



**BAYKI HUSSEIN KASSAB**

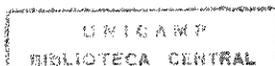
**Purificação e Caracterização Parcial de  
uma lectina do Veneno da Serpente  
*Bothrops moojeni***

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (s) candidato (a)  
*Bayki Hussein Kassab*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
*Sérgio Marangoni*  
31/8/99

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas  
para obtenção do título de mestre em  
Ciências Biológicas - Área de  
Bioquímica.

**Orientador:** Prof. Dr. Sérgio Marangoni

CAMPINAS - S.P.  
Agosto/1999



T. M. Amor  
V. 100  
Ex. 1  
TOMBO BC/ 29522  
PROC. 229199  
C  D   
PREÇO R\$ 11,00  
DATA 21/10/99  
Nº CPD

CM-00136293-1

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

**Kassab, Bayki Hussein**

**K154p** Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da serpente *Bothrops moojeni*/Bayki Hussein Kassab.-- Campinas, SP. [s.n.], 1999.  
77f.:ilus.

Orientador: Sérgio Marangoni  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

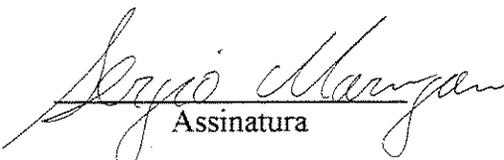
1. Lectinas. 2. Serpente-veneno. 3. Hemaglutinação. 4. Aminoácidos.  
I. Marangoni, Sérgio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 09 de agosto de 1999

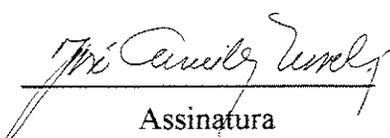
BANCA EXAMINADORA

**TITULARES:**

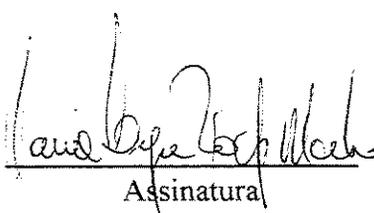
Prof. Dr. SÉRGIO MARANGONI

  
Assinatura

Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO

  
Assinatura

Prof.ª Dra. MARIA LÍGIA RODRIGUES MACEDO

  
Assinatura

SUPLENTE

Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni, pela oportunidade e orientação durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pela colaboração neste trabalho e pelo apoio.

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

Aos profs. Eneida de Paula, Hiroshi Aoyama e Maria Lígia Rodrigues Macedo pela participação no exame de qualificação, pelas sugestões e correções da tese.

À minha querida companheira de trabalho, Daniela Diógenes de Carvalho, obrigada pela atenção, confiança e amizade e pelo estímulo, que foi imprescindível na execução deste trabalho.

À um “anjo” que apareceu e se tornou uma grande amiga, **Daniela Yokaichiya**, muito obrigada pela força, amizade, paciência e apoio, e por dividir comigo todos os momentos de sofrimentos e preocupações. Você merece muito mais do que esse singelo agradecimento.

À prof<sup>ª</sup>. Dra. Eneida de Paula, meus sinceros agradecimentos, pela atenção e pelo incentivo que contribuiu muito para minha formação. Obrigada por tudo.

Aos Profs. do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade cultivada.

Aos companheiros do Laquip e do Departamento de Bioquímica: Paulo Baldasso, Lúzia, Evandro, Zeca, Marcão, Paulo C., Eduardo, Léo, Lú, Mariza e demais, por contribuírem para a realização deste trabalho e pela cômica convivência.

Às secretárias do Departamento de Bioquímica: Andréia, Marina e Myrian, pela atenção e disponibilidade.

À Maria Isabel, minha irmã de coração, por ter sido tão companheira, paciente e solidária durante esses anos de convivência.

Ao Vagner, Smurf e Daniel, pela paciência e por conseguirem conviver em simbiose com meu mau-humor.

Ao Altair, por ter sido tão amigo e prestativo em todos os momentos, mesmo distante sua presença foi constante.

E finalmente, mas jamais em último lugar, à minha adorável família, por ter a sensibilidade e paciência em repartir o tempo de convivência da filha, irmã e tia com a Bioquímica.

---

ABREVIACÕES.....	ii
RESUMO.....	IV
SUMMARY.....	V
- <b>INTRODUÇÃO</b> .....	6
1- PROPRIEDADES DE VENENOS OFÍDICOS.....	7
2- LECTINAS.....	12
3- LECTINAS DE VENENO DE SERPENTES.....	18
OBJETIVOS.....	24
- <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
1- VENENO DE <i>BOTHROPS MOOJENI</i> .....	26
2- PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE <i>BOTHROPS MOOJENI</i> .....	26
3- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	27
4- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	27
5- ENSAIO PARA GLICOPROTEÍNAS.....	29
6- ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS.....	30
7- ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO.....	32
8- AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	36
- <b>RESULTADOS</b> .....	38
1- PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE <i>BOTHROPS MOOJENI</i> .....	39
2- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	42
3- ENSAIO PARA GLICOPROTEÍNAS.....	42
4- ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS.....	45
5- ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO.....	45
6- AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA.....	51
- <b>DISCUSSÃO</b> .....	52
CONCLUSÃO.....	64
- <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66

## ABREVIACÕES

### Lectinas

---

BMooL	lectina de <i>Bothrops moojeni</i>
BJL	lectina de <i>Bothrops jararaca</i>
BJcuL	lectina de <i>Bothrops jararacussu</i>
BML	lectina de <i>Lachesis muta</i>
CML	lectina de <i>Ancistrodon piscivorous leukostoma</i>
CuHL	lectina de <i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>
JML	lectina de <i>Dendroaspis jamesonii</i>
LmsL	lectina de <i>Lachesis muta stenophrys</i>
MBP	lectina de plasma de rato
MMGL	lectina de macrófagos de camundongo
Pal	lectina de <i>Bitis arietans</i>
RSL	lectina de <i>Crotalus atrox</i>
TL	lectina de <i>Bothrops atrox</i>
WGA	lectina de gérmen de trigo

---

---

**Outras Abreviações**

---

ADP	adenosina difosfato
Alsever	tampão com glicose, NaCl e citrato de sódio
Asx	aspartato e asparagina
CLPs	proteínas relacionadas com lectinas do tipo-C
CRD	domínio de reconhecimento de carboidrato
CTBS	tampão tris com NaCl (150 mM) e CaCl <sub>2</sub> (25 mM)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	ácido etilenoglicol tetracético
Glx	glutamato e glutamina
GP	complexo glicoprotéico de plaquetas (Ia, Ib, IIIa, V e VI)
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IgE	Imunoglobulina E
IgSF	Superfamília das Imunoglobulinas
PBS	tampão fosfato com NaCl (150 mM)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PL	plaquetas lavadas
PPP	plasma pobre em plaquetas
PRP	plasma rico em plaquetas
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBS	tampão tris contendo NaCl (150 mM)
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N-N-N-N-tetrametil etileno diamina
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris-hidroximetil aminometano
vWF	fator de Von Willebrand

---

## RESUMO

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos e outras células, precipitar polissacarídeos e outras glicoproteínas por possuírem um (ou mais) centro de ligação, específico e reversível, a carboidratos. As lectinas podem ser encontradas em animais, vegetais e microorganismos. BMooL é uma lectina específica para galactosídeos, e foi purificada do veneno da serpente *Bothrops moojeni* através da cromatografia de afinidade em D-lactose. O perfil eletroforético (SDS-PAGE) mostrou que BMooL é um homodímero com subunidades de 14 kDa. A proteína apresentou reação positiva quando submetida a coloração para carboidrato, sendo portanto uma glicoproteína. Dentre os eritrócitos testados, BMooL apresentou maior afinidade por eritrócitos humanos tripsinizados do tipo A, B e O, em concentrações mínimas respectivas de 0,50 µg/ml, 0,96 µg/ml e 0,96 µg/ml. Eritrócitos tripsinizados de cavalo e pato não foram aglutinados na presença desta lectina. A atividade hemaglutinante com 2,0 µg/ml de BMooL sobre eritrócitos humanos tripsinizados do tipo A é inibida com 0,8 mM de lactose, 1,56 mM de galactose e 1,56 mM de rafinose. A atividade hemaglutinante de BMooL demonstrou ser dependente de  $Ca^{2+}$ , pois foi inibida na presença de EDTA e EGTA. A associação das subunidades é uma condição fundamental para a atividade hemaglutinante de BMooL, pois quando reduzida com DTT, a lectina não mantém tal atividade. A composição de aminoácidos da lectina, permitiu verificar que BMooL é uma proteína que contém em maior proporção resíduos de aminoácidos hidrofílicos como Asx (14%), Glx (13%) e Lys (8,0%) e aminoácidos não polares como Leu (8,1%). Em testes de agregação plaquetária com plasma humano, na presença de colágeno como agonista das agregações, a lectina não demonstrou nenhuma modulação significativa nas plaquetas em concentrações de até 40,0 µg/ml. A função das lectinas em venenos ofídicos ainda não está bem esclarecida, a atividade hemaglutinante não reflete diretamente o papel dessas proteínas. O estudo da estrutura e de outras atividades biológicas que as lectinas apresentam, faz-se necessário para um melhor entendimento das interações lectina-carboidrato, que participam da grande maioria das interações biológicas existentes.

## SUMMARY

Lectins are proteins or glycoproteins which agglutinate erythrocytes and other cells and polysaccharides, since they have one or more specific carbohydrate-binding sites. Lectins are widely distributed in plants, as well as in animals and microorganisms. They have also been found in the venom of snakes. A lactose-specific lectin, BMooL, was purified from the crude venom of *Bothrops moojeni* by affinity chromatography on an immobilized D-lactose column. The SDS-PAGE, under reduction conditions, showed that BMooL is a homodimer of 14kDa subunits. The protein appeared to be a glycoprotein once it showed a positive reaction to the Schiff's reagent. Among the assayed erythrocytes, BMooL had more affinity to trypsinized A, B and O types of human erythrocytes with end points of approximately 0.50 µg/ml, 0.96 µg/ml and 0.96 µg/ml, respectively. On the other hand, trypsinized erythrocytes from horses and ducks did not agglutinate in the presence of this lectin. The hemagglutination of trypsinized A type human erythrocytes induced by 2.0 µg/ml of BMooL was inhibited specifically in the presence of 0.8 mM lactose, 1.56 mM galactose and 1.56 mM raffinose. BMooL activity is a Ca<sup>2+</sup>-dependence since EDTA and EGTA inactivated the lectin induced hemagglutination. Subunits association is a fundamental condition for the hemagglutination activity of the lectin, since when reduced by DTT, BMooL have no effect on trypsinized human erythrocytes. The determination of BMooL aminoacid composition showed that it have a high content of acidic residues such as Asx (14%), Glx (13%) and Lys (8%) and non-polar amino acids as Leu (8,1%). On collagen-induced platelet aggregation assays with human plasma, 40,0 µg/ml lectin showed no significant modulation in the platelet. The role of these lectins in the snake venoms remains unclear, the hemagglutination activity does not direct reflect the function of these proteins. Structural and other biological activities studies are needed for a more detailed understanding about the carbohydrate-lectin interactions, which take part in the majority of the biological interactions described up to now.

# **- Introdução**

## 1- PROPRIEDADES DE VENENOS OFÍDICOS

Os venenos de serpentes são misturas complexas de proteínas e peptídeos que possuem uma variedade de atividades biológicas. Essas proteínas e peptídeos compreendem cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno, sendo o restante composto por cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e níveis menores de aminoácidos livres e lipídios (Tu, 1977). Sódio é o cátion em maior concentração nos venenos, porém com função ainda não esclarecida; zinco e cálcio estão presentes em muitas metaloproteases do veneno e os carboidratos estão presentes principalmente na forma de glicoproteínas (Tu, 1988).

A presença de enzimas como proteases, peptidases, fosfatases e lecitinasas em venenos de serpentes auxiliam na digestão e facilitam a alimentação das serpentes. Muitas destas enzimas são também encontradas em outras espécies animais nos seus sucos digestivos. (Casais-Silva, 1995).

O veneno das serpentes é rico em substâncias farmacologicamente ativas e sua ação depende da natureza e da interação biológica destes compostos. Por esse motivo o veneno é uma importante ferramenta no estudo de proteínas e suas funções (Varanda & Giannini, 1994).

A composição do veneno está bastante relacionada com a variação geográfica e a fonte alimentar disponível em determinado local. Como a função primordial do veneno de serpentes é a imobilização e digestão de animais capturados, serpentes da mesma espécie diferem na composição do veneno devido a posição geográfica em que se encontram e a diversidade de animais disponíveis para sua alimentação (Daltry e cols., 1996).

Os venenos de serpentes da família Viperidae possuem, dentre vários componentes, proteínas que interferem no mecanismo homeostático e na adesão celular, afetando a coagulação sangüínea, o funcionamento das plaquetas e causando hemorragia local (Bjarnason & Fox, 1994; Kamiguti & Sano-Martins, 1995).

As serpentes do gênero *Bothrops* (família Viperidae, sub-família Crotalidae), compreendem muitas espécies, distribuídas desde o México até a Argentina (Schvartsman, 1992). Elas são responsáveis por cerca de 90% de todos os acidentes ofídicos no Brasil, sendo que só no estado de São Paulo a responsabilidade destas serpentes em 9.820 casos registrados foi de 87%, levando a 28 óbitos (Ribeiro e cols., 1998).

Essas serpentes habitam, preferencialmente, os ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, locais de proliferação de roedores e zonas rurais. São as serpentes mais agressivas do Brasil e caracterizam-se por apresentarem fosseta loreal, a calda normal e hábitos noturnos. O veneno destas serpentes é capaz de induzir efeitos clinicamente importantes e de ação sistêmica (como a insuficiência renal, hemorragia e choque cardiovascular), além de efeitos locais traduzidos por edema volumoso, que pode atingir vários segmentos do membro afetado. Além disso é comum o desenvolvimento de áreas necróticas próximas ao local da picada (França & Fan, 1992).

A serpente *Bothrops moojeni* (Figura 1), vulgarmente conhecida como “caiçaca”, tem uma ampla distribuição na América do Sul e Central. Os espécimes são grandes, agressivos e vivem em áreas mais secas sendo encontrados na parte sul, sudeste e centro oeste do Brasil (Schvartsman, 1992). A importância dos estudos desta espécie relaciona-se com sua distribuição geográfica, além dos quadros característicos que esse veneno produz, como

reações proteolíticas, coagulante e hemorrágicas, causando: dor, edema, necrose e intensa reação inflamatória (Barravieira & Pereira, 1994).



