

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

**BC/41630
IB/81528**

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

R265

EVANDRO JOSÉ LIMA REGO



Purificação e Caracterização de uma Lectina
Isolada das Sementes de *Crotalaria pallida*

Aiton

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Evandro José Lima Rego
e aprovada pela Comissão Julgadora
19/4/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho

CAMPINAS - SP
2000

208639



UNIDADE	IB		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	R265p		
V.	E.		
TOMBO BC/	41630		
PROC.	278/00		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00		
DATA	14-07-00		
N.º CPD			

CM-00142209-B

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

Rego, Evandro José Lima

R265p Purificação e caracterização de uma lectina isolada das sementes de *Crotalaria pallida* Aiton/Evandro José Lima Rego. - - Campinas, SP:[s.n.], 2000.
92f: ilus

Orientador: Benedito Oliveira Filho
Tese(doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia.

1. Lectina. 2. Proteína. 3. Crotalaria. 4. Leguminosa. I. Oliveira Filho, Benedito. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

EVANDRO JOSÉ LIMA REGO

Purificação e Caracterização de uma Lectina
Isolada das Sementes de *Crotalaria pallida*
Aiton

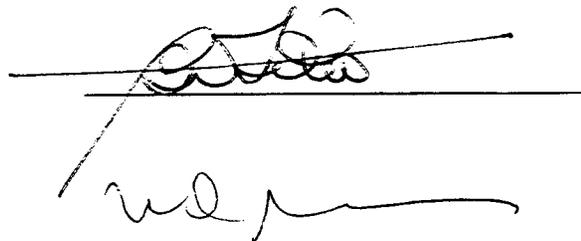
**Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.**

Orientador: Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho

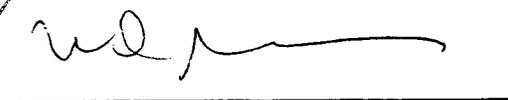
CAMPINAS - SP
2000

Campinas, 19 de abril de 2000.

Prof. Dr. Benedito Oliveira Filho
(Orientador)

Handwritten signature of Benedito Oliveira Filho in cursive script, written over a horizontal line.

Profa. Dra. Nilce Correa Meirelles

Handwritten signature of Nilce Correa Meirelles in cursive script, written over a horizontal line.

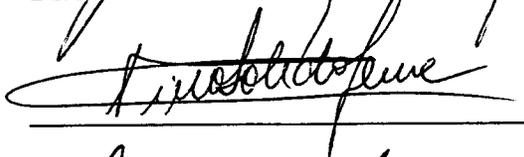
Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

A horizontal line intended for the signature of Graciliano de Oliveira Neto.

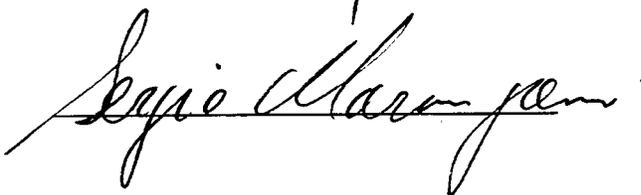
Prof. Dr. José Camillo Novello

Handwritten signature of José Camillo Novello in cursive script, written over a horizontal line.

Dra. Luciana Di Ciero

Handwritten signature of Luciana Di Ciero in cursive script, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Sergio Marangoni

Handwritten signature of Sergio Marangoni in cursive script, written over a horizontal line.

Prof. Dr. Luís Alberto Magna

A horizontal line intended for the signature of Luís Alberto Magna.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedito de Oliveira Filho, pelo incentivo e orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Camillo Novello, pelo acompanhamento deste projeto e sugestões propostas.

Ao Prof. Dr. Sergio Marangoni, pelo auxílio e observações.

À Prof. Dra. Nilce Correa Meirelles e à Profa. Dra. Luciana Di Ciero, pela análise prévia deste trabalho e sugestões apresentadas.

À Srta. Daniela Diógenes de Carvalho, doutoranda do curso de pós-graduação em Bioquímica da Unicamp, por sua colaboração na execução deste trabalho.

Às Srtas. Bayki Hussein Kassab, Luzia Pando e Silvana Pando e ao Sr. Marcus Bustamante Smolka, doutorandos do curso de pós-graduação em Bioquímica da Unicamp, pelos auxílios e sugestões.

À Srta. Flávia Vischi Winck e ao Sr. Paulo Baldasso, pela competência e presteza no apoio técnico prestado, o meu agradecimento.

Aos demais funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica, especialmente do LAQUIP, pela convivência e ajuda.

Às Dras. Maria Elena Infante-Malaquias, Terezinha Célia de Almeida e Silva Zollner e Maristela Freitas Pereira Bittencourt, pelo incentivo e amizade.

A todos aqueles que permitirem o uso de reagentes, vidrarias, equipamentos e laboratórios.

A todos os que, embora não nomeados, colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

ABREVIações	2
ABREVIações PARA AMINOácIDOS	4
RELACão DE ILUSTRAções	5
RESUMO	6
ABSTRATCS	9
INTRODUção	11
OBJETIVOS	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
RESULTADOS	37
DISCUSSão	55
REFERências BIBLIOGRáFICAS	71

ABREVIações

AMBIC	Bicarbonato de amônio
BIS	N, N'- metileno bis acrilamida
CpL	Lectina isolada de semente de <i>Crotalaria pallida</i> Aiton
CTBS	Salina tamponada com tris mais CaCl ₂
Da	Dalton
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético.
HPLC	High performance liquid chromatography (CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência)
kDa	Kilodalton
M	Molar
nm	Nanômetro
P/V	Porcentagem peso/volume
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Salina tamponada com fosfato
PITC	Fenilisotiocianato
PTC	Feniltiocarbamil
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS	Salina tamponada com tris
TCA	Ácido tricloroacético
TDG	Tiodigalactosídeo
TEMED	N-N'-N'-Tetrametiletlenodiamina

TRIS Tris-hidroximetil aminometano

V/V Percentagem volume/volume

ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS¹

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

¹Segundo nomenclatura do IUPAC

RELAÇÃO DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1: Atividade hemaglutinante de CpL sobre diferentes eritrócitos na presença de 5 mM de CaCl₂.

Tabela 2: Efeito de carboidratos na hemaglutinação induzida por CpL. Concentração Mínima do carboidrato que inibe a hemaglutinação (CMIc).

Tabela 3: Efeito de agentes quelantes de cátions divalentes e agente redutor na hemaglutinação induzida por CpL (CMIq).

Figura 1- Perfil cromatográfico do precipitado protéico das sementes de *Crotalaria pallida* em coluna Sephadex G-75.

Figura 2 -Repurificação das frações hemaglutinante cromatografia em coluna Protein Pak DEAE 5PW.

Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das etapas de purificação da lectina isolada de *Crotalaria pallida*.

Figura 4 – SDS PAGE (15%) de CpL em condições redutoras e não redutoras.

Figura 5 – Coloração para detecção de glicoproteínas

Tabela 4 - Composição de aminoácidos de CpL.

Tabela 5- Composição percentual de aminoácidos de CpL.

Figura 7 - Seqüência amino-terminal dos 9 primeiros resíduos da proteína CpL

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imune, capazes de se ligar a carboidratos e aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoconjugados. Embora isoladas em maior número de plantas, principalmente de sementes de leguminosas, as lectinas apresentam distribuição universal ocorrendo desde vírus até mamíferos. As lectinas têm sido utilizadas como instrumento de pesquisa em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas afins, pois constituem um sistema modelo para estudar a base molecular de muitos eventos biológicos que envolvem reconhecimento entre proteínas e carboidratos. Sua abundância no reino vegetal sugere que elas apresentam diversos papéis biológicos. A possibilidade de utilização das lectinas no aumento da fertilidade e como biopesticida tem despertado o interesse de utilizá-las no desenvolvimento de plantas geneticamente transformadas que sejam resistentes a patógenos e pragas ou capazes de estabelecer simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio. Neste trabalho foi purificada uma lectina das sementes de *Crotalaria pallida*, por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Shephadex G-75 e cromatografia de troca iônica em coluna Protein Pak 5SW em HPLC. A massa molecular determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras e não redutoras foi calculada em 30 kDa. A massa molecular aparente calculada por cromatografia em coluna Protein Pak 300 SW foi de 120 kDa, sugerindo trata-se de um tetrâmero. A hemaglutinação de eritrócitos humanos e animais induzida por CpL é inibida especificamente por rafinose e galactose. EDTA e EGTA também inibem a atividade hemaglutinante de lectina, o que revela a dependência de cátions divalentes. A composição global de aminoácido e seqüência amino terminal mostra similaridade com lectinas isoladas das sementes de outras espécies do gênero *Crotalaria*. Os dados levantados para a

lectina de *Crotalaria pallida*, quando comparados com os obtidos para *Crotalaria juncea* e *Crotalaria striata* mostram que apesar de pertencentes ao mesmo gênero possuem diferentes propriedades de aglutinação e especificidade para carboidratos, apresentando entretanto grande homologia estrutural, confirmando a importância da lectina como marcador taxonômico. Deste modo, a lectina purificada e caracterizada neste trabalho se constitui em um marcador molecular para estudos de evolução filogenética e especiação do gênero *Crotalaria*, mas sobretudo permite sua utilização como ferramenta biológica útil em várias áreas, como pesquisas sobre câncer e imunologia, que requerem a compreensão dos processos biológicos envolvidos no reconhecimento celular.

