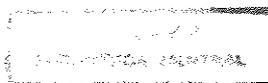


DANIELA DIOGENES de CARVALHO

Purificação e Caracterização de BJcuL,
uma Lectina do Veneno da Serpente
Bothrops jararacussu

CAMPINAS - 1997



DANIELA DIOGENES de CARVALHO

Purificação e Caracterização de BJcuL,
uma Lectina do Veneno da Serpente
Bothrops jararacussu

Este exemplar em resposta à solicitação
da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Daniela Diogenes de
Carvalho

e aprovada pela Comissão Julgadora.

15/08/97 Proferência

CAMPINAS - 1997

9720197

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

C253p

Carvalho, Daniela Diógenes de
Purificação e caracterização de BJcuL, uma lectina
do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* / Daniela
Diógenes de Carvalho. -- Campinas, SP : [s.n.], 1997.

Orientador: Jose Camillo Novello. 012

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Lectina. 2. Cobra - Veneno. 3. Hemaglutinação.
4. Células - Proliferação. I. Novello, José Camillo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

DANIELA DIOGENES de CARVALHO

Purificação e Caracterização de BJcuL, uma Lectina
do Veneno da Serpente *Bothrops jararacussu*

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas na área
de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Camillo Novello

CAMPINAS - SP
1997

Campinas, 15 de agosto de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. José Camillo Novello



Assinatura

Prof. Dr. Edson Antunes



Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Sergio Marangoni

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Camillo Novello, pela orientação.

Ao Professor Dr. Sergio Marangoni pelo apoio e disponibilidade e ao Professor Dr. Benedito de Oliveira pela oportunidade.

À Professora Dra. Marcela Haun pela colaboração nos testes com cultura de células.

À amiga Dra. Maristela Freitas Pereira pelo auxílio na realização dos experimentos em cultura de células, e sobretudo pela amizade, incentivo e companheirismo.

Ao Paulo A. Baldasso pela amizade, apoio técnico e presença constante durante este trabalho.

Aos colegas pós-graduandos, funcionários e professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À **CAPES**, **CNPq** e **FAEP-UNICAMP** pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	7
ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS.....	8
RESUMO.....	9
SUMMARY.....	11
INTRODUÇÃO	
Venenos Ofídicos.....	14
Lectinas.....	18
Lectinas de Venenos de Serpentes.....	26
Objetivos.....	33
MATERIAIS E MÉTODOS	
Purificação de BJcuL.....	35
Dosagem de Proteínas.....	36
Eletroforese em SDS-PAGE.....	37
Ensaio de Hemaglutinação.....	39
Estudos de Toxicidade de BJcuL sobre a Proliferação de Células de Mamíferos em Cultura.....	42
RESULTADOS	
Purificação de BJcuL.....	47
Eletroforese em SDS-PAGE.....	50
Ensaio de Hemaglutinação.....	52
Estudos de Toxicidade de BJcuL sobre a Proliferação de Células de Mamíferos em Cultura.....	58
DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	74
TRABALHOS E COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS.....	75
REFERÊNCIAS.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Diagrama esquemático dos domínios estruturais A, B, C, D e E, do precursor comum de metaloproteases, disintegrinas e proteínas relacionadas com lectinas tipo C (CLPs).....	17
FIGURA 2. Perfil cromatográfico de eluição da lectina do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i> em cromatografia de afinidade em D-galactose.....	48
FIGURA 3. Perfil cromatográfico da fração eluída com lactose na cromatografia de afinidade, em HPLC-fase reversa, coluna C18.....	49
FIGURA 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS da fração obtida na cromatografia de afinidade em D-galactose.....	51
FIGURA 5. Ensaio de hemaglutinação induzida por BJcuL. Placa de hemaglutinação depois de 2 horas de incubação à temperatura ambiente.....	54
FIGURA 6. Efeito de BJcuL sobre o crescimento celular, após tratamento durante 24 horas (3 a 10 µg/ml).....	60
FIGURA 7. Efeito de BJcuL sobre a proliferação celular, após tratamento durante 2, 24 e 48 horas (10 a 30 µg/ml).....	61
FIGURA 8. Efeito de 10 µg/ml de BJcuL na proliferação celular.....	62

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Concentração mínima hemaglutinante de BJcuL sobre diferentes eritrócitos.....55

TABELA 2. Efeito de carboidratos na hemaglutinação induzida por BJcuL.....56

TABELA 3. Efeito de agentes quelantes de cátions divalentes na hemaglutinação induzida por BJcuL.....57

ABREVIACÕES

- BJcuL - Lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*.
- BJL - Lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.
- BML - Lectina isolada do veneno da serpente *Lachesis muta*.
- CLPs - PROTEÍNAS RELACIONADAS COM LECTINA TIPO C.
- CRD - DOMÍNIO DE RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATO.
- CTBS - SALINA TAMPONADA COM TRIS MAIS CaCl₂.
- DMEM - MEIO "EAGLE" MODIFICADO POR DUBELCCO.
- DTT - DITIOREITOL.
- EDTA - ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRACÉTICO.
- EGTA - ÁCIDO ETILENOGLICOL TETRACÉTICO.
- HPLC - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE.
- JML - Lectina isolada do veneno da serpente *Dendroaspis jamesonii*.
- kDa - KILODALTON.
- LmsL - Lectina isolada do veneno da serpente *Lachesis muta stenophrys*.
- PAGE - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.
- PBS - SALINA TAMPONADA COM FOSFATO.
- P/V - PERCENTAGEM PESO/VOLUME.
- RSL - Lectina isolada do veneno da serpente *Crotalus atrox*.
- SDS - DODECIL SULFATO DE SÓDIO.
- SFB - SORO FETAL BOVINO.
- TBS - SALINA TAMPONADA COM TRIS.
- TCA - ÁCIDO TRICLOROACÉTICO.
- TDG - TIODIGALACTOSÍDEO.
- TEMED - N-N-N'-N'- TETRAMETILENODIAMINA.
- TFA - ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO.
- TL - Lectina isolada do veneno da serpente *Bothrops atrox*.
- TRIS - TRIS-HIDROXIMETIL AMINOMETANO.
- V/V - PERCENTAGEM VOLUME/VOLUME.

ABREVIAÇÕES PARA AMINOÁCIDOS

AMINOÁCIDOS	TRÊS LETRAS	UMA LETRA
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
HISTIDINA	His	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

Segundo nomenclatura IUPAC

RESUMO

As lectinas constituem um grupo de proteínas que possuem a capacidade de se ligarem especificamente e reversivelmente a determinados carboidratos. Identificadas em vegetais e animais, são também encontradas em venenos ofídicos. Quando isoladas de venenos de serpentes, essas proteínas ligam-se a β -galactosídeos e induzem aglutinação de eritrócitos, agregação de plaquetas e são mitogênicas para linfócitos.

Uma lectina específica para β -galactosídeos foi purificada do veneno de *Bothrops jararacussu* através de cromatografia de afinidade em D-galactose, e foi denominada BJcuL. A análise do perfil de massa molecular em SDS-PAGE a 15% mostrou que BJcuL é um homodímero composto de subunidades de 15 kDa. Quando submetido à coloração para carboidratos após SDS-PAGE, a proteína mostrou reação negativa, sugerindo que BJcuL não é uma glicoproteína.

BJcuL aglutina eritrócitos tripsinizados de porco e boi, em concentrações mínimas de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ e 2,0 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A hemaglutinação de eritrócitos porcinos induzida por 4,0 $\mu\text{g/ml}$ de BJcuL é inibida especificamente por lactose 0,8 mM, galactose 3,2 mM e rafinose 3,2 mM. EDTA 0,2 mM e EGTA 0,1 mM também inibem a atividade hemaglutinante de BJcuL, o que revela a dependência de cátions divalentes. A associação das subunidades da lectina de *B. jararacussu* é essencial para sua atividade hemaglutinante, pois BJcuL reduzida com DTT não exibe esta atividade sobre eritrócitos porcinos.

A mesma concentração de BJcuL que aglutina eritrócitos intactos de mamíferos (3 a 30 $\mu\text{g/ml}$) foi testada em cultura de fibroblastos de pulmão de hamster chinês

linhagem V-79, para estudos de alterações na proliferação celular. BJcuL nessas concentrações não possui atividade mitogênica ou tóxica sobre este tipo celular, que seja detectável através da absorvância do conteúdo total de ácidos nucléicos em 260 nm.

A atividade hemaglutinante observada para a maioria das lectinas não reflete diretamente sua função fisiológica. O papel das lectinas nos venenos ofídicos permanece sem ser esclarecido, porém há uma forte possibilidade de que estas lectinas sejam derivadas, por proteólise, de um precursor comum de metaloproteases/disintegrinas. Este fato fornece base para um melhor entendimento das relações estrutura-função destes precursores e das proteínas relacionadas, podendo, futuramente, esclarecer os mecanismos e a origem de vários efeitos farmacológicos destas proteínas.

SUMMARY

Lectins are polyvalent carbohydrate-binding proteins which agglutinate red blood cells. Identified in plants and animals, have also been found in snake venoms. These proteins bind to lactose moieties and induce agglutination of erythrocytes, aggregation of platelets and are mitogenic to lymphocytes.

A galactose-specific lectin in *Bothrops jararacussu* venom (BJcuL) was adsorbed on a immobilized D-galactose column and eluted with 0.1 M lactose. On SDS-PAGE, under reducing conditions (0.1 M DTT), the fraction eluted showed a single band of 15 kDa, and under non reducing conditions, a major band of 30 kDa. This protein appeared not to be a glycoprotein because it gave negative reaction to the Schiff's reagent following treatment with periodate.

Trypsined erythrocytes from pig and cow were agglutinated by BJcuL, with end points of approximately 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and 2.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The hemagglutination of trypsinized pig erythrocytes induced by 4.0 $\mu\text{g/ml}$ of BJcuL was inhibited specifically in the presence of 0.8 mM lactose, 3.2 mM galactose, 3.2 mM raffinose. BJcuL demonstrated a requirement for divalent cation, since 0.2 mM EDTA or 0.1 mM EGTA, completely inactivated the lectin induced hemagglutination activity. The association of subunits via interchain disulfide bonds is essential for lectin activity, since DTT-reduced BJcuL showed no hemagglutination activity against pig erythrocytes

The same concentration of BJcuL that agglutinates intact mammals erythrocytes (3 to 30 $\mu\text{g/ml}$) was tested on a cell culture to verify its toxicity and capacity to induce

cell proliferation. Assays were carried out on Chinese hamster lung fibroblast V-79 cells. BJcuL has no toxicity activity toward this cell type, which could be detected through total acid nucleic contents in 2, 24 and 48 hours of incubation.

The hemagglutination activity observed for almost all lectins, does not directly reflect their main physiological function. The role of these lectins in the snake venoms remains unclear. There is also a strong possibility that these lectins may be formed by the proteolytic degradation of precursors of metalloproteinases/disintegrins. Subsequent researches may lead to a better understanding of structure-function relationships of these precursors and related proteins, and help to clarify the mechanisms and origins of various pharmacological effects.

INTRODUÇÃO

VENENOS OFÍDICOS

O veneno das serpentes é um objeto de estudo interessante no que diz respeito às proteínas e suas funções. É rico em substâncias farmacológica e bioquimicamente ativas. Sua composição química extremamente complexa varia de espécie para espécie e sua ação depende da natureza dos elementos presentes e da interação biológica entre estes elementos (Varanda & Giannini, 1994).

Em geral, noventa a noventa e cinco por cento do peso seco do veneno é composto de proteínas com funções diversas. Os componentes proteicos mais comuns são: enzimas (fosfolipases, fosfodiesterases, exonucleases, fosfomonoesterases, oxidases, proteases, etc); cardiotoxinas e citotoxinas. Os componentes não proteicos são divididos em orgânicos e inorgânicos: os aminoácidos livres e peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas constituem os orgânicos, enquanto os inorgânicos são basicamente os íons (Varanda & Giannini, 1994).

Os cátions monovalentes presentes no veneno de serpentes são requeridos para a neutralização de cargas, enquanto os divalentes participam como cofatores de diferentes atividades enzimáticas e biológicas (Tu, 1977).

Distribuída pela América do Sul e Central, a *Bothrops jararacussu*, mais conhecida popularmente como “Jararacuçu”, é reponsável por grande parte dos acidentes ofídicos. Sua importância está, principalmente, na alta quantidade de veneno

inoculado na vítima. O veneno produz reações características como dor, edema e hemorragia no local da picada, seguindo-se a necrose coagulativa da musculatura e dos vasos sanguíneos, acompanhada por intensa reação inflamatória aguda. (Barravieira & Pereira, 1994).

Serpentes da mesma espécie apresentam pequenas diferenças na composição do veneno que estão relacionadas com a variação geográfica. Como a função primordial do veneno é imobilização e digestão de animais capturados, estas diferenças se devem à diversidade de animais disponíveis para alimentação, estes com diferentes sensibilidades ao veneno. A variação geográfica na composição do veneno reflete a seleção natural pela fonte de alimentação característica de determinado local (Daltry e cols, 1996).

Na complexa mistura de peptídeos ativos e proteínas presentes no veneno das serpentes, três grupos de proteínas se destacam: as proteases, as disintegrinas e as proteínas relacionadas com as lectinas tipo C (CLPs) (Kini & Evans, 1992).

As proteases formam um grupo heterólogo com massas moleculares variando de 15 kDa a 380 kDa, têm seu principal papel na digestão de presas, induzindo vários efeitos farmacológicos, entre eles, os hemorrágicos, anticoagulantes e de ativação/inibição de plaquetas (Pirkle & Stocker, 1991).

