.S. Lima, W.M.S.C.
Tamashiro, E. Antunes and S. Marangoni. **TOXICON**, 2003.



Inflammatory responses induced by *Talisia esculenta* seeds lectin in mouse

M.G.M. Freire^{a*}, I. A. Desouza^b, A.C.M. Silva^c, M.L.R. Macedo^{a,e}, M.S. Lima^c,
W.M.S.C. Tamashiro^d, E. Antunes^b and S. Marangoni^a

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^bDepartamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^cDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil

^dDepartamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^eDepartamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Três Lagoas, MS, Brazil

*Correspondence:

Maria das Graças Machado Freire

Instituto de Biologia

Departamento de Bioquímica

Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Cidade Universitária Zefferino Vaz, C.P. 6109

CEP 13083-970, SP, Brazil.

E-mail address: maria.freire@terra.com.br

FAX: 55-19-37886129

ABSTRACT

A novel lectin from *Talisia esculenta* seeds (TEL) has been recently purified and characterized. In this study we investigated the proinflammatory activity of TEL using both the air-pouch and peritoneal cavity as well as paw oedema models. TEL (10-40 μ g) induced a significant neutrophil and mononuclear cell recruitment when injected into either mouse air-pouch or peritoneal cavity. The neutrophil accumulation into the air-pouch was dose-and time-dependent with a maximal response at 16 h, returning to control levels at 72 h whereas maximal mononuclear cells accumulation was observed at 24 h after TEL injection. The same profile of neutrophil accumulation was observed when this lectin was injected into mouse peritoneal cavity, although the maximal mononuclear cells recruitment was observed 48 h after TEL injection. Additionally, TEL (12.5-200 μ g/paw) dose dependently increased the microvascular permeability in the mice paw. D-mannose, better than D-glucose, significantly inhibited TEL-induced neutrophil migration into peritoneal cavity or air-pouch model. The carbohydrate D-galactose had no effect on TEL-induced neutrophil migration in either cavities studied. On the other hand, D-mannose slightly inhibited the TEL-induced paw edema, whereas neither D-glucose nor D-galactose affected this phenomenon. In conclusion, our data show that TEL induces neutrophil and mononuclear cell accumulation by a mechanism related to their specific sugar-binding properties.

Keywords: *Talisia esculenta* lectin; mouse paw edema; leukocyte immigration

1. Introduction

Plant lectins can mimic endogenous mammalian lectins and therefore have been widely used to study physiopathological processes (Bento et al., 1993; Lima et al., 1999). The isolation and characterization of plant lectins were traditionally carried out from dry seeds of leguminous species (Chrispeels and Raikhel, 1991). More recently, the lectins have also been found in numerous other plant families (Etzler, 1986; Van Damme et al., 1995).

Previous studies reported that plant lectins act as potent mitogens, inducing *in vitro* proliferation of human lymphocytes by cytokine-independent mechanisms (Ito et al., 1984; Borreback and Carlson 1989). Additionally, lectins isolated from *Dioclea grandiflora* (Moreira et al., 1983), *Canavalia brasiliensis* (Moreira et al., 1984) and *Soybean agglutinin* (Benjamin et al., 1997) induce a typical *in vivo* inflammatory response characterized by dose-dependent plasma protein exudation and neutrophil migration in the rat (Bento et al., 1993). A neutrophil migration-inducing lectin was also found in *Artocarpus integrifolia* seeds (Santos-de-Oliveira et al., 1994). In mice, lectin isolated from *D. grandiflora* induces an inflammatory cutaneous reaction accompanied by influx of polymorphonuclear leukocytes (Silva Lima et al., 1993). Recently we purified and characterized a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds (TEL), the first one belonging to Sapindaceae family (Freire et al., 2001, 2002). This lectin showed two protein bands in SDS-PAGE (MW 20,000 and 40,000) and presented hemagglutinating activity in human and rat erythrocytes. In this study, we have investigated the inflammatory activities of TEL in the mouse *in vivo*. To achieve this, the experimental models of peritonitis, air pouch and hind-paw oedema were used. Since most of the lectin activities depend on cell-specific carbohydrate recognition, we have examined the effects of different sugars on lectin-induced inflammatory responses.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Talisia esculenta seeds were collected in the State of Ceará (Brazil). The sugars D-glucose, D-mannose and D-galactose were obtained from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of reagent grade obtained from local suppliers.