ABSTRATCS

Lectins are multivalent carbohydrate-binding proteins with the ability to agglutinate erythrocytes, normal and cancer cells, and microorganisms. They are widely distributed in many plants, as well as in animals and other organisms. Lectins are generally most abundant in the seeds of plants, especially in the seeds of legume. A lectin was extracted from seeds of *Crotalaria pallida* and purified by gel filtration on Sephadex G-75 and HPLC cation-exchange on SP-5PW column. A molecular mass of 30kDa was determined by SDS-polyacrilamide gel electrophoresis under non-reducing and reducing conditions. Molecular sieving on a protein Pak 5SW column indicated a molecular mass of 120 kDa, suggesting the tetrameric nature of the native protein. The lectin effectively agglutinates human erythrocytes, trypsinized or intact. The hemagglutination activity was inhibited by raffinose and galactose, and requires divalent cations for hemagglutination, since EDTA and EGTA, inhibited this activity. N-terminal amino-acid sequencing showed a striking similarity with the N-terminal sequence of the other lectins from genus *Crotalaria*. The data obtained for the lectin of *Crotalaria pallida*, when compared with obtained for *Crotalaria juncea* and *Crotalaria striata* they show that in spite of belonging to the same genus they possess different agglutination properties and specificity for carbohydrate, presenting great structural homology meantime, confirming the importance of the lectin as marker taxonomic. This way, the purified lectin and characterized in this work it is constituted in a molecular marker for studies of evolution phylogenetic and speciation of the genus *Crotalaria*, but above all it allows its use as useful biological tool in several areas, as researches on cancer and immunology that request the understanding of the biological processes involved in the cellular recognition.

INTRODUÇÃO

O estudo das lectinas, proteínas de origem não imune, capazes de se ligar a carboidratos e aglutinar células ou precipitar polissacarídeos e glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980), foi iniciado por Kobert e colaboradores ao pesquisarem proteínas tóxicas de espécies de euforbiáceas e leguminosas (Toms e Western, 1971). Entretanto o primeiro a descrever o processo da aglutinação de eritrócitos foi Stellmark, em 1888, ao isolar das sementes de *Ricinus communis*, uma fração protéica altamente tóxica que foi denominada de ricina (Lis & Sharon, 1972, Pusztai, 1991).

Pesquisas posteriores mostraram que outras espécies de plantas também possuíam proteínas com capacidade hemaglutinante. A descoberta da abrina, em 1891, isolada das sementes de *Abrus precatorius*, e da crotina, em 1898, extraída de *Croton tigliu*, merecem destaque pois possibilitaram estudos clássicos que fundamentaram os princípios imunológicos (Toms e Western, 1971; Pusztai *et al.*, 1983a). Em 1898 foi proposto o termo hemaglutinina para denominar esta classe de proteínas, que conforme observado, tinham ação antigênica sem necessariamente serem tóxicas como a ricina e a abrina (Pusztai, 1991).

Em 1908 foi observado que o extrato das sementes de *Phaseolus*, *Ervum*, *Pisum* e *Vicia* exibiam diferença na capacidade de aglutinar eritrócitos de uma mesma espécie, ou seja, havia especificidade de um determinado extrato para uma dada espécie animal. Neste mesmo estudo foi verificado que estas lectinas eram globulinas e possuíam baixa toxicidade, ao contrário da ricina, uma albumina com acentuada toxicidade (Toms e Western, 1971; Toms, 1981; Pusztai, 1991).

Em 1936 foi demonstrado por Sumner e Howell que a aglutinação produzida pela concanavalina A, lectina isolada de *Canavalia ensiformis*, podia ser inibida pela sacarose. Entretanto, somente em 1952 foi demonstrado que os

carboidratos podiam neutralizar a aglutinação de maneira específica (Pusztai *et al.*, 1983a, Pusztai, 1991; Toms e Western, 1971).

Passaram-se quatro décadas até que a especificidade descoberta por Landsteiner & Raubitscheck fosse registrada para os eritrócitos humanos. Renkonen (1948) após estudar 99 espécies de leguminosas verificou que o extrato de 6 delas apresentavam claramente especificidade para os antígenos do sistema ABO. Curiosamente Boyd já havia verificado, que o extrato das sementes de *Phaseolus lunatus* apresentavam especificidade para eritrócitos do grupo A, mas o fato só foi publicado em 1949 (Boyd & Rugera, 1949). Esta descoberta abriu caminho para o uso das lectinas na determinação do grupo sanguíneo, reativando o interesse por estas proteínas e levando ao estudo de muitas espécies vegetais.

Em vista da descoberta da especificidade, Boyd & Sharpleigh (1954) propuseram o termo lectina (derivado do latim 'legere', selecionado, escolhido), como referência às "fitohemaglutininas com especificidade". Em 1972 o termo passou a ser aplicado a todas proteínas ligantes de açúcar, de origem não imune, sejam ou não grupo específico (Sharon & Lis, 1987).

A descoberta feita por Nowell (1960) que a lectina isolada de *Phaseolus vulgaris* tem ação mitogênica sobre os linfócitos da circulação periférica, seguida da observação de Aub *et al.* (1963) que as lectinas podem aglutinar células malignas, foi importante para todos os campos da ciência, particularmente para os estudos relacionados com imunologia e câncer (Lis & Sharon, 1986).

A atual definição para as lectinas, proposta por Goldstein *et al.* (1980), foi adotada pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (IUPAC) em 1981, em oposição à definição de Kocourek & Horejsi (1981) que

visavam um conceito mais amplo que destacasse a ausência de atividade enzimática por parte destas proteínas (Dixon, 1981).

Embora isoladas em maior número de plantas, principalmente de sementes de leguminosas, as lectinas apresentam distribuição universal ocorrendo desde vírus até mamíferos (Lis & Sharon, 1973, Toms, 1981), sua função natural, ainda hoje, é objeto de muita discussão e especulação.

De acordo com Sharon & Lis (1989) as lectinas têm papel fundamental no controle de vários processos normais e patológicos dos seres vivos. Nas enterobactérias as lectinas seriam essenciais à adesão ao epitélio intestinal; nos invertebrados são encontradas na hemolinfa contribuindo na resistência a infecções (papel análogo ao das imunoglobulinas nos vertebrados - já que, em sua maioria, reconhecem e ligam resíduos de ácido siálico). Em animais mais complexos, as lectinas são produzidas na forma solúvel ou se encontram ligadas à membrana (Zatta & Cummings, 1991). Nos venenos ofídicos, supostamente poderiam estar envolvidas em processos metabólicos da própria serpente, não agindo no animal exposto ao veneno (Ogilvie & Gartner, 1984).

As sementes de leguminosas são fontes ricas de lectinas, mas estas também são encontradas nas partes vegetativas das plantas, geralmente, em concentrações menores que as encontradas nas sementes (Pusztai, 1991). Cerca de uma centena delas já foram isoladas e caracterizadas bioquímica e biologicamente (Cavada, 1997). Embora muitas lectinas isoladas das partes vegetativas sejam idênticas às isoladas das sementes isto nem sempre ocorre. Em algumas espécies, as lectinas isoladas de partes vegetativas como raízes, folhas, cascas, flores, bulbos e rizomas diferem das localizadas nas sementes (Law & Strijdom, 1984; Quinn & Etzler, 1987; Hankins *et al.*, 1988).

Os genes para lectinas foram conservados durante a evolução especialmente nas leguminosas (Lis & Sharon, 1986). Parece que os genes de lectina do feijão comum evoluíram por duplicação e divergência de um gene ancestral (todos os genes ainda são unidos) e as proteínas resultantes adquiriram propriedades biológicas diferentes. Isto, provavelmente, também é válido para outros legumes. Nos cereais, as lectinas parecem ter se originado por repetições em tandem que aparentemente surgiram por duplicação deste domínio. Esta combinação de fusão e duplicação de genes de defesa pode ter dado para plantas uma vantagem evolutiva criando proteínas novas com especificidade diversa (Chrispeels & Raikhel, 1991).

As lectinas de leguminosas consistem de duas ou quatro subunidades, com massa molecular variando entre 25 kDa e 30 kDa e cada uma das subunidades possui um sítio de ligação para carboidratos, sendo que o processo é dependente da presença simultânea de Ca^{2+} e Mn^{2+} (ou de outro metal de transição) (Sharon & Lis, 1990). Apenas a arcelina 5a, isolada de *Phaseolus vulgaris*, apresenta estrutura monomérica (Loris *et al.*, 1998). O sítio para ligação ao metal foi descrito em detalhes para a concanavalina A (Hardman *et al.*, 1982) e tem se mostrado bastante conservado em todas outras lectinas de leguminosas (Loris *et al.*, 1998).

Em algumas lectinas as subunidades são capazes de se dissociar e se reassociar, produzindo diferentes formas da mesma lectina. Além disso, cada subunidade pode ser composta por fragmentos polipeptídicos diversos, como no caso da Concanavalina A (Con A). Esta lectina possui estrutura tetramérica que se dissocia em dímeros se o pH for inferior a seis. Mesmo quando cristalizada a Con A apresenta ao menos oito bandas com migração eletroforética diferentes, porém quando complexada a qualquer dos carboidratos específicos, o número de bandas reduz-se a dois, sendo este fenômeno pouco entendido (Akedo *et al.*,

1972; Carvalho, 1990). Outras lectinas também apresentam estrutura quaternária dependente da variação de pH como observado por Calvete *et al.*, 1999.

A lectina do gérmen de trigo (WGA) possui estrutura dimérica e quatro sítios para ligação com açúcares. Por outro lado, embora tetramérica, a lectina de *Dolichos biflorus* possui um único sítio de ligação (Nagata & Burger, 1972; Carvalho, 1990).

A região molecular de ligação ao carboidrato é denominada de domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD), sendo que cada subunidade da lectina possui pelo menos um domínio. A "divalência" ou "polivalência" permite a interação com açúcares localizados na superfície de células adjacentes, resultando em aglutinação destas células (Lis & Sharon, 1986). Os sítios para ligação de carboidratos reconhecem e ajustam-se de acordo com o modelo chave e fechadura, através de um complexo sistema de ligações de hidrogênio. A formação do complexo carboidrato-proteína envolve o deslocamento da molécula de água associada com o grupo polar da proteína e em torno do carboidrato altamente polar, com o estabelecimento de novas pontes de hidrogênio; essas últimas ligações e forças de van der Waals são dominantes na estabilização da ligação (Quioco, 1986).