Figura 1: Foto de um exemplar da serpente *Bothrops moojeni*.

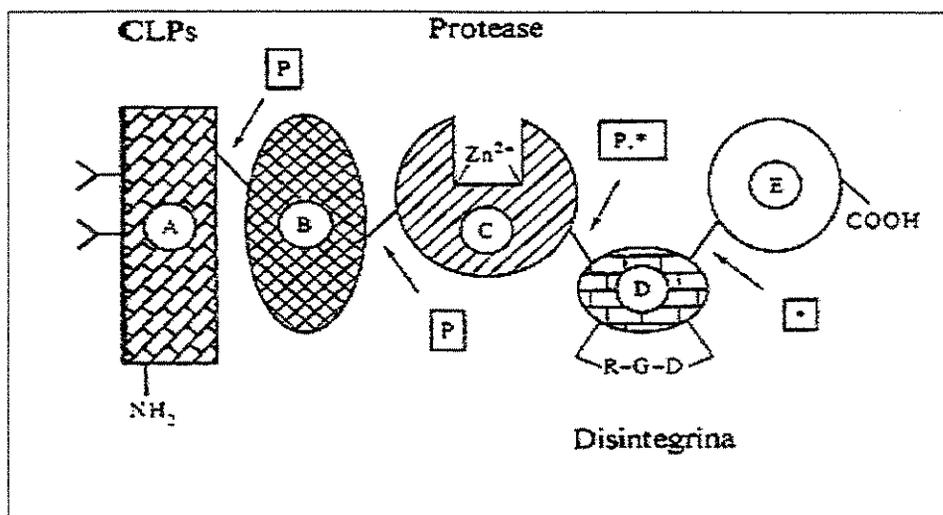
Dentre as proteínas encontradas nesse veneno podemos citar as metaloproteases e as desintegrinas. As primeiras são conhecidas como MDC composta de um domínio N-terminal Metaloprotease, um domínio tipo Desintegrina e um domínio C-terminal rico em cisteínas. Essas enzimas têm um potente efeito proteolítico nas proteínas da matriz extracelular. Dentre as várias classes em que são divididas as metaloproteases, uma apresenta domínios adicionais de proteínas relacionadas com as lectinas (Bjarnason & Fox, 1994; Jia e cols., 1996).

As desintegrinas são um grupo de proteínas, não enzimáticas, com baixo peso molecular, ricas em resíduos de cisteínas. Elas contêm uma seqüência de aminoácidos Arg-Gly-Asp reconhecida pelas integrinas e inibem a interação do fibrinogênio com seus receptores, os complexos glicoproteicos IIb-IIIa (Gran e cols., 1988; Huang e cols., 1989; Gould e cols., 1990; Kamiguti e cols., 1998).

Vários pesquisadores têm proposto que as metaloproteases e as desintegrinas são derivadas da proteólise de um precursor comum (Kini & Evans, 1992; Hite e cols., 1992; Paine e cols., 1992, 1994). Segundo Kini (1995, 1996), a hipótese de que as proteínas relacionadas com a lectinas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CLPs) também são derivadas da região N-terminal desse precursor comum permitiu o desenvolvimento de um modelo precursor com cinco domínios (Figura 2), onde as proteases constituem o domínio C, as desintegrinas o domínio D (com a seqüência de resíduos Arg-Gly-Asp) e as CLPs o domínio A (com o segmento Y, de ligação a carboidratos). O domínios B e E ainda não foram caracterizados (Kini, 1996).

As CLPs são grupos de proteínas estruturalmente homólogas, porém com distintas funções. Algumas exibem atividade tipo lectina por se ligarem a muitos carboidratos, induzirem a aglutinação de eritrócitos (Gartner & Ogilvie, 1984) e agregação plaquetária

(Ogilvie e cols., 1989); outras induzem efeitos anticoagulantes por se ligarem a fatores X e IX ou com a trombina (Chen & Tsai, 1995).



**Figura 2** : Esquema dos domínios estruturais de metaloprotease (C), desintegrina (D) e proteínas relacionadas a lectina do tipo-C, CLPs (A) em um precursor comum. **P** indica sítio de clivagem proteolítica; \* o “códon de terminação”; **Y** o segmento de ligação a carboidratos ( que nem todas CLPs contem); **RGD** sequência característica em desintegrinas. A função dos domínios B e E ainda não foi determinada (Kini, 1996).

## 2- LECTINAS

As lectinas foram descritas pela primeira vez em vegetais, há mais de 100 anos por Stillmark (1888-1889 apud Etzler, 1985) tendo sido primeiramente denominadas de hemaglutininas por Elfastrand (1898 apud Pusztai, 1991) e posteriormente de lectinas (Boyd e cols., 1954), do latim “lectus/legere”- meio de seleção ou escolha, referindo-se à capacidade de ligação seletiva destas proteínas com carboidratos.

Em 1972, o termo lectina foi generalizado para todas as proteínas que possuem a capacidade de aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoproteínas, pelo fato de se ligarem específica e reversivelmente a determinados carboidratos, sejam eles açúcares simples ou carboidratos complexos (Sharon, 1972). As lectinas não possuem origem imune e podem ser encontradas em animais, vegetais e microorganismos (Sharon & Lis, 1987; Carvalho, 1990).

As lectinas foram inicialmente isoladas de vegetais. As lectinas vegetais constituem o maior e mais bem caracterizado grupo dessas proteínas, englobando, por exemplo, a concanavalina A (Abe e cols., 1971) e a WGA de germen de trigo (Nagata & Burger, 1972). As lectinas vegetais possuem uma longa tradição como instrumentos para estudos bioquímicos e imunológicos.

Em invertebrados são encontradas na hemolinfa e contribuem na resistência a infecções (papel análogo ao das imunoglobulinas nos vertebrados). Em vertebrados as lectinas são encontradas em duas formas: ligadas à membrana, podendo agir como mediadores no reconhecimento entre as células (Sharon & Lis, 1993). e na forma solúvel (Barondes, 1984; Zatta & Cummings, 1991).

Nos microorganismos o melhor exemplo do papel das lectinas é a adesão de vírus e bactérias com as células hospedeiras (Sharon, 1993).

## **2.1- Classificação das Lectinas**

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem um ou mais centro de ligação a carboidratos. Atualmente, sabe-se que algumas lectinas possuem um segundo centro de ligação que interage com outros ligantes que não carboidratos, como outras proteínas (Barondes, 1988). A presença de um único sítio de ligação a carboidrato encontrado em algumas proteínas não lhes confere a capacidade de aglutinar células; no entanto, não a exclui de pertencer ao grupo das lectinas. Estas interpretações estendem o termo Lectina a um grande número de outras moléculas que não foram inicialmente caracterizadas como tais (Harrison, 1991).

A região molecular de ligação ao carboidrato é um domínio que reconhece uma seqüência específica de resíduos de açúcares e é chamado de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD de Carbohydrate Recognition Domain) (Lis & Sharon, 1986).

A comparação das seqüências dos CRDs permite a divisão das lectinas animais em 5 categorias principais que são convencionalmente designadas como: tipo-C, tipo-S ou galectinas, tipo-I, Pentraxinas e tipo-P (Drickamer, 1988; Barondes e cols., 1994). Os CRDs destas categorias diferem entre si, entretanto os CRDs encontrados dentro de cada família apresentam regiões invariáveis e seqüência de aminoácidos altamente conservados.

### **Lectinas do tipo-C:**

As lectinas presentes nesta categoria, requerem íons  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade de ligação a carboidratos, apresentam solubilidade variável, estão localizadas principalmente no meio extracelular e possuem resíduos de cisteínas ligados formando pontes dissulfeto (Drickamer, 1988). Elas possuem uma seqüência comum de 14 resíduos de aminoácidos invariáveis e 18 resíduos altamente conservados num segmento de 115-130 aminoácidos que auxiliam na identificação de proteínas ligantes de carboidratos (Haagsman e cols., 1987).

Estas lectinas que incluem as colectinas do plasma e as selectinas do endotélio e leucócitos são, provavelmente, o grupo mais diverso das lectinas com relação a estrutura, localização e especificidade a carboidratos (Drickamer, 1995; Ni & Tizard, 1996).

### **Lectinas do tipo-S:**

Também conhecida como galectina, a segunda classe de lectinas solúveis de animais têm atividade independente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; possuem grupos tióis livres pois a oxidação inibe sua atividade; apresentam, em sua maioria, especificidade para a ligação de  $\beta$ -galactosídeos; apresentam caráter ácido, têm baixo peso molecular e encontram-se no meio intracelular e extracelular. As lectinas do tipo-S apresentam também resíduos conservados que não são similares aos encontrados nas lectinas do tipo C. Essas lectinas possuem um número menor de resíduos de cisteína em sua estrutura se comparadas com as lectinas do tipo C (Drickamer, 1988; Drickamer & Taylor, 1993). Evidências sugerem que as galectinas estão envolvidas, em mamíferos, na regulação do crescimento, adesão e migração celular e têm uma importante função na neoplasia e resposta imune (Barondes e cols., 1994).

**Lectinas do tipo-I:**

Trata-se de um grupo de lectinas que desempenham função no sistema imune. Estão nesta categoria lectinas que se ligam ao ácido siálico, de maneira independente de  $\text{Ca}^{2+}$  e que estruturalmente pertencem a superfamília das imunoglobulinas. São proteínas integrais de membranas e possuem amplos domínios citossólicos com sítios potenciais de fosforilação. O CRD é semelhante ao das imunoglobulinas, apresentando uma unidade estrutural compacta fornecida por 70 a 110 aminoácidos, caracterizada por dois planos de folhas  $\beta$ -pregueadas (Powell & Varki, 1995).

**Lectinas do tipo-P:**

É um grupo de lectinas que inclui somente dois membros, com massa molecular de 46 e 300 kDa ligantes de glicoproteínas contendo manose-6-fosfato. O CRD destas lectinas ainda não foi estritamente definido. Encontram-se principalmente no meio intracelular, bem como na membrana plasmática sendo também responsáveis pela transferência de glicoproteínas para os lisossomos e pela internalização de glicoproteínas extracelulares. A dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade é variável (Powell and Varki, 1995; Gabius, 1997; Ni and Tizard, 1996).

**Pentraxinas:**

São proteínas plasmáticas que incluem, dentre outras, a proteína reativa C. Essas lectinas proliferam quando há algum processo de inflamação ou injúria tecidual no organismo e podem desempenhar funções como estimulação da fagocitose por leucócitos. As subunidade ligadas não-covalentemente dispõem-se em uma simetria cíclica pentamérica, variam de

tamanho entre 25 a 30 kDa e são capazes de se ligar a múltiplos ligantes de maneira  $\text{Ca}^{2+}$  dependente (Steel and Whitehead, 1994; Gabius, 1997).

## **2.2- Estrutura das Lectinas**

A capacidade das lectinas em se ligar a carboidratos é modulada por uma série de domínios presentes na molécula que determinam muitas funções das lectinas e são particularmente característicos a cada uma das categorias acima citadas (Gabius, 1994; Kishore e cols., 1997).

Usualmente, as lectinas consistem de duas a quatro subunidades, cada uma com massa molecular variando de 14 a 30 kDa e com um sítio de ligação para carboidratos (Sharon, 1993). A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  associada ao grupo polar da proteína e a formação de novas pontes de hidrogênio com os carboidratos altamente polares. Essas últimas ligações e forças de van der Waals são dominantes na estabilização do complexo carboidrato-proteína (Quioco, 1986).

Vários estudos sugerem que a interação lectina-carboidrato possui um importante papel no reconhecimento celular e nos mecanismos de comunicação entre as células do sistema imune, que apresentam carboidratos e lectinas de diferentes especificidades em sua superfície (Muller e cols., 1983; Stahl e cols., 1978; Ni & Tizard, 1996).

Algumas lectinas encontradas na membrana de macrófagos, como o receptor de manose e a MMGL uma lectina de macrófagos de camundongo específica para galactose e galactosamina, participam na destruição ou fagocitose de organismos estranhos (Wileman e

cols., 1986) e estão envolvidas no reconhecimento de células tumorais (Yamamoto e cols., 1994), devido a interação dos receptores de membranas dos macrófagos com carboidratos dessas células e dos microorganismos.

As selectinas, lectinas encontradas na superfície de células como os leucócitos e em células do endotélio, desempenham uma função importante no processo de migração dos leucócitos, promovendo a interação adesiva entre leucócitos e o endotélio das vênulas pós-capilares. Alguns estudos demonstraram que lectinas das células do endotélio são angiogênicas, comprovando uma ligação direta entre adesão de leucócitos e angiogêneses (Ni and Tizard, 1996). Na superfície celular de mastócitos e neutrófilos, também foi identificada uma lectina que se liga com IgE causando degranulação e ativação celular nessas células, respectivamente (Liu, 1993).

A maior parte das lectinas é purificada através de cromatografia de afinidade (Spadaro & Fonseca, 1990) em adsorventes bioespecíficos como: polissacarídeos (nativos ou modificados), glicoproteínas, mono ou dissacarídeos ligados a uma matriz (Lis & Sharon, 1981a). A facilidade na purificação contrasta com a dificuldade na delimitação das funções dessas lectinas (Gabiús, 1994). Com relação a isolectinas (isoformas) outros passos de caracterização físico-química são necessários como, por exemplo, focalização isolelétrica.

Para a detecção de lectina realiza-se ensaio de hemaglutinação que consiste na diluição serial da lectina antes de incubá-la com eritrócitos humanos ou de animais, intactos ou sensibilizados pela tripsinização (Lis & Sharon, 1972; 1981b).

As lectinas podem se tornar modelos experimentais importantes pois são moléculas estáveis encontradas em vários tipos de organismos, apresentam alta especificidade para carboidratos e permitem modificação química e conjugação. As lectinas podem ser aplicadas

como instrumento em várias áreas, como pesquisas sobre câncer, imunologia, estudos básicos de bioquímica e estrutura de membranas, purificação de glicoproteínas, identificação celular e histológica (Zatta & Cummings, 1991).

### **3- LECTINAS DE VENENO DE SERPENTES**

As lectinas dos venenos serpentes geralmente apresentam massa molecular de aproximadamente 14 kDa por subunidade, são solúveis e específicas para açúcares como os  $\beta$ -galactosídeos, e requerem cálcio para sua atividade (Hirabayashi e cols., 1991). O interesse no estudo de lectinas de venenos de serpentes não se restringe unicamente ao fato dessas apresentarem dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  e especificidade por carboidratos, mas sim porque essas lectinas parecem ter propriedades intermediárias entre os dois grupos de lectinas animais: as do tipo S e as do tipo C.