2.2. Animals

Male Swiss mice (20-30 g, aged four to six weeks) were provided by UNICAMP Central Animal House Services (CEMIG). All experiments were carried out in accordance with the guidelines for animal care of State University of Campinas (UNICAMP).

2.3. Lectin isolation

Talisia esculenta lectin was prepared according to Freire et al. (2002). Dehulled *T. esculenta* seeds were finely ground and extracted (1:5 meal to buffer ratio) with a 150 mM NaCl solution for 24 h at 4°C and then centrifuged at 10 000 x g, for 30 min at the same temperature. The crude extract was obtained as clear supernatants, and were used to determine the protein content and to test hemagglutinating activity. Next, this extract was diluted in 150 mM NaCl and applied to a Sephadex G-100 column (2.5 cm x 80 cm) equilibrated with the same solution. The lectin-rich fraction was recovered and applied to a chitin column (20 ml) equilibrated with 50 mM phosphate buffer, pH 7.6, and eluted with 100 mM HCl. The purified lectin were dialyzed and lyophilized.

2.4. Leukocyte migration

2.4.1. Air-pouch model

Six day old air-pouches were produced in the dorsal skin of mice as described previously (Edwards et al., 1981). Briefly, the back of mice was shaved and 5 ml of

sterile air were injected subcutaneously. Three days later, the pouches were again injected with 2.5 ml of sterile air to maintain pouches patency. Six days after the initial injection, the pouches were injected with TEL at doses of 10 to 40 µg. Control animals received 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) alone. Leucocyte counts were assessed 8, 16, 24, 48 and 72 h after the injection of TEL.

2.4.2. Peritoneal cavity

TEL (5-100 µg) was injected intraperitoneally (i.p.) in 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline. Control animals received 0.1 ml of sterile phosphate-buffered saline alone. Leucocyte counts were measured 4, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 h after injection of the lectin.

2.5. Mouse paw oedema

Edema was induced in the subplantar region of right hind-paw of Swiss mice (20 g) by injection of TEL diluted in 0.1 ml sterile (NaCl 0.9%). The left paw was used as control and received the same volume of sterile saline. Four h later, the animals were killed and paw oedema measured. Briefly, the paws were amputated at the tarsocrural joint and weighed on an analytical balance. The oedema (expressed in mg) was evaluated as the weight difference between the right (treated) and left (untreated) paws.

2.6. Effect of carbohydrates on lectin-induced inflammatory responses

In some experiments, TEL was dissolved in a solution of D-glucose (Glu), D-mannose (Man) or D-galactose (Gal) before injection into the paw, peritoneal cavity or air pouch. Carbohydrates, unless otherwise stated, were used at concentrations 100 times greater than that used for the lectin, on a molar basis. Animals treated with the carbohydrates alone were used as controls.

2.7. Statistical analyses

All data were examined using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test for multiple comparisons. A *P* value less than 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Neutrophil and mononuclear cell migration induced by TEL

The injection of TEL (10-40 µg) into the air pouch caused a marked and dose-dependent neutrophil accumulation (Fig. 1A) that reached a maximal response at 16 h, returning to control levels at 72 h (Fig. 1B). In addition, TEL (same concentrations) caused a dose-dependent accumulation of mononuclear cells into air pouch (Fig. 1A), the maximal effect of which was observed at 24 h post-injection (Fig. 1B).

Figure 2A shows that TEL (5-100 µg) induced a dose-dependent neutrophil migration when injected into mouse peritoneal cavity. The maximal peritoneal migration of neutrophils was observed at 16 h after the TEL administration, returning to control levels at 48 h (Fig. 2B). A dose-dependent mononuclear cell accumulation was also observed into the peritoneal cavity (Fig. 2A) with maximal response achieved at 48 h post-TEL injection (Fig. 2B).