As disintegrinas, possuem massa molecular variada e são proteínas não enzimáticas que inibem a interação entre o fibrinogênio e o complexo glicoproteico IIb-IIIa, na coagulação sanguínea. Possuem uma sequência característica de três resíduos de aminoácidos, R-G-D, responsável pela sua atividade (Musial e cols, 1990).

As proteínas relacionadas com as lectinas tipo C, constituem um grupo de proteínas estruturalmente homólogas, mas com funções distintas. Algumas delas exibem atividade de lectina, outras induzem efeitos anticoagulantes ou efeitos na aglutinação e agregação de plaquetas (Kini, 1996). Devido a variação em suas atividades biológicas, as relações estrutura-função destas proteínas são importantes no estudo das diferenças estruturais que levam às diferentes atividades biológicas.

Segundo Kini (1996), as metaloproteases, as disintegrinas e as CLPs são derivadas por proteólise de um precursor comum. É proposto um modelo do precursor com cinco domínios (Figura 1) onde as proteases constituem o domínio C, as disintegrinas o domínio D e as CLPs o domínio A, que está presente na região amino terminal da molécula precursora.

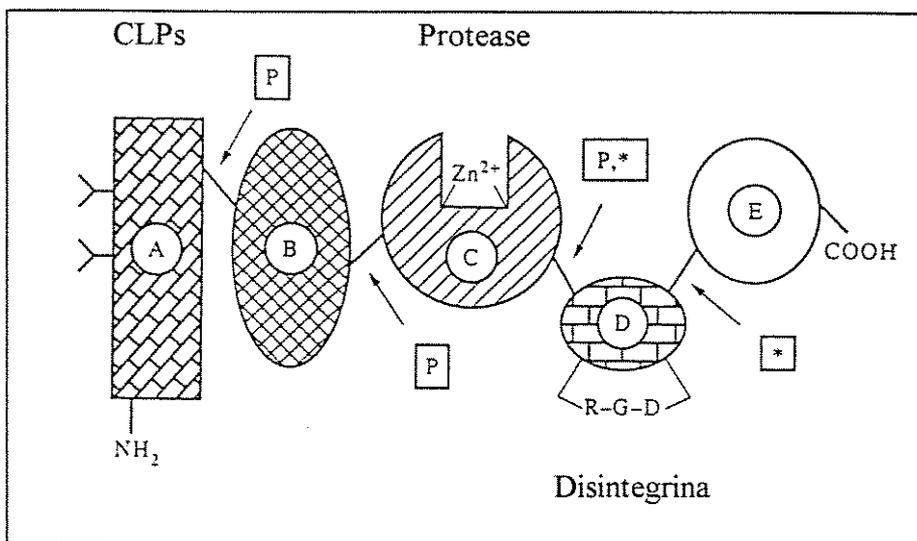


Figura 1. Diagrama esquemático dos domínios estruturais A, B, C, D e E, do precursor comum de metaloproteases, disintegrinas e proteínas relacionadas com lectinas tipo C (CLPs). **P** - indica sítio de clivagem proteolítica, * - “códon de terminação”, Y-segmento de ligação a carboidratos (nem todas as CLPs contêm este sítio). Domínios: A- CLPs, C-proteases, D-disintegrinas; B e E, ainda não caracterizados. Sequência de resíduos de aminoácidos **R-G-D**, característica de disintegrinas (Kini, 1996).

LECTINAS

O termo LECTINA, derivado do latim LEGERE (selecionado, escolhido) foi proposto por Boyd e Sharpleigh (1954) e refere-se à capacidade de ligação seletiva ou de escolha de açúcares particulares. Este termo foi generalizado em 1972 para todas as proteínas ligantes de açúcar, aglutinantes de células, que não possuem origem imune, encontradas em animais, vegetais e microrganismos (Sharon & Lis, 1987; Carvalho, 1990).

As lectinas constituem um grande grupo de proteínas ou glicoproteínas, não enzimáticas, que possuem a capacidade de aglutinar células, precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos. Originalmente isoladas de plantas, principalmente das sementes, foram também isoladas em vários organismos animais, desde invertebrados até vertebrados, algumas ocorrem na superfície de células estando envolvidas no reconhecimento célula-célula (Sharon & Lis, 1993).

As lectinas estão presentes em microrganismos. As enterobactérias possuem lectinas essenciais para sua adesão ao epitélio intestinal; em invertebrados são encontradas na hemolinfa e contribuem na resistência a infecções (papel análogo ao das imunoglobulinas nos vertebrados - já que, em sua maioria, reconhecem e ligam resíduos de ácido siálico). Em organismos animais mais complexos, as lectinas são produzidas na forma solúvel ou na forma ligada à membrana (Zatta & Cummings, 1991).

Quando ligadas à membrana celular agem como receptores para ligantes fisiológicos e mediam as interações célula-célula através da combinação com os carboidratos localizados nas células adjacentes, dentre outras funções. Elas têm papel fundamental no controle de vários processos normais e/ou patológicos em seres vivos (Sharon & Lis, 1989).

Pode-se dizer que as lectinas estão presentes em todos os organismos pesquisados até hoje. A facilidade na sua purificação contrasta com a dificuldade na delimitação de suas funções (Gabijs, 1994).

As lectinas são facilmente purificadas através da cromatografia de afinidade (Spadaro & Fonseca, 1990) em adsorventes bioespecíficos como polissacarídeos nativos ou modificados; ou glicoproteínas, glicopeptídeos, mono ou dissacarídeos ligados a uma matriz, como Sepharose, por exemplo (Lis & Sharon, 1981a).

Quando a lectina possui massa molecular suficientemente grande para ser excluída de matrizes cromatográficas, ou a matriz bioespecífica para determinada lectina requer operações muito complicadas, usa-se purificar estas moléculas através da adsorção em eritrócitos fixados com formaldeído (Horejsi e cols, 1978) ou glutaraldeído (Haq e cols, 1996).

A detecção de lectinas é realizada, principalmente, através do ensaio de hemaglutinação, no qual uma diluição seriada da lectina é feita antes da incubação com eritrócitos humanos ou de outras espécies animais. A hemaglutinação é usualmente medida pela técnica de diluição serial e a menor concentração capaz de aglutinar as

hemácias (“end point”) é determinada visualmente ou fotometricamente (Lis & Sharon, 1981b).

Para minimizar os fatores que se opõem à hemaglutinação costuma-se utilizar hemácias tripsinizadas (Lis & Sharon, 1972) e/ou fixadas com glutaraldeído ou formaldeído (Butler, 1962; Bing, 1967). Com a fixação, as células se mantêm estáveis e podem ser usadas por períodos superiores a um mês, sem perda significativa da atividade (Nowak e cols, 1976).

Usualmente, as lectinas consistem de duas ou quatro subunidades. Cada subunidade tem massa molecular variando entre 14 kDa e 30 kDa, e possui um sítio de ligação para carboidratos (Sharon, 1993).

Os sítios para ligação de carboidratos reconhecem e ajustam-se de acordo com o modelo chave e fechadura, através de um complexo sistema de ligações de hidrogênio. A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento da molécula de água associada com o grupo polar da proteína e em torno do carboidrato altamente polar, com o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio; essas últimas ligações e forças de van der Waals são dominantes na estabilização da ligação (Quiocho, 1986).

A região molecular de ligação ao carboidrato é um domínio que reconhece a sequência específica de resíduos de açúcar, e é chamado de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD). Cada subunidade da lectina possui pelo menos um CRD. A “divalência” ou “polivalência” permite a interação com açúcares localizados na

superfície de células adjacentes, resultando em aglutinação destas células (Lis & Sharon, 1986). Algumas proteínas solúveis ligantes de lactose possuem dois ou mais domínios CRD distintos, porém homólogos, na mesma cadeia polipeptídica (Oda e cols, 1993; Ozeki, 1997).

As lectinas isoladas de animais foram divididas em dois grupos principais quanto ao seu requerimento de cálcio para a atividade de ligação a carboidratos: lectinas tipo C, requerem íons Ca^{2+} para sua atividade, seus resíduos de cisteína estão ligados formando pontes dissulfeto, possuem solubilidade variável e são localizadas principalmente no ambiente extracelular. E as lectinas tipo S, que não requerem Ca^{2+} para sua atividade, as cisteínas encontram-se como grupos tióis livres, são solúveis em tampão, sendo localizadas tanto extracelularmente como intracelularmente e apresentando maior especificidade para açúcares que contêm β -galactosídeos (Drickamer, 1988).

Também chamadas de lectinas solúveis ligantes de β -galactosídeos, as lectinas tipo S são acídicas, têm baixa massa molecular, e geralmente são compostas de subunidades de 14 kDa a 16 kDa. Requerem grupos tióis livres para sua ligação a carboidratos, tanto que, quando oxidadas, perdem sua atividade (Drickamer, 1988). Quanto à estrutura primária, sua sequência é altamente conservada (66 a 92%) em diversos tecidos e organismos, sugerindo que estas proteínas derivaram de um gene ancestral comum (Ali, 1991).

As galectinas, fazem parte das lectinas tipo S, possuem uma sequência característica e massa molecular de 14 kDa por subunidade (Barondes e cols, 1994b). Em mamíferos, as galectinas parecem estar envolvidas na regulação do crescimento e da adesão celular, assim como na migração de células. Têm também papel importante na neoplasia e nas respostas imunes (Barondes e cols, 1994a).

Quanto ao papel desempenhado pelas lectinas na resposta imune, Powell e Varki (1995), descreveram uma família de lectinas tipo I, que seriam originadas da superfamília das imunoglobulinas. As lectinas tipo-I são proteínas integrais de membrana e possuem amplos domínios citosólicos com potenciais sítios de fosforilação.

Estas proteínas hemaglutinantes que não necessitam de cálcio para sua atividade, possuem um domínio de reconhecimento de carboidrato: CRD-Tipo S. Este CRD é definido entre 36 resíduos de aminoácidos conservados e 19 invariantes. Nenhum resíduo de cisteína é invariante neste tipo de CRD, já que estas proteínas possuem estes resíduos como grupamentos tióis livres (Drickamer & Taylor, 1993).

Nas lectinas tipo C, o CRD é caracterizado por um domínio constituído de cerca de 100 a 130 resíduos de aminoácidos. Este CRD-Tipo C foi identificado em várias proteínas ligantes de carboidratos, através de um grupo de resíduos invariantes que se localiza em posições distintas, dependendo da proteína, sendo que, em média, 15 resíduos são conservados e estão nas mesmas posições relativas (Drickamer, 1988).

Apesar do CRD estar associado com a ligação da lectina ao açúcar específico, a sua presença não implica em, necessariamente, que a proteína que o possua tenha atividade de ligação a carboidratos (Drickamer, 1993).

Estas regiões da cadeia polipeptídica onde estão os resíduos conservados do CRD não devem ser vistos como entidades independentes, pois a capacidade da lectina de se ligar a carboidratos é modulada também por vários outros domínios presentes na molécula (Gabiús, 1994). A interação do CRD com outros domínios adicionais, determinam muitas das funções das lectinas (Drickamer & Taylor, 1993).

Algumas proteínas não caracterizadas como ligantes de carboidratos possuem em sua estrutura uma região homóloga ao CRD das lectinas, como na apoproteína surfactante pulmonar, receptor de IgE nos linfócitos T, tetranectina, etc (Hirabayashi e cols, 1991).

Várias proteínas como as ligantes de manose (Drickamer e cols, 1986), lectinas de mosca (Haq e cols, 1996) e de ouriço do mar (Ozeki e cols, 1991) apresentam sequências de reconhecimento de carboidratos. O que implica em dizer que este domínio ligante de carboidrato pode estar presente em várias proteínas, desempenhando papel de reconhecimento de substrato ou de direcionadora a um sítio específico (Gabiús, 1994).

Um peptídeo com atividade hemaglutinante isolado do veneno da aranha *Selenocosmia huwena* possui apenas 32 resíduos de aminoácido e massa molecular de

aproximadamente 5 kDa, nenhuma lectina foi relatada tendo estas características (Liang & Pan, 1995).

Moléculas de adesão de células sanguíneas, como a PADGEM/GMP-140, ELAM 1 e gp90MEL também apresentam uma sequência CRD-homóloga. A descoberta dos carboidratos ligantes destas proteínas possibilitará uma possível aplicação terapêutica na modificação das interações de células sanguíneas e vasculares através do uso de análogos destes carboidratos. Isto ilustra o potencial da combinação das modernas técnicas de biologia celular e molecular com análises estruturais e imunológicas (Harrison, 1991).

Biologicamente, as lectinas podem se tornar modelos experimentais importantes, pois são moléculas altamente estáveis, relativamente fáceis de purificar, encontradas em várias espécies de organismos e apresentam alta especificidade para carboidratos, além de permitirem modificação química e conjugação. Em várias áreas, como pesquisas sobre câncer, imunologia, estudos básicos de bioquímica e estrutura de membranas, purificação de glicoproteínas, identificação celular, histologia, citoquímica, as lectinas podem ser aplicadas como instrumento. Por exemplo, muitas lectinas são utilizadas na identificação de glicoproteínas em gel de poliacrilamida quando conjugadas com substâncias fluorescentes (Zatta & Cummings, 1991).

Algumas lectinas, na sua maioria de origem vegetal, são usadas no isolamento de certos carboidratos. Por exemplo, a Concanavalina A, que se liga especificamente à α -D-Glicose e à α -D-Manose é usada em cromatografia de afinidade na separação

destes carboidratos e de glicoproteínas. Outras lectinas como a Lectina de Soja, que liga-se a α -galactose e N-acetil-D-galactosamina e a Lectina de Gérmen de Trigo que liga-se a N-acetilglicosamina (Lis & Sharon, 1986).