A presença do CRD não implica, necessariamente, que a proteína que o possui tenha atividade de ligação a carboidratos (Drickamer, 1993), pois algumas proteínas não caracterizadas como ligantes de carboidratos possuem em sua estrutura uma região homóloga ao CRD das lectinas (Hirabayashi *et al.*, 1991). Este domínio ligante de carboidrato pode estar presente em várias proteínas, desempenhando papel de reconhecimento de substrato ou de direcionadora a um sítio específico (Gabijs, 1994).

A capacidade da lectina de se ligar a carboidratos é modulada também por vários outros domínios presentes na molécula (Gabiús, 1994). A interação do CRD com outros domínios adicionais, determina muita das funções das lectinas (Drickamer & Taylor, 1993).

As lectinas de leguminosas, de *Moraceae*, as de animais dependentes de cálcio (tipo C), as galectinas e a hemaglutinina do vírus influenza apresentam CRD composto por aproximadamente 120-250 resíduos e forma uma única subunidade. Enquanto nas lectinas de bulbo e de cereais o CRD possui 40-50 resíduos de aminoácidos (Vijayan & Chandra, 1999).

Na maioria das lectinas de leguminosas a oligomerização se dá pela associação dos domínios de estrutura tipo beta (β sheet). Em Con A e em muitas lectinas de leguminosas a formação do dímero envolve a associação, lado a lado, dos monômeros através da interação entre os 6 domínios de estrutura beta com outros 6 domínios da outra subunidade, formando uma estrutura de 12 domínios (Hardman & Ainsworth, 1972; Becker *et al.*, 1975, Lis & Sharon, 1998; Loris *et al.*, 1998). Esta estrutura é denominada de “canonical legume lectin dimer” (Loris *et al.*, 1998; Vijayan & Chandra, 1999).

As diferenças na estrutura quaternária podem ser responsáveis pelas diferentes propriedades biológicas apresentadas por lectinas altamente homólogas. A lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* apesar da alta similaridade na seqüência de aminoácidos (99%) com a Con A, apresenta tanto *in vivo* quanto *in vitro* marcantes diferenças. Mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação ao carboidrato, produzindo uma estrutura quaternária mais aberta que Con A, pode ser a base para explicar suas distintas atividades biológicas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

Os resíduos de aminoácidos envolvidos nos sítios de ligação a carboidratos, de metais e na cavidade hidrofóbica são completamente conservados nas lectinas de *Diocleinae* até agora seqüenciadas (Calvete *et al.*, 1999). Além disto, as características químicas e físico-químicas destas lectinas são externamente semelhantes, confirmando a alta similaridade entre estas moléculas. Estudos de modelamento de algumas destas lectinas, comparadas com Con A, mostram grandes semelhanças, mas apresentam também algumas modificações nas cadeias laterais envolvidas nos sítios de ligação a carboidratos. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, as diferenças na habilidade de reconhecimento de carboidratos exibido por estas proteínas (Calvete *et al.*, 1999).

Também deve ser considerado que todas as lectinas de *Diocleinae* são na realidade, uma mistura de isolectinas e que as mesmas ocorrem em pH fisiológico com diferentes proporções de suas isoformas (Cavada, 1997). Granjeiro *et al.* (1997) mostraram que a Con Br, lectina de *Canavalia brasiliensis*, possui pelo menos três tipos de subunidade α , o que aumenta significativamente o numero potencial de isoformas desta lectina.

A real função das lectinas em plantas é, até o momento, desconhecida, embora muitas hipóteses sobre suas funções fisiológicas tenham sido sugeridas.

Alguns experimentos sugerem que as lectinas podem ter papel no sistema de reconhecimento celular nas plantas superiores. A interação do pólen com o estigma apropriado pode ser mediada pelas lectinas. O sucesso ou fracasso depende da interação entre as glicoproteínas da superfície do pólen e produtos complementares do estigma. A ligação desencatilha a liberação de água pela célula estigmática, hidratando assim o grão de pólen, permitindo que este germine. Este processo faz parte de um sistema de auto-incompatibilidade, pois impede a fertilização por autofecundação ou o cruzamento entre plantas com os

mesmos alelos, o que ajuda na manutenção da heterozigidade por favorecer a polinização cruzada. Foi demonstrado que a incompatibilidade é determinada pela síntese de certas proteínas, o que ocorre após o reconhecimento da glicoproteína codificada pelo mesmo complexo alélico (Ferrari *et al.*, 1981; Carvalho, 1990).

Algumas evidências permitem sugerir um papel de proteína de reserva para as lectinas: as proteínas de reserva são produzidas durante um estágio específico do desenvolvimento da semente, principalmente para atuar como fonte de nitrogênio durante a germinação e ocorrem como oligômeros compostos por duas ou mais subunidades. As lectinas de sementes seriam uma forma especializada de proteínas de armazenamento que podem ter, ocasionalmente, outras funções (Pusztai, 1991).

As lectinas estão presentes em quantidades apreciáveis nos corpúsculos protéicos da semente e há grandes evidências experimentais que sugerem que algumas lectinas de tecidos (Greenwood *et al.*, 1986, Nsimba-Lubakie e Peumans, 1986) e rizomas (Peumans *et al.*, 1985) estão localizadas nos corpúsculos de proteína destes tecidos e apresentam semelhanças com as proteínas de armazenamento durante o processo de biossíntese e da germinação (Pusztai *et al.*, 1983b, Etzler, 1985), sendo por isto consideradas como proteína de reserva.

Duas outras hipóteses têm atraído muita atenção: a de que as lectinas seriam mediadoras da relação simbiótica entre as bactérias do gênero *Rhizobium* e as leguminosas; e a segunda de que fariam parte do mecanismo de defesa das plantas contra insetos e patógenos microbianos.

A distribuição das lectinas em todos os tecidos da planta, associada à sua capacidade de se ligar aos carboidratos da superfície celular, são características apontadas como indicadoras do papel das lectinas no combate a organismos

patogênicos e insetos predadores. As funções atribuídas às lectinas vegetais como agentes no mecanismo de defesa baseiam-se principalmente na capacidade apresentada por algumas lectinas de se ligarem à parede celular das bactérias. O papel defensivo das lectinas não seria restrito à ação bacteriana, mas impediria o desenvolvimento de fungos e também o ataque de insetos predadores (Toms, 1981, Leach *et al.*, 1982, Pusztai, 1991, Hirsch, 1999, Bladergroen & Spaink, 1998, Sengupta *et al.*, 1997).

A presença das lectinas nas sementes estaria relacionada com papel destas como órgão responsável pela perpetuação da espécie, necessitando portanto, de substâncias que promovam a proteção da informação genética necessária à formação de um novo indivíduo (Xavier-Filho, s/data).

Somente certas bactérias, chamadas diazotróficas ou fixadoras de N_2 , são capazes de transformar o N_2 da atmosfera em NH_3 ou aminoácidos absorvíveis pelas plantas. A associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio é uma característica peculiar das leguminosas sendo conhecido desde o início do século. A simbiose com as bactérias do gênero *Rhizobium* ou *Azorhizobium* pode ser observada pela presença de nódulos nas raízes, ou em certos casos, também no colmo (Döbereiner, 2000). A associação das bactérias à superfície radicular ocorre de modo específico e o primeiro a sugerir o papel das lectinas nesse processo foi Saint-Paul (1961), sem contudo obter resultados conclusivos.

Os inúmeros estudos realizados nas últimas décadas inclusive usando plantas transgênicas (Hirsch, 1999) trouxeram sugestivas evidências da participação das lectinas no processo de mediação da simbiose *Rhizobium*-leguminosas. Contudo o processo de nodulação é complexo e resulta de um grande número de processos interligados, não cabendo superestimar o papel das lectinas no evento (Carvalho, 1990; Pusztai, 1991).

Outros estudos sugerem que as lectinas atuam na organização celular, na embrio-morfogênese, no armazenamento ou transporte de carboidrato (Moreira *et al.*, 1991, Rüdijer, 1997). Certamente a presença nos diferentes tecidos aponta para diferentes papéis fisiológicos, sendo mais sensato considerá-las como multifuncionais, talvez tendo diferentes funções em uma planta ou diferentes funções em diferentes espécies.

Desde sua descoberta as lectinas mostraram um grande número de propriedades químicas e biológicas, o que tem permitido sua utilização como instrumento de pesquisa em diversas áreas como: bioquímica, biologia celular e imunologia, pois constituem um sistema modelo para estudar a base molecular de muitos eventos biológicos que envolvem reconhecimento entre proteínas e carboidratos, como o estabelecimento das infecções, da fertilização, dos processos relacionados ao câncer e ao crescimento e diferenciação celular. s de pesquisa. Mais recentemente, o possível papel das lectinas no processo de fixação do nitrogênio e no combate à agentes patogênicos tem despertado a atenção de grupos interessados no desenvolvimento de plantas geneticamente transformadas, visando a produção de organismos transgênicos que sejam capazes de estabelecer simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio e/ou resistentes a patógenos. (Sengupta *et al.*, 1997; Dempsey *et al.*, 1998; Machuka, 2000).

OBJETIVOS

Este trabalho focaliza o estudo das lectinas de leguminosas e tem como objetivos:

- Pesquisar a presença de lectinas nas sementes de *Crotalaria pallida*;
- Isolar e purificar a lectina (CpL) presente nas sementes de *Crotalaria pallida*;
- Caracterizar a atividade hemaglutinante e de ligação a diferentes carboidratos apresentada pela lectina;
- Determinar a ação de agentes quelantes e redutores sobre a atividade hemaglutinante da lectina;
- Caracterizar bioquimicamente, por eletroforese em gel de poliacrilamida, composição global de aminoácidos e seqüenciamento da região N-terminal, a molécula da lectina;
- Analisar a conservação filogenética da lectina.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO E REAGENTES

As sementes de *Crotalaria pallida* foram doadas pelo Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, Campinas - SP.