A trombolectina (TL), foi a primeira lectina a ser isolada do veneno de serpente, apresentando-se como um homodímero com peso molecular de 15 kDa por subunidade, com pouca afinidade a D-glucose, D-galactosamina e D-glicosamina. Devido a sua afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, esta lectina foi caracterizada como uma galactolectina (Gartner e cols., 1980).

Desde então a atividade hemaglutinante do veneno de serpentes vem sendo estudada e muitas lectinas purificadas. Olgivie & Gartner (1984) estudaram a presença de lectina testando o veneno total em mais 17 espécies de serpentes, sendo que 16 apresentaram atividade

hemaglutinante. O dissacarídeo lactose foi responsável pela inibição de 9 espécies de serpentes, seguido de D-fucose, D-galactose e tiogalactosídeos.

Posteriormente, a inibição por lactose também foi observada em duas outras lectinas isoladas do veneno de serpentes: a BML e a JML. A lectina BML é um homodímero com massa molecular de 28 kDa e apresenta inibição total por EDTA enquanto JML não apresenta dependência a  $\text{Ca}^{2+}$  e constitui-se de um complexo de subunidades de massa molecular 43, 26 e 14 kDa. Outras diferenças também foram detectadas entre essas duas lectinas, possivelmente por pertencerem a famílias diferentes de serpentes (Olgivie e cols., 1986).

No veneno bruto da serpente *Agkistrodon rhodostoma*, foi purificada uma lectina que apresentou inibição da atividade hemaglutinante por vários glicoconjugados, polissacarídeos de bactérias e glicoproteínas. Esta lectina mostrou uma alta atividade mitogênica em linfócitos-T de humanos (Helmbold e cols., 1986). A habilidade em estimular a mitose em linfócitos também foi testada com as lectinas RSL, CuHL, CML, JML e TL, sendo comparável à atividade mitogênica da Concanavalina A (lectina vegetal estimuladora de mitose em linfócitos). Nessas serpentes esta atividade é inibida pela presença de lactose, EDTA ou EGTA e a presença de macrófagos na cultura é fundamental para a resposta mitogênica das lectinas sobre as células T (Mastro e cols., 1986).

A ligação de lectinas com glicoproteínas tem sido muito utilizada para facilitar a purificação e identificação de glicoproteínas de plaquetas, como no caso da fitohemaglutinina e WGA (lectina de trigo), que também estimulam a secreção e agregação de plaquetas. Outras três lectinas de veneno de serpentes CML, BML e RSL, consistentemente estimularam a secreção e a agregação de plaquetas. A TL, ocasionalmente causou agregação, enquanto que

CuHL, não causou nenhuma agregação. A lactose foi um potente inibidor das agregações, para todas estas lectinas (Olgivie e cols., 1989).

A lectina isolada de *Bothrops godmani* não apresentou atividade mitogênica em leucócitos humanos e não atuou como um fator importante no desenvolvimento de edema de pata em ratos. Trata-se de uma proteína ácida (pI= 4,9) que possui subunidades de aproximadamente 14 kDa. Esta lectina aglutina eritrócitos humanos de todos os tipos, porém não é responsável por nenhuma outra atividade provocada pelo veneno total, como efeito hemorrágico ou proteolítico. As características físico-químicas desta lectina, bem como a sua especificidade por lactose, são bastante semelhantes às demais lectinas isoladas do veneno de serpentes (Lomonte e cols., 1990).

A lectina LmsL, homodimérica, de 28 kDa e pI de 5,8 aglutina eritrócitos humanos do tipo A e O Rh<sup>+</sup>, e não aglutina os tipos B ou O Rh<sup>-</sup>. Espectros de dicroísmo circular mostraram 78% de estrutura  $\beta$  e 1% de estrutura  $\alpha$  como característica de sua estrutura secundária. Ela possui 135 resíduos de aminoácidos, na maioria ácidos, e massa molecular calculado por subunidade de 16,2 kDa. A lectina LmsL foi a 2ª a ser seqüenciada e apresenta 92% de homologia com RSL (Aragón-Ortiz e cols. 1990, 1996).

A estrutura da RSL é composta de 135 resíduos em cada subunidade e não apresenta carboidratos na sua estrutura. O CRD desta lectina está localizado entre os resíduos 31 a 131, dentre os quais 8 são altamente conservados e encontrados na maioria das proteínas que contém este tipo de CRD (Hirabayashi e cols., 1991).

Muitas CLPs, isoladas do veneno de serpentes da família Viperidae, possuem efeitos anticoagulantes como a de *Trimeresurus flavoviridis*, que se liga ao fator de coagulação IX e X (Atoda e cols., 1991) apresenta 61% de homologia com echicetina, uma proteína dimérica

inibidora da aglutinação de plaquetas induzida por vários agonistas da glicoproteína Ib (GPIb), isolada da serpente *Echis carinatus* (Peng e cols., 1994). Atividade semelhante à da echicetina foi observada em agkicetina do veneno de *Agkistrodon acutus* (Chen & Tsai, 1995). O contrário foi observado em alboagreguina (*Trimeresurus albolabris*), a qual induziu a aglutinação mesmo na ausência de qualquer cofator como colágeno ou  $Ca^{+}$  (Peng e cols., 1991).

Algumas proteínas isoladas de *Bothrops jararaca* apresentam homologia estrutural com as lectinas do tipo-C, mas não possuem atividade de ligação a carboidratos (CLPs). Exemplificando temos a botrocetina, que é uma proteína formada de heterodímeros, ligante do fator de von Willebrand (vWF) - proteína multimérica presente na circulação sanguínea – indutora de aglutinação plaquetária (Fujimura e cols., 1991). A proteína anticoagulante, Jararaca IX/ X bp, ligante dos fatores IX e X da cascata de coagulação sanguínea, também inclui-se dentro das CLPs (Sekyia e cols., 1993).

A B JL possui uma seqüência de aminoácidos (55 resíduos de aminoácidos sequenciados na região N-terminal) homóloga com RSL (85% de identidade no N-terminal). Alguns resíduos de cisteínas presentes em B JL encontram-se nas mesmas posições que em RSL, sugerindo formação de pontes dissulfeto em posições semelhantes (Ozeki e cols., 1994).

Botrocetina e B JL são proteínas estruturalmente semelhantes mas com atividades distintas. B JL aglutina fortemente eritrócitos de coelho porém não induz a agregação plaquetária mesmo na presença do modulador vWF. Em contrapartida, a botrocetina promove a agregação plaquetária na presença de vWF, independentemente de  $Ca^{2+}$  (Ozeki e cols., 1994).

O efeito de agregação plaquetária também foi observado para a glicoproteína de *Crotalus durissus terrificus*, a convulxina, que é um heterodímero formado por subunidades com 16 e 14 kDa. Os vinte resíduos N-terminais seqüenciados de ambas subunidades indicaram que convulxina pertence a família das lectinas do tipo-C, e não possui atividade hemaglutinante. O mecanismo de ativação/agregação das plaquetas pela convulxina não tem o envolvimento da GPIb. A indução deste mecanismo ocorre através da ligação a um componente p62/GPVI, uma glicoproteína receptora de colágeno das membranas de plaquetas (Polgár e cols., 1997b). A rhodocitina, semelhante a convulxina, isolada do veneno de *Calloselasma rhodostoma* também induz a agregação plaquetária sem ligar a GPIb (Shin & Morita, 1998).

Este alto grau de homologia apresentado entre as CLPs e as lectinas ligantes de carboidratos indica um possível precursor comum, com estruturas semelhantes ao CRD, possivelmente diferenciado por mutações ou rearranjos genéticos pós-transcricionais, que determinaram a atividade biológica destas proteínas (Ozeki e cols., 1994). O papel fisiológico das lectinas em venenos de serpentes ainda não foi totalmente esclarecido, entretando, acredita-se que as lectinas no veneno de serpentes tenham uma função de defesa assim como nos invertebrados, porém de uma maneira mais ofensiva. Sugere-se que quando o veneno é injetado na presa a lectina elicita alguns fenômenos, como aglutinação de células e plaquetas (Hirabayashi e cols., 1991; Ozeki e cols., 1994).

Uma outra atividade de lectina de veneno de serpentes pode ser encontrada na lectina Pal, que atua especificamente na liberação de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, e é cerca de 200 vezes mais eficiente que a cafeína, não estando envolvida com a atividade das fosfolipases, abundantes em venenos de serpentes (Ohkura e cols, 1996).

Uma outra lectina do tipo-C ligante de galactosídeos extremamente sensível a agentes redutores como o DTT, a BJcuL, foi isolada em nosso laboratório (Laboratório de Química de Proteínas, Departamento de Bioquímica, UNICAMP). Essa lectina apresenta especificidade para galactosídeos, tem massa molecular por subunidade de 15 kDa e não é uma glicoproteína (Carvalho e cols., 1998).

É interessante notar que 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).

A atividade hemaglutinante presente nas lectinas não reflete diretamente a função biológica que desempenham no veneno, mas constitui um ensaio convencional para caracterizar a proteína com atividade de lectina. A função das lectinas nos venenos ainda não está esclarecida, no entanto as particularidades de sua estrutura, bem como as interações com carboidratos podem levar-nos a aplicações de modelos para o estudo dessas interações, as quais participam da grande maioria das interações biológicas descritas para as lectinas.

## **OBJETIVOS**

- Purificação de uma lectina (BMooL), partindo do veneno total da serpente *Bothrops moojeni*.
- Caracterização físico-química parcial de BMooL
- Caracterização de BMooL quanto a sua atividade hemaglutinante e especificidade a diferentes carboidratos.
- Determinação dos fatores de inibição de BMooL.
- Investigação da modulação da lectina na agregação plaquetária.

## **- Materiais e Métodos**

## **1- VENENO DE *Bothrops moojeni***

O veneno bruto de *Bothrops moojeni* foi cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – UNESP (Botucatu- São Paulo).

## **2- PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *BOTHROPS MOOJENI***

### **Cromatografia de Afinidade**

A lectina de *B. moojeni* foi purificada por Cromatografia de Afinidade. Cem miligramas do veneno bruto de *B. moojeni* foram dissolvidos em 1,0 mL de tampão CTBS (Tris- HCl 20 mM + NaCl 150 mM + CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,5) e centrifugado – 10 x g por 1 min.. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de agarose (Sigma) de 1,0 mL de resina complexada com D-Lactose, previamente equilibrada com tampão CTBS. Frações de 1,0 mL foram coletadas e monitoradas a 280 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV1201. A lectina foi eluída da coluna após aplicação de 100 mM de Lactose (Sigma) em CTBS. O eluído foi dialisado contra CTBS, TBS (Tris- HCl 20 mM + NaCl 150 mM, pH 7,5) ou água com trocas em intervalos de 2 em 2 horas durante 16 horas, posteriormente liofilizado e estocado a 4°C.

### **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência/Fase Reversa**

Para verificar a pureza do pico eluído com lactose na cromatografia de afinidade, bem como o grau de hidrofobicidade da proteína, utilizou-se o equipamento Waters HPLC modelo

PDA, equipado com duas bombas Waters mod. 510, com injetor automático de amostra Waters modelo U6K e coluna C18/  $\mu$ Bondapack. Para a cromatografia de fase reversa utilizou-se um gradiente descontínuo de 0 a 100% de solução de acetonitrila 66% em 0,1% de ácido trifluoroacético pH 2,5 (Hearn, 1987). As amostras foram monitoradas a 280nm e em seguida liofilizadas.

### **3- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS**

A dosagem de proteínas foi feita utilizando-se o método descrito por Lowry e cols., (1951). A amostra com solução de proteína foi diluída 8 vezes em um volume final de 200  $\mu$ l e incubada a temperatura ambiente por 10 min. com 1,0 mL de reagente cuproalcalino, constituído de Solução A (carbonato de sódio 2% em NaOH 0,1 N, p/v), Solução B1 (sulfato de cobre 1% em H<sub>2</sub>O, p/v) e da Solução B2 (tartarato de sódio e potássio 2% em H<sub>2</sub>O, p/v) na proporção de 100:1:1 v/v, respectivamente.

Em seguida foram adicionados 50  $\mu$ l de Reagente de Folin (Merck), deixou-se por 30 min. à temperatura ambiente e na ausência de luz; posteriormente foi lida a absorbância a 660 nm. A concentração de proteína foi determinada usando curva padrão de soro albumina bovina, com concentrações de 0 a 400  $\mu$ g/mL.

### **4- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

A eletroforese em gel de Poliacrilamida foi realizada segundo Laemmli (1970).

Os gels de poliacrilamida foram feitos de modo descontínuo, apresentando um gel de concentração de 5% e gel de corrida de 12,5%, preparados a partir de uma solução de acrilamida estoque, a 30% e N,N, metileno-bisacrilamida a 0,8% (Bio Rad Labs. Richmond, CA, USA) dissolvidos em água desionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore-Waters Co.).

O gel de corrida foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 contendo 0,2% de SDS para solubilização das amostras, 0,1% de N-N-N-N-Tetrametilediamina (TEMED) e 0,01% de persulfato de amônio para polimerização. Após a polimerização deste, foi preparado o gel superior (gel de concentração) com 5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 1M, pH 6,8; 0,2% de SDS, 0,1% de TEMED e 0,01% de persulfato de amônio.

As amostras (20 a 50 µg de proteína) foram diluídas no tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M pH 6,8, adicionando-se 2% SDS + 10% de glicerol e 1% de azul de bromofenol). A redução das amostras foi feita com DTT (Sigma), numa concentração final de 0,1M.

A eletroforese SDS–PAGE foi realizada em sistema duplo de placas “SE 250 Might Small II” (Hoefer Scientific Instruments), em tampão de corrida (Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) à voltagem inicial de 60 Volts até a entrada da proteína no gel de corrida e posteriormente de 100 Volts. Foram usados como padrão os seguintes marcadores de massa molecular, obtidos da Sigma: albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (36 kDa), tripsinogênio (24 kDa), lisozima (14,3 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

Após a corrida eletroforética o gel foi corado com Comassie Blue R-250 0,1% em solução de ácido acético, metanol e água na proporção de 1: 4: 5 (v/v) durante 5 horas. Em seguida o gel foi descorado em solução de ácido acético, metanol e água, na mesma proporção.

## **5- ENSAIO PARA GLICOPROTEÍNAS**

A eletroforese em condições nativas, na ausência de SDS, foi realizada para determinar a presença de carboidratos em BMooL. O gel nativo contendo BMooL foi dividido, para que uma parte fosse corada com Comassie Blue e a outra, correspondente a primeira fosse corada com reagente de Schiff.