A especificidade de ligação a certos carboidratos por parte das lectinas é útil nos estudos de isolamento de subpopulações celulares, tipagem sanguínea e caracterização de tipos celulares. O isolamento de células cancerosas, parece estar relacionado com o agrupamento das lectinas ligadas aos receptores de superfície. Nas células tumorais tais agrupamentos ocupam regiões restritas da superfície, enquanto nas células normais a distribuição das lectinas ligadas aos receptores é homogênea (Sharon, 1983).

A importância das lectinas para diagnóstico microbiológico está fundamentada na propriedade de algumas dessas moléculas promoverem aglutinação específica de determinadas bactérias (Schalla e cols, 1985). *Neisseria gonorrhoeae* pode ser diferenciada de outras espécies do mesmo gênero ou de bactérias correlatas, pela aglutinação com a lectina de gérmen de trigo (Doyle e cols, 1984).

As lectinas também podem ser usadas para diferenciar linhagens patogênicas e não patogênicas de *Trypanosoma cruzi* (Miranda Santos & Pereira, 1984). No estudo de bactérias e protozoários, as lectinas são um conveniente instrumento para caracterização de receptores de membrana.

LECTINAS DE VENENOS DE SERPENTES

O interesse no estudo das lectinas de venenos de serpentes não reside unicamente na sua função biológica e farmacológica, mas também pelo fato de possuírem características intermediárias entre os dois grupos de lectinas animais, tipo S e tipo C. As proteínas hemaglutinantes isoladas dos venenos de serpentes são solúveis, apresentam de modo geral massa molecular por subunidade de aproximadamente 14 kDa, são específicas para açúcares com β -galactosídeos, mas requerem Ca^{2+} para sua atividade (Hirabayashi e cols, 1991).

As lectinas de venenos são constituídas de cadeias polipeptídicas que correspondem à região molecular relativa ao CRD, ou seja, sua estrutura primária é homóloga à região molecular que contém o CRD em outras proteínas ligantes de açúcar. São constituídas de aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos e não possuem outros domínios acessórios. Elas são o próprio domínio de ligação a carboidratos observado em outras lectinas, desta forma é vista como um CRD livre (Drickamer, 1993).

A primeira lectina isolada de veneno de serpente foi a trombolectina (TL), do veneno de *Bothrops atrox* (Gartner e cols, 1980). A atividade hemaglutinante foi, então, investigada em outras dezessete espécies de serpentes, sendo que em dezesseis espécies foi verificada a presença desta atividade no veneno total (Ogilvie & Gartner, 1984).

A TL tem sua atividade hemaglutinante inibida especificamente por sacarídeos como lactose e tiodigalactosídeo (TDG, análogo à lactose), enquanto D-glucose, D-galactosamina e D-glicosamina tem pouco efeito na atividade de hemaglutinação desta proteína. A Trombolectina foi inicialmente caracterizada como galactoelectina, devido a sua especificidade por β -galactosídeos. É composta de duas subunidades idênticas de aproximadamente 15 kDa e não foi caracterizada como uma glicoproteína (Gartner e cols, 1980).

As lectinas isoladas de *Lachesis muta* (BML) e de *Dendroaspis jamesonii* (JML) também são específicas para lactose e por TDG. O quelante de íons divalentes, EDTA, só inibe a atividade da BML, apesar de JML ter 50 moléculas de Ca^{2+} ligadas por molécula. Em BML foram detectadas 12,5 moléculas de Ca^{2+} por dímero de lectina. A alta quantidade de resíduos de serina, ácido glutâmico, ácido aspártico e alanina é comum a estas duas proteínas. A concentração de lisina é duas vezes menor em JML do que em BML, mas a quantidade de prolina é duas vezes maior em JML (Ogilvie e cols, 1986).

A lectina isolada do veneno de *Bothrops godmani*, é uma proteína ácida com ponto isoelétrico em torno de 4,9 e com subunidades de aproximadamente 14 kDa. Esta proteína aglutina eritrócitos humanos de todos os tipos A, B, AB e O, Rh + e Rh -, mas não apresenta efeito letal, hemorrágico, miotóxico, proteolítico ou de atividade fosfolipásica. A indução fraca de edemas em ratos sugere que esta proteína não é o fator principal no desenvolvimento de edemas resultantes de envenenamento por *B.*

godmani. A atividade mitogênica em leucócitos mononucleares humanos foi nula (Lomonte e cols, 1990).

Por outro lado, as lectinas isoladas do veneno de algumas serpentes são mitogênicas para linfócitos bovinos (Mentley e cols, 1983). As lectinas de *Crotalus atrox* (RSL), *Ancistrodon piscivorous leukostoma* (CML), *Dendroaspis jamesonii* (JML), *Agkistrodon contortrix contortrix* (CuHL) e *Bothrops atrox* (TL), foram testadas quanto à habilidade em estimular mitose em linfócitos. Destas, RSL, CML e JML, apresentaram atividade mitogênica comparável à da concanavalina A, já conhecida como estimuladora da mitose em linfócitos. Lactose bloqueia tanto a atividade hemaglutinante quanto a atividade mitogênica destas lectinas, e a resposta mitogênica sobre as células T depende da presença de macrófagos na cultura (Mastro e cols, 1986).

A proteína hemaglutinante isolada do veneno de *Lachesis muta stenophrys* (LmsL) é uma proteína dimérica de 28 kDa, com alta quantidade de resíduos de triptofano e de resíduos ácidos. Não foi caracterizada a presença de carboidratos ou ácido siálico ligados covalentemente à sua estrutura, e pelo espectro de dicroísmo circular esta proteína tem como estrutura secundária 78% de estrutura β e 1% de estrutura α . Também tem sua atividade hemaglutinante inibida por lactose, porém não mostrou atividade mitogênica em linfócitos (Aragón-Ortiz e cols, 1990).

A estrutura primária da lectina purificada do veneno da cascavel *Crotalus atrox* (RSL) foi sequenciada, o CRD foi localizado entre os resíduos 31 e 131, onde estão 15

resíduos conservados. A variação dos resíduos não conservados garante a especificidade para o reconhecimento de diferentes açúcares por parte das diferentes lectinas (Hirabayashi e cols, 1991).

Entre estes resíduos conservados no caso da RSL, oito são encontrados na maioria das proteínas que contêm este tipo de CRD, e é a posição relativa destes resíduos o que garante a caracterização do CRD (Hirabayashi e cols, 1991).

A lectina de *Bothrops jararaca* (BJL) apresenta 85% de identidade do N-terminal com a lectina de *C. atrox* (RSL) (dos 55 resíduos N-terminais sequenciados, só 7 são diferentes). A composição de aminoácidos de BJL é bem similar a da RSL, sugerindo que o alto nível de homologia é mantido durante toda a sequência das proteínas. Os quatro resíduos de cisteína determinados em BJL na região N-terminal estão presentes nas mesmas posições em RSL, sugerindo que as ligações dissulfeto se encontram nas mesmas posições nestas duas lectinas (Ozeki e cols, 1994).

A segunda sequência de lectina de veneno de serpentes relatada foi a da *Lachesis muta stenophrys*, a LmsL. Os 135 resíduos sequenciados permitiram o cálculo preciso da massa molecular de um monômero que é 16,2 kDa. Este valor é próximo ao estimado em SDS-PAGE. LmsL e RSL apresentam 92% de homologia em sua sequência total (Aragón-Ortiz e cols, 1996).

Outras proteínas isoladas do veneno de *Bothrops jararaca* apresentam homologia estrutural com as lectinas tipo-C, sem possuir a atividade de ligação a carboidratos, as denominadas CLPs (já mencionadas nas págs. 12/13). Por exemplo: Jararhagina-C, que

inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (adenosina di-fosfato), (Usami e cols, 1994) e a proteína anticoagulante, Jararaca IX/X-bp, que se liga aos fatores IX e X da cascata de coagulação sanguínea (Sekiya e cols, 1993). As duas formas de botrocetinas, a de uma cadeia polipeptídica e a de duas cadeias, que se ligam ao fator de von Willebrand (proteína multimérica presente na circulação sanguínea), e este complexo ativado induz a aglutinação plaquetária (Read e cols, 1989; Fujimura e cols, 1991).

BJL e botrocetina de duas cadeias (Usami e cols, 1993) possuem atividades diferentes. A atividade hemaglutinante é exclusiva da lectina, enquanto a botrocetina media a agregação plaquetária na presença do fator de von Willebrand independentemente de íons Ca^{2+} , apesar de ter estrutura de lectina tipo C (Ozeki e cols 1994).

Várias outras CLPs, todas isoladas de veneno de serpentes, possuem diversas funções como: efeitos anticoagulantes através da ligação aos fatores de coagulação X e XI (Atoda e cols, 1991; Sekiya e cols, 1993) ou através da ligação a trombina (Zingali e cols, 1993) Outras se ligam a glicoproteína Ib mas exibem efeitos variáveis na aglutinação e agregação de plaquetas, por exemplo: albogreguina (*Trimeresurus albolabris*) induz aglutinação na ausência de qualquer cofator (Peng e cols, 1991), enquanto echicetina, do veneno da serpente *Echis carinatus* (Peng e cols, 1993), e agkicetina, do veneno da serpente *Agkistrodon acutus* (Chen & Tsai, 1995), inibem aglutinação.

O alto grau de homologia destas proteínas pode estar relacionado com um precursor ancestral comum, um CRD ancestral (Drickamer, 1993). Além disso, possíveis mutações pontuais ou rearranjos genéticos pós-transcricionais poderiam ter influência direta na expressão da atividade biológica.

A função das CLPs que apresentam atividade de lectina nos venenos de serpentes ainda não foi esclarecida. A sua presença nos venenos pode ser vista como uma arma efetiva na defesa da própria serpente, assim como na captura de presas, pois sugere-se que elas podem elicitar vários fenômenos como aglutinação de células sanguíneas, incluindo plaquetas e estimulação das células presentes nos tecidos periféricos (Hirabayashi e cols, 1991; Ogilvie e cols, 1989).

Nem todas as lectinas isoladas de venenos de serpentes estimulam a agregação plaquetária. Foram testadas cinco lectinas de diferentes espécies: *Lachesis muta* (BML), *Ancistrodon piscivorous leukostoma* (CML), *Crotalus atrox* (RSL), *Bothrops atrox* (TL) e *Agkistrodon contortrix contortrix* (CuHL). As três primeiras estimularam consistentemente a secreção e agregação plaquetária, enquanto TL e CuHL não possuem tal efeito (Ogilvie e cols, 1989).

Por outro lado, estas lectinas não são tóxicas para mamíferos, já que injeções intramusculares ou subcutâneas em coelhos de laboratório não causam reações adversas (Ogilvie e cols, 1986).

Supostamente, as lectinas poderiam estar envolvidas em processos metabólicos da própria serpente, não agindo no animal exposto ao veneno. Agiriam na regulação

das proteases presentes no reservatório de veneno, prevenindo a autoproteólise desta estrutura através do sequestro de íons cálcio; ou no sítio da síntese do veneno, pois são encontrados mucopolissacarídeos em abundância na glândula de veneno e não o são no reservatório. Desta forma, as lectinas preveniriam a perda de mucopolissacarídeos da glândula de veneno para o reservatório (Ogilvie & Gartner, 1984).

Apesar de muitas especulações, ainda não se esclareceu a função da lectina no veneno de algumas serpentes. O estudo da estrutura e da atividade destas moléculas hemaglutinantes pode nos levar a soluções e aplicações de modelos para o estudo de interações proteína-carboidrato, pois estas interações fazem parte da grande maioria das interações biológicas em vertebrados.

OBJETIVOS

Purificação da proteína hemaglutinante do veneno de *Bothrops jararacussu*, caracterização da sua atividade hemaglutinante e de ligação a diferentes carboidratos.
Investigar possível ação da proteína na proliferação de células de mamíferos em cultura.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) VENENO DE *BOTHROPS JARARACUSSU*.

O veneno total seco da serpente *Bothrops jararacussu* foi cedido pelo Instituto Butantã, São Paulo-SP, Brasil.

2) PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *BOTHROPS JARARACUSSU*.

Cromatografia de Afinidade

A lectina do veneno de *B. jararacussu* (BJcuL) foi purificada por cromatografia de afinidade em galactose. Cem miligramas do veneno bruto de *B. jararacussu* foram dissolvidos em 4,0 ml de tampão CTBS (Tris-HCl 20 mM + NaCl 150 mM + CaCl₂ 5 mM, pH 7,5) e clarificado por centrifugação em centrífuga de bancada (Spin I - Incibrás) por um minuto. O veneno dissolvido e solubilizado foi aplicado em uma coluna de 2,5 ml (0,8 x 5 cm) de agarose complexada com D-galactose (Pierce, USA), previamente equilibrada com tampão CTBS. A lectina foi eluída com lactose 0,1 M (Sigma) em CTBS. Frações de 1,5 ml foram coletadas e monitoradas a 280 nm no espectrofotômetro Shimadzu UV1201. As frações proteicas eluídas com lactose foram reunidas e dialisadas contra CTBS, TBS ou água. Após diálise foram estocadas a - 16 °C ou liofilizadas.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Fase Reversa

O equipamento Waters HPLC modelo PDA - 991, equipado com duas bombas Waters mod. 510, injetor automático de amostra Waters mod.U6K e coluna C18 / μ

Bondapack (0,78 cm x 30 cm), foi usado para verificar a pureza do pico eluído com lactose na cromatografia de afinidade, após diálise deste com água. A cromatografia reversa usou um gradiente linear de 0 a 100% de uma solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético pH 2,5 (Hearn, 1987). As amostras aplicadas foram monitoradas a 280 nm e em seguida liofilizadas.

3) DOSAGEM DE PROTEÍNAS.