Todos os reagentes foram de grau analítico ou HPLC. A resina utilizada para cromatografia de troca iônica foi adquirida da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden) e a coluna de fase reversa (sistema de HPLC) da Waters (EUA). Os reagentes utilizados na determinação da composição de aminoácidos foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e os do seqüenciamento da região N-terminal da Applied Biosystems (Foster City, EUA). Os reagentes para eletroforese foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories (Rachmond, EUA) e os padrões de massas moleculares da Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden).

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA

Extração salina

Sementes inteiras de *Crotalaria pallida* foram trituradas em um triturador de grãos até a obtenção de um material finamente pulverizado que foi homogeneizado com solução salina de NaCl 0,15M (1:10 v/v) permanecendo sob leve agitação por 2 horas à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 3000 x g, por 20 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi utilizado em ensaios de hemaglutinação para determinar a presença de lectinas nas sementes de *Crotalaria pallida* e na etapa seguinte do processo de extração protéica.

Precipitação cetônica

Ao sobrenadante obtido na etapa anterior foi adicionada, lentamente e sob agitação, acetona à temperatura de 4°C, até concentração final de 80 %. Após um período de 30 minutos o material decantado foi centrifugado a 3000 x g por 20 minutos, a 4°C. O precipitado obtido foi seco à temperatura ambiente, pulverizado, ressuspenso em bicarbonato de amônio 0,1 M, pH 8,0, dialisado contra o mesmo tampão e liofilizado.

Cromatografia de exclusão molecular

O material resultante da etapa anterior foi ressuspenso em bicarbonato de amônio 0,1 M, pH 8,0 e submetido à cromatografia em coluna de Sephadex G-75 (102 x 1,9 cm), equilibrada com o mesmo tampão de diluição da amostra.

A eluição foi realizada sob um gradiente linear utilizando-se um fluxo de 12 ml por hora, sendo coletadas frações de 4 ml, monitoradas por leitura da absorbância a 280nm. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas e liofilizadas.

Cromatografia de troca iônica

O material que apresentou atividade hemaglutinante foi submetido à cromatografia de troca iônica, realizada em coluna Protein Pak DEAE 5PW 60 (7,5 x 75 mm), acoplada a sistema de HPLC (Waters), previamente equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 8,0 (tampão A). A purificação foi feita sob um gradiente linear de 0 a 100% de uma solução de NaCl 0,5 M (tampão B), utilizando um fluxo de 1 ml por minuto, sendo as frações monitoradas a 220 nm.

As frações obtidas foram dializadas contra bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0, liofilizadas e utilizadas nos ensaios de hemaglutinação.

Dosagem de Proteínas

As concentrações relativas e quantitativas de proteínas foram estimadas, respectivamente, por leitura da absorbância a 280nm e de acordo com o método descrito por Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

DETECÇÃO DA PRESENÇA DE LECTINAS

Ensaio de hemaglutinação

A detecção da existência de lectinas nas sementes de *Crotalaria pallida* foi determinada através de ensaios de hemaglutinação. A atividade hemaglutinante foi testada sobre eritrócitos humanos e animais, intactos e tripsinizados.

Coleta e preparação dos eritrócitos

O sangue foi coletado assepticamente e homogeneizado em igual volume de solução de Alsever (Bukantz *et al.*, 1946) e centrifugado a 450 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente. Os eritrócitos foram lavados 4 vezes com solução NaCl 0,15 M (1:5 v/v). A tripsinização dos eritrócitos seguiu o descrito por Lis e Sharon (1972), onde para cada 4 ml de eritrócitos lavados foram adicionados 100 ml de PBS (0,8g de NaCl, 0,02g de KCl, 0,17g de Na₂HPO₄ e 0,02g de KH₂PO₄, para 100 ml H₂O) resultando numa suspensão com absorbância 2,0 a 620 nm. A dez partes desta suspensão foi adicionada uma parte de solução de tripsina a 1% (p/v), deixou-se incubar a 37°C por 1 hora.

Os eritrócitos tripsinizados foram, então, lavados 5 vezes com NaCl 0,15 M para remoção da tripsina. Foi preparada uma suspensão a 2% (v/v) em CTBS ou TBS, dependendo do ensaio a ser realizado. A quantidade de eritrócitos por ml na suspensão padrão foi estimada através de contagem em câmara de Neubauer.

Determinação da atividade hemaglutinante

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, os quais foram preenchidos com 50 µl de CTBS e em seguida acrescidos 50µl da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Terminadas as diluições, foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos a 2% (v/v).

As leituras foram realizadas após 1 hora de incubação da placa à temperatura ambiente. A mínima concentração (ou maior diluição) que permite visualização dos eritrócitos aglutinados foi determinada.

Os últimos poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controles.

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE POR CARBOIDRATOS

Ensaio de inibição por carboidrato

Os testes para inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos foram realizados com: D-galactose, D-rafinose, D-glicose, D-sacarose, D-maltose, D-frutose, D-manose, D-galactosamina e D-lactose.

Em placas de microtitulação foram adicionados aos primeiros poços das fileiras 50 μ l do carboidrato em concentrações iniciais de 150 mM, com exceção da lactose e rafinose que tiveram concentrações iniciais de 100 mM. Estes foram diluídos serialmente com 50 μ l de CTBS já presente nos poços da placa. Logo após, 50 μ l da amostra foram adicionados em todos os poços para uma concentração final de 1,0 μ g/ml. As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos e em seguida se adicionou 50 μ l de uma suspensão a 2% de eritrócitos humanos do tipo A tripsinizados. Após uma hora, à temperatura ambiente, foi determinada a menor concentração de cada carboidrato capaz de inibir a aglutinação dos eritrócitos.

Os controles negativos (sem hemaglutinação) constaram de 50 μ l de solução de carboidrato e 50 μ l de suspensão celular, e os positivos (hemaglutinação) de 50 μ l da lectina e 50 μ l de suspensão celular.

Ensaio de Sensibilidade ao Agente Redutor

Em placas de microtitulação 50 μ l de solução de DTT a 5mM foi diluída de modo semelhante aos ensaios já descritos. Adicionou-se 50 μ l da lectina a uma concentração final de 1,0 μ g/ml e incubou-se por 30 minutos à temperatura

ambiente. Em seguida foi adicionada a suspensão de eritrócitos humanos tipo A tripsinizados. Os controles não continham DTT.

Ensaio de Sensibilidade a Agentes Quelantes

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

Na placa de microtitulação 50 μl de soluções de EDTA ou EGTA foram acrescentadas aos primeiros poços e diluídas serialmente em TBS, já presente nos poços. A lectina foi adicionada na concentração final de 1,0 $\mu\text{g/ml}$, e finalmente foram acrescentados 50 μl de suspensão a 2% de eritrócitos humano tipo A tripsinizados. Os controles foram realizados com 50 μl da lectina e 50 μl de suspensão celular, em TBS.

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O gel de poliacrilamida foi realizado segundo o método descrito por Laemmli (1970), com modificações. Os géis de concentração e separação foram obtidos a partir de solução estoque de acrilamida a 30% e de N-N'- metileno bis-acrilamida 0,8%, preparada com água deionizada e mantida em refrigeração, a 4 $^{\circ}\text{C}$, em frasco âmbar.

O gel de concentração a 5% foi preparado em tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 , e o gel de separação 15%, em tampão Tris-HCl 0,3 M, pH 8,6, sendo

acrescentado a ambos dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20%. A polimerização foi conseguida pela adição de N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio a 10% (PSA).

As amostras (10-50 µg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8, contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e 0,1% de azul de bromofenol, sendo imersas em água em ebulição por 1 minuto. Como redutor foi utilizado DTT, a concentração final de 0,1 M. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1%, a 100 volts durante 2 horas.

Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa) (Pharmacia Electrophoresis Calibration Kit LMW).

Os géis depois de retirados das placas foram corados com Coomassie Blue a 0,1% em ácido acético, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v) durante 2 horas e então descorados em solução de ácido acético glacial, metanol e água na proporção de 1:4:5 (v/v/v).

COLORAÇÃO PARA CARBOIDRATOS

A coloração específica para determinar a natureza glicoprotéica da lectina isolada de *Crotalaria pallida* foi realizada segundo a técnica de Korn e Wright (1973). O gel de poliacrilamida a 15%, sem SDS, foi fixado por uma hora em ácido tricloroacético (TCA) a 12,5% (v/v), lavado 3 vezes em água deionizada e incubado por uma hora em ácido periódico a 1% (p/v) em ácido acético 3% (v/v), sendo em seguida lavado por três vezes com água deionizada e deixado por um período de 12 horas, também em água deionizada. Após a remoção da água o gel

foi corado com reativo de Schiff durante uma hora e depois lavado rapidamente com metabissulfito de sódio a 0,5% (p/v) e deixado por 10 minutos em ácido acético a 3%, para retirar o excesso de corante e depois mantido em água. Todas as etapas foram desenvolvidas na ausência da luz.

ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS

O sistema utilizado foi o do analisador Pico-Tag da Waters, onde a identificação dos aminoácidos das proteínas ou peptídeos foi feita através da cromatografia em HPLC do derivado feniltiocarbamil (PTC) do aminoácido, proveniente da derivatização com fenilisotiocianato dos aminoácidos, obtidos através de hidrólise ácida. Esta forma de cromóforo pode ser detectada a partir de 1 picomol.

Preparação da Amostra

Quantidades entre 0,5 - 10 μg de proteína ou peptídeo, dissolvidos em água e acetonitrilo (1:1) (v/v) foram transferidas para pequenos tubos de reação com volume máximo de 20 μl , o qual foi transferido para o frasco de reação, que possui tampa especial, para a conexão com o sistema de vácuo e atmosfera de nitrogênio.