3.2. Lectin-induced mouse paw edema

The intraplantar injection of TEL induced a dose-dependent paw oedema, at doses varying from 12.5 to 200 µg/paw, as evaluated at 4 h after the lectin injection (Fig. 3).

3.3. Effect of carbohydrates on lectin-induced neutrophil migration and paw oedema

TEL was diluted in a solution of D-glucose, D-mannose or D-galactose (0.1 M each) before injection into mouse air-pouches and peritoneal cavity. D-mannose, better than D-glucose, significantly (*P*<0.05) inhibited TEL-induced neutrophil migration in peritoneal cavity (Fig. 4A). The same results were obtained in the air pouch model (Fig. 4B). The carbohydrate D-galactose had no effect on TEL-induced

neutrophil migration in peritoneal cavity and air pouch (Fig 4). These carbohydrates did not cause a significant increase in cell number when injected alone.

Intraplantar injection of carbohydrates alone (1 mM) did not cause significant paw swelling (data not shown). When TEL (50 µg) was co-injected with D-mannose, it caused a slight (but significant) inhibition on TEL-induced paw oedema. Neither D-glucose and D-galactose (Fig. 4C) significantly affected the paw oedema.

4. Discussion

This study clearly shows that *T. esculenta* lectin is able to attract neutrophils and mononuclear cells when injected into either the air-pouch or the peritoneal cavity, an effect inhibited by the carbohydrates glucose and mannose. Additionally, TEL significantly increased the microvascular permeability leading to oedema formation in the mice paw that was slightly reduced by mannose. Similar responses have been reported for lectins from *Artocarpus integrifolia* (Santos-de-Oliveira et al., 1994) and *Erythrina velutina* seeds (Moraes et al., 1996) in rats.

Protein-carbohydrate interactions occur in a number of biochemical processes in different cell types such as lymphocytes, macrophages and mast cells (Lis and Sharon, 1986; Serke et al., 1990; Kilpatrick, 1991; Andrade et al., 1999; Barbosa et al., 2001). These interactions are believed to serve as major signals in these cells causing the release of proinflammatory mediators such as cytokines, nitric oxide, leukotrienes and PAF (Benjamin et al., 1997). Our results showing the inhibitory effect of the carbohydrates glucose and mannose on TEL-induced responses indicate it is closely related to their specific sugar-binding properties (Rodríguez et al., 1992; Ofek et al., 1996). Similar to TEL, leukocyte migration and oedema induced by lectins from *Canavalia ensiformis*, *Dioclea grandiflora* and *Glycine max* (soybean agglutinin) were inhibited by specific carbohydrates such as glucose and N-acetyl-galactosamine (Bento et al., 1993; Benjamin et al., 1997). It has been suggested that one lectin site interacts with carbohydrate on the neutrophil surface while the other site interacts with

glycoconjugates in the extracellular matrix (Santos-de-Oliveira et al., 1994). Our results showed the leukocyte migration into either the peritoneal cavity or air-pouch was better inhibited by D-mannose (80 %) compared to D-glucose (51 %), while no effect was observed with D-galactose. On the other hand, D-mannose slightly inhibited TEL-induced paw oedema, whereas D-glucose and D-galactose had no significant effect. The agglutinating activity of TEL was also better inhibited by D-mannose, while D-galactose had no inhibitory activity (Freire et al., 2002). It is likely that different affinity for carbohydrate present on the cell surface may be involved in neutrophil migration. The inhibitory effect of carbohydrates injected conjointly with lectins shows that the proinflammatory actions of these proteins are closely related to their specific sugar-binding properties (Bento et al., 1993). When the lectin association was made with specific carbohydrates, the edematogenic effect was differently reversed. Although the inhibition mechanism for sugars has not been explained, we could suggest that differences between inhibitory activities may be related to different affinities of TEL for the glycosyl groups present on the cell surface.

In conclusion, our data shown that TEL induces a neutrophil migration into different mouse cavity and paw edema. The mechanisms whereby TEL stimulates these phenomenon remains to be studied.

Acknowledgements

Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and CNPq.