A quantificação das frações proteicas foi feita de acordo com o método descrito por Lowry (Lowry e cols, 1951; Peterson, 1979). Uma amostra (200 µl) de solução de proteína convenientemente diluída foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente com 1 ml do reagente cupro-alcálico chamado de Solução C. A Solução C é constituída de Solução A [carbonato de sódio 2% (p/v) em NaOH 0,1 N], Solução B1 [sulfato de cobre 1% (p/v) em H₂O] e de Solução B2 [tartarato de sódio e potássio 2% (p/v) em H₂O] na proporção de 100:1:1(v/v), respectivamente.

À mistura acima adicionou-se 50 µl do reagente Folin-fenol Ciocalteus (Merck), deixou-se em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente, ao fim dos quais foi determinada a absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de albumina bovina (Fraction V, Sigma, Co.) com concentrações variando de 0 a 400 µg/ml.

4) ELETROFORESE EM SDS-PAGE.

As placas de poliacrilamida foram preparadas de acordo com Laemmli (1970). Apresentaram gel de concentração de 5% e o gel de corrida de 15%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque a 30% (Bio Rad Labs. Richmond, Cal.) e N-N-metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richmond, Cal.), ambas dissolvidas em água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore-Waters Corporation), filtradas em papel de filtro (Whatman nº1) e mantidas a 4°C em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5% foi preparado utilizando-se tampão Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, enquanto para o gel de corrida a 15% foi utilizado o tampão Tris-HCl 0,3 M pH 8,8. A ambos os géis foram adicionados 0,1% (p/v) de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e a polimerização concluída com 0,1% (v/v) de N-N-N-N-tetrametildiamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio. A eletroforese PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de placas "SE 250 Might Small II", Hoefer.

As amostras aplicadas aos géis tiveram de 20 a 50 µg de proteínas e foram dissolvidas no tampão da amostra (Tris-HCl 0,08M pH 6,8, adicionando-se 2% SDS + 10% de glicerol e 1% de azul de bromofenol). Quando necessário, as amostras foram reduzidas com DTT (Sigma), numa concentração final de 0,1 M.

A eletroforese foi realizada no tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) à voltagem constante de 100 Volts. Os seguintes marcadores de peso molecular (Pharmacia Electrophoresis Calibration Kit LMW)

foram usados como padrão; fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

O gel retirado do sistema de placas foi corado com solução de Coomassie Blue R-250 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1: 4: 5 (v/v) durante 3 horas. Em seguida foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1: 4: 5 (v/v).

Placas de SDS-PAGE contendo BJcuL foram também coradas para carboidratos com o método do ácido periódico - Reativo de Schiff (Korn & Wright, 1973). Após a corrida eletroforética, o gel foi retirado do sistema de placas e fixado com ácido tricloroacético (TCA) 12,5% (v/v) por 1 hora. Terminado o tempo, o gel foi lavado 3 vezes com água Milli Q, e incubado por 1 hora com ácido acético 3,0% (v/v) contendo ácido periódico 1,0% (p/v). O gel foi, então, lavado com água Milli Q e deixado descansar por uma noite, também em água. Depois deste período, o gel foi incubado em câmara fria com o reagente de Schiff por 1 hora. Em seguida foi lavado repetidamente com metabissulfito de sódio 0,5% (p/v) e mantido nesta solução.

5) ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO.

A atividade hemaglutinante de BJcuL foi testada sobre eritrócitos intactos e sobre eritrócitos tripsinizados de porco, boi, carneiro, cavalo, rato e pato. O sangue destes animais foi colhido e mantido em solução de Alsever (2,05g de glicose, 0,80g de citrato de sódio e 0,42g de cloreto de sódio, para 100 ml de água destilada, pH 6,1 ajustado com ácido cítrico).

Tripsinização dos Eritrócitos

A tripsinização dos eritrócitos seguiu o descrito por Lis e Sharon (1972). Os eritrócitos foram coletados do estoque de sangue por centrifugação a temperatura ambiente em centrífuga de mesa (Excelsa 3, Fanem S.A.) a 450 x g por 10 minutos. O sedimento de células (eritrócitos) foi lavado 3 a 4 vezes com NaCl 0,15 M, numa proporção de 5 ml de NaCl para cada ml de eritrócito sedimentado.

Para cada 4 ml de eritrócitos lavados foram adicionados 100 ml de PBS (0,8g de NaCl, 0,02g de KCl, 0,17g de Na_2HPO_4 e 0,02g de KH_2PO_4 , para 100 ml H_2O) resultando numa suspensão com absorvância 2,0 a 620 nm. A dez partes desta suspensão foi adicionada uma parte de solução de tripsina a 1% (p/v), deixou-se incubar a 37°C por 1 hora.

Os eritrócitos tripsinizados foram, então, lavados 4 a 5 vezes com NaCl 0,15 M para remoção da tripsina. Finalmente foram ressuspensos em tampão (CTBS ou

TBS) suficiente para uma suspensão padrão de eritrócitos a 3% (v/v). A quantidade de eritrócitos por ml na suspensão padrão foi estimada através de contagem em câmara de Neubauer.

Atividade Hemaglutinante

Para determinação da atividade hemaglutinante da lectina do veneno de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (Sigma Chemical Co., USA) (12 colunas↓ e 8 fileiras→). Primeiramente, foram adicionados aos poços 50 µl de CTBS, em seguida 50µl da amostra (BJcuL) foram colocados nos primeiros poços das fileiras. A amostra é então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Os últimos poços não continham BJcuL, mas somente suspensão de eritrócitos e foram considerados os controles.

Terminadas as diluições, foram adicionados aos poços 50 µl de suspensão de eritrócitos a 3% (v/v). As leituras foram realizadas após 2 horas de incubação da placa à temperatura ambiente. A mínima concentração (ou maior diluição) de BJcuL que permite visualização dos eritrócitos aglutinados foi determinada.

Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante por Carboidratos

Os testes para inibição da atividade hemaglutinante por diferentes carboidratos foram realizados com Lactose, Galactose, Glicose, Maltose, Frutose, Rafinose,

Sacarose, Manose, Galactosamina e Glicosamina, todos adquiridos da Sigma Co., USA. O restante dos reagentes utilizados foram todos de grau analítico.

Em placas de microtitulação (96 poços, Sigma, Co., USA) foram adicionados aos primeiros poços das fileiras 25 µl do carboidrato em concentrações iniciais que variaram de 150 mM a 12,5 mM em CTBS. Estes foram diluídos serialmente com 25 µl de CTBS já presente nos poços da placa. Logo após, 25 µl de BJcuL foram adicionados em todos os poços para uma concentração final de 4,0 µg/ml. As placas foram mantidas em repouso por 5 minutos e em seguida adicionou-se 50 µl de uma suspensão a 3% (v/v) de eritrócitos tripsinizados de porco.

Após repouso das placas por 2 horas à temperatura ambiente, foi determinada a menor concentração de cada carboidrato capaz de inibir a aglutinação de eritrócitos tripsinizados de porco induzida por 4,0 µg/ml de BJcuL. Os controles negativos (sem hemaglutinação) constaram de 50 µl de solução de carboidrato e 50 µl de suspensão celular, e os positivos (hemaglutinação) de 50 µl de BJcuL e 50 µl de suspensão celular.

Ensaio de Requerimento de Cátions Divalentes

O requerimento de cátions divalentes para atividade de BJcuL foi primeiramente investigada acrescentando-se EDTA ao sistema de hemaglutinação, em placas de microtitulação. Depois de verificado o requerimento, EGTA foi utilizado para verificar se a atividade de BJcuL é dependente de íons Ca^{2+} . O tampão usado nestes ensaios foi TBS.

Na placa de microtitulação 25 µl de soluções de EDTA ou EGTA foram acrescentadas aos primeiros poços e diluídas serialmente em TBS já presente nos poços. BJcuL foi adicionada para a concentração final de 4,0 µg/ml, e finalmente foram acrescentados 50 µl de suspensão de eritrócitos tripsinizados de porco a 3% (v/v). Os controles foram realizados com 50 µl de BJcuL e 50 µl de suspensão celular, em TBS.

Ensaio de Sensibilidade a Agente Redutor

Em placas de microtitulação 25 µl de solução de DTT foi diluída de modo semelhante aos ensaios já descritos. Adicionou-se, então, BJcuL para uma concentração final de 4,0 µg/ml e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados aos poços a suspensão de eritrócitos tripsinizados de porco a 3% em CTBS. Os controles não continham DTT.

6) ESTUDOS DE TOXICIDADE DE BJCuL SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM CULTURA.

A atividade de BJcuL em cultura de células foi testada sobre fibroblastos de pulmão de hamster chinês linhagem V-79. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Bioquímica-IB, UNICAMP.



Estocagem das Células

A linhagem celular V-79 foi criopreservada em nitrogênio líquido. Para tal, foi adicionado meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium - Sigma) mais 10% SFB (soro fetal bovino - Nutricell) nas suspensões celulares individualizadas, na presença de dimetilsulfóxido (DMSO - Aldrich, grau espectroscópico), utilizado como agente criopreservante. As células foram acondicionadas em frascos adequados e estéreis. O processo de resfriamento foi efetuado de maneira controlada, numa diminuição de temperatura de 1 a 3°C/minuto.

Quando necessário, os estoques foram removidos do nitrogênio líquido e imediatamente colocados em banho a 37°C. A suspensão celular assim descongelada foi transferida para uma placa de Petri (5 cm de diâmetro), contendo o meio de cultura DMEM, na presença de 20 % de SFB. Após a adesão das células (aproximadamente 6 a 8 horas), o meio de cultura foi trocado por meio fresco e as células cultivadas em condições padrão (meio completo a 37°C, CO₂ 5%) até atingirem a densidade de confluência. As culturas foram, então, rotineiramente subcultivadas, como descrito a seguir.

Manutenção das Linhagens Celulares

As células foram rotineiramente cultivadas em garrafas de cultura em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células cresceram na forma de monocamadas aderidas ao fundo da garrafa, e foram mantidas à 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As culturas celulares em densidade de confluência, foram

subcultivadas após lavagem das células com tampão PBS pH 7,4 e tratamento enzimático com tripsina por 1 a 2 minutos em temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, o tratamento com tripsina foi bloqueado com a adição do meio de cultura DMEM com 10% de SFB. As células individualizadas em suspensão foram homogeneizadas, contadas em câmara de Neubauer, e finalmente semeadas em baixa densidade celular em outras garrafas de cultura ou em placas de Petri (5 cm diâmetro).

Efeito de BJcuL Sobre a Proliferação de Células V-79.

Uma alíquota da suspensão celular de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês linhagem V-79 obtida após a tripsinização, foi contada em câmara de Neubauer e diluída em meio de cultura DMEM (10% SFB) para atingir a densidade final de $3,0 \times 10^4$ células/ml em cada poço (em placa de poliestireno - 24 poços, Corning).

As células foram, então, incubadas em meio DMEM, por 48 horas em estufa com CO₂ 5% a 37°C, até atingirem a fase exponencial de crescimento. Após este período, as células foram tratadas com BJcuL em doses que variaram de 3 a 30 µg/ml.

As células foram incubadas por 24 horas com BJcuL dissolvida, em DMEM sem soro fetal bovino, para concentração de 3 a 10 µg/ml (faixa de concentração capaz de aglutinar eritrócitos de porco, boi e rato, nos ensaios de hemaglutinação), e por 2, 24 e 48 horas, numa concentração maior de BJcuL (10 a 30 µg/ml).

Após o término do tempo de exposição das células à lectina, o meio de tratamento foi retirado, as células lavadas com PBS-Ca²⁺, fixadas com TCA 5%, e o

excesso de TCA lavado com etanol. Finalmente, as células foram lisadas com NaOH 0,1 N durante 1 hora a 37°C e o conteúdo total de ácidos nucléicos foi determinado por absorvância a 260 nm (A_{260}) (Haun e cols, 1992).

Todos os resultados foram expressos como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles (100%).

RESULTADOS

1) PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *BOTHROPS JARARACUSSU*.

A lectina do veneno de *Bothrops jararacussu* foi purificada através de cromatografia de afinidade em D-galactose. A coluna de agarose complexada com D-galactose foi previamente equilibrada com CTBS. Após a passagem do veneno total e de várias lavagens da coluna com CTBS, a eluição de BJcuL foi feita com 100 mM de lactose em CTBS.

O perfil cromatográfico de BJcuL é mostrado na Figura 2, onde após a adição de lactose 100 mM, um único pico de absorção a 280 nm foi observado, depois da fração 22. A eficiência máxima da purificação foi 0,9 mg de BJcuL em 100 mg de veneno de *B. jararacussu* (0,9%).

Após diálise com água por 12 horas e liofilização, a fração eluída com lactose foi submetida à cromatografia em HPLC - fase reversa. O perfil cromatográfico mostrado na Figura 3 apresenta um único pico de absorbância a 280 nm, eluído no tempo de retenção de 18 minutos e na concentração de 82% de solvente B.