Hidrólise ácida

As hidrólises foram efetuadas colocando-se no fundo do frasco de reação 100 μl de uma solução de HCl 6M, onde foi adicionado fenol (1 mg/ml), para evitar a formação de clorotirosina. Em seguida foi feito vácuo próximo a 1-2 Torr até

início do borbulhamento do HCl. O vácuo foi fechado e deixou-se entrar nitrogênio (SS - ultrapuro) durante 5 segundos. Estas etapas foram repetidas por três vezes sendo por último feito vácuo até 1 Torr. O frasco foi fechado e removido para o forno de hidrólise a 105°C por 24 horas. Após este período, os tubos de reação foram colocados a vácuo até 65 miliTorr, para a secagem das amostras hidrolisadas.

Derivatização

As amostras hidrolisadas foram lavadas com 20 µl de uma solução de metanol: água: trietilamina (2: 2: 1) (v/v). Cada tubo foi agitado, centrifugado e colocado a evaporar em vácuo até a leitura de 65 miliTorr. Este procedimento remove sais e solventes que possam estar adsorvidos nos aminoácidos.

Uma solução fresca de derivatização preparada com metanol: trietilamina: água: fenilisotiocianato na relação 7: 1: 1: 1 (v/v), foi adicionada (20 µl) a cada tubo de reação, e estes deixados a temperatura ambiente por um período de 30 minutos. Após a derivatização as amostras foram secas a vácuo até a leitura de 50 miliTorr, para a remoção de todo o PITC. Cada amostra foi dissolvida em 50 µl de uma solução 0,4 mM de fosfato de sódio, cujo pH foi titulado a 7,4 com ácido fosfórico a 10%, sendo adicionado 5% de acetonitrila.

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

SEQUENCIAMENTO AMINO TERMINAL

Degradação automática de Edman

O seqüenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman & Begg (1967), para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após ativação de um filtro composto de papel e fibra de vidro, a proteína é covalentemente unida a este suporte e, em seguida colocado na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilinoctiazolinona (ATZ). O ATZ-aminoácido é automaticamente transferido para uma segunda câmara de reação, onde ocorre a conversão para um derivado mais estável, na forma de feniltiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH). O PTH-aminoácido é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta pressão onde a identificação é realizada em comparação a uma cromatografia de um padrão de PTH-aminoácidos. O seqüenciador utilizado foi o modelo 477A, que utiliza, para a identificação dos PTH-aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120A, ambos da Applied Biosystem.

Reagentes e solventes são transferidos para a câmara de reação e conversão por controle automático através de um micro processador, permitindo seqüências automáticas em alta sensibilidade entre 10 - 500 picomoles de proteína ou peptídeos. Os reagentes utilizados foram: R1, 5% fenilisotiocianato (PITC) em n-heptano; R2, 12,5% trimetilamina (TMA) em água; R3, ácido trifluoroacético (TFA), com 0.002% de ditioneitol (DTT); R4, 25% TFA em água

com 0,01% DTT; R5, acetonitrila, com 0.001% DTT; S1 n-heptano; S2, etilacetato; S3, 1-clorobutano; S4, 20% acetonitrila em água.

Ativação do filtro

Um filtro de fibra de vidro é tratado com BioBrene. Esta ativação é realizada na câmara de reação do seqüenciador, onde está programado a realizar dois ciclos de reação, para a completa ativação e eliminar o excesso de reagentes, que poderiam interferir durante as etapas da degradação de Edman. A amostra, quando adicionada ao filtro, ficará imobilizada e pronta, para iniciar o seqüenciamento. A capacidade máxima é cerca de 30 μ l ; mas quando necessário, aplica-se maior volume e seca-se o filtro com nitrogênio após cada aplicação.

Ciclo de reação

As etapas da degradação de Edman denominadas de acoplamento, que consiste na união do PITC com o aminoácido da cadeia polipeptídica e a etapa de clivagem para a formação do ATZ aminoácido, ocorrem na câmara de reação, que consiste de dois blocos de vidro, onde internamente está uma pequena câmara com o filtro ativado. Todas as etapas de reação ocorrem no ciclo chamado Normal-1, que tem um período de duração de 43 minutos e 32 segundos . O reagente R2 (TMA) proporciona o pH básico (9,0 - 9,5), para que o PITC acople ao aminoácido N-terminal do peptídeo. R3, que consiste de TFA, é usado para clivar o aminoácido unido ao PITC do resto da cadeia polipeptídica, produzindo o derivado anilintiazolinona (ATZ) do aminoácido. Após a etapa de

clivagem a proteína é deixada com um novo amino terminal, pronto para o próximo ciclo de degradação.

Ciclo de conversão

Nessa etapa da degradação de Edman, o ATZ aminoácido é transferido da câmara de reação pelo solvente S3 para a câmara de conversão. O ATZ é um derivado instável, sendo desejável sua conversão para um isômero mais estável que é a feniltiohidantoína do correspondente aminoácido (PTH aminoácido). A câmara de conversão consiste em um tubo cônico com um volume interno de 1 ml, para onde são enviados os reagentes químicos necessários para o ciclo de conversão, sendo mantida a temperatura constante de 62°C e possui um período de duração de 44 minutos e 1 segundo.

Identificação dos PTH aminoácidos

Após ter completado um ciclo de conversão, uma alíquota do PTH aminoácidos é transferida para o coletor de frações e pode ser monitorada para confirmar a presença de PTH-S-CMCYS (feniltiohidantoína-S-carboximetil cisteína). O restante da amostra é injetado imediatamente no HPLC, para identificação e quantificação dos aminoácidos, que é feita em comparação com uma análise padrão de PTH aminoácidos.

RESULTADOS

Deteção de lectinas nas sementes de *Crotalaria pallida*

Os resultados positivos de hemaglutinação foram detectados visualmente através da formação, após 1 hora de incubação, de uma malha ou rede de hemácias que cobria o fundo e os lados dos poços. Foram considerados negativos para hemaglutinação os poços onde se visualizava um botão compacto de células no fundo do poço.

Os testes utilizando o extrato bruto obtido das sementes de *Crotalaria pallida* indicaram a presença de lectinas, já que este foi capaz de aglutinar eritrócitos intactos humanos tipo A. A presença de lectina foi confirmada nos testes realizados com o material obtido da precipitação protéica.

Os ensaios foram repetidos com as frações obtidas durante as diferentes etapas da purificação da lectina e com a lectina purificada (CpL).

Determinação da atividade hemaglutinante

A Tabela 1 mostra a concentração mínima de CpL capaz de aglutinar os eritrócitos na concentração final de 2 % (v/v), ou seja, na quantidade estimada em câmara de Neubauer de $6,0 \times 10^6$ células/ml. A atividade hemaglutinante da lectina foi testada sobre eritrócitos humanos (sistema ABO), de porco e de boi, tanto intactos quanto sensibilizados por tripsinização. Os ensaios utilizando eritrócitos humanos intactos e tripsinizados do tipo A, B, AB e O, indicam que a lectina não apresenta especificidade para um tipo particular de eritrócitos, pois foi capaz de aglutinar todos os tipos de eritrócitos, com exceção das células sanguíneas tipo O.

Eritrócitos intactos e tripsinizados de porco não foram aglutinados pela lectina, em concentrações máximas de até aproximadamente 62,75 µg/ml. Contudo a lectina apresentou atividade sobre os eritrócitos intactos e tripsinizados de bovinos.

Inibição da hemaglutinação por carboidratos.

Com base nos resultados obtidos nos testes de hemaglutinação, os eritrócitos humanos tipo A foram selecionados para os testes de inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos. Como mostrado na tabela 2, a atividade hemaglutinante induzida por 1,0 µg/ml de CpL sobre eritrócitos humanos tipo A tripsinizados é especificamente inibida na presença de 25 mM de rafinose e 37,5 mM de galactose.

Os outros carboidratos, testados até uma concentração de 150 mM, não tiveram nenhum efeito inibitório sobre a hemaglutinação induzida pela lectina.

Requerimento de cátions divalentes

A lectina demonstrou requerer cátions divalentes para sua atividade hemaglutinante (Tabela 3). EDTA e EGTA inibem completamente a hemaglutinação induzida por 1,0 µg/ml de CpL em eritrócitos humanos tripsinizados, caracterizando e confirmando a dependência de íons cálcio na atividade hemaglutinante de CpL.

Sensibilidade de CpL a agente redutor

A incubação prévia de CpL com DTT inibe a hemaglutinação induzida por 1,0 $\mu\text{g/ml}$ de CpL sobre eritrócitos humanos tipo A tripsinizados. De acordo com a Tabela 3, a lectina quando submetida às condições redutoras de 4,8 μM DTT não foi capaz de provocar a aglutinação de eritrócitos tipo A.

Tabela 1: Atividade hemaglutinante de CpL sobre diferentes eritrócitos na presença de 5 mM de CaCl₂.

Eritrócitos	Concentração mínima Hemaglutinante de CpL	
	Intactos	Tripsinizados
A	7,81 µg/ml	0,46 µg/ml
B	15,62 g/ml	0,46 µg/ml
AB	7,81 µg/ml	0,46 µg/ml
O	Na	na
Boi	46,46 µg/ml	2,30 µg/ml
Porco	Na	na

(na) não ocorreu hemaglutinação até concentração de 62,75 µg/ml de CpL.

Tabela 2: Efeito de carboidratos na hemaglutinação induzida por CpL. Concentração Mínima do carboidrato que inibe a hemaglutinação (CMic).

Carboidrato	CMic (mM)
D-galactose	37,5
D-rafinose	25,0
D-glicose	> 150
D-sacarose	> 150
D-maltose	> 150
D-frutose	> 150
D-manose	> 150
D-galactosamina	> 150
D-lactose	> 150

Concentração de CpL previamente ajustada para 1,0 $\mu\text{g/ml}$, utilizando-se eritrócitos humanos tripsinizados tipo A.

Tabela 3: Efeito de agentes quelantes de cátions divalentes e agente redutor na hemaglutinação induzida por CpL (CMIq).

Agente Inibidor	CMIq (μM)
EDTA	24,3
EGTA	24,3
DTT	4,8

CpL na concentração ajustada para 1,0 $\mu\text{g/ml}$ e eritrócitos humanos tipo A a 2%.