A coloração para carboidratos foi desenvolvida de acordo com o método do ácido periódico – Reagente de Schiff (Korn & Wright, 1973). A corrida eletroforética foi feita como descrito acima. O gel nativo, após retirado do sistema, foi fixado com TCA a 12,5% v/v durante 1 hora e em seguida foi lavado 3 vezes com água Milli Q e incubado com ácido periódico a 1%, p/v, em ácido acético 3%, v/v, por 1 hora. Após este intervalo, o gel foi lavado por 3 vezes com água Milli Q e deixado por 12 horas, também em água. A revelação foi feita após este período com a retirada da água e a adição de reagente de Schiff por 1 hora ou até o aparecimento das bandas. Em seguida foi lavado repetidamente com metabissulfito de sódio 0,5%, p/v, e deixado por 10 min. em ácido acético 5%, para retirar o excesso de corante; posteriormente o gel foi mantido em água. Todas as etapas foram desenvolvidas na ausência de luz e a amostra utilizada para este ensaio, foi dialisada por 1 hora em ácido acético 5% e em seguida com água até a retirada total do ácido acético.

## **6 – ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS.**

O sistema utilizado foi do analisador “Pico-Tag” da Waters, onde a identificação dos aminoácidos é feita através da cromatografia em HPLC do produto feniltiocarbamil do aminoácido, proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos, obtidos de hidrólise ácida. Estas formas de cromóforos podem ser detectados em concentrações de 1 pmol.

### **6.1 – Preparação da amostra**

Uma quantidade aproximada de 0,5 µg da lectina BmooL, proveniente da cromatografia em gel de agarose, foi dissolvida em água e acetonitrila (1:1, v/v) e transferida para pequenos tubos de reação de 20 µl de volume. Estes tubos foram colocados dentro do frasco de reação, que possui uma tampa especial, para conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

### **6.2 – Hidrólise ácida**

Esta etapa foi efetuada colocando no fundo do frasco de reação 100 µl de uma solução de HCl 6 N, além de 1mg/ml de fenol para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida foi feito vácuo próximo de 1-2 Torr até início do borbulhamento do HCl. Fechado o vácuo, deixou-se entrar nitrogênio (SS-ultra puro) por 5 seg.. Esta etapa foi repetida por 3 vezes. A seguir removeu-se a tampa do frasco de reação, e a amostra foi levada ao forno de hidrólise,

a 105°C, por 24 horas. Após este período o tubo de reação foi colocado a vácuo até 65 militorr, para secagem da amostra hidrolisada.

### **6.3 – Derivatização**

A amostra hidrolizada foi lavada com 20 µl de uma solução de metanol:água:triethylamina, 2:2:1 v/v. Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até 65 militorr. Este procedimento removeu sais e solventes, adsorvidos nos aminoácidos. Uma solução fresca de derivatização foi preparada com metanol:triethylamina:água:feniltiocianato, na proporção 7:1:1:1 v/v, sendo adicionados 20 µl a cada tubo de reação e deixados a temperatura ambiente por 30 min.. Após a derivatização a amostra foi seca à vácuo até 50 militorr, para completa remoção de todo o PITC. A amostra foi dissolvida em 50 µl de uma solução 0,4 mM de tampão fosfato de sódio contendo 5% de acetonitrila.

A análise dos aminoácidos PTC foi realizada em HPLC, usando coluna C18/µBondapack em cromatografia de fase reversa com um gradiente linear de 20,5 min., de 0 a 100% de acetonitrila 60%. A identificação de cada aminoácido foi feita em relação a uma corrida padrão de aminoácidos PTC (Bidlingmeyer e cols., 1984).

## **7- ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO**

A atividade hemaglutinante da lectina BMooL foi testada sobre eritrócitos intactos e sobre eritrócitos tripsinizados de: humanos tipos A, B e O, boi, cavalo, porco e pato. O sangue foi colhido e mantido em solução Alsever (2,05 g de glicose, 0,80 g de citrato de sódio e 0,42 g de cloreto de sódio, para 100 mL de água destilada, pH 6,1 ajustado com ácido cítrico).

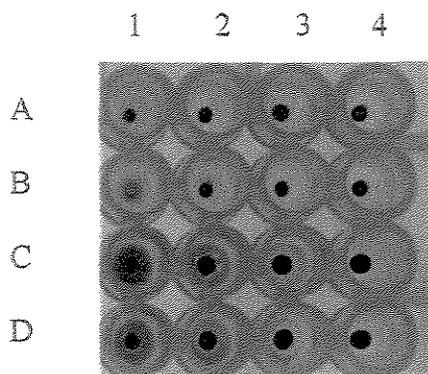
A tripsinização dos eritrócitos seguiu o método descrito por Lis & Sharon (1972). O sangue foi centrifugado a temperatura ambiente em centrífuga de mesa (Excelsa 3, Fanem S.A.) a 450 x g por 10 min.. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e o sedimento de células (eritrócitos) foi lavado 4 a 5 vezes com NaCl 0,15 M, numa proporção de 5 mL de NaCl para cada mL de eritrócito sedimentado.

Para cada 1 mL de eritrócitos lavados foram adicionados 25 mL de PBS (0,8 g de NaCl, 0,02 g de KCl, 0,17 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,02 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para 100 mL H<sub>2</sub>O). 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 lavados de, 4 a 5 vezes, com solução de NaCl 0,15 M para remoção da tripsina por centrifugação. Finalmente foram ressuspendidos em tampão (CTBS ou TBS) até a concentração de 2% dos eritrócitos v/v.

### **7.1 - Atividade Hemaglutinante**

Para determinação da atividade hemaglutinante da lectina BMooL foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços (Corning., USA), com 12 colunas verticais e 8 fileiras horizontais. Inicialmente foram colocados 100 µl da amostra (BMooL) nos poços da coluna 1

e nos demais poços foram adicionados 50 µl de CTBS. A amostra foi então diluída serialmente, com transferência de 50 µl dos poços da coluna 1 até a penúltima (coluna 11). Após as diluições, foram adicionados aos poços 50 µl de suspensão de eritrócitos intactos ou tripsinizados a 2% (v/v). Os últimos poços (coluna 12) continham somente suspensão de eritrócitos e foram considerados controles. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e observou-se ao final desse período a concentração mínima de BMooL que apresentava atividade hemaglutinante. Os resultados da hemaglutinação foram observados através da formação de uma malha de hemácias que cobria o fundo dos poços (colunas 1 e 2, Figura 3). Como resultado negativo, isto é, ausência de hemaglutinação, foi considerada a formação de um botão compacto de células no fundo dos poços (coluna 4, Figura 3).



**Figura 3:** Ensaio de hemaglutinação após 2 horas de incubação. Fileiras: A e B suspensão de eritrócitos humanos tipo A intactos; C e D eritrócitos humanos tipo A tripsinizados e BMooL partindo de concentração 0,48 µg/mL (coluna 1).

## **7.2 - Ensaio de Inibição da Atividade Hemaglutinante de BMooL**

### **7.2.1- Por Carboidratos**

Os carboidratos utilizados para o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante foram: Lactose, Galactose, Glicose, Maltose, Frutose, Rafinose, Sacarose, Manose e Glucosamina, todos adquiridos da Sigma Chem.Co., USA.

Em placas de microtitulação foram adicionados aos poços da coluna 1; 50  $\mu$ l do carboidrato em concentrações iniciais de 100 mM, diluído em CTBS; os demais poços foram completados com 25  $\mu$ l de CTBS e em seguida foi feita a diluição serial dos carboidratos, transferindo-se 25  $\mu$ l dos poços da coluna 1 para o seguinte até o penúltimo poço. Acrescentou-se, logo após, 25  $\mu$ l de BMooL para uma concentração de 2,0  $\mu$ g/ml em todos os poços. As placas ficaram em repouso por 5 min. e em seguida adicionou-se 50  $\mu$ l de uma suspensão de eritrócitos humanos tipo A tripsinizados a 2% (v/v). As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. A coluna 12 foi considerada como controle, por conter 50  $\mu$ l de suspensão de eritrócito e 50  $\mu$ l de uma solução de carboidrato 200 mM em CTBS. O controle positivo constou de 50  $\mu$ l de BMooL e 50  $\mu$ l de suspensão de eritrócitos.

### **7.2.1- Por Agentes Quelantes**

Para esta atividade acrescentou-se EDTA ao teste de hemaglutinação, para investigar o requerimento de cátions divalentes. Em seguida utilizou-se de EGTA para verificar se BMooL é dependente de cálcio para a atividade. O tampão utilizado para estes ensaios foi o TBS.

Foram acrescentados, nos poços da coluna 1 da placa de microtitulação, 50  $\mu$ l de EDTA ou EGTA (25 mM) e foram diluídos serialmente em 25  $\mu$ l de TBS, já presente nos demais poços. Adicionou-se 25  $\mu$ l de BMooL com concentração final de 2,0  $\mu$ g/ml e posteriormente fez-se o acréscimo de 50  $\mu$ l de suspensão de eritrócitos humanos tipo A tripsinizados de a 2% (v/v) em TBS. A coluna 12 foi controle, contendo 50  $\mu$ l de BMooL e 50  $\mu$ l de suspensão de eritrócito, em TBS.

### **7.2.3-Por Agente Redutor**

Em placas de microtitulação 25  $\mu$ l de solução de DTT (5 mM) foi diluída de modo semelhante aos ensaios já descritos. Foi adicionado BMooL, para uma concentração final de 4,0  $\mu$ g/ml e incubou-se por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados aos poços a suspensão de eritrócitos tripsinizados de humanos do tipo A à 2% em CTBS. Os controles não continham DTT.

## 8- AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Para este ensaio foi coletado sangue de voluntários sadios, que não tomaram medicamentos por 15 dias. O sangue foi colocado em tubos plásticos contendo citrato de sódio 3,8% (1:10 v/v). e centrifugado à 200 x g por 15 min. à 25°C para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) enquanto que o plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido centrifugando-se o sangue remanescente a 900 x g por 15 min., à 25°C.

Para preparar as plaquetas lavadas, o PRP foi centrifugado à 900 x g por 12 min. na presença de 9 µl de iloprost (8 nM), um análogo da prostaciclina. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado de plaquetas foi ressuspenso em solução de Krebs livre de  $Ca^{2+}$  e centrifugado à 200 x g; o processo repetiu-se por mais duas vezes (Radomski & Moncada, 1983). Após a lavagem, as plaquetas (50 µl) foram incubadas em tubos tipo eppendorf, com 950 µl de oxalato de amônio 1% por 10 min. e a contagem de plaquetas foi feita em Câmara de Neubauer, ajustada para  $3 \times 10^8$  plaquetas/mL. Cloreto de Cálcio (1 mM) foi adicionado à suspensão final das plaquetas. O sangue para obtenção das PL continha ACD-C 3,68% (1:10).

### 8.1- Medida da Agregação Plaquetária

A medida de agregação foi realizada, usando-se uma agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). Para o PRP o aparelho foi calibrado contra PPP, que representa 100% de agregação, determinando-se um pico máximo de agregação. O PRP representa 0% de agregação, determinando-se uma linha de base, com isso é possível determinar uma amplitude para o registro de agregações deste plasma. Para as PL (0%) a

calibração foi realizada contra solução de Krebs (100%).

Uma suspensão de PRP (500  $\mu$ l) foi mantida sob agitação constante (900 rpm) no agregômero em cuvetas à 37°C, e então estimuladas com 25  $\mu$ l de colágeno (8  $\mu$ g/mL). Para este agonista, a agregação (medida por mudanças na absorbância) iniciava-se em 3 min. após a estimulação, no entanto os registros eram feitos por um período de 10 min. Para uma maior segurança dos resultados.

Após o registro da agregação estimulada por colágeno, adicionou-se, a uma outra suspensão de plaquetas, 15  $\mu$ l de BMool (30  $\mu$ g/ mL) na ausência e presença do colágeno.

## - Resultados

## 1- PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE *BOTHROPS MOOJENI*

A purificação de lectina de *B. moojeni* foi feita através de cromatografia de afinidade em D-lactose. A coluna foi previamente equilibrada com CTBS. Após a eluição do pico A, monitorado por leitura da absorbância a 280 nm, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e a BMooL foi eluída após aplicação de 100 mM de lactose, em CTBS, como discutido em métodos.

A BMooL mostrou um único pico de absorção a 280 nm, como é apresentado no perfil cromatográfico (Figura 4). A eficiência máxima da purificação foi de 0,4%, ou seja, um rendimento de 0,4 mg de BMooL em cada 100 mg de veneno de *B. moojeni*.

A fração eluída da coluna de afinidade após a adição de lactose foi dialisada com água por 16 horas e liofilizada. Posteriormente a amostra foi submetida a cromatografia em HPLC – fase reversa. O perfil cromatográfico de BMooL (Figura 4) apresenta um pico principal, eluído com um tempo de retenção de 20 min. em uma concentração de 80% de solvente B, e dois outros picos menores com tempo de retenção de 22 e 24 min. e concentração de 83% e 85% de solvente B, respectivamente.

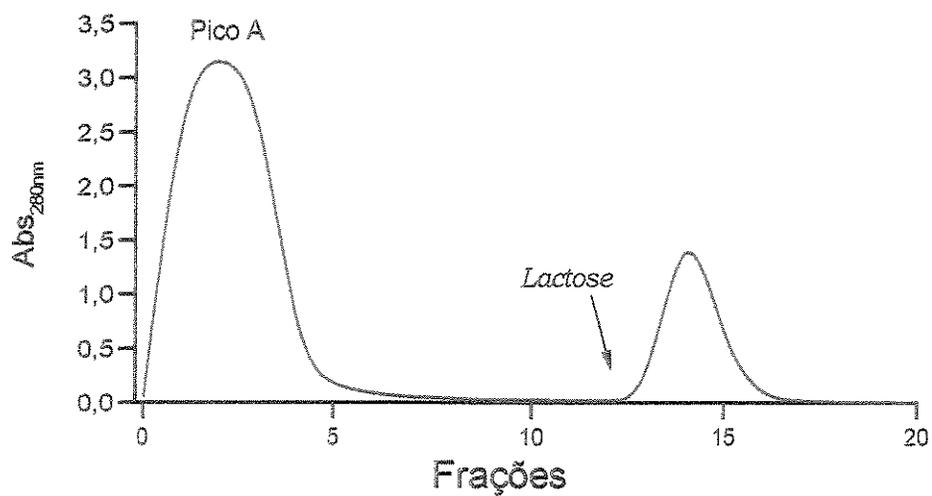


Figura 4. Cromatografia de afinidade em D-lactose-agarose. O veneno total de *B. moojeni* foi aplicado na coluna equilibrada com CTBS. A lectina foi eluída na presença de 100 mM de lactose (indicado pela seta). Absorbância foi monitorada a 280 nm, coletando-se frações de 1 mL por tubo.