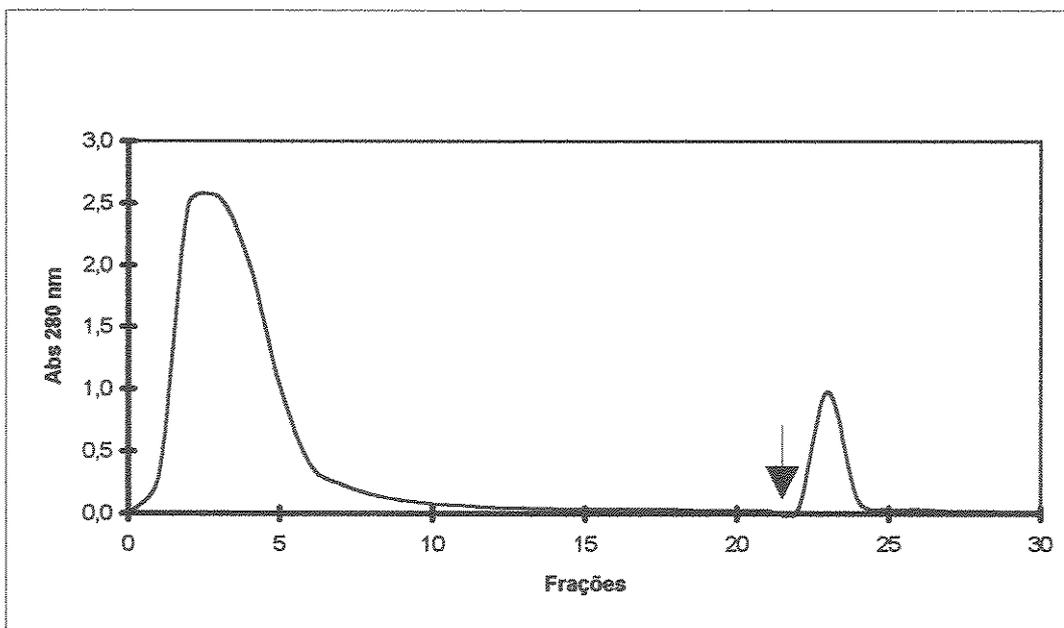


Figura 2. Perfil cromatográfico de eluição da BJcuL em cromatografia de afinidade em D-galactose. O veneno total de *Bothrops jararacussu* foi aplicado na coluna equilibrada com CTBS. O primeiro pico representa a fração do veneno de *B. jararacussu* que não se ligou à coluna. A lectina foi eluída com 100 mM de lactose (indicado pela ↓) em CTBS, absorvância monitorada a 280 nm, frações com volume de 1,5 ml.

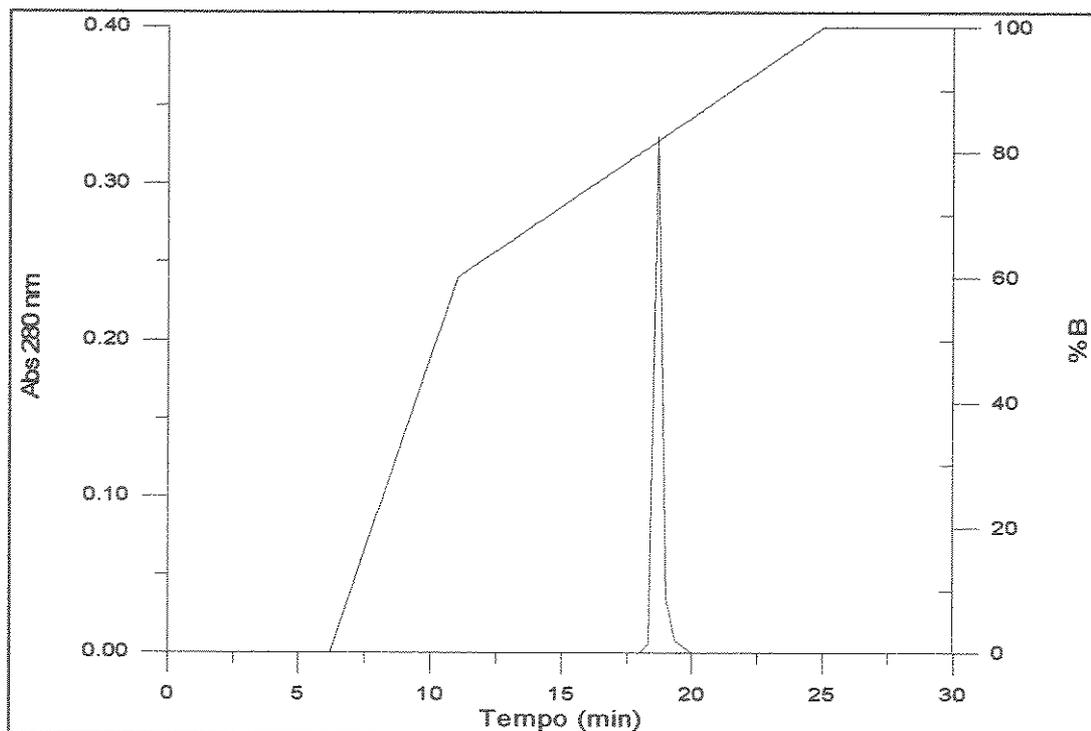


Figura 3. Perfil cromatográfico da fração eluída com lactose na cromatografia de afinidade, em HPLC-fase reversa, coluna C18 μ Bondapack (7.8 x 300 mm, 125 Å). Tampão A: ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 %, pH 2,5 e tampão B: acetonitrila 66% em tampão A. Fluxo de 2 ml/min. Abs 280 (—) e % de solvente B (—).

2)ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

As frações eluídas com lactose na cromatografia em D-galactose, após diálise com CTBS, foram reunidas e submetidas a análise do perfil de massa molecular em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS.

Na Figura 4, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250. Em condições redutoras (R), BJcuL migra como uma banda única com massa molecular aparente de 15 kDa. Em condições não redutoras (NR), a lectina migra como uma banda principal de 30 kDa, e como bandas com baixas concentrações proteicas de massa molecular aparente de 60 kDa e 45 kDa, aproximadamente. Provavelmente, BJcuL forma agregados de três subunidades (correspondendo a 45 kDa) e quatro subunidades (correspondendo a 60 kDa).

O gel de acrilamida a 15% também foi submetido à coloração para carboidratos e não apresentou banda corada pelo reativo de Schiff, sugerindo que esta proteína não contém resíduos de açúcares ligados covalentemente em sua estrutura.

3) ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO

Os resultados positivos de hemaglutinação foram visualmente detectados através da formação, após 2 horas de incubação, de uma malha ou rede de hemácias que cobria o fundo e os lados dos poços. Foram considerados negativos para hemaglutinação os poços onde se visualizava um botão compacto de células no fundo do poço.

Na Figura 5, os poços contendo hemácias de pato e BJcuL aparecem como botões no fundo dos poços (fileiras A e B), mostra que BJcuL não possui atividade hemaglutinante sobre este tipo de eritrócitos. Onde ocorre hemaglutinação, nos poços contendo hemácias de porco e BJcuL (fileiras C a F), observa-se um tapete de células. A concentração mínima de BJcuL capaz de provocar hemaglutinação total foi considerada antes da formação da rosácea visualizada na coluna 7, fileiras C e D.

A atividade hemaglutinante de BJcuL foi testada sobre eritrócitos de boi, porco, pato, cavalo, rato e carneiro. A Tabela 1 mostra a concentração mínima de BJcuL capaz de aglutinar os eritrócitos na concentração final de 1,5 % (v/v), ou seja, na quantidade estimada (contagem em câmara de Neubauer) de $6,0 \times 10^6$ células/ml.

Eritrócitos tripsinizados de boi e porco foram aglutinados pela lectina, em concentrações mínimas de aproximadamente 2,0 µg/ml e 0,5 µg/ml, respectivamente. A tripsinização dos eritrócitos os torna mais sensíveis a baixas concentrações de BJcuL,

pois eritrócitos intactos de boi e porco somente são aglutinados na presença de uma maior quantidade de BJcuL.

Eritrócitos tripsinizados e eritrócitos intactos de pato, cavalo e carneiro não aglutinaram na presença de BJcuL (até concentração máxima de 66 $\mu\text{g/ml}$). Os eritrócitos intactos de rato aglutinam na presença de concentração baixa de BJcuL, e quando comparados com os outros eritrócitos, não resistiram a tripsinização pela metodologia utilizada.

Com base nos resultados obtidos, os eritrócitos de porco foram selecionados para os testes de atividade de inibição, por apresentarem maior sensibilidade à hemaglutinação induzida por BJcuL e por serem mais resistentes à tripsinização de acordo com a metodologia utilizada.

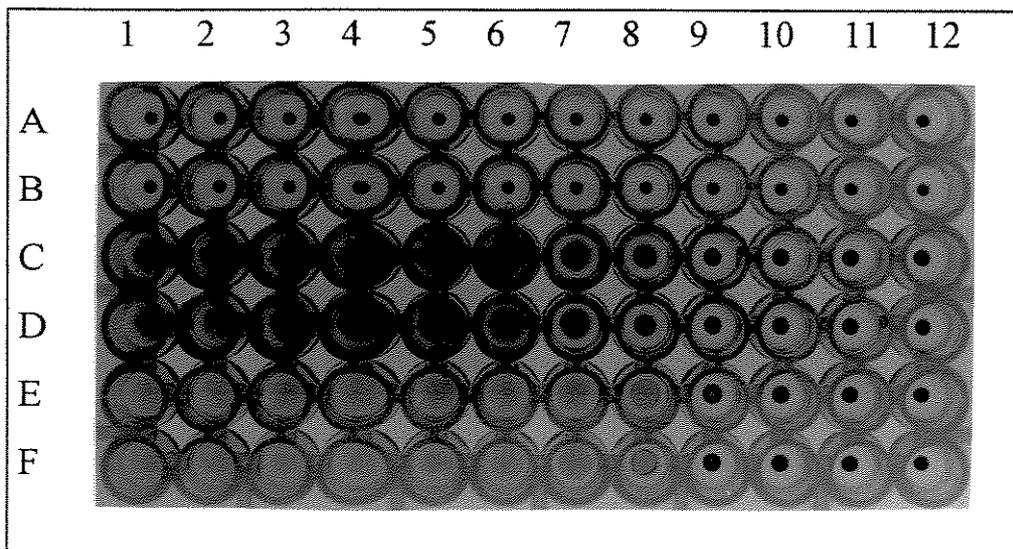


Figura 5. Ensaio de hemaglutinação induzida por BJcuL. Placa de hemaglutinação depois de 2 horas de incubação à temperatura ambiente. Diluições seriais de BJcuL (concentração inicial de 66,0 µg/ml). **Fileiras:** **A**: diluições de BJcuL e suspensão de eritrócitos intactos de pato; **B**: diluições de BJcuL e suspensão de eritrócitos tripsinizados de pato; **C e D**: diluições de BJcuL e suspensão de eritrócitos intactos de porco; **E e F**: diluições de BJcuL e suspensão de eritrócitos tripsinizados de porco. **Coluna 12**: suspensão de eritrócitos (controle).

Tabela 1: Concentração mínima hemaglutinante de BJcuL. Atividade hemaglutinante de BJcuL sobre diferentes eritrócitos na presença de 5 mM de CaCl₂, ensaios descritos em Materiais e Métodos.

Eritrócitos	Intactos	Tripsinizados
boi	16,6 µg/ml	2,0 µg/ml
porco	2,4 µg/ml	0,5 µg/ml
pato	na. ₁	na. ₁
cavalo	na. ₁	na. ₁
rato	1,3 µg/ml	nd. ₂
carneiro	na. ₁	na. ₁

1. até concentração de 66,0 µg/ml de BJcuL não ocorreu hemaglutinação (na).

2. nd.-não determinado (eritrócitos não resistiram a tripsinização).

4) INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO POR CARBOIDRATOS.

De acordo com a Tabela 2, a atividade hemaglutinante induzida por 4,0 µg/ml de BJcuL sobre eritrócitos tripsinizados de porco é especificamente inibida na presença de 0,8 mM de lactose, 3,2 mM de galactose e 3,2 mM de rafinose. Sacarose e outros carboidratos como maltose, frutose, manose, D-galactosamina e D-glicosamina tiveram pouco ou nenhum efeito sobre esta atividade.

Tabela 2: Efeito de carboidratos na hemaglutinação induzida por BJcuL. Concentração Mínima do carboidrato que inibe a hemaglutinação (CMic). Ensaios descritos em Materiais e Métodos.^a

Carboidrato	CMic (mM)
D-lactose	0,8
D-galactose	3,2
D-rafinose	3,2
D-glicose	50,0
D-sacarose	> 100,0
D-maltose	> 150,0
D-frutose	> 100,0
D-manose	> 100,0
D-galactosamina	> 50,0
D-glicosamina	> 100,0

^aConcentração de BJcuL previamente ajustada para 4,0 µg/ml, utilizando-se eritrócitos tripsinizados de porco.

5) REQUERIMENTO DE CÁTIOS DIVALENTES

BJcuL demonstrou requerer cátions divalentes para sua atividade hemaglutinante (Tabela 3). De acordo com os resultados observados, EDTA inibe completamente a hemaglutinação induzida por 4,0 µg/ml de BJcuL em eritrócitos porcinos tripsinizados. Da mesma forma, EGTA também inibe esta atividade, caracterizando e confirmando a dependência de íons cálcio na atividade hemaglutinante de BJcuL.

Tabela 3: Efeito de agentes quelantes de cátions divalentes na hemaglutinação induzida por BJcuL. Concentração mínima de agentes quelantes na inibição da atividade hemaglutinante (CMIq). Ensaios descritos em Materiais e Métodos. ^a

Quelante de íons divalentes	CMIq (mM)
EDTA	0,2
EGTA	0,1

^aA atividade hemaglutinante de BJcuL foi testada na presença de EDTA ou EGTA. BJcuL previamente ajustada para 4,0 µg/ml e os eritrócitos tripsinizados de porco a 3%, diluídos em TBS.

6) SENSIBILIDADE DE BJcuL A AGENTE REDUTOR:

A incubação prévia de BJcuL com DTT 2,5 mM inibe a hemaglutinação induzida por 4,0 µg/ml de BJcuL sobre eritrócitos porcinos tripsinizados. A associação das subunidades através das ligações dissulfeto é essencial para a atividade hemaglutinante da lectina.

7) ESTUDOS DE TOXICIDADE DE BJcuL SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE MAMÍFEROS EM CULTURA.