Cromatografia de exclusão molecular

A figura 1 mostra o perfil cromatográfico do precipitado protéico das sementes de *Crotalaria pallida* em coluna de Shephadex G-75. As frações indicadas (—) apresentaram capacidade de aglutinar eritrócitos humanos.

Cromatografia de troca iônica em sistema HPLC

As frações hemaglutinantes provenientes da cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75), foram reunidas e liofilizadas. Este material foi, então, submetido a recromatografia em coluna de troca iônica (Protein Pak DEAE 5PW 60) acoplada a sistema de HPLC. Foi obtido o perfil mostrado na figura 2. A atividade hemaglutinante foi localizada no pico indicado (↓), denominado CpL.

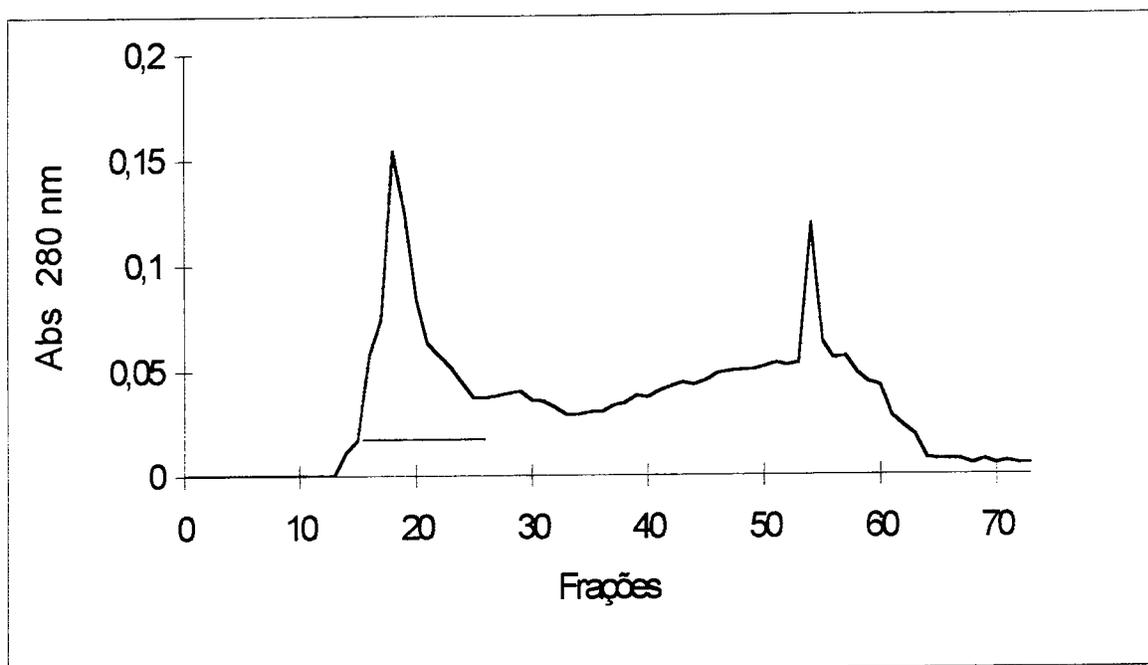


Figura 1- Perfil cromatográfico do precipitado protéico das sementes de *Crotalaria pallida* em coluna Sephadex G-75. O material foi eluído em solução de bicarbonato de amônio a um fluxo de 12 ml/h. As frações indicadas (—) apresentaram atividade hemaglutinante.

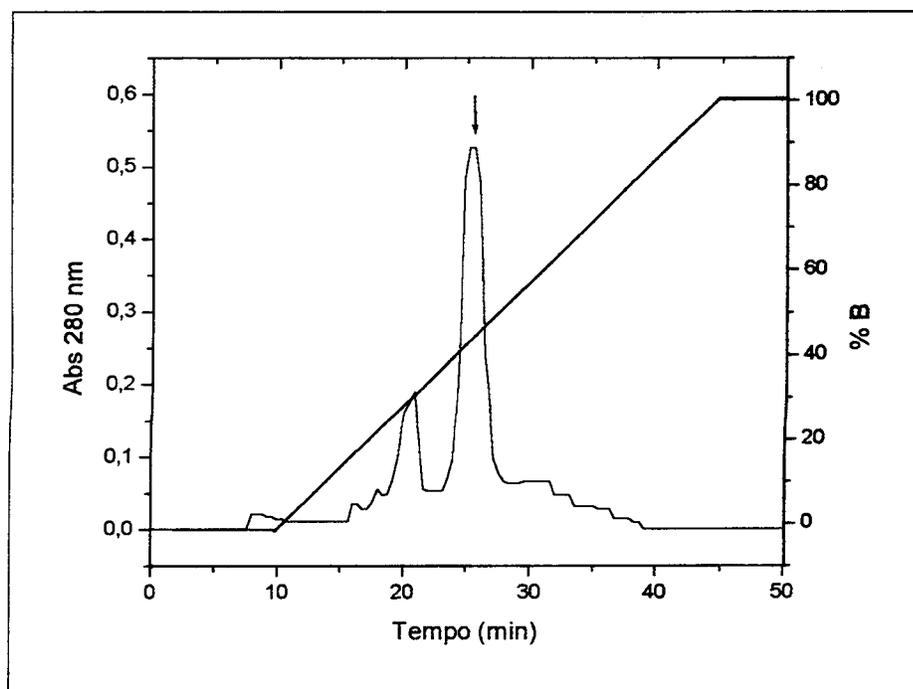


Figura 2 - Repurificação das frações hemaglutinantes (proveniente da cromatografia em Sephadex G-75) em troca iônica por HPLC utilizando coluna Protein Pak DEAE 5PW 60 (7,5 x 75 mm). A purificação foi feita sob um gradiente linear de 0 a 100% do tampão B (solução de NaCl 0,5 M) a um fluxo de 1 ml por minuto. O pico indicado pela seta apresentou atividade hemaglutinante, sendo eluído aos 25 minutos na concentração de 45% do solvente B.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A figura 3 representa o perfil eletroforético das etapas de purificação da lectina de *Crotalaria pallida*: marcadores de massa molecular (pista A); extrato total (pista B); precipitado cetônico (pista C); pico ativo proveniente de G-75 (pista D) e a lectina isolada (CpL) em condições não redutoras (pista E).

Na figura 4 é observada o perfil eletroforético da lectina isolada de *Crotalaria pallida* (CpL) em condições não redutoras (pista B) e redutoras (pista C), que migrou como uma banda única protéica. A distância percorrida pelos marcadores de massa molecular e pela amostra foi calculada em centímetros e utilizada nos cálculos de regressão linear para determinação da massa molecular de CpL que migrou paralelamente à anidrase carbônica. Esta posição correspondeu a uma massa molecular calculada de 30 kDa.

Coloração para glicoproteínas

Gel de acrilamida a 15% em condições nativas foi submetido à coloração para carboidratos e apresentou reação positiva para o reativo de Schiff (figura 5), sugerindo que esta proteína contém resíduos de açúcares ligados covalentemente à sua estrutura, tratando-se de uma glicoproteína.

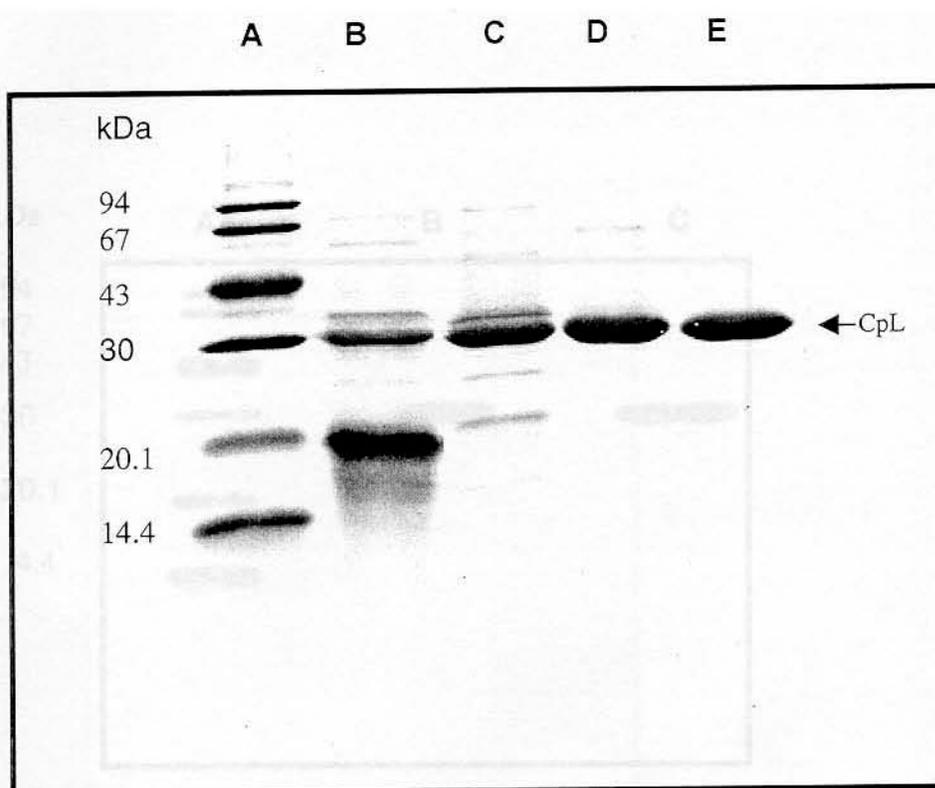


Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%), com SDS em condições não redutoras, das etapas de purificação da lectina isolada de *Crotalaria pallida*. Marcadores de massa molecular (pista A): fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa); extrato total (pista B); precipitado cetônico (pista C); pico ativo proveniente de G-75 (pista D) e a lectina isolada em condições não redutoras (pista E).