References

- Andrade, J.L., Arruda, S., Barbosa, T., Paim, L., Ramos, M.V., Cavada, B.S., Barral-Netto, M., 1999. Lectin-induced nitric oxide production. *Cel. Immunol.* 194, 98-102.
- Barbosa, T., Arruda, S., Cavada, B., Granjeiro, T.B., Freitas, L.A., Barral-Netto, M., 2001. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectin of the Dioclainae subtribe. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96(5): 673-678.
- Benjamin, C.F., Figueiredo, R.C., Henriques, M.G.M.O., Barja-Fidalgo, C., 1997. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 873-881.
- Bento, C.A.M., Cavada, B.S., Oliveira, J.T.A., Moreira, R. A. and Barja-Fidalgo, C., 1993. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents Actions* 38, 48-54.
- Borreback, C.A.K., Carlson, R., 1989. Lectins as mitogens. *Adv. Lectin Res.* 2, 10-27.
- Chrispeels, M.J. and Raikhel, N.V., 1991. Lectins, lectin genes and role in plant defense. *Plant Cell* 3, 1-9.
- Dias-Baruffi, M., Roque-Barreira, M.C., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1995. Biological characterization of purified macrophage-derived neutrophil chemotactic factor. *Mediators Inflamm.* 4, 263-269.
- Edwards, J.C.W., Sedgewick, A.D., Willoughby, D.A., 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air. An in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* 153, 147-156.
- Etzler, M. E. 1986. Distribution and function of plant lectins. In: Liener, I.E., Sharon, N., and Goldstein I.J. (Eds.) *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*, Academic Press, Orlando, FL., pp. 371-435.
- Freire, M.G.M., Gomes, V.M., Corsini, R. E., Machado, O.T., De Simone, S.G., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.L.R., 2002. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 61-68.

- Freire, M.G.M., Machado, O.L.T., Smolka, M.B., Marangoni, S., Novello, J.C., Macedo, M.L.R., 2001. Isolation and characterization of isolectins from *Talisia esculenta* seeds. J. Protein. Chem. 20 (6), 495-500.
- Ito, Y., Tsurudome, M., Yamada, A., Hishiyama, M., 1984. Interferon induction in mouse spleen cells by mitogenic and non mitogenic lectins. J. Immunol. 132, 2440-2444.
- Kilpatrick, D.C., 1991. Lectin interactions with human leukocytes: mitogenicity, cell separation, clinical applications. In: D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche and T.C. Bog-Hansen (Eds.), Lectin Reviews. Sigma Chemical Company, St Louis, USA, vol. 1, pp. 69-80.
- Lima, J.E., Sampaio, A.L.F., Henriques, M.G.M.O., Barja-Fidalgo, C., 1999. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) in vivo and in vitro. Immunopharmacol. 41, 147-155.
- Lis, H and Sharon, 1986. Biological properties of lectins. In: I. E. Liener, N. Sharon and I. J. Goldstein (Eds.), The Lectins. Properties, functions and applications in biology and medicine, Academic Press, London, pp. 266-276.
- Moraes, S.M.D., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Roque-Barreira, M.C., Santos-de-Oliveira, R., Pinto, V.P.T., Oliveira, J.T.A., 1996. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma *aurantiaca* seeds. Braz. J. Med. Biol. Res. 29, 977-985.
- Moreira, R.A., Barros, A.C.H., Stewart, J.C., Pusztai, A., 1983. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). Planta 158, 63-69.
- Moreira, R. A. and Cavada, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.) 1984. Isolation, characterization and behavior during germination. Biol. Plantarum 26 (2), 113-120.
- Ofek, I., Kahane, I., Sharon, N., 1996. Toward antiadhesion therapy for microbial diseases. Trends Microbiol. 4, 297-299.
- Rodríguez, D., Cavada, B.S., Abreu-de-Oliveira, J.T., de-Azevedo-Moreira, R., Russo, M., 1992. Differences in macrophage stimulation and leukocyte

- accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 823-826.
- Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M.O., Beltramini, L.M., Roque-Barreira, M.C., 1994. Neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.* 153, 1798-1807.
- Serke, S., Neubauer, A., Van Lessen, A., 1990. Binding of mitogenic plant lectins to human lymphocytes. Flow cytometric analysis. *J. Immunol. Methods* 26, 121-122.
- Silva Lima, M., Albuquerque D. A., Ibañez, O.M., Sant'anna, O., 1993. Inflammatory cutaneous reaction induced by the lectin of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88, 599-603.
- Peumans, W. J. and Van Damme, E. J. M.; 1998. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15, 199- 228.