As alterações na proliferação celular causadas pela lectina do veneno da serpente *Bothrops jararacussu* foram medidas através do conteúdo total de ácidos nucléicos de fibroblastos V-79 (A₂₆₀).

Quando as células V-79 são tratadas por 24 horas (Figura 6) com BJcuL, em doses que variaram de 3 a 10 µg/ml da proteína, nenhum efeito citotóxico observado.. Tanto os poços tratados quanto os controles (não tratados) permanecem em torno de 100 % de sobrevivência.

A proteína hemaglutinante do veneno de *B. jararacussu* não apresentou atividade citotóxica sobre fibroblastos V-79, mesmo quando a dose foi aumentada cerca de dez vezes. Em duas horas de tratamento (Figura 7), BJcuL não tem efeito tóxico sobre essas células.

No entanto, observando a Figura 7, BJcuL parece estimular a proliferação celular de fibroblastos V-79 em cultura. Os dados analisados numa outra forma de apresentação (Figura 8) mostram que a lectina do veneno de *B. jararacussu* numa concentração de 10 µg/ml, depois de 24 horas de incubação, parece ser capaz de induzir proliferação destas células.

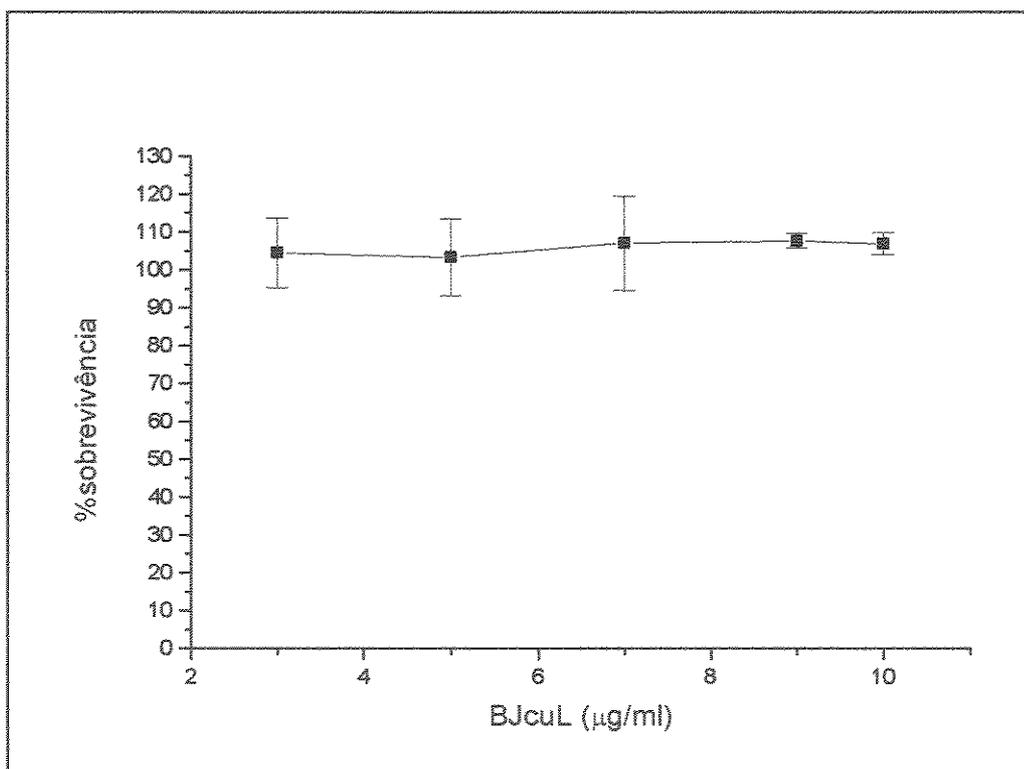


Figura 6. Efeito de BJcuL na proliferação celular. Células V-79 em fase exponencial de crescimento foram incubadas por 24 horas com BJcuL. Após o tratamento as células foram fixadas e lisadas conforme descrito em Materiais e Métodos. A proliferação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles (100%). O gráfico representa valores médios de três ensaios em triplicatas com os respectivos desvios padrões da média.

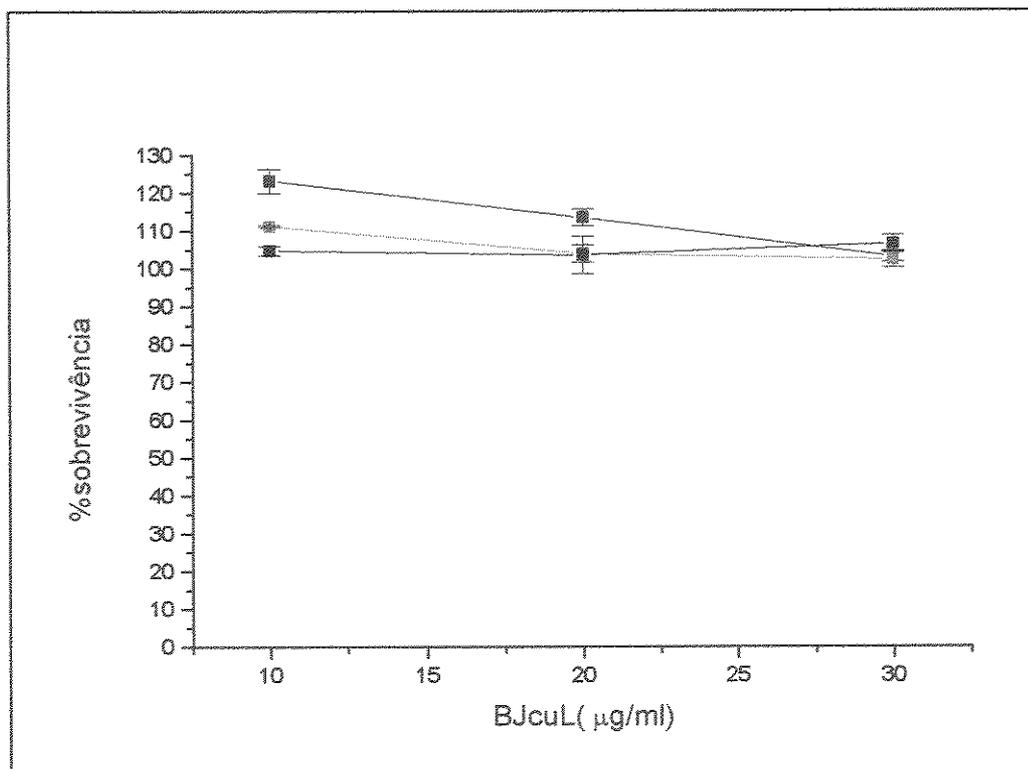


Figura 7. Efeito de BJcuL na proliferação celular. Células V-79 em fase exponencial de crescimento foram incubadas por 2 (—■—), 24 (—■—) e 48 (—■—) horas com BJcuL. Após o tratamento as células foram fixadas e lisadas conforme descrito em Materiais e Métodos. A proliferação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles (100%). O gráfico representa valores médios de três ensaios em triplicatas com os respectivos desvios padrões da média.

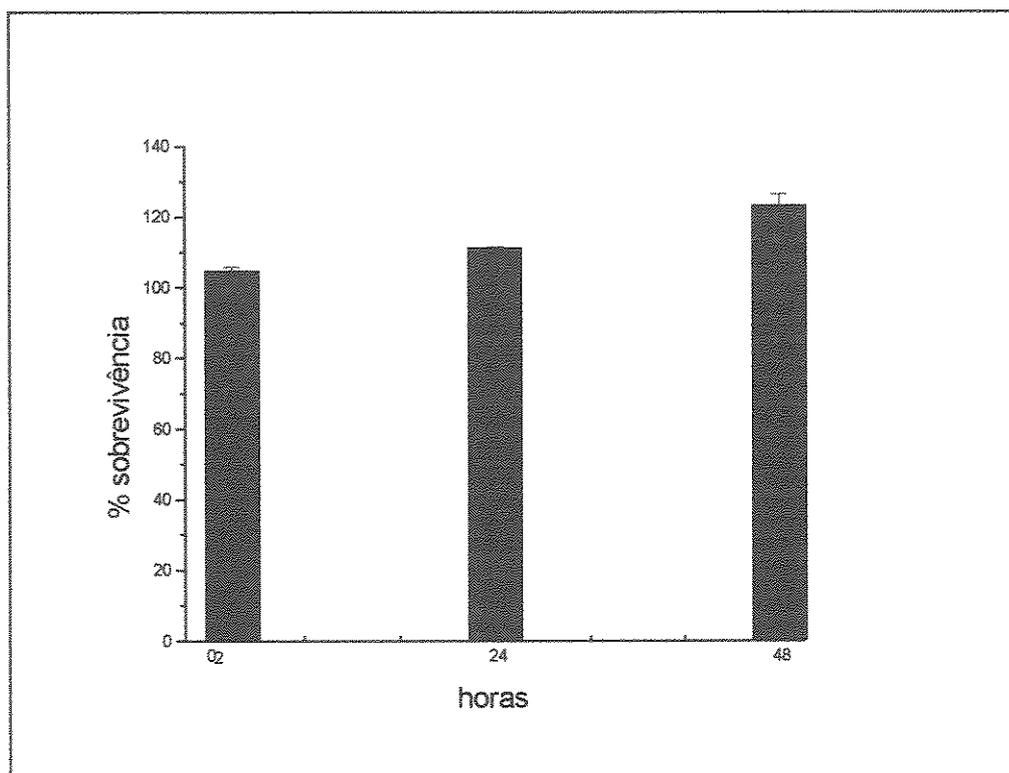


Figura 8. Efeito de BJcuL na proliferação celular. Células V-79 em fase exponencial de crescimento foram incubadas com 10 $\mu\text{g/ml}$ da lectina do veneno serpente *Bothrops jararacussu* por 2, 24 e 48 horas. Após o tratamento as células foram fixadas e lisadas conforme descrito em Materiais e Métodos. A proliferação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles (100%). O gráfico representa valores médios de três ensaios em triplicatas com os respectivos desvios padrões da média.

DISCUSSÃO

As lectinas são proteínas que se ligam especificamente, não covalentemente, a determinados carboidratos. Devido à essa característica possuem a propriedade de aglutinar ertrócitos, células normais e cancerosas, assim como microrganismos. Estão amplamente distribuídas em várias plantas, em animais e outros organismos (Carvalho, 1990).

Vários venenos de serpentes foram investigados quanto à atividade hemaglutinante e mostraram a presença de lectinas dependentes de cálcio, específicas para lactose e sensíveis a agentes redutores (Ogilvie & Gartner, 1984). Estas lectinas foram purificadas de veneno de serpentes como *Bothrops atrox* (Gartner e cols, 1980), *Bothrops godmani* (Lomonte e cols, 1990), *Crotalus atrox* (Hirabayashi e cols, 1991), *Bothrops jararaca* (Ozeki e cols, 1994) and *Lachesis muta s.* (Aragón-Ortiz e cols, 1996).

Assim como estes venenos de serpentes, o veneno da serpente *Bothrops jararacussu* contém uma potente hemaglutinina. Essa hemaglutinina é uma lectina, que foi isolada a partir do veneno total através de cromatografia de afinidade em coluna de D-galactose imobilizada. O perfil cromatográfico de eluição da lectina de *Bothrops jararacussu* (BJcuL) mostra um único pico de absorção a 280 nm, após eluição com 100 mM de lactose.

Para cada 100 mg de veneno de *Bothrops jararacussu*, o máximo de BJcuL purificada através da cromatografia de afinidade foi 0,9 mg, dosados através do método

de Lowry. BJcuL perfaz 0,9% do veneno total dessa serpente, o que é um conteúdo proteico comparável aos das lectinas já purificadas do veneno de outras serpentes, que ficam em torno de aproximadamente 0,3 a 1,0 % do veneno total (Gartner & Ogilvie, 1984).

A cromatografia em fase reversa-HPLC permitiu comprovar o grau de pureza da fração obtida do veneno total de *B. jararacussu* pela cromatografia de afinidade em D-galactose. Esta fração foi eluída como um pico único em 82% do solvente B, o que nos mostra uma proteína que se liga fortemente à matriz cromatográfica, pois sua eluição só é feita em concentrações elevadas do solvente orgânico.

As lectinas de veneno de serpentes são caracterizadas pelo alto conteúdo de Asp, Glu e Lys, sendo, portanto, caracterizadas como moléculas hidrofílicas, como observado em *Crotalus atrox* (Hirabayashi e cols, 1991) e *Lachesis muta stenophrys* (Aragón-Ortiz e cols, 1996). Porém, a ligação forte de uma proteína à uma coluna de interação hidrofóbica caracteriza uma proteína que possui alta quantidade de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Guimarães & Collins, 1990).

Esta ligação forte de BJcuL à matriz cromatográfica da coluna C18 pode estar, então, relacionada com as regiões hidrofóbicas que formam o “core” (centro) hidrofóbico da proteína, já caracterizado na lectina do veneno de *Crotalus atrox* (Hirabayashi, 1991). Este “core” hidrofóbico de BJcuL poderia estar se ligando fortemente à matriz da coluna C18.

Estudos com a lectina hepática de galinha mostram que, quando o meio é ácido, a afinidade do CRD por Ca^{2+} diminui, e que, na ausência destes cátions ligados, não há formação do sítio de ligação do carboidrato (Loeb & Drickamer, 1988). Desta forma, quando BJcuL é submetida a baixos valores de pH (como o do tampão utilizado na cromatografia de HPLC - fase reversa) ocorreria a perda do Ca^{2+} ligado. Esta perda ocasionaria a desestabilização da estrutura da molécula, expondo os sítios hidrofóbicos responsáveis pela interação com a coluna C18.