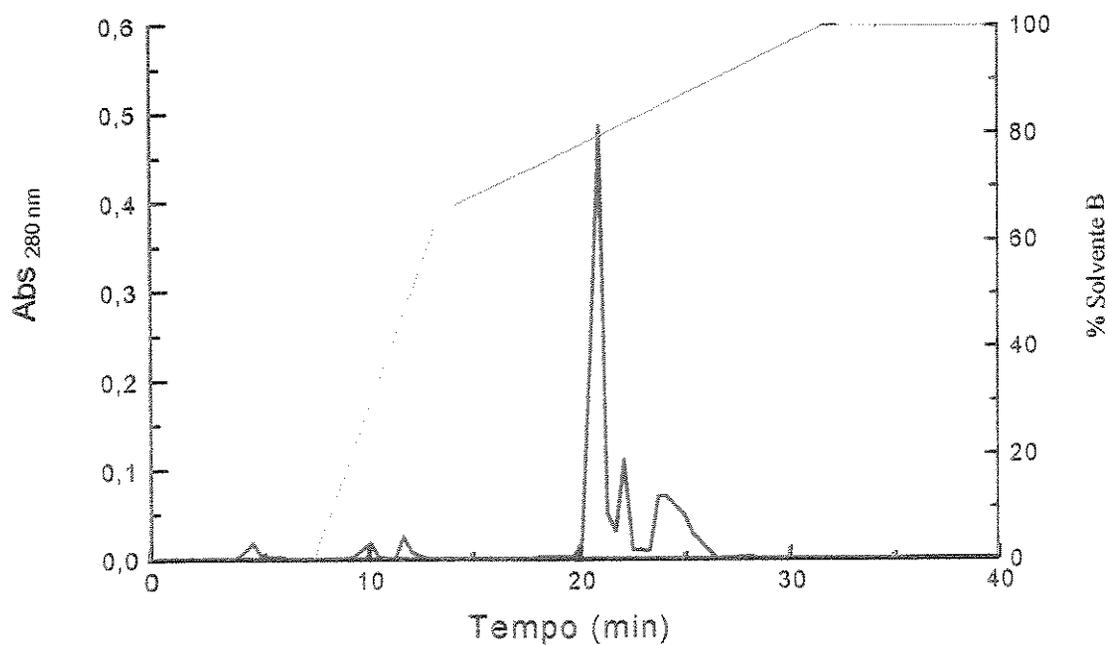


Figura 5: Cromatografia HPLC – fase reversa. A lectina eluída da coluna de afinidade foi aplicada a uma coluna C-18  $\mu$ Bondapack (7.8 x 300 mM). Tampão A: TFA 0,1%, pH 2,5 e tampão B: acetonitrila 66% em tampão A. Fluxo de 2 mL/min. Abs 280 nm (—) e % de solvente B (---).

## 2- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

As frações eluídas com lactose, após a diálise contra água, foram reunidas, liofilizadas e submetidas a análise do perfil de massa molecular aparente em gel de poliacrilamida a 12,5%, com SDS, como descritos em métodos.

O gel foi corado com Comassie Blue R-250. A fração BMooL, em condições não redutoras, apresentou uma banda principal (NR), (Figura 6), tendo também a presença de bandas com baixa concentração protéica, de aproximadamente 64 e 30 kDa (observadas em outros géis- dados não mostrados). Em condições redutoras (R), a fração de BMooL aparece como uma única banda com massa molecular de aproximadamente 14 kDa (Figura 6). A massa molecular aparente nas condições não redutoras de BMooL foi estimada no valor de 28 kDa (Figura 7).

## 3- ENSAIO PARA GLICOPROTEÍNAS

A coloração realizada com ácido periódico - Reagente de Schiff foi feita com o objetivo de verificar se BMooL seria uma glicoproteína. O gel nativo utilizado para o teste, após 30 min. de reação, apresentou uma banda correspondente a BMooL, sem a separação das subunidades (Figura 8B), o gel nativo, corado com Comassie Blue, (Figura 8A), apresentou um arraste.

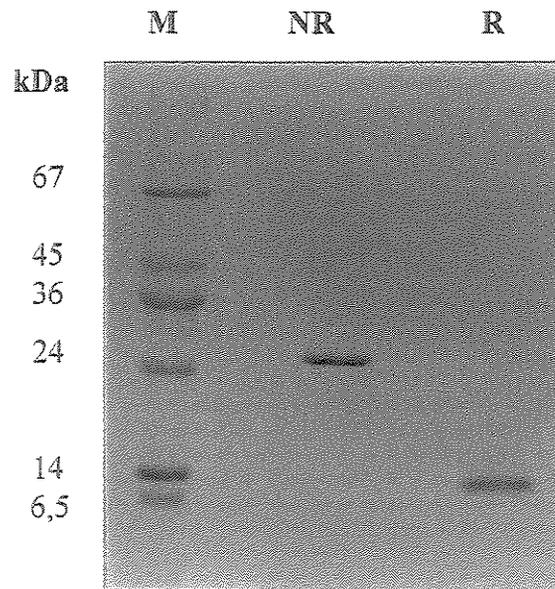


Figura 6: Eletroforese de BMooL em gel de poliacrilamida 12,5% (com SDS). No 1º poço (M) estão os marcadores de massa molecular em kDa. Nos 2º e 3º poços estão BMooL em condições não redutoras (NR) e em condições redutoras (R).

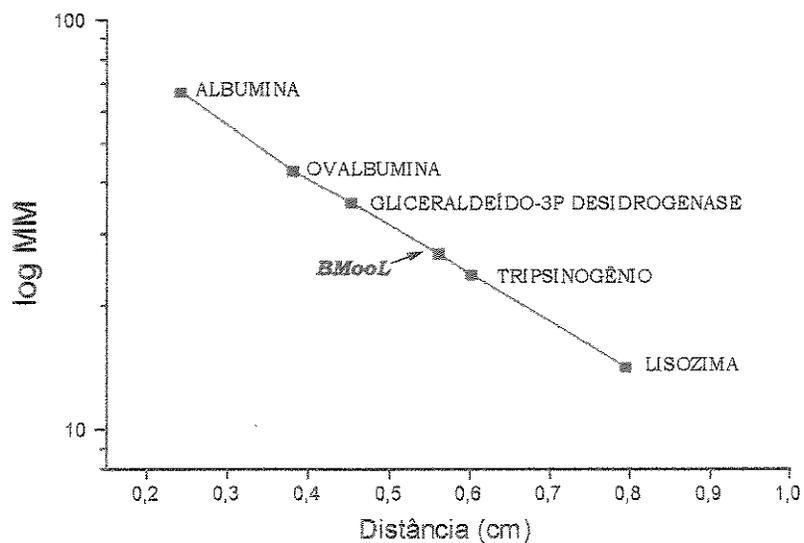
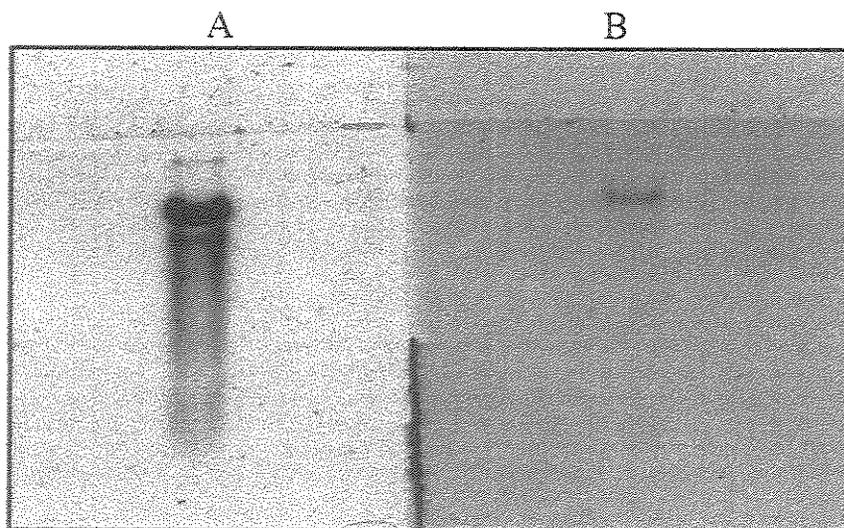


Figura 7: Determinação da massa aparente da lectina BMooL de *Bothrops moojeni*, através da eletroforese em SDS-PAGE, contra proteínas padrão de massa molecular.



**Figura 8:** Eletroforese de BMooL em condições nativas (ausência de SDS), pH 8,0. As amostras foram coradas para proteínas (gel A) e para carboidratos (gel B).

#### **4-ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS**

A lectina BMooL, após ser purificada e parcialmente caracterizada, foi submetida a hidrólise ácida (HCl 6N) e a derivatização, para obtenção da composição global de aminoácidos, mostrado na Tabela 1.

Os resíduos dos aminoácidos Trp e Cys não foram determinados pelo método utilizado. A composição global de aminoácidos de BMooL evidenciou uma alta ocorrência de Asx, Glx, Lys e Leu, em comparação a outros resíduos.

#### **5- ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO**

As leituras foram realizadas após 2 horas de incubação da placa de microtitulação a temperatura ambiente.

Para os ensaios da atividade hemaglutinante de BMooL foram testados eritrócitos intactos e tripsinizados de boi, cavalo, pato, porco e humano (ABO).

Dentre as hemácias testadas, BMooL mostrou diferentes comportamentos quanto à atividade hemaglutinante nos eritrócitos. A concentração mínima de BMooL capaz de aglutinar os eritrócitos é dada na Tabela 2 para os diferentes eritrócitos testados.

**Tabela 1:** Composição em aminoácidos de BMooL e BJL.<sup>(a)</sup>

<i>AMINOÁCIDOS</i>	<i>BMooL</i>	<i>BJL</i>
Ác. aspártico/Asparagina (Asx)	13,9	14,1
Treonina (Thr)	3,1	2,2
Serina (Ser)	4,2	6,6
Ác. Glutâmico/Glutamina (Glx)	12,6	13,4
Prolina (Pro)	3,4	4,0
Glicina (Gly)	4,5	4,9
Alanina (Ala)	5,2	3,9
Cisteína (Cys)	nd	8,1
Valina (Val)	2,5	2,9
Metionina (Met)	1,2	1,6
Isoleucina (Ile)	2,8	3,0
Leucina (Leu)	8,1	7,7
Tirosina (Tyr)	6,2	6,2
Fenilalanina (Phe)	4,0	5,4
Lisina (Lys)	8,0	9,7
Histidina (His)	3,6	3,0
Arginina (Arg)	3,3	2,3
Triptofano (Trp)	nd	nd

<sup>(a)</sup> A composição de aminoácidos está expressa como % molar.  
nd-: resíduos de aminoácidos não determinado

Eritrócitos intactos e tripsinizados de boi foram aglutinados pela BMooL em concentrações mínimas de 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente.

Eritrócitos humanos intactos e tripsinizados mostraram uma sensibilidade maior para a lectina. Hemácias do tipo A intactas e tripsinizadas foram aglutinadas, em concentrações mínimas de 0,48  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 0,24  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Hemácias do tipo B e tipo O foram aglutinadas com a mesma concentração mínima de BMooL, as intactas com 0,96  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e as tripsinizadas com 0,48  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para eritrócitos de cavalo intactos e tripsinizados utilizou-se de uma concentração máxima de 66  $\mu\text{g}/\text{mL}$  da lectina e não ocorreu aglutinação. No caso de eritrócitos de pato foram testados apenas os intactos com uma concentração máxima de 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BMooL e também não houve aglutinação.

Os eritrócitos tripsinizados e intactos de porco foram aglutinados, em concentrações de BMooL de 1,5 e 3,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente.

Para os demais testes foram selecionadas as hemácia humanas do tipo A, devido a sua maior sensibilidade à hemaglutinação induzida por BMooL.

**Tabela 2:** Concentração mínima hemaglutinante de BMooL sobre diferentes eritrócitos a 2% (v/v) em tampão CTBS.

<b>ERITRÓCITOS</b>	<b>INTACTOS</b> µg/ml	<b>TRIPSINIZADOS</b> µg/ml
<i>Boi</i>	80,0	5,0
<i>Humano tipo –A</i>	0,48	0,24
<i>Humano tipo –B</i>	0,96	0,48
<i>Humano tipo –O</i>	0,96	0,48
<i>Porco</i>	3,4	1,5
<i>Cavalo</i>	na <sup>1</sup>	na <sup>1</sup>
<i>Pato</i>	na <sup>1</sup>	nd <sup>2</sup>

na<sup>1</sup>- Não ocorreu aglutinação (na).

nd<sup>2</sup>- Não foi determinado (nd).

## 6- ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE DE BMooL

### 6.1- Inibição por Carboidratos

A atividade hemaglutinante induzida por 2,0 µg/ml de BMooL sobre eritrócitos humanos tipo- A tripsinizados é inibido mais intensamente na presença de 0,78 mM de lactose, 1,56 mM de galactose e 1,56 mM de rafinose. Sacarose, glicose e maltose também inibem a aglutinação na concentração de 6,2 mM, enquanto outros açúcares como manose, frutose e glucosamina tiveram pouco ou nenhum efeito sobre a atividade desta lectina (Tabela 3).

**Tabela 3:** Efeito de carboidratos na hemaglutinação induzida por BMooL em eritrócitos humanos tipo A tripsinizados. CM<sub>1c</sub> corresponde a concentração mínima de carboidrato que inibe a atividade hemaglutinante. A concentração de BMooL foi ajustada para 2,0 µg/ mL.

<i>CARBOIDRATO</i>	<i>CM<sub>1c</sub> (mM)</i>
<i>D-lactose</i>	0,78
<i>D-galactose</i>	1,56
<i>D-rafinose</i>	1,56
<i>D-glicose</i>	6,25
<i>D-sacarose</i>	6,25
<i>D-maltose</i>	6,25
<i>D-manose</i>	50
<i>D-frutose</i>	50
<i>D-glucosamina</i>	>100

### **6.2- Inibição por Agentes Quelantes**

BMooL demonstrou requerer cátions divalentes para sua atividade. Os ensaios feitos na presença de EDTA apresentaram inibição completa de hemaglutinação induzida por 2.0 µg/ml de BMooL em eritrócitos tipo A tripsinizados de humano. O mesmo ocorreu na presença de EGTA, confirmando a dependência desta lectina por íons cálcio (dados não mostrados). A determinação da concentração mínima dos quelantes na atividade hemaglutinante não foi observada, pois até a diluição de 0,024 mM de EDTA e EGTA houve inibição.