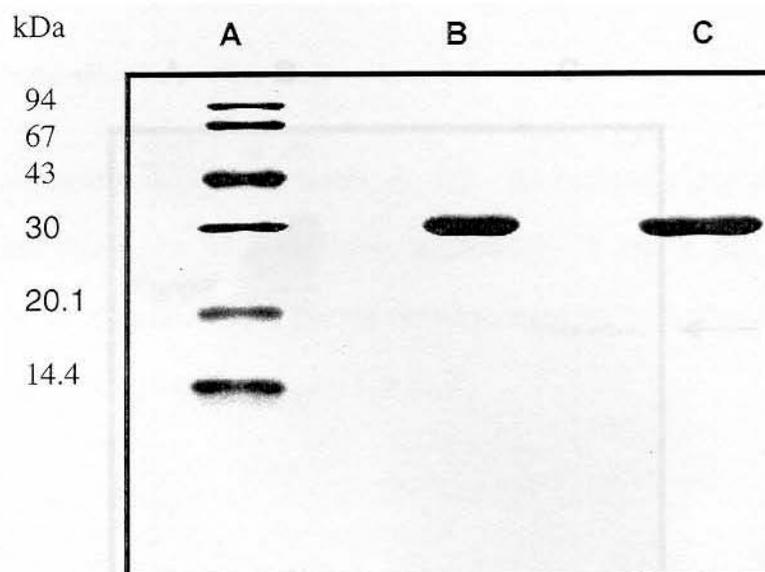


Figura 4 – SDS PAGE (15%) de CpL em condições não redutoras (pista B) e redutoras (pista C). Na pista A os marcadores de massa molécula: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e lactoalbumina (14,4 kDa).

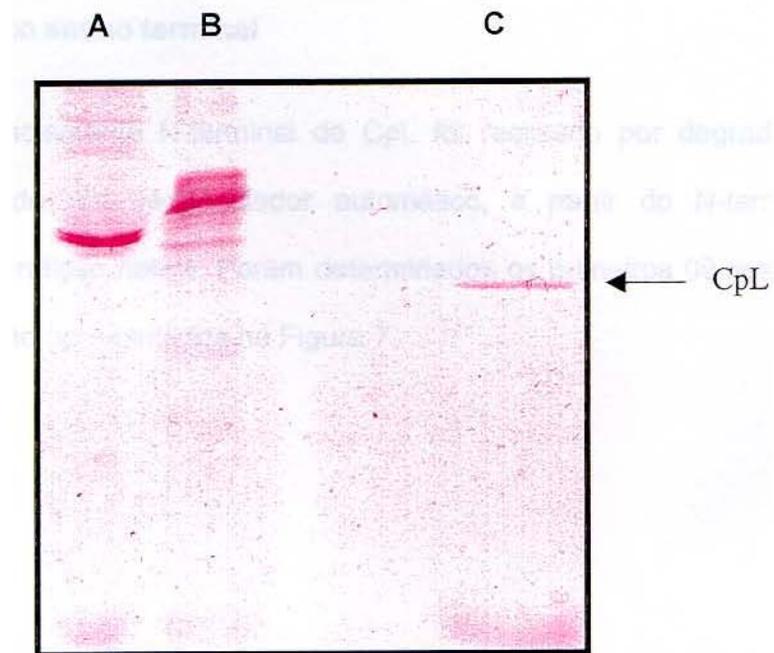


Figura 5 – Coloração para detecção de glicoproteínas – reagente de Schiff. Na faixa C foi aplicada a lectina isolada de *Crotalaria pallida* (CpL). Nas faixas A e B foram aplicadas Albumina e Asialofetuína, respectivamente, como controle.

Análise da composição de aminoácidos

Os resultados da composição global de aminoácidos são apresentados nas Tabelas 4 e 5. A metodologia empregada não detectou a presença de resíduos de triptofano, cisteína e prolina.

Seqüenciamento amino terminal

O seqüenciamento N-terminal de CpL foi realizado por degradação de Edman, utilizando um seqüenciador automático, a partir do N-terminal da molécula, em condição nativa. Foram determinados os primeiros 09 resíduos da molécula, que são apresentados na Figura 7.

Tabela 4 - Composição de aminoácidos de CpL.

Aminoácido	Número de Resíduos^d (mol/mol)
Asx ^a	36
Glx ^b	27
Ser	24
Gly	27
His	04
Arg	06
Thr	30
Ala	22
Pro ^c	--
Tyr	09
Val	25
Met	0
1/2 Cys ^c	--
Ile	10
Leu	22
Phe	18
Lys	14
Trp ^c	--
Total	274

a- O número de resíduos Asx, é a soma dos resíduos de ácido aspártico com os de asparagina;

b- Glx, é a soma dos resíduos de ácido glutâmico e glutamina.

c- nd; não determinado.

d- Determinado como valor integral mais próximo.

Tabela 5- Composição percentual de aminoácidos de CpL.

Aminoácido	Número de Resíduos^d	% resíduo	Massa Resíduos
Asx ^a	36	13,1	115,11
Glx ^b	27	9,9	129,13
Ser	24	8,8	87,09
Gly	27	9,9	57,07
His	4	1,4	137,13
Arg	6	2,1	156,21
Thr	30	10,9	111,12
Ala	22	8,0	71,09
Pro ^c	--	--	--
Tyr	9	3,3	114,15
Val	25	9,1	163,13
Met	0	0	131,21
½ Cys ^c	--	--	--
Ile	10	3,6	113,17
Leu	22	8,0	113,17
Phe	18	6,6	147,19
Lys	14	5,1	128,19
Trp ^c	--	--	--
Total	274		

a- O número de resíduos Asx, é a soma dos resíduos de ácido aspártico com os de asparagina;

b- Glx, é a soma dos resíduos de ácido glutâmico e glutamina.

c- nd; não determinado

d- Determinado como valor integral mais próximo

DISCUSSÃO

O gênero *Crotalaria* abriga cerca de 500 espécies amplamente distribuídas, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. São plantas anuais ou perenes, herbáceas ou arbustivas, com frutos inflados, com grande espaço vazio no interior, cujas sementes quando maduras fazem um barulho de chocalho muito característico, semelhante ao dos guizos das cascavéis. Vindo daí também a denominação do gênero: *Crotalaria* (Heywood, 1971; Dickison, 1981).

Algumas espécies apresentam valor econômico sendo utilizadas na produção de fibras, como pastagens, como adubo verde, no controle da erosão do solo; na para produção de ração animal, como planta ornamental e na medicina popular (Duke, 1980).

No Brasil são conhecidas aproximadamente 35 espécies introduzidas ou nativas, que são conhecidas pelo nome vulgar de guizo-de-cascavel, cascavelera e chique-chique, em referência ao ruído, produzido pelas sementes maduras no interior do fruto. Dentre as espécies que ocorrem no Brasil está *Crotalaria pallida*.

Embora cerca de uma centena de lectinas de plantas já tenham sido isoladas e caracterizadas bioquímica e biologicamente (Cavada, 1997), a grande maioria proveniente de espécies da família Leguminosae, principalmente da subfamília Papilionoideae, composta por 500 gêneros, há uma evidente lacuna na literatura em relação as lectinas do gênero *Crotalaria*. Apesar do seu grande número de espécies apenas duas lectinas tiveram a seqüência da região N-terminal determinada (Foliers *et al.*, 1979; Khang *et al.*, 1990). Até o momento nenhuma lectina do gênero *Crotalaria* teve a seqüência de aminoácidos completa determinada, embora o gene da subunidade maior da ribulose carboxilase isolada dos cloroplastos de *C. pallida*, *C. incana* e *C. capensis*, tenha sido determinada. (Käss & Wink, 1995).

Neste trabalho isolamos e caracterizamos uma lectina presente nas sementes de *Crotalaria pallida*. A detecção da presença da lectina foi realizada através de ensaios de hemaglutinação e sua purificação foi obtida por meio de técnicas cromatográficas.

A mais conhecida propriedade das lectinas é a atividade aglutinante, sendo a que a detecção de lectinas é realizada, principalmente, através do ensaio de hemaglutinação, de modo que a vasta maioria das pesquisas tem restringido sua investigação contra os antígenos do sistema ABO dos eritrócitos humanos (Ersson, 1973; Toms, 1981; Khang, 1990). Entretanto uma lectina pode não hemaglutinar eritrócitos humanos ou não possuir especificidade para um grupo sangüíneo, mas mostrar variabilidade de atividade sobre os eritrócitos de outras espécies e às vezes diferenças entre indivíduos de uma mesma espécie (Scheinberg e Reckel, 1960).

Os ensaios de hemaglutinação podem apresentar resultado falso negativo caso a lectina coexista com inibidores, como substâncias presentes no sangue, glicoproteínas contendo ácido siálico, amins heterocíclicas, carboidratos ou certos íons metálicos, ou ainda, se os receptores presentes nas células não existam em número suficiente ou estejam inacessíveis (Toms, 1981).

Certas lectinas não aglutinam eritrócitos a não ser que sejam pré-tratadas com uma protease, que remove obstruções dos receptores da superfície da membrana tornando-os acessíveis ao sítio de ligação da lectina.

A remoção do ácido siálico da superfície celular pode aumentar a aglutinação como resultado da diminuição da repulsão eletrostática entre as células e as lectinas; além de permitir a interação com potenciais receptores da membrana que se encontrem obstruídos (Toms, 1981; Lis & Sharon, 1981).

Em todo caso, a interação da lectina com eritrócitos ocorre porque estes possuem receptores similares àqueles contra o qual a lectina foi desenvolvida. Certamente, a ocorrência de lectinas aponta para papéis adicionais e é apropriado pensar em lectinas como moléculas multifuncionais, tendo mais de uma função em uma determinada espécie ou tendo função diferente em diferentes espécies (Toms, 1981).

Os testes mostram que a lectina isolada de *Crotalaria pallida* não apresenta especificidade para um determinado tipo de eritrócito humano. A lectina promoveu aglutinação das células tipo A, AB e B não reagindo com células tipo O, mesmo após estas serem tratadas com tripsina. A tripsinização dos eritrócitos A aumentou em 17 vezes a sensibilidade destes à proteína, sendo que em relação aos eritrócitos B a potencialização foi de 33 vezes. A tripsinização também produziu uma maior afinidade da lectina com os eritrócitos bovinos.