A análise do perfil de massa molecular em SDS-PAGE revelou, em condições redutoras com 0,1 M DTT, uma banda com massa molecular aparente de 15 kDa, e em condições não redutoras, uma banda maior com massa molecular aparente de 30 kDa. Esses resultados demonstram que BJcuL é um dímero composto de subunidades de 15 kDa unidas por ligações dissulfeto.

A presença de bandas que migram com massa molecular aparente de 45 kDa e 60 kDa quando BJcuL não é submetida às condições redutoras, provavelmente, são formas de agregação não específica de três e quatro subunidades, respectivamente. Essas formas também são encontradas nas lectinas do veneno das serpentes *Dendroaspis jamesonii* (Ogilvie e cols, 1986) e *Crotalus atrox* (Hirabayashi e cols, 1991), que parecem formar oligômeros em condições fisiológicas. Quando BJcuL é exposta às condições redutoras, estas bandas desaparecem, constando-se a presença de somente uma banda de aproximadamente 15 kDa.

Parecem não existirem carboidratos ligados covalentemente à BJcuL, uma vez que esta proteína não apresentou coloração pelo reagente de Schiff, após tratamento com periodato.

Nos ensaios de hemaglutinação, BJcuL aglutina eritrócitos de porco e boi, tanto intactos, quanto tripsinizados. Os eritrócitos de porco são mais sensíveis à ação da lectina, cerca de quatro vezes mais sensíveis que os eritrócitos de boi. Quanto aos eritrócitos de rato, quando intactos, são os mais sensíveis à ação hemaglutinante de BJcuL, mas não resistem à tripsinização de acordo com a metodologia empregada.

Os eritrócitos de cavalo e carneiro não aglutinam na presença de BJcuL, em concentrações que chegam a 66,0 µg/ml, mesmo aumentando a sensibilidade desses eritrócitos à hemaglutinação através da tripsinização. Eritrócitos de ave (pato) não são sensíveis à ação da lectina de *B. jararacussu*. A presença de diferentes determinantes de carboidratos localizados nas membranas dos eritrócitos de cada espécie reflete a especificidade de BJcuL por determinados eritrócitos.

A atividade hemaglutinante de BJcuL sobre eritrócitos de porco tripsinizados é inibida por lactose, galactose e rafinose, apresentando a mesma especificidade das lectinas tipo S (Drickamer and Taylor, 1993). Galactose, um monossacarídeo; lactose, um dissacarídeo composto de galactose; e rafinose um trissacarídeo, composto de galactose, glicose e frutose (Voet & Voet, 1990), todos apresentam pelo menos um grupo galactosídeo disponível para interação com a BJcuL. Desta forma já era

esperado que esses sacarídeos inibissem a hemaglutinação induzida por essa lectina específica para β - galactosídeos.

As lectinas que interagem com galactose são, em geral, também específicas para galactosamina, como ocorre com as lectinas dependentes de cálcio isoladas de holotúrias (invertebrados marinhos) (Hatakeyama e cols, 1994). Porém, no caso da BJcuL e também de outras lectinas isoladas de venenos de serpentes (Gartner e cols, 1980; Ozeki e cols, 1994), os açúcares aminados, mesmo contendo grupamentos galactosídeos, não têm qualquer efeito sobre sua atividade hemaglutinante. Talvez a posição do grupamento amino atrapalhe a interação da proteína com o resíduo galactosídeo do açúcar em questão.

Quando os eritrócitos são submetidos à aglutinação induzida pela BJcuL na presença de agente quelante de cátions divalentes, como EDTA, ou quelante de íons cálcio, EGTA, esta atividade é inibida. De acordo com esses resultados, conclui-se que essa proteína necessita de íons cálcio para a atividade hemaglutinante, pois quando cálcio é retirado do sistema de teste, não ocorre hemaglutinação. EGTA, por ser um quelante específico de cálcio, inibe a hemaglutinação em concentrações duas vezes menores do que EDTA.

A associação das subunidades através das ligações dissulfeto é essencial para a atividade hemaglutinante da lectina, pois BJcuL quando exposta às condições redutoras com DTT perde esta função. Ainda não se esclareceu se a forma funcional de BJcuL é um dímero ou um complexo de três ou quatro subunidades. Sabe-se, porém, que

agentes redutores, como DTT, inibem a atividade hemaglutinante dessa proteína, e que a forma dimérica é predominante no veneno.

A atividade hemaglutinante foi também testada para o veneno total de *B. jararacussu* (dado não mostrado). O veneno não apresentou atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de boi, o que sugere a presença de algum fator antagônico no veneno que inibe a atividade desta proteína.

A atividade hemaglutinante observada para a maioria das lectinas não reflete diretamente sua principal função fisiológica. O papel das lectinas nos venenos ofídicos permanece sem esclarecimento, embora alguns autores descrevam funções tóxicas para as lectinas, como aglutinação de células sanguíneas, incluindo plaqueta, e estimulação de células presentes nos tecidos periféricos (Ogilvie e cols, 1989; Hirabayashi e cols, 1991). A aglutinação, observada neste trabalho, de eritrócitos intactos de rato numa concentração da lectina, inferior aos demais eritrócitos testados, demonstra uma maior especificidade de BJcuL por este tipo de eritrócito.

Pelo fato das lectinas se ligarem rapidamente, seletivamente e reversivelmente a carboidratos, as interações lectinas-carboidratos têm demonstrado serem capazes de induzir e/ou controlar vários processos metabólicos e de proliferação celular (Gabiús, 1991). Desta forma é esperado que estejam envolvidas numa grande variedade de fenômenos regulatórios, nos quais o reconhecimento de carboidratos é um processo essencial.

Dados de literatura descrevem lectinas de animais e vegetais capazes de alterarem a proliferação celular de algumas linhagens celulares em cultura. Principalmente alterações na proliferação celular de células tumorais (Camby e cols, 1996), citotoxicidade para algumas linhagens celulares (Oda e cols, 1997), e indução de respostas mitogênicas em linfócitos (Mastro e cols, 1986).

Com o propósito de verificar se BJcuL apresenta alguma das atividades relacionadas acima, utilizamos células V-79 como ferramenta biológica para o estudo do efeito de BJcuL sobre a proliferação celular. O primeiro ensaio realizado no intuito de verificarmos a possível ação citotóxica desta lectina sobre células V-79, teve como doses, a faixa de concentração que aglutinava eritrócitos intactos de rato e porco, de 3 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Conforme foi observado na Figura 6, a lectina do veneno de *B. jararacussu* não apresentou atividade tóxica sobre esta linhagem celular após 24 horas de incubação, ou seja, a quantidade total de ácidos nucléicos permanece igual aos controles (100%).

Sendo assim, aumentou-se a dose para 10 a 30 $\mu\text{g/ml}$, e também, o tempo de exposição das células à lectina. Quando as células foram incubadas por 2 horas com BJcuL (Figura 7), nenhum efeito citotóxico foi observado, tanto visualmente (alterações morfológicas) quanto na quantidade relativa do conteúdo total de ácidos nucléicos destas células.

No tratamento por 24 e 48 horas (Figura 7), BJcuL na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$, parece ser capaz de induzir alguma proliferação de células V-79. Quando

analisamos a percentagem de sobrevivência destas células através da Figura 8, fica evidente que esta percentagem aumenta com o tempo de exposição das células à BJcuL.

De acordo com os testes realizados sobre as células V-79, BJcuL não exhibe atividade citotóxica, ou seja, não altera a quantidade total de ácidos nucleicos, quando comparado com os controles (100%). Por outro lado, BJcuL parece estimular a proliferação destas células, e de acordo com os resultados observados, este estímulo ocorre na concentração de 10 µg/ml, concentrações menores ou maiores não parecem estimular a proliferação das células V-79.

Estudos mais detalhados da ação de BJcuL sobre linhagens celulares serão necessários para o esclarecimento das suas propriedades biológicas. De qualquer forma, este resultado nos fornece base para verificação do potencial mitogênico desta proteína sobre tipos celulares já conhecidos como modelos biológicos no estudo de alterações na divisão celular, como por exemplo, os linfócitos (Mastro e cols, 1986).

Este fato não descarta a possibilidade de ação tóxica desta proteína sobre outras linhagens celulares ou mesmo sobre células tumorais, já que estas últimas apresentam extrema variação na composição e distribuição dos glicoconjugados da superfície celular (Sharon, 1983).

As lectinas, em geral, possuem um segundo sítio de ligação que interage com outros tipos de ligantes, principalmente com proteínas (Barondes, 1988), porém as lectinas de venenos de serpentes não possuem estes domínios (Drickamer, 1993).

Assim, as lectinas dos venenos de serpentes podem ser vistas como domínios adicionais de outras proteínas, como por exemplo, das metaloproteases. Poderiam desta forma, estar funcionando como moduladores das propriedades biológicas destas enzimas (Jia e cols, 1996), ou tendo papel de reconhecimento de substrato e direcionadora (Gabiús, 1994)

O fator coagulante do veneno de *Vipera russelli*, que se liga ao fator X da cascata de coagulação sanguínea, o RVV-X, possui os três domínios caracterizados por Kini em 1996 (Figura 1, página 13), em duas cadeias polipeptídicas, uma pesada e uma leve. A cadeia pesada é constituída dos domínios de metaloprotease e disintegrina e a cadeia leve de um domínio homólogo às lectinas tipo C. O domínio que caracteriza a lectina tipo C talvez esteja envolvido no reconhecimento e ligação desta proteína ao fator X, enquanto os outros dois domínios exerceriam cada um sua função já definida: de disintegrina e de metaloprotease (Takeya e cols, 1992).

Pode-se especular sobre a presença da lectina como integrante de uma molécula precursora inativa, um zimogênio de metaloproteases e disintegrinas (Hite e cols, 1992; Hite e cols, 1994). A forma ativa das proteínas em questão seriam liberadas após a hidrólise do precursor, que ocorreria após da liberação do veneno pelas presas da serpente. Este precursor seria a forma inativa destas proteínas; e com a liberação da parte N-terminal (ligante de galactosídeos) passariam a desempenhar suas funções proteolíticas. Assim, preveniriam, de certa forma, a ação do próprio veneno no reservatório desse nas serpentes.

A possibilidade das proteínas relacionadas com as lectinas tipo C (CLPs) serem formadas pela degradação proteolítica de um precursor comum de metaloproteases e disintegrinas ainda é objeto de estudo. De qualquer forma, a evidência de CLPs ligadas a domínios de metaloproteases/disintegrinas, como em RVV-X (Takeya, 1992), e CLPs livres em vários venenos, fornece base para um melhor entendimento das relações estrutura-função destes precursores e das proteínas relacionadas. Podendo, futuramente, esclarecer os mecanismos e a origem de vários efeitos farmacológicos destas proteínas.

Para maiores esclarecimentos acerca das prováveis funções das lectinas de venenos ofídicos é necessária, entre outros, a caracterização da estrutura molecular destas proteínas; através de estudos da estrutura primária (sequenciamento total dessa proteína), descrição das porcentagens de estruturas secundárias e determinação da estrutura terciária da molécula a partir de estudos de cristalografia de proteínas. A análise estrutural da interação proteína-carboidrato, assim como os domínios responsáveis pela atividade biológica destas proteínas são importantes no ponto de vista que este tipo de interação não ocorre só em lectinas de venenos, mas que também é fundamental para todos os processos metabólicos de um organismo.

CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu isolar uma proteína com atividade hemaglutinante do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*. Esta proteína foi caracterizada como uma lectina e tem sua atividade hemaglutinante dependente de cálcio e inibida por açúcares contendo galactosídeos. Estruturalmente é um dímero composto de subunidades de 15 kDa unidas por ligações dissulfeto, sendo que a associação destas subunidades é essencial para a atividade hemaglutinante da lectina. BJcuL demonstrou não apresentar atividade citotóxica sobre fibroblastos de pulmão de hamster chinês linhagem V-79 em cultura, por outro lado, parece estimular a proliferação destas células após 24 horas de incubação, quando em concentrações de 10 µg/ml.

TRABALHOS E PUBLICAÇÕES

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS:

♦ **Eighth PABMB** (Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology) **Congress**. Pucón, Chile, 16-21, November, 1996.

“BJCUL: A C-TYPE GALACTOSIDE-BINDING LECTIN FROM *BOTHROPS JARARACUSSU* VENOM.” Carvalho, D.D.; Marangoni, S.; Oliveira, B. and Novello, J.C.

♦ **XXVI Reunião Anual da SBBq** (Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular). Caxambu, MG, 03-06 maio de 1997.

“CHARACTERIZATION AND ACTIVITY OF A β -GALACTOSIDE BINDING LECTIN ISOLATED FROM THE VENOM OF *BOTHROPS JARARACUSSU*”. D.D. Carvalho, M.F. Pereira, S. Marangoni; M. Haun, B. Oliveira and J.C. Novello.

♦ **17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology** (IUBMB). San Francisco, USA, 24-29, August, 1997.

Resumo submetido: “ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LECTIN-LIKE PROTEIN FROM *BOTHROPS JARARACUSSU* VENOM.” D.D. Carvalho, S. Marangoni, B. Oliveira and J.C. Novello.

PUBLICAÇÃO EM REVISTA INTERNACIONAL:

Os resultados desta tese serão submetidos para publicação na revista internacional: "Biochemistry and Molecular Biology International".

"ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM BOTHRUPS JARARACUSSU VENOM." D. D. Carvalho, S. Marangoni, B. Oliveira and J.C. Novello.