LEGENDS

Fig. 1. Effect of TEL injection on neutrophil and mononuclear cells migration into air pouche. (A) doses responses of neutrophil migration induced by indicated doses of TEL, analysed 16 h after the injection of the stimuli and mononuclear cells accumulation 24h after the injections. (B) time course of neutrophils stimulation by TEL (20 μ g) and kinetics of the mononuclear cells accumulation induced with 50 μ g. The control (saline) represents migration induced by saline solution. The data are the mean $\pm$ S.E.M. of five mice. The same letters indicate that there was no significant statistical differences ($p < 0.05$; student's t-test).

Fig. 2. Effect of TEL injection on neutrophil migration and mononuclear cells into peritoneal cavity. (A) shows the neutrophil migration induced by indicated doses of TEL analysed 4 h after the injections and dose response of mononuclear cells accumulation 48h after the injections. (B) shows the time course of neutrophil migration induced by TEL (20 μ g) and kinetics of the macrophage accumulation induced with TEL (50 μ g). The control (saline) represents migration induced by saline solution. The data are the mean $\pm$ S.E.M. of five mice. The same letters indicate that there was no significant statistical differences ($p < 0.05$; student's t-test).

Fig. 3. Mouse paw edema induced by TEL. Dose-dependent edema with doses varying from 12.5 to 200 μ g/ paw analysed 4 h after the injection of the stimuli. The same letters indicate that there was no significant statistical differences ($p < 0.05$ student's t-test).

Fig 4. Inhibitory effect of carbohydrates on TEL-induced neutrophil migration and paw oedema on mice. Neutrophil migration was evaluated 4 h after TEL injection or

simultaneously with 0.1M of specific (D-glucose and D-mannose) and not specific carbohydrate (D-galactose) to peritoneal cavity (A) or 16 h after TEL injections into mouse air pouches (B). Inhibitory effect of carbohydrates on TEL-induced paw edema was evaluated 4 h after the same stimuli (C). The same letters indicate that there was no significant statistical differences ($p < 0.05$ student's t-test).

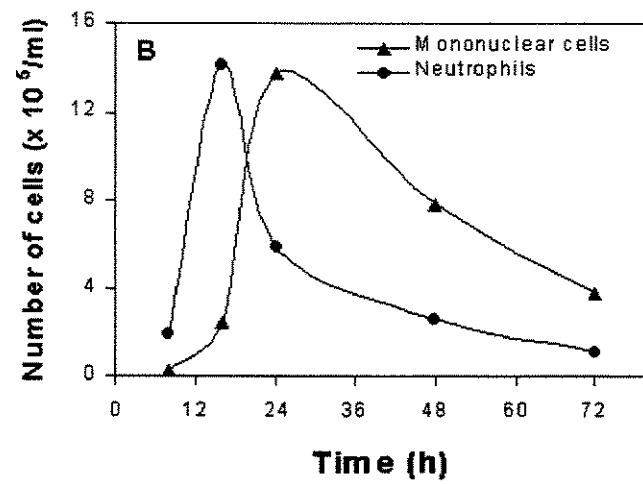
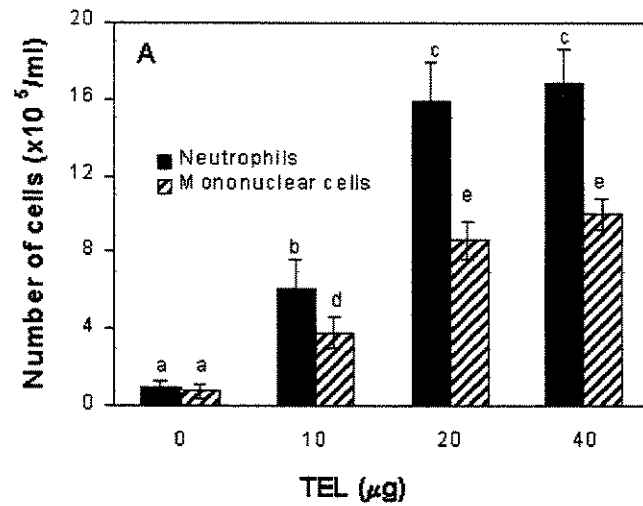


Figure 1 . M.G. Freire, I. A. Desouza, A.C.M. Silva, M.L.R. Macedo, M.S. Lima, J.C. Novello, W.M.S.C. Tamashiro, E. Antunes, S. Marangoni.