Os eritrócitos de porco não aglutinam na presença de CpL, nem em concentrações que chegaram a 62,75 µg/ml, mesmo tendo a sensibilidade aumentada pela tripsinização.

Estes resultados quando confrontados com os obtidos por Ersson (1973, 1977), para *Crotalaria juncea* e por Khang *et al.* (1990) para *Crotalaria striata*, mostram que CpL apresenta um padrão de aglutinação mais próximo do observado para *C. juncea* já que esta não possui significante especificidade para nenhum dos tipos sangüíneos, mas aglutina os eritrócitos O, o que não foi observado em relação a *Crotalaria pallida*. A lectina de *Crotalaria striata* diferentemente das outras duas isoladas do gênero, apresenta destacada especificidade para eritrócitos tipo A, sendo monoespecífica (Khang *et al.*, 1990).

Toms (1981) fornece um amplo levantamento de estudos que mostram a existência de variação no padrão de hemaglutinação entre variedades e até entre espécimes. Segundo o autor, *Phaseolus lunatus* é um impressionante exemplo de variação na capacidade e especificidade de hemaglutinação quando analisadas os resultados apresentados pelas diferentes variedades. Outros exemplos apontados são *Vigna mungo* e *V. caracalla*.

A espécie *Phaseolus vulgaris* possui várias variedades com ausência de lectinas, sendo que em uma determinada variedade algumas sementes são capazes de aglutinar células de coelhos e outras não. Em *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* foram detectadas populações com e sem lectina. Quatro de nove populações apresentavam resultados positivos ou negativos dependendo das sementes utilizadas, enquanto outras cinco eram uniformes nos resultados positivos (Tobiska, 1964, *apud*. Toms, 1981). Assim, diferenças entre trabalhos são comuns. (Toms, 1981). Uma complicação adicional na interpretação de especificidade das lectinas é que às vezes as reações alteram com idade de semente e com o modo de armazenamento.

Diferenças quanto à presença de lectina foram observadas no gênero *Mucana*, particularmente para a espécie *M. pruriens* de diferentes origens geográficas. Em 1994, Mo e Goldstein isolaram uma lectina das sementes de *Mucana derringiana*, demonstrando a presença de lectinas em espécie do gênero. Posteriormente, Siddhuraju *et al.* (1996), trabalhando com sementes de outra espécie, *M. pruriens*, coletadas na Índia, também observaram a presença de lectinas. Contudo, Udebila e Carlini (1998) não encontraram a proteína nos espécimes que ocorrem no Brasil. Machuka (2000) trabalhando com onze variedades de *Mucana pruriens* originárias da Nigéria não observou aglutinação

sobre eritrócitos tripsinizados de coelhos. Para o autor este fato indica a ausência de lectinas ou sua existência em baixos níveis, ou ainda que esta não é reativa para o sangue de coelhos, mas poderia ter ação sobre eritrócitos de outras espécies, apesar de Udeliba e Carlini (1998) também não tenham encontrado atividade aglutinante sobre eritrócitos de coelhos, porcos e humanos. Para Machuka *et al.* (2000) isto sugere que fatores ecológicos e climáticos podem influenciar nos níveis e concentrações das lectinas.

Não são raros os exemplos de lectinas de uma mesma fonte que demonstram especificidade diferente entre si (Cavalcanti, 1994). As três formas moleculares observadas para a lectina isolada das sementes de *Cratylia mollis*, apresentaram diferenças quanto ao comportamento eletroforético, reconhecimento para carboidratos e especificidade para eritrócitos, além de mostrarem diferenças no padrão de subunidades (Correia, 1989; Paiva e Coelho, 1992).

É interessante registrar que as espécies do gênero *Crotalaria* também se distinguem quanto à sua atividade de inibição sobre serinoproteinases, conforme observado por Pando (1996) ao estudar os inibidores de protease presentes nas sementes de *Crotalaria paulina*, *Crotalaria juncea* resistente à murcha bacteriana e *Crotalaria juncea* não resistente à murcha bacteriana. Portanto é importante saber qual variedade é usada quando da determinação da atividade de hemaglutinante, pois um resultado publicado para uma determinada espécie pode não ser válido para toda variedade daquela espécie.

A hemaglutinação produzida por CpL foi inibida pela ação de D-rafinose e D-galactose, porém somente a partir de concentrações de 25 e 37,5 mM, respectivamente. Os açúcares: D-glicose, D-sacarose, D-maltose, D-frutose, D-

manose, D-galactosamina e D-lactose, não apresentaram efeito inibitório mesmo quando utilizados em concentrações iguais ou superiores a 150 mM. A inibição da aglutinação com açúcares contendo resíduos de galactose também foi observada para as outras lectinas do gênero. Para *C. juncea* foram encontrados os seguintes carboidratos: lactose, melibiose, rafinose, N-acetil-D-galactosamina, D-galactose e D-galactosamina, em ordem decrescente de afinidade (Ersson, 1973). Já a lectina isolada de *C. striata* apresentou especificidade para N-acetil-D-galactosamina, seguida de D-galactose, D-galactosamina (Khang *et al.*, 1990).

Embora a hemaglutinação produzida por CpL tenha sido inibida por D-rafinose e D-galactose, os epímeros de D-galactose, mesmo quando utilizados em altas concentrações, não apresentaram o mesmo efeito. A lectina isolada de *Mucuna derringiana* demonstrou o mesmo comportamento, pois apesar de inibida por N-acetil-D-galactosamina e D-galactose, não teve sua afinidade aos eritrócitos influenciada por D-talose, D-gulose e D-glicose, epímeros de D-galactose. Para Mo e Goldstein (1994) isto indica que todos os grupo hidroxila da galactose podem estar envolvidos na ligação com a lectina, embora em graus diferentes; pois os grupos C-3 e C-4 são os que mostram maior importância na ligação à lectina.

As altas concentrações de galactose necessárias para inibição da atividade hemaglutinante de eritrócitos tratados com tripsina não são incomuns para lectinas de plantas (Peumans *et al.*, 1984, Higuchi *et al.*, 1986; Cavada *et al.*, 1998, Machuka *et al.*, 1999).

É importante registrar que o extrato bruto e o precipitado cetônico das sementes de *Crotalaria pallida* não foram inibidos por nenhum dos carboidratos que agiram sobre a lectina isolada. De acordo com Cavalcanti (1994), que

também encontrou resultados semelhantes ao estudar *Swartzia pickellii*, não se afasta a possibilidade de ocorrerem modificações no sítio de ligação para carboidratos da lectina durante o processo de purificação, mesmo quando este se dá em apenas duas etapas. Para Ersson (1973) estas diferenças provavelmente são devidas à presença, nos extratos, de inibidores do açúcar.

A atividade hemaglutinante também foi inibida quando a lectina foi submetida a tratamento térmico (dados não mostrados) ou tratamento químico. A estabilidade térmica da lectina foi testada para um intervalo de temperatura variando de 30-100°C, tendo sido observada perda completa da atividade para temperaturas acima de 80°C, este resultados estão condizentes com os resultados encontrados para a lectina isolada das sementes *Sphenostyles stenocarpa* (Machuka *et al.*, 1999).

Perda da atividade por ação de agentes quelantes de cálcio e íons divalentes, também foi observada como mostram os ensaios com EDTA e EGTA. A necessidade de cálcio e magnésio (ou outro metal de transição) geralmente é necessária para ligação das lectinas de leguminosas ao carboidrato (Sharon, 1993).

Ensaio envolvendo a estabilidade química da molécula auxiliam no entendimento da relação estrutura função da lectina. Uma bem conduzida pesquisa neste campo foi realizada por Sikdar & Chatterjee (1990) em relação a lectina isolada das sementes de *Crotalaria strita*.

O estudo envolveu a utilização de reagentes específicos capazes de modificar os diversos grupamentos de determinados aminoácidos. Os efeitos sobre a lectina dependeram dos tipos de alterações produzidas e dos aminoácidos envolvidos, indo da relativa ausência de danos à perda total das

atividades. Resumidamente pode-se dizer que os resultados indicaram que triptofano, tirosina, ácido aspártico e ácido glutâmico são essenciais para o funcionamento da lectina (Sikdar & Chatterjee, 1990).

O perfil eletroforético da lectina isolada das sementes de *Crotalaria pallida* (CpL) realizada em gel de poliacrilamida com SDS, em condições redutoras e não-redutoras, mostrou apenas uma banda protéica e confirmou a pureza do material, que migrou paralelamente à anidrase carbônica, marcador de massa molecular de 30 kDa. A massa molecular aparente da proteína em condições nativas foi determinada por filtração em gel utilizando coluna Protein Pak 300 Sw acoplada a sistema HPLC, tendo sido obtido um valor estimado de 120 kDa, indicando tratar-se de um tetrâmero constituído de quatro subunidades de 30 kDa, ligadas por ligações não covalentes. Esses resultados indicam que a estrutura quaternária da molécula possui características comuns às lectinas de leguminosas, geralmente constituída de duas ou quatro cadeias iguais com massa de 25-30kDa (Sharon & Lis, 1990).

As lectinas isoladas das sementes de *Crotalaria striata* (Khang *et al.*, 1990) e *Crotalaria juncea* (Ersson, 1977, Foreis *et al.*, 1979) também são tetrâmeros compostos de subunidades de 30 kDa.

As lectinas geralmente são glicoproteínas e CpL e as lectinas *Crotalaria striata* (Khang *et al.*, 1990) e *Crotalaria juncea* (Foreis *et al.*, 1979) também pertencem a esta classe de proteínas. Segundo Carvalho (1990) a porção glicídica das glicoproteínas possui papel crítico em eventos específicos da biologia da célula e remoção ou alteração da estrutura oligossacarídica conduzem a mudanças na atividade de algumas glicoproteínas. Entretanto, como