REFERÊNCIAS

- Ali, N. (1991). Soluble β -galactoside binding lectins: physicochemical and functional properties. **Biochem. Educ.** **19:2-6.**
- Aragón-Ortiz, F.; Brenes-Brenes, J.R. and Gubensek, F. (1990). Characterization and properties of a lectin-like protein from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**, **28:143.**
- Aragón-Ortiz, F.; Mentele, R. and Auerswald, E. A. (1996). Amino acid sequence of a lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. **Toxicon** **34:763-769.**
- Atoda, H.; Hyuga, M. and Morita, T. (1991). The primary structure of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biol. Chem.**, **266:14903-14911.**
- Barondes S.H. (1988). Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem. Sci.** **13:480-482.**
- Barondes, S. H.; Castronovo, V.; Cooper D. N. W.; Cummings, R. D.; Drickamer, K.; Feizi, T.; Gitt, M. A.; Hirabayashi, J.; Hughes, C.; Kasai, K-i; Leffler, H.; Liu F-t.; Lotan, R.; Mercurio, A.M.; Monsigny, M.; Pillai, S.; Poirer, F.; Raz, A.; Rigby, P. W. J.; Rini, J.M. and Wang, J. L. (1994 a). Galectins: a family of animal β -galactoside binding lectins. **Cell**, **79: 597-598.**

- Barondes, S. H.; Cooper, D.N.W., Gitt, M.A. and Leffler, H. (1994 b). Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, **269:20807-20810**.
- Barravieira, B. e Pereira, P.C.M. (1994). Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barravieira, B. **Venenos Animais. 1ª ed. EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.**
- Bing, D.H.; Weyand, J.G.M. and Stavinsk, A.B. (1967). Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for essay of antigens and antibodies. **Proc. Soc. Cyp. Biol. Med.**, **124:1166-1170**.
- Boyd W.C. and Sharpleigh, E. (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, **199:419**.
- Butler, W.T. (1962). Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. **J. Immunol.**, **90:663-671**.
- Camby, I.; Janssen, T.; Decker, R. de; Petein, M; Raviv, G.; Pasteels, J-L, Kiss, R. and Danguy, A. (1996). Lectin-induced alterations on the proliferation of three human prostatic cancer cell lines. **In Vitro Cell. Dev. Biol.** **32:633-639**.
- Carvalho, H.F. (1990). Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. **Ciência e Cultura (revista da Sociedade Brasileira para o Progresso de Ciência)**, **42:884-893**.

- Chen, Y.L. and Tsai, I.H. (1995). Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glycoprotein-Ib antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **210:472-477.**
- Daltry, J.C.; Wüster, W. and Thorpe R.S. (1996). Diet and snake venom evolution. **Nature**, **379:537-540.**
- Doyle R.J.; Nedjat-Haiem, F.; Keller K.F. and Frasch, C.E. (1984). Diagnostic value of interactions between members of the family *Neisseriaceae* and lectins. **J. Clin. Microbiol.**, **19: 383-387.**
- Drickamer, K.; Dordal, M.S. and Reynolds, L. (1986). Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. **J. Biol. Chem.**, **261: 6878-6887.**
- Drickamer, K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, **263: 9557-9560.**
- Drickamer, K. (1993). Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. **Prog. Nucl. Acid Res.** **45:207-232.**
- Drickamer, K. and Taylor M.E. (1993). Biology of animal lectins. **Annu. Rev. Cell Biol.**, **9:237-264.**
- Fujimura, Y.; Titani, K.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Oyama, R.; Matsui, T.; Fukui, H.; Sugimoto, M. and Zaverio, R.M. (1991). Isolation and chemical characterization

- of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, **30**: 1957-1964.
- Gabius, H.J. (1991). Detection and functions of mammalian lectins - with emphasis on membrane lectins. **Biochim. Biophys. Acta**, **1071**:1-18.
- Gabius, H.J. (1994). Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. **Int. J. Biochem.**, **26**: 469-477.
- Gartner, T.K.; Stoker, K. and Williams, D.C. (1980). Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters**, **117**: 13-16.
- Gartner, T.K. and Ogilvie, M.L. (1984). Isolation and characterization of three Ca²⁺-dependent β -galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochem. J.**, **224**:301-307.
- Guimarães, L.F.L. e Collins, C.H. (1990). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C.H.; Braga, G.L. e Bonato, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5^o ed., Ed. da Unicamp, Campinas-SP, Brasil.
- Haq, S.; Kubo, T.; Kurata, S.; Kobayashi, A. and Natori, S. (1996). Purification, characterization, and cDNA cloning of a galactose-specific C-type lectin from *Drosophila melanogaster*. **J. Biol. Chem.**, **33**: 20213-20218.

- Harrison, F.L. (1991). Soluble vertebrate lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. **J. Cell Sci.**, **100:9-14**.
- Hatakeyama, T.; Kohzaki, H., Nagatomo, H. and Yamasaki, N. (1994). Purification and characterization of four Ca^{2+} -dependent lectins from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. **J. Biochem.**, **116:209-214**.
- Haun, M.; Pereira, M.F.; Hoffman, M.E.; Joyas, A.; Campos, V.; Filardi, L.D.; De Castro, S.L. and Durán, N. (1992). Bacterial Chemistry VI. Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2 one derivatives. **Biol. Res.**, **25:21-25**.
- Hearn, M.T.W. (1987). General strategies in the separation of proteins by high-performance liquid chromatographic methods. **J. Chromatogr.**, **418:3-26**.
- Hirabayashi, J.; Kusunoki, T. and Kasai K-I. (1991). Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. **J. Biol. Chem.**, **266:2320-2326**.
- Hite, L.A.; Shannon, J.D.; Bjarnason, J.B. and Fox, J.W. (1992). Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zimogen and disintegrin - like structures. **Biochemistry**, **31:6203-6211**.
- Hite, L.A.; Bjarnason, J.B. and Fox, J.W. (1994). cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, **308:182-191**.

- Horejsi, V.; Haskovec, C. and Kocourek, J. (1978). Isolation and characterization of the lectin from Black Locust Bark (*Robinia pseudocacia L.*). **Biochim. Biophys. Acta**, **532:98-104**.
- Jia, L-G; Shimokawa, K-I; Bjarnason, J.B. and Fox, J.W. (1996). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMS family of proteins. **Toxicon**, **34:1269-1276**.
- Kini, R.N. and Evans, H.J. (1992). Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, **30:265-293**.
- Kini, R.N. (1996). Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? **Toxicon**, **34:1287-1294**.
- Korn, E.D. and Wright, P.L. (1973). Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, **248:439-447**.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, **227: 680-685**.
- Liang, S-P. and Pan, X. (1995). Lectin-like peptide isolated from the venom of the chinese bird spider *Selenocosmia huwen*. **Toxicon**, **33: 875-882**.

- Lis, H. and Sharon, N. (1972). Soy bean (*Glycine max*) agglutinin. **Meth.Enzimol.**, **28:360-365.**
- Lis, H. and Sharon, N. (1981a). Affinity chromatography for the purification of lectins (a review). **J. Chromatogr.**, **215:361-372.**
- Lis, H. and Sharon, N. (1981b). Lectins in higher plants. **Biochem. Plants**, **6: 371-447.**
- Lis, H. and Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. **Annu. Rev. Biochem.**, **55:35-67.**
- Loeb, J.A. and Drickamer, K. (1988). Conformational changes in the chicken receptor for endocytosis of glycoproteins: modulation of binding activity by Ca^{2+} and pH. **J. Biol. Chem.**, **263:9752-9760.**
- Lomonte, B.; Rojas, G.; Gutiérrez, J.M. and Ramírez, G. (1990). Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops Godmani* (Godmann's Pit Viper). **Toxicon**, **28: 75-81.**
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J.Biol. Chem.**, **193:265-275.**
- Mastro, A.M.; Hurley D.J.; Winning, R.K.; Fillipowski, R.; Ogilvie, M.L. and Gartner, T.K. (1986). Mitogenic activity of snake venom lectins. **Cell Tissue Kinet.**, **19:557-566.**

- Mentley, R.K.; Mastro, A.M.; Ogilvie, M.L. and Gartner, T.K. (1983). Lectins from snake venoms are mitogenic for lymphocytes. **J. Cell Biol.**, **97:338a**.
- Miranda Santos, I.K.F. de and Pereira, M.E.A. (1984). Lectins discriminate between pathogenic and nonpathogenic south american *Trypanosomes*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **33:839-844**.
- Musial, J; Niewiarowski, S.; Rucinski, B.; Stewart, G.J.; Cook, J.J., Williams, J.A. and Edmunds, L.H. (1990). Inhibition of platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuits by disintegrins: RGD-containing peptides from viper venoms. **Circulation** **82:261-273**.
- Nowak, T.P.; Haywood, P.L. and Barondes, S.H. (1976). Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **68:650-657**.
- Oda, Y.; Herrmann, J.; Gitt, M.A.; Turck, C.W.; Burlingame, A.L.; Barondes, S.H. and Leffler, H. (1993). Soluble lactose-binding lectin from rat intestine with two different carbohydrate-binding domains in the same peptide chain. **J. Biol. Chem.**, **268:5929-5939**.
- Oda, T.; Tsuru, M.; Hatakeyama, T.; Nagatomo, H.; Muramatsu, T. and Yamasaki, N (1997). Temperature and pH-dependent cytotoxic effect of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* on various cell lines. **J. Biochem.**, **121:560-567**.

- Ogilvie, M L. and Gartner, T.K. (1984). Identification of lectins in snake venoms. **J. Herpetol.**, **18:285-290.**
- Ogilvie, M.L.; Dockter, M.E.; Wenz, L. and Gartner, T.K. (1986). Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. **J. Biochem.**, **100: 1425-1431.**
- Ogilvie, M.L.; Byl J.A.W. and Gartner, T.K. (1989). Platelet aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. **Thromb. Haemostasis**, **62:704-707.**
- Ozeki, Y.; Matsui, T.; Suzuki, M. and Titani, K. (1991). Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) Eggs. **Biochemistry**, **30: 2391-2394.**
- Ozeki, Y.; Matsui, T.; Hamako, J.; Suzuki, M.; Fujimura, Y.; Yoshida, E.; Nishida, S. and Titani, K. (1994). C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, **308:306-310.**
- Ozeki, Y. (1997). Purification of a 63 kDa β -D-galactoside binding lectin from cuttlefish, *Todarodes pacificus*. **Biochem. Mol. Biol. Int.** **41:633-640.**
- Peng, M.; Lee, W. and Kirby, E.P. (1991). Alboaggregin-B: a new platelet agonist that binds to platelet membrane glycoprotein-Ib. **Biochemistry**, **30:11529-11539.**

- Peng, M.; Lee, W.; Beviglia, L.; Niewiarowski, S. and Kirby, E.P. (1993). Echicetin: a snake venom protein that inhibits binding of von Willebrand factor and alboaggregins to platelet glycoprotein Ib. **Blood**, **81:2321-2328**.
- Peterson, G. L. (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Anal. Biochem.**, **100:201-220**.
- Pirkle, H and Stocker K. (1991).; for the subcommittee on nomenclature of exogenous hemostatic factors of the scientific and standardization committee of The International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an inventory. **Thromb.Haemostasis**. **65:444-450**.
- Powell, L.D. and Varki, A. (1995). I-type lectins. **J. Biol. Chem.**, **270:14243-14246**.
- Quioco, F.A. (1986). Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. **Ann. Rev. Biochem.**, **55: 287-315**.
- Read, M.S.; Smith, S.V.; Lamb, M.A. and Brinkhous, K.M. (1989). Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex of botrocetin and von Willebrand factor. **Blood**, **74:1031-1035**.
- Schalla, W.O.; Whittington, W.L.; Rice, R.J. and Larsen, S.A. (1985). Epidemiological characterization of *Neisseria gonorrhoeae* by lectins. **J. Clin. Microbiol.**, **22:379-382**.

- Sekiya, F.; Atoda, H. and Morita, T. (1993). Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, **32:6892-6897**.
- Sharon, N. (1983). Lectin receptors as lymphocyte surface markers. **Adv. Immunol.**, **34:213-298**.
- Sharon, N and Lis, H. (1987). A century of lectin research (1888-1988). **Trends Biochem. Sci.**, **12:488-491**.
- Sharon, N. and Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. **Science**, **246:227-234**.
- Sharon, N. and Lis, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, **74-81**.
- Sharon, N. (1993). Lectin-carbohydrates complexes of plants and animals. An atomic view. **Trends Biochem. Sci.**, **18:221-226**.
- Spadaro, A.C. e Fonseca, M.J.V. (1990). Cromatografia por bioafinidade. In: Collins, C. H.; Braga, G. L. e Bonato, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. **5ª ed., ed. da Unicamp, Campinas-SP, Brasil**.
- Takeya, H.; Nishida, S.; Miyata, T.; Kawada, S-i.; Saisaka, Y.; Morita, T. and Iwanaga, S. (1992). Coagulation factor X activating enzyme from Russel's viper venom (RVV-X). **J. Biol. Chem.**, **267:14109-14117**.

Tu, A.T. (1977). *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. **John Wiley and Sons, New York.**

Usami, Y.; Fujimura, Y.; Suzuki, M.; Ozeki, Y.; Nishio, K.; Fukui, H. and Titani, K. (1993). Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:928-932.**

Usami, Y.; Fujimura, Y.; Miura, S.; Shima, H.; Yoshida, E.; Yoshioka, A.; Hirano, K.; Suzuki, M. and Titani, K. (1994). A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Comm., 201:331-339.**

Varanda, E.A. e Giannini, M.J.S. (1994). Bioquímica dos venenos de serpentes. In: Barravieira, B. **Venenos Animais. 1^o ed., EPUC, Rio de Janeiro, Brasil.**

Voet, D. and Voet, J.G. (1990). Sugars and polysaccharides **In: Biochemistry, John Wiley and Sons, New York.**

Zatta, P.F. and Cummings, R.D. (1991). Lectins and their uses as biotechnological tools. **Biochem. Educ., 20:2-9.**

Zingali, R.B.; Jandrot-Perrus, M.; Guillin, M.C. and Bon, C. (1993). Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry, 32: 10794-10802.**