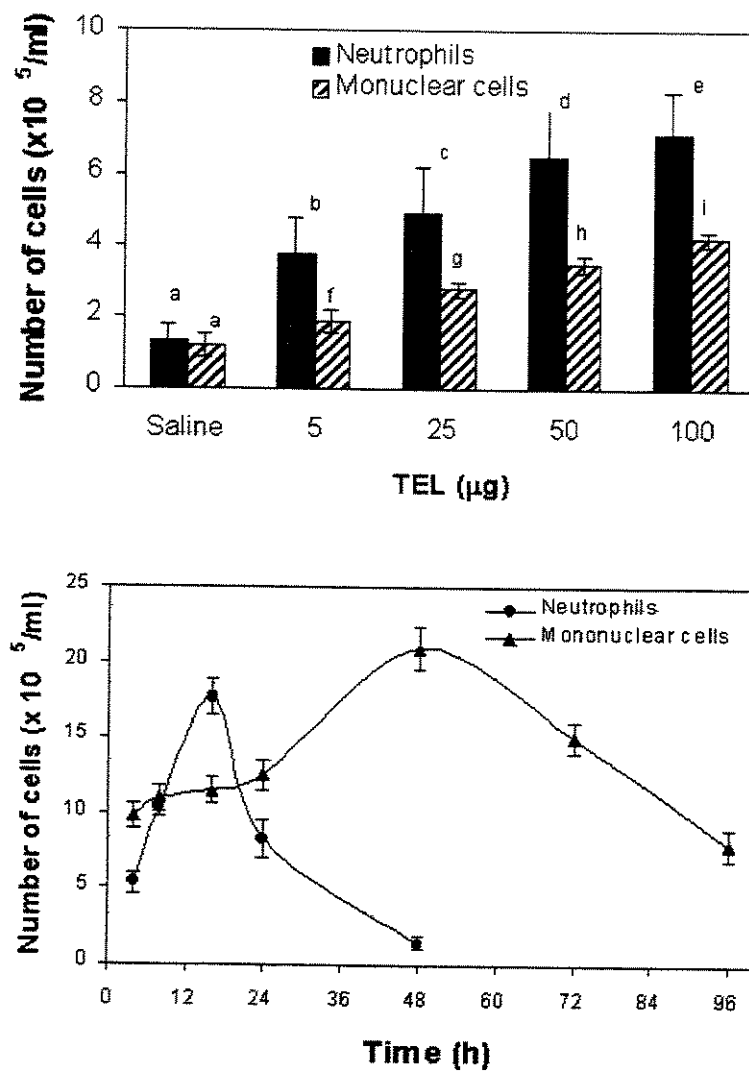


Figure 2 . M.G.M. Freire, I. A. Desouza, A.C.M. Silva, M.L.R. Macedo, M.S. Lima, J.C. Novello, W.M.S.C. Tamashiro, E. Antunes, S. Marangoni.