### **6.3- Inibição por Agente Redutor**

A atividade hemaglutinante da lectina BMooL (4,0 µg/ mL) em eritrócitos tipo A tripsinizados de humanos foi inibida até uma concentração mínima de 0,31 mM de DTT (agente redutor).

## 7- AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Inicialmente, utilizamos 30µg/ mL de BMooL em PRP (25 vezes a concentração dos testes de hemaglutinação) e não foi observada uma atividade agregante da lectina. Um segundo ensaio foi feito com PRP na presença de BMooL e colágeno (8 µg/ mL) e não se observou qualquer efeito significativo, estimulador ou inibidor da agregação.

Posteriormente foram feitos controles de agregações estimuladas com ADP ou Colágeno e testes desses agonistas na presença da lectina. No PRP contendo BMooL e ADP, observamos uma agregação semelhante ao controle, e com relação ao colágeno, uma sutil estimulação (cerca de 10%) foi observada na presença da lectina. Trombina e ristocetina, foram testadas em PL na presença de plasma, e não se observou nenhuma modulação nas plaquetas por ação de BMooL.

Desta forma, foram feitos mais 4 experimentos na presença de Colágeno e nenhum efeito significativo foi observado, mesmo com doses de até 40 µg/ mL de BMooL e com tempos de incubação superior a 5 minutos.

## **- Discussão**

As serpentes do gênero *Bothrops* há muito tempo vêm sendo objeto de estudos dos pesquisadores por apresentarem em seus venenos uma complexa mistura de proteínas e de componentes não protéicos, por serem responsáveis por grande parte dos acidentes ofídicos no Brasil, bem como pelo quadro clínico característico que seu veneno produz. Outra característica importante, e que está sendo recentemente estudada nas serpentes deste gênero, são as diferenças dentre os venenos, com relação as suas propriedades bioquímicas devido as variações geográficas, idade, sexo e dieta das serpentes. Tais diferenças podem ser observadas em serpentes da mesma espécie e muitas vezes provenientes do mesmo local (Daltry e cols., 1996; Francischetti e cols., 1998).

Como exemplo, podemos citar o veneno de *Bothrops moojeni* que apresenta similaridades com os venenos de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu*, quanto a elevada atividade fosfolipásica, agregação plaquetária, atividade coagulante e diminuição na atividade proteolítica e inibitória na agregação das plaquetas, contrariamente a *Bothrops jararaca*. Essas diferenças atuam como ferramentas para distinguir atividades bioquímicas entre os venenos e também para classificação taxonômica de espécies do mesmo gênero (Francischetti e cols., 1998).

Para o presente trabalho, foram testados um total 10 amostras de veneno da espécie *Bothrops moojeni*, de diferentes procedências. Desses venenos, apenas 2 amostras apresentaram atividade de lectina nos testes realizados, sendo que uma era de um indivíduo apenas e a outra de um “pool” de indivíduos. Somente esta última foi utilizada em todos os outros experimentos. Segundo Monteiro e cols. (1997), as proteínas dos venenos de serpentes não são expressas igualmente em todos os espécimes e podem ser produzidas com variações qualitativa e quantitativa significantes.

Segundo esses autores, nos venenos coletados durante 10 meses de duas fêmeas de *Bothrops jararaca* foram testados a presença de lectina, em testes de hemaglutinação, e em apenas uma das serpentes foi detectada a presença de lectina sem variação na atividade durante o período de coleta. A ausência da atividade hemaglutinante em um dos venenos (assim como em outras serpentes) pode indicar que outros aspectos, como fatores genéticos, devem ser considerados para explicar os diferentes resultados encontrados nos venenos de serpentes (Monteiro e cols., 1998).

A presença de lectina foi investigada em vários venenos de serpentes e em todos eles essas proteínas demonstraram ser dependentes de cálcio, específicas para lactose e sensíveis a agentes redutores (Ogilvie & Gartner, 1984). Lectinas com essas características foram purificadas dentre outras, de serpentes de vários gêneros como *Crotalus atrox* (Hirabayashi e cols., 1991) e *Lachesis muta stenophrys* (Aragón-Ortiz e cols., 1996) e do gênero *Bothrops* como *Bothrops atrox* (Gartner e cols., 1980), *Bothrops godmani* (Lomonte e cols., 1990), *Bothrops jararaca* (Ozeki e cols., 1994) e *Bothrops jararacussu* (Carvalho e cols., 1998).

Da mesma forma, isolamos do veneno da serpente *Bothrops moojeni*, uma proteína com atividade hemaglutinante. Essa proteína é uma lectina e foi isolada em um único passo de purificação através de cromatografia de afinidade em coluna de D-lactose imobilizada. A lectina foi facilmente eluída da coluna após a aplicação de 100 mM de lactose, apresentando um único pico de absorção a 280nm (Figura 4); no primeiro pico (pico A) do perfil de eluição foram separadas as demais proteínas do veneno, não ligantes de carboidratos.

A quantidade máxima de BMooL purificada, em cada 100mg de veneno, variou para cada amostra entre 0,38 a 0,7 mg. O rendimento das lectinas purificadas do veneno das serpentes fica em torno de 0,3% a 1% do veneno total segundo Gartner & Ogilvie (1984).

Comumente BMooL perfaz 0,4% do veneno total, similarmente ao encontrado na lectina de *Dendroaspis jamesoni* (0,48%), uma porcentagem um pouco maior do que a lectina encontrada em *B. godmani* (0,3%) e em *B. atrox* (0,24%) (Olgivie e cols., 1986) e menor com relação a BjcuL (0,9%) (Carvalho e cols., 1998).

A lectina de *B. moojeni* (BMooL), depois de eluída da cromatografia de afinidade, foi submetida a uma cromatografia em fase reversa-HPLC, onde monitoramos o grau de pureza e de hidrofobicidade da lectina. BMooL foi eluída no pico principal, em torno de 80% de acetonitrila (figura 5), demonstrando que a lectina tem uma forte ligação com a matriz cromatográfica da coluna C-18. Essa ligação, provavelmente, está relacionada ao centro hidrofóbico das lectinas, formado por resíduos conservados de aminoácidos alifáticos e aromáticos, já caracterizada em algumas lectinas (Drickamer & Taylor, 1993) como a do veneno de *Crotalus atrox* (Hirabayashi e cols., 1991).

A fração de BMooL proveniente do HPLC foi submetida a testes de hemaglutinação e apresentou perda de atividade hemaglutinante, mesmo após a diálise com CTBS. Desta forma, podemos observar que em meio ácido (tampão utilizado na cromatografia de fase-reversa) há uma desestabilização da estrutura da lectina, devido a uma diminuição da afinidade de seu CRD por  $\text{Ca}^{2+}$ . Desta forma não ocorre a formação do complexo de ligação a carboidratos. Esta perda do cátion possivelmente promove a exposição dos centros hidrofóbicos da lectina, os quais interagem com a coluna C-18 (Loeb & Drickamer, 1988; Drickamer & Taylor, 1993). Uma observação interessante, é proveniente de modelagem molecular da proteína echicetina, baseado em MBP, mostra que o “loop” de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  coincide com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das subunidades  $\alpha$  daquela lectina (Polgár e cols., 1997a).

Concordando com os resultados encontrados nas lectinas de *D. jamesonii* (Olgivie e cols., 1986), *B. godmani* (Lomonte e cols., 1990) e *B. jararacussu* (Carvalho e cols., 1998), a análise eletroforética da fração eluída com lactose (100 mM) em SDS-PAGE revelou em condições não redutoras, uma banda principal com massa molecular aparente de 28 kDa (figura 5 e 6). Há a presença de mais duas outras bandas, menos evidentes que a primeira, que migram com massa molecular aparente de 30 kDa e 64 kDa. Provavelmente essas bandas referem-se a formas de agregação, de três e quatro subunidades da lectina, respectivamente, apesar da maior parte da proteína ocorrer como um dímero de 28 kDa. Em condições redutoras, isto é, na presença de 0,1 M de DTT, essas bandas desaparecem e BMooL apresenta uma única banda, de aproximadamente 14 kDa.

A coloração de BMooL pelo reagente de Schiff, após o tratamento do gel nativo com periodato, (figura 8B) evidencia a presença de carboidratos ligados covalentemente à lectina, revelando ser esta uma glicoproteína. O gel que foi corado com Comassie blue, (figura 8A) demonstra a banda de BMooL seguida de um arraste, que é característico para a eletroforese de glicoproteínas nas condições nativas (ausência de SDS). Os carboidratos são responsáveis por essa heterogeneidade que aparece nos géis (Morris e cols., 1989).

A única lectina de veneno de serpente descrita como uma glicoproteína, a convulxina de *C. durissus terrificus*, é heterodimérica com massa molecular de 14 e 16 kDa, não apresenta atividade hemaglutinante e é uma potente ativadora de agregação plaquetária, através de receptor de colágeno-p62/GPVI (Polgár e cols., 1997b). As demais lectinas isoladas dos venenos de serpentes como RSL, BML, JML e a trombolectina, foram analisadas pelo método de Schiff e não apresentaram carboidratos ligados as suas estruturas. Por outro lado, grande parte das lectinas isoladas de vegetais como as lectinas de *Erythrina velutina* (Moraes e cols.,

1996) e *Dolichas labla* (Mo e cols., 1999) e lectinas isoladas de microorganismos como da *Entoameba histolítica* (McCoy e cols., 1993) é glicoproteína.

Muitas proteínas de venenos de serpentes são glicoproteínas e em algumas espécies podem ser glicosiladas de maneira específica. Elas contêm oligossacarídeos de diversas estruturas, e as atividades biológicas e farmacológicas dessas glicoproteínas em veneno de serpente ainda permanece em estudo (Gowda & Davidson., 1992).

Apesar das características hidrofóbicas citadas acima (figura 5), BMooL, bem como as lectinas de veneno de serpentes como BJL (Ozeki e cols., 1994), *C. atrox* (Hirabayashi e cols., 1991) e *Lachesis muta stenophyrs* (Aragón-Ortiz e cols., 1996), são consideradas moléculas hidrofílicas pelo alto conteúdo de Asp, Glu e Lys compondo sua estrutura.

A composição global em aminoácidos de BMooL evidenciou um alto conteúdo de aminoácidos hidrofílicos como Asx, Glx, Lys e Leu (Tabela 1) compatível com as lectinas BJL (Ozeki e cols., 1994), RSL (Hirabayashi e cols., 1991) e mais discretamente com a lectina da serpente *Lachesis muta stenophyrs* (Aragón-ortiz e cols., 1996). A composição de aminoácidos de BML e JML não tem valores semelhantes à BMooL, principalmente JML - uma lectina que apresenta características muito distintas das lectinas de veneno de serpentes -, já que não depende de  $Ca^{2+}$  e apresenta atividade hemaglutinante na presença de agente redutor: JML tem um elevado conteúdo glicina e alanina (Olgivie e cols., 1986).

As diferenças observadas entre os resultados das análises de aminoácidos entre BMooL e BJL (Tabela 1) podem ser atribuídas a alguns fatores, como alterações químicas que ocorrem quando a proteína é submetida à hidrólise ácida em elevadas temperaturas. Não há uma condição padrão de hidrólise que forneça resultados corretos para todos os aminoácidos. A

presença de outros componentes não protéicos (açúcares, lipídios), pode interferir na recuperação dos aminoácidos (Sittampalam e cols., 1988).

Em nossa análise, os valores de  $\frac{1}{2}$  cistina e triptofano não foram tabelados, pois esses resíduos não foram detectados pelo processo empregado e nenhuma correção para possíveis perdas durante a hidrólise ácida foi feita, relativamente ao conteúdo de cistina. Isto, em parte, impossibilitou uma estimativa precisa da massa molecular para BMooL, pela análise de aminoácidos.

Nos ensaios de hemaglutinação BMooL foi testada com diferentes tipos de eritrócitos e mostrou atividade aglutinante sobre eritrócitos intactos e tripsinizados de humanos (ABO), de boi e de porco. O perfil da atividade hemaglutinante foi (em ordem decrescente): eritrócitos humanos do tipo A > humanos do tipo B = humanos do tipo O > porco > boi; sendo que os eritrócitos humanos intactos e tripsinizados do tipo A (Figura 3), apresentaram sensibilidade a BMooL 2 vezes maior que os do tipo B e O, cerca de 6 vezes maior que eritrócitos de porco e 20 vezes maior que os de boi (Tabela 2).

Os eritrócitos de cavalo não aglutinaram na presença de BMooL, mesmo após tripsinização (que aumenta a sensibilidade dos eritrócitos, como mostram os dados da tabela 2) e em concentrações de BMooL que ultrapassam 66,0  $\mu\text{g/ml}$ . Os eritrócitos intactos de pato não são sensíveis à ação da lectina BMooL em concentrações de até 160  $\mu\text{g/ml}$ . As lectinas apresentam diferenças quanto a atividade hemaglutinante sobre vários tipos de eritrócitos, intactos ou sensibilizados com tripsina ou pepsina. Isso pode nos indicar a presença de diferentes carboidratos ou glicoproteínas na superfície externa das membranas dos eritrócitos de cada espécie, justificando a afinidade diferencial das lectinas por determinados eritrócitos.

A atividade hemaglutinante de BMooL sobre eritrócitos humanos tripsinizados do tipo

A é inibida competitivamente por lactose, galactose e rafinose (Tabela 3). Esses três carboidratos apresentam pelo menos um grupo galactosídeo disponível que interage, na presença de  $\text{Ca}^{2+}$ , com a lectina BMooL. A afinidade apresentada por BMooL é a mesma das lectinas do tipo S (Drickamer & Taylor, 1993)

Tendo BMooL maior afinidade para galactosídeos, esperávamos encontrar ausência ou efeito menor de outras hexoses como glicose e manose, devido a diferenças estereoquímicas nas posições 2- (manose) e 4-OH (glicose) em relação à galactose, que certamente teriam interações diferentes no sítio de ligação, considerando posições de resíduos de aminoácidos (Kolatkár & Weis, 1996; Elgavish & Shaanan, 1997). De fato os dados da Tabela 3 mostram que a glicose é 4 vezes menos potente e a manose 32 vezes menos potente que a galactose na inibição da atividade hemaglutinante. As lectinas que interagem com galactose, frequentemente, também interagem com galactosamina. No entanto, em lectinas isoladas de venenos de serpentes os carboidratos aminados, mesmo contendo grupamentos galactosídeos, não apresentam nenhum efeito sobre a atividade destas lectinas (Gartner e cols., 1984; Ozeki e cols., 1994 e Carvalho e cols., 1998). Nossos resultados confirmam essas observações uma vez que glicosamina não é capaz de inibir a atividade hemaglutinante de BMooL sobre eritrócitos humanos tipo A, mesmo em concentrações superiores a 100 mM (Tabela 3) ao passo que 12,5 mM de glicose foram suficientes para inibir tal atividade. Possivelmente a posição do grupamento amina interfira na interação da lectina com o resíduo galactosídeo (Carvalho e cols., 1998).

A ação hemaglutinante de BMooL sobre eritrócitos humanos do tipo A é inibida na presença de EDTA e EGTA (quelantes de cátions divalentes) em concentrações mínimas, isto é, inferiores a 24  $\mu\text{M}$ . Isto mostra que a atividade hemaglutinante de BMooL é dependente de

$\text{Ca}^{2+}$ , enquanto em algumas outras lectinas de veneno de serpentes essa dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  não é observada (Olgivie e cols., 1986)

Pelos resultados obtidos em SDS-PAGE, é possível observar que a forma dimérica de BMooL é predominante no veneno da serpente. No entanto, não é possível afirmar se a forma funcional de BMooL é representada pelo dímero ou por complexos de 3 ou 4 subunidades. A única afirmação possível a partir de nossos resultados experimentais é que BMooL perde sua atividade com a dissociação das subunidades, induzida pela presença de agentes redutores como o DTT. Portanto, a associação dessas subunidades por pontes dissulfeto é fundamental para atividade hemaglutinante da lectina.

Vários trabalhos relatam que venenos de serpentes apresentam muitos componentes que estimulam ou inibem a agregação plaquetária. As lectinas, pelo fato de se ligarem reversível e seletivamente a carboidratos, têm demonstrado uma capacidade de se ligar às plaquetas e induz uma mudança conformacional em receptores de fibrinogênio, como a GP IIb/IIIa, promovendo uma subsequente agregação/aglutinação ou inibição deste processo (Markland, 1998).

Com a intenção de verificar se BmooL apresenta alguma atividade na agregação plaquetária, utilizamos PRP e PL humanos na presença de agonistas como ADP - que induz mudança conformacional nas plaquetas e expressa receptores para fibrinogênio - o colágeno que possui receptores nas membranas das plaquetas, como a glicoproteína GPIa - Trombina que causa agregação ligando-se a GPIb e degrada GPV - e ristocetina um antibiótico que é análogo ao vWF, causando adesão e aglutinação das plaquetas (Siess, 1989).

A adição de BMooL à PRP não teve, *per se*, uma atividade agregante significativa na concentração de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com 3, 5 e 8 min. de incubação. Os experimentos na presença de

Colágeno não apresentaram nenhum efeito significativo, mesmo com doses de até 40 µg/ mL de BMooL e com tempos de incubação superiores a 5 min. Outros ensaios com agonistas como ADP e em PL com trombina e ristocetina foram realizados, em um único experimento, com finalidade de verificar o comportamento de BMooL, mas também nenhum efeito modulador foi observado.

Dados na literatura mostram que a lectina BJL não tem atividade moduladora no fator vWF e que a TL ocasionalmente causou agregação plaquetária, em uma concentração de 50 µg/ mL. Outras lectinas de serpentes como em *L. muta*, *Crotalus atrox* e *Ancistrodon piscivorous leuostoma* (todas específicas para lactose) estimula a agregação plaquetária (Olgivie e cols., 1989).

A convulxina, uma glicoproteína pertencente a família heterodímera das lectinas do tipo-C e que não possui atividade hemaglutinante, é um potente agente da agregação plaquetária. Esta lectina não se liga a GPIb, mas induz uma transdução de sinal semelhante ao colágeno, ligando-se a um outro receptor glicosilado da membrana (p62/GPVI), para ativar as plaquetas. Diferentemente de outras lectinas de veneno, a ação da convulxina nas plaquetas não está relacionada com a GPIb (Polgár e cols., 1997b).

É interessante notar que algumas proteínas isoladas do veneno de serpentes, como a botrocetina (*B. jararaca*), a alboagreguina (*T. albolabris*) ou a bitiscetina (*B. arietans*) que agregam plaquetas, apresentam-se estruturalmente como heterodiméricas, relacionadas com as lectinas do tipo-C, sem atividade hemaglutinante, e possuem CRD estrutural não ligante de carboidratos (Fujimura e cols., 1996). Desta forma, é possível afirmar que estas proteínas pertencem a uma família com alta homologia estrutural e com atividades biológicas diferentes.

Segundo Ozeki (1996), há uma seqüência tripeptídica altamente conservada nos CRD das lectinas ligantes de carboidratos Gln-Pro-Asp (específica para manose) e Glu-Pro-Asn (específica para galactose) que não está presente nas “proteínas heterodímeras”, provavelmente por deleção ou substituição dos resíduos.

Essas observações sugerem que muitas proteínas do veneno estão relacionadas com uma proteína precursora, de estrutura semelhante ao CRD, porém diferenciada em suas funções. É provável que as lectinas tipo C possam ser formadas por degradação proteolítica de um precursor de disintegrinas e metaloproteases (Kini, 1996). Como um exemplo, temos o RVV-X, um fator coagulante de *Vipera russelii* que se liga ao fator X da cascata de coagulação sanguínea e apresenta três domínios divididos em duas cadeias peptídicas. A cadeia pesada é constituída dos domínios de metaloprotease e disintegrina, enquanto a cadeia leve possui um domínio homólogo às lectinas do tipo-C, que pode estar envolvido na ligação da proteína ao fator X (Takeya e cols., 1992).

Os estudos realizados com BMooL em plaquetas, necessitam ser aprofundados para melhor entendimento das propriedades biológicas desta lectina. Outros ensaios para verificar o potencial mitogênico ou de adesão de BMooL sobre linhagens celulares como as de linfócitos deverão ser feitos, para uma caracterização biológica mais completa desta proteína.

Dados que podem corroborar para a determinação das prováveis funções das lectinas de venenos como a BMooL, além das atividades biológicas, incluem: uma caracterização da estrutura molecular desta proteína por sequenciamento total de seus resíduos (estrutura primária), a determinação das porcentagens de estruturas secundárias (dicroísmo circular), bem como a análise da estrutura terciária a partir de estudos cristalográficos. O interesse no estudo das lectinas de venenos de serpentes não se restringe unicamente ao fato dessas

apresentarem dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  ou por terem propriedades intermediárias entre os dois grupos de lectinas animais: as do tipo S e tipo C, mas pela constituição de sua estrutura primária, que apresenta aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos e não possuem outros domínios. Em outras palavras, pode-se dizer que essas proteínas constituem o próprio CRD observado em outras lectinas (Drickamer, 1993). Faz-se necessário um entendimento mais detalhado da interação lectina-carboidrato para esclarecimento dos mecanismos e da origem das atividades biológicas das lectinas em venenos de serpentes.

## CONCLUSÃO

BMooL é uma glicoproteína isolada do veneno da serpente *Bothrops moojeni*. Caracterizada como uma lectina com propriedades intermediárias entre os tipos C e S, ela apresenta atividade hemaglutinante dependente de cálcio que é inibida por carboidratos como lactose e galactose. Não foi observado nenhum efeito de BMooL como modulador da agregação de plaquetas humanas. É um dímero, com subunidades de 14 kDa associadas por pontes dissulfeto e a associação destas é imprescindível para sua atividade. A determinação da composição de aminoácidos demonstra um conteúdo elevado de resíduos ácidos (Asx e Glx) e uma composição de aminoácidos semelhantes a BJL (Lectina de *B. jararaca*).

## COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E PUBLICAÇÕES

- **6<sup>th</sup> Panamerican Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins.** Isla Margarita – Venezuela, 22-26, September, 1998.

“ ISOLATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A C-TYPE LECTIN FROM *BOTHROPS MOOJENI* VENOM.” Kassab, B. H.; Carvalho, D. D.; Novello, J. C. and Marangoni, S.

- **XXVIII<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).** Caxambu – MG, 23-26 de Maio de 1999.

“ CHARACTERIZATION OF BMooL: A C-TYPE LECTIN FROM *BOTHROPS MOOJENI* VENOM.” Kassab, B. H.; Carvalho, D. D.; Marangoni, S. and Novello, J. C.

Os resultados obtidos com a realização deste trabalho serão submetidos à revista:

“ International Union Biochemistry Molecular Biology – Life.”

“ ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM *BOTHROPS MOOJENI* VENOM.” Kassab, B. H.; Carvalho, D. D.; Novello, J. C. and Marangoni, S.

## **-Referências Bibliográficas**

- Abe, Y.; Iwabushi, M. and Ishi, S. I. (1971) Multiple Forms in the Subunit Structure of Concanavalin A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, p. 1271-1278.
- 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**, p. 141-143.
- Aragón-Ortiz, F.; Mentele, R. and Auerswald, E. A. (1996) Amino acid sequence of lectin-like protein from *Lachesis muta stenophrys* venom. *Toxicon*, **34**, p. 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**, p. 14903-14911.
- Barondes, S. H. (1984). Soluble Lectins: A New Class of Extracellular Proteins. *Science*, **223**, p. 1259-1264.
- Barondes, S. H. (1988). Bifunctional Properties of Lectins: Lectins Redefined. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, p. 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.; Mercúrio, A. M.; Monsigny, M.; Pillai, S.; Poirer, F.; Raz, A.; Rigby, P. W.J.; Rini, J. M. and Wang, J. L. (1994) Galectins: a Family of Animal  $\beta$ -Galactoside Binding Lectins. *Cell*, **79**, p. 597-598.
- Barravieira, B. and Pereira, P. C. M. (1994) Acidentes por Serpentes do Gênero *Bothrops* In: Barravieira, B. Venenos Animais 1. ed. Epuc. Rio De Janeiro Brasil.
- Bidlingmeyer, B. A.; Cohen, S. A and Tarvin, T.L. (1984) Rapid Analysis of Amino Acids Using Pre-Column Derivatization. *J Chromatogr.*, **336**, p. 93-104.
- Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1994) Hemorrhagic Metalloproteinases From Snake Venoms. *Pharmacol. and Therap.* **62**, p. 325-372.
- Boyd, W. C. and Shapleigh, E. (1954): Antigenic Relations of Blood Group Antigens as Suggested by Tests with Lectins. *J. Immunol.* **73**, p. 226-231.
- Carvalho, D.D., Marangoni, S., Oliveira, B. and Novello, J.C. (1998) Isolation and Characterization of A New Lectin From the Venom of the Snake *Bothrops jararacussu*. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* **44**, p. 933-938.
- Carvalho, H. F. (1990) Aspectos Moleculares e Biológicos das Lectinas. *Ciência e Cultura* (Revista da Sociedade Brasileira para o Progresso de Ciência). **42**, p. 884-893.

- Casais-Silva, L. L. (1995) Caracterização das Atividades Biológicas e Enzimáticas do Veneno de Duas Espécies de *Micrurus* (serpentes; Elapidae) do Estado da Bahia. São Paulo, 98p (Tese de Mestrado – Universidade de São Paulo).
- Chen, Y. L. and Tsai, I. H. (1995) Functional and Sequence Characterization of Agkicetin, A New Glicoprotein-Ib Antagonist Isolated from *Agkistrodon acutus* Venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, p. 472-477.
- Daltry, J. C.; Wiister, W. and Thorpe, R. S. (1996) Diet and Snake Venom Evolution. *Nature*, **379**, p. 537-540.
- Drickamer, K. (1988) Two Distinct Classes of Carbohydrate Recognition Domains in Animal Lectins. *J. Biol. Chem.*, **263**, p. 9557-9560.
- Drickamer, K. (1995) Increasing Diversity of Animal Lectin Structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, p. 612-616.
- Drickamer, K. and Taylor, M. E. (1993) Biology of Animal Lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **9**, p. 237-264.
- Elgavish, S. and Shaanan, B. (1997) Lectin-Carbohydrate Interaction: Different Fold, Commn Recognition Principles. *Trends Biochem. Sci.* **22**, p.462-467
- Etzler, M. E. (1985) Plant Lectins: Molecular and Biological Aspects. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **36**, p. 209-234.
- França, F. O. S. and Fan, H. W. (1992) Acidente Botrópico. In: Schvartsman, S. Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos. Ed. Sarvier, 149 p. São Paulo.
- Francischetti, I. M.; Castro, H. C.; Zingali, R. B.; Carlini, C. R. and Guimarães, J. A. (1998) Bothrops sp. Snake Venoms: Comparison of some Biochemical and Physicochemical Properties and interferences in Platelet Function. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **119**, p. 21-29.
- Fujimura, Y.; Titani, K.; Usami, Y.; Suzuki, M.; Oyama, R.; Matsui, T.; Fukui, H.; Sugimoto, M. and Zaveriu, 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**, p. 1957-1964.
- Fujimura, Y., Kawasaki, T. and Titani, K. (1996) Snake venom proteins modulating the interaction between von Willebrand factor and platelet glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.*, **76**, p.633-9.
- Gabius, H. J. (1994) Non-Carboydrate Binding Partners/Domains of Animal Lectins. *Intl. J. Biochem.*, **26**, p. 469-477.