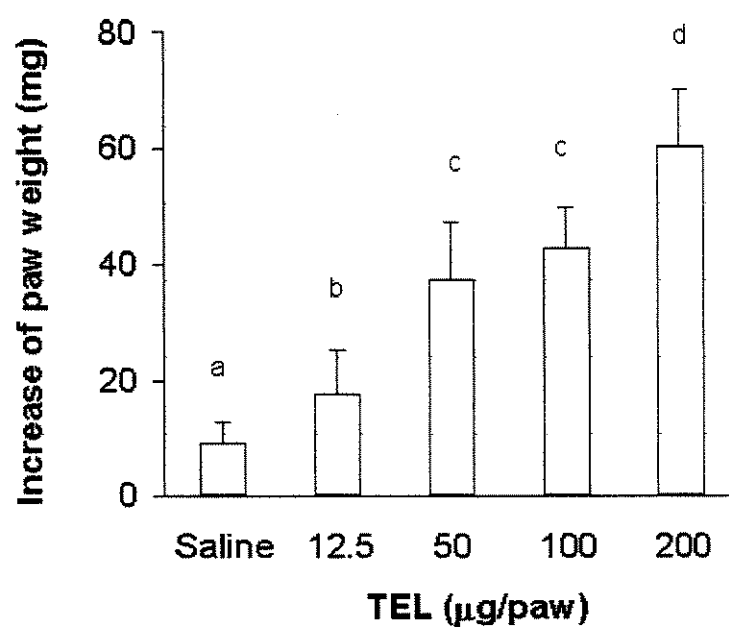
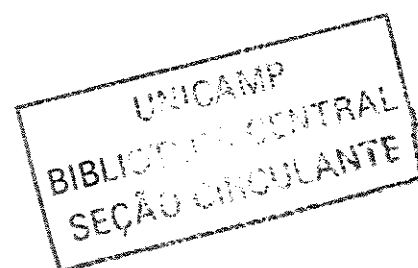


Figure 3 . M.G. Freire, I. A. Desouza, A.C.M. Silva, M.L.R. Macedo, M.S. Lima, W.M.S.C. Tamashiro, E. Antunes, S. Marangoni.



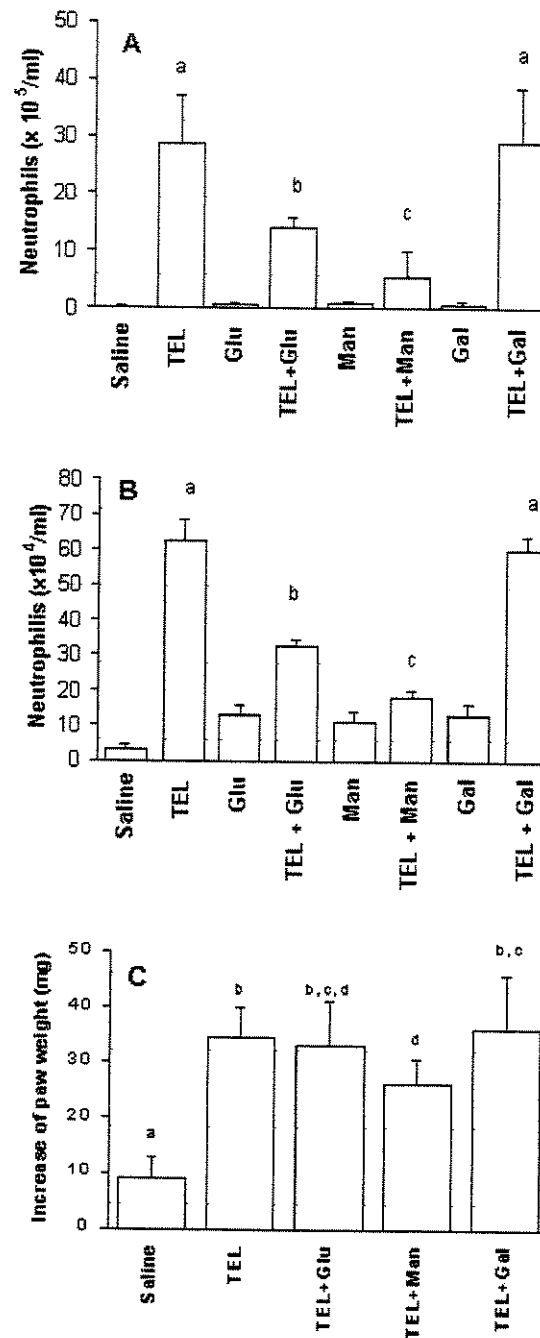


Figure 4. M.G.M. Freire, I.A. Desouza, A.C.M. Silva, M.L.R. Macedo, M.S.Lima, W.M.S.C. Tamashiro, E. Antunes, S. Marangoni