- Gabius, H. J. (1997) Animal Lectins. *Eur. J. Biochem.*, **243**, p. 543-576.
- Gartner, T. K. and Ogilvie, M.L. (1984) Isolation and Characterization of Three  $\text{Ca}^{2+}$  – Dependent  $\beta$ -Galactoside-Specific Lectins from Snake Venoms. *Biochem. J.*, **224**, p. 301-307.
- Gartner, T. K.; Stoker, K. and Williams, D. C. (1980) Thrombolectin: A Lectin Isolated From *Bothrops Atrox* Venom. *FEBS Lett.*, **117**, p. 13-16.
- Gould, R. J.; Polokoff, M. A.; Friedman, P. A.; Huang, T. F.; Holt, J.C.; Cook, J. J. and Niewiarowski, S. (1990) Disintegrins: A Family of Integrin Inhibitory Proteins from Viper Venoms (Minireview). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **195**, p. 168-171.
- Gowda, D. C. and Davidson, E. A. (1992) Structural Features of Carbohydrate Moieties in Snake Venom Glycoproteins. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **182**, p. 294-301.
- Gran, Z. R.; Gould, R. J.; Jacobs, J.W.; Friedman, P. A. and Polokoff, M. (1988) Echistatin: A Potent Platelet-Aggregation Inhibitor from the Venom of the Viper, *Echis Carinatus*. *J. Biol. Chem.*, **263**, p. 19827-19832.
- Haagsman, H. P.; Hawgood, S.; Sargeant, T.; Buckley, D. and White, R. T. (1987) The Major Lung Surfactant Protein, Sp 28-36 is a Calcium-Dependent, Carbohydrate-Binding Protein. *J. Biol. Chem.*, **262**, p. 13877-13880.
- Harison, F. L. (1991) Soluble vertebrate Lectins: ubiquitous but inscrutable proteins. *J. Cell Sci.*, **100**, p 9-14.
- Hearn, M. T. W. (1987) General Strategies in the Separation of Proteins by High-Performance-Liquid-Chromatographic Methods. *J. Chromatogr.*, **418**, p. 3-26.
- Helmbold, W.; Fehres, J.; Prokop, O. and Uhlenbruck, G. (1986) B and T lymphocytes Mitogenic Properties in a Snake Venom. *Biomed. Biochim. Acta.*, **45**, p. 459-466.
- 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**, p. 2320-2326.
- Hite, L. A.; Shannon, J. D.; Bjarnason, J. B. and Fox, J. W. (1992) Sequences of a cDNA Clone Encoding the Zinc Metalloproteinase Hemorrhagic Toxin from *Crotalus Atrox*: Evidence For Signal, Zymogen, and Disintegrin-Like Structures. *Biochemistry*, **31**, p. 6203-6211.
- Huang T. F.; Holt, J. C. Kirby, E. P. and Niewiarowski, S. (1989) Trigramin: Primary Structure and Its Inhibition of Von Willebrand Factor Binding to Glycoprotein IIb/IIIa Complex on Human Platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, **308**, p. 182-191

- 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**, p.1269-1276.
- Kamiguti, A. S. and Sano-Martins, I. S. (1995). South American Snake Venoms Affecting Haemostasis. *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **14**, p.359-374.
- Kamiguti, A. S.; Zuze, M. and Theakston, R.G.D. (1998) Snake Venom Metalloproteinases and Disintegrins: Interactions with Cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **31**, p. 853-862.
- Kini, R. N. (1995) Do we Know the Complete Sequence of Metalloproteinase and Non-Enzymatic Platelet Aggregation Inhibitor (Disintegrin) Precursor Protein? *Toxicon*, **33**, p. 1151-1160.
- Kini, R. N. (1996) Are C-Type Lectin-Related Proteins Derived By Proteolysis of Metalloproteinase/Disintegrin Precursor Proteins? *Toxicon*, **34**, p. 1287-1294.
- Kini, R. N. and Evans, H. J. (1992) Structural Domains in Venom Proteins: Evidence That Metalloproteinases and Noenzymatic Platelet Aggregation Inhibitors (Disintegrins) from Snake Venoms Are Derived By Proteolysis from a Common Precursor. *Toxicon*, **30**, p. 265-293.
- Kishore, U.; Eggleton, P. and Reid, K. B. M. (1997) Modular Organization of Carbohydrate Recognition Domains in Animal Lectins. *Matrix Biol.*, **15**, p. 583-592.
- Kolatkar, A. R.; Leung, A. K.; Isecke, R.; Brossmer, R.; Drickamer, K and Weis, W. I. (1998) Mechanism of N-acetylgalactosamine Binding to a C-type Animal Lectin Carbohydrate-Recognition Domain. *J. Biol. Chem.*, **273**, p. 19502-19508.
- Korn, E. D. and Wright, P. L. (1973) Macromolecular Composition of Amoeba Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.*, **248**, p. 439-447.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins among the Assembly of the Head of the Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**, p. 680-685.
- Lis, H. and Sharon, N. (1972) Soy Bean (Glycine Max) Agglutinin. *Meth. Enzimol.*, **28**, p. 360-365.
- Lis, H. and Sharon, N. (1981a). Affinity Chromatography for the Purification of Lectins (a Review). *J. Chromatogr.*, **215**, p. 361-372.
- Lis, H. and Sharon, N. (1981b) Lectins in Higher Plants. *Biochem. Plants*, **6**, p. 371-447.
- Lis, H. and Sharon, N. (1986) Lectins as Molecules and as Tools. *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, p. 35-67.

- Liu, F. T. (1993) S-type Mammalian Lectins in Allergic Inflammation. *Immunol. Today*, **14**, p. 486-490.
- Loeb, J. A. and Drickamer, K. (1988). Conformational Changes in the Chicken Receptor for Endocytosis of Glycoproteins: Modulation of Binding Activity by  $\text{Ca}^{2+}$  and pH. *J. Biol. Chem.*, **263**, p. 9752-9760.
- Lomonte, B.; Rojas, G.; Gutiérrez, J.M. and Ramirez, G. (1990) Isolation of Galactose-Binding Lectin from the Venom of the Snake *Bothrops Godmani* (Godmann's Pit Viper). *Toxicon*, **28**, p. 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**, p. 265-275.
- Mastro, A. M.; Hurley, D. J.; Winning, R. K.; Filipowski, R.; Ogilvie, M. L. and Gartner, T. K. (1986) Mitogenic Activity of Snake Venom Lectins. *Cell Tis. Kinet.*, **19**, 557-566.
- Markland, F. S. (1998) Snake Venoms and the Hemostatic System. *Toxicon*, **36**, p. 1749-1800.
- McCoy, J. J.; Mann, B. J.; Vedvick, T. S.; Pak, Y.; Heimark, D. B. and Petri, W. A. Jr. (1993) Structural Analysis of the Light Subunit of the *Entamoeba histolytica* Galactose-specific adherence lectin. *J. Biol. Chem.*, **268**, p. 24223-24231.
- Mo, H.; Meah, Y.; Moore, J. G. and Goldstein, I. J. (1999) Purification and Characterization of *Dolichas lablab* lectin. *Glycobiol.*, **9**, p. 173-179.
- Monteiro, R.Q.; Carlini, C. R.; Guimarães, J. A; Bon, C. and Zingali, R. B. (1997) Distinct Bothrojaracin Isoforms Produced by Individual Jararaca (*Bothrops Jararaca*) Snakes. *Toxicon*, **35**, p. 649-657.
- Monteiro, R.Q.; Yamanouye, N.; Carlini, C. R.; Guimarães, J. A; Bon, C. and Zingali, R. B. (1998) Variability of Bothrojaracin Isoforms and other Venom Principles in individual Jararaca (*Bothrops jararaca*) Snakes maintained under seasonally invariant conditions. *Toxicon*, **36**, p. 153-163.
- Moraes, S. M.; Cavada, B. S.; Moreira, R. A., Roque-Barreira, M.C.; Santos-de-Oliveira, R.; Pinto, V. P. and Oliveira, J. T. (1996) Purification, Physicochemical Characterization and Biological Properties of a Lectin from *Erythrina velutina* Forma Aurantiaca Seeds. *Braz. J. Med. Biol Res.*, **29**, p. 977-85.
- Morris, M. F.; Waheed, A; Risley, J. M. and Van Etten, R. L. (1989) Carbohydrate Removal Fails to Eliminate the Heterogeneity of Human Prostatic Acid Phosphatase. *Clin. Chim. Acta.*, **182**, p. 9-20.

- Mueller, E.; Schroeder, C.; Schaver, R. and Sharon, N. (1983) Binding and Phagocytosis of Sialidase-Treated Rat Erythrocytes by a Mechanism Independent of Opsonins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **364**, p. 1419-1429.
- Nagata, Y and Burger, M. M. (1972) Wheat Germ Agglutinin. Isolation and Characterization. *J. Biol. Chem.*, **247**, p. 2248-2254.
- Ni, Y. and Tizard, I. (1996) Lectin-Carbohydrate Interaction in the Immune System. *Vet. Immun. Immun.*, **55**, p. 205-223.
- Ogilvie, M. and Gartner, T. K. (1984). Identification of Lectins in Snake Venoms. *J. Herpet.*, **18**, p. 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**, p. 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. Haem.*, **62**, p. 704-707.
- Ohkura, M.; Miyashita, Y.; Nikai, T.; Suzuki, J.; Komori, Y.; Sugihara, H. and Ohizumi, Y. (1996) Properties of Ca<sup>++</sup> Released Induced by Puff Adder Lectin, a Novel Lectin from the Snake *Bitis arietans*, in Sarcoplasmic Reticulum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, p. 1043-1048
- 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**, p. 306-310.
- Paine, M. J. I.; Desmond, H. P.; Theakston, R. G. D. and Crampton, J. M. (1992) Purification, Cloning, and Molecular Characterization of a High Molecular Weight Hemorrhagic Metalloproteinase, Jararhagin, from *Bothrops Jararaca* Venom. Insights Into the Disintegrin Family. *J. Biol. Chem.*, **267**, p. 22869-22876.
- Paine, M. J. I.; Moura-De-Silva, A. M.; Theakston, R. G. D. and Crampton, J. M. (1994) Cloning of Metalloproteinase Genes in the Carpet Viper (*Echis Pyramidum Leakeyi*). Further Members of the Metalloprotease/Disintegrin Gene Family. *Eur J. Biochem.*, **224**, p. 483-488.
- Peng, M.; Lee, W. and Kirby, E. P. (1991) Alboaggregin-B: a New Platelet Agonist that Binds to Platelet Membrane Glycoprotein-Ib. *Biochemistry*, **30**, p. 11529-11539.
- Peng, M.; Holt, J. C. and Niewiarowski, S. (1994) Isolation, Characterization and Amino Acid Sequence of Echicetin  $\beta$ -subunit, a Specific Inhibitor of Von Willebrand Factor and Thrombin Interaction with Glycoprotein Ib. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, **205**, p. 68-72.

- Polgár, J.; Magnenat, E. M.; Peitsch, M. C.; Wells, T. N. C.; Saqi, M. S. A. and Clemetson, K. J. (1997a) Amino Acid Sequence of the  $\alpha$ -subunit and Computer Modelling of the  $\alpha$  and  $\beta$  Subunits of Echicetin from the Venom of *Echis carinatus* (saw-scaled viper). *Biochem. J.*, **323**, p.533-537 .
- Polgár, J.; Clemetson, J. M.; Kehrel, B. E.; Wiedemann, M., Magnenat, E. M.; Wells, T. N. C. and Clemetson, K. J. (1997b) Platelet Activation and Signal Transduction by Convulxin, a C-type Lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical Rattlesnake) Venom via p62/GPVI Collagen Receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, p. 13576-13583.
- Powell, L. D. and Varki, A. (1995) I-Type Lectins. *J. Biol. Chem.*, **270**, p. 14243-14246.
- Pusztai, A. (1991) Plant lectins. Cambridge University Press, p. 3-263.
- Quioco, F.A.(1986). Carbohydrate-binding Proteins: Tertiary Structures and Protein-Sugar Interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, p. 287-315.
- Radomski, M. W. and Moncada, S. (1983) An Improved Method for washing Human Platelets with Prostacyclin. *Thromb. Res.*, **30**, p. 383-389.
- Ribeiro, L. A.; Albuquerque, M. J.; De Campos, V. A.; Katz, G.; Takaoka, N. Y.; Lebrao, M. L. and Jorge, M.T. (1998) Obits by Venomous Snakes in the State of São Paulo: Evaluation of 43 cases from 1988 to 1993. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, **44**, p. 312-318.
- Schvartsman, S. (1992) Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos- SARVIER- São Paulo.
- 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**, p. 6892-6897.
- Sharon, N. (1972) Lectins: Cell-agglutinating and Sugar-specific Proteins. *Science*, **177**, p. 949-959.
- Sharon, N. (1993) Lectin-Carbohydrates Complexes of Plants and Animals. An Atomic View. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, p. 221-226.
- Sharon, N. and Lis, H. (1987) A Century of Lectin Research (1888-1988). *Trends Biochem. Sci.*, **12**, p. 488-491.
- Sharon, N. and Lis, H. (1993) Carbohydrates in Cell Recognition. *Sci. Am.*, **268**, p. 82-89.
- Shin, Y. and Morita, T. (1998) Rhodocytin, a functional novel Platelet Agonist belonging to the heterodimeric C-type Lectin Family, induces platelet aggregation independently of Glycoprotein Ib. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, p.741-5.

- Siess, W. (1989) Molecular Mechanism as Platelet Activation. *Physiol. Reviews*, **69**, p. 58-178
- Sittampalam, G. S.; Ellis, R. M.; Miner, D. J.; Richard, E. C. and Clodfelter, D. K. (1988) Evaluation of Amino Acid Analysis as Reference Method to Quantitate Highly Purified Proteins. *J. As. Anal. Chem.*, **71**, p. 833-838.
- Spadaro, A.C. e Fonseca, M.J.V. (1990). Cromatografia por Bioafinidade. in: Collins, C. H.; Braga, G.L. and Bonato, P.S. Introdução a Métodos Cromatográficos, 5ª Ed. Ed. da Unicamp, Campinas.
- Stahl, P. D. ; Rodman, J. S.; Miller, M. J., and Schlesinger, P. H. (1978) Evidence For Receptor-Mediated Binding of Glicoproteins Glycoconjugates and Lysosomal Glycosidases by alveolar Macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, p. 1399-1403. Usa.
- Steel, D. M. and Whitehead, A. S. (1994) The Major Acute Phase Reactants C-Reactive Protein, Serumamyloid P Component and Serum Amyloid A Protein. *Immunol. Today*, **15**, p. 81-88.
- Takeya, H.; Nishida, S.; Miyata, T.; Kawada, S-i; Saisaka, Y.; Morita, T. and Iwanaga, S. (1992) Coagulation Factors X Activating Enzyme from Russel's viper Venom (RVV-X). *J. Biol. Chem.*, **267**, p. 14109-14117.
- Tu, A. T. (1977) Venoms: Chemistry and Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
- Tu, A. T. (1988) Overview of Snake Venom Chemistry. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **391**, p. 37-62.
- Varanda, E. A. and Giannini, M. J. S. (1994) Bioquímica dos Venenos de Serpentes. in: Barravieira, B. Venenos Animais, 1º Ed. Epuc, Rio De Janeiro, Brasil.
- Wileman, T. E.; Linnartz, M. R. and Stahl, P. D. (1986): Identification of the Macrophage Mannose Receptor as a 175-kDa Membrana Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, p. 2501-2505.
- Yamamoto, K.; Ishida, C.; Shinohara, Y.; Hasegawa, Y.; Konami, Y.; Osawa, T. and Irimura, T. (1994) Interaction of Immobilized Recombinant Mouse C-Type Macrophage Lectin with Glycopeptides and Oligosaccharides. *Biochemistry*, **33**, p. 8159-8166.
- Zatta, P.F. and Cummings, R.D. (1991). Lectins and their uses as Biotechnological Tools. *Biochem. Educ.*, **20**, p. 2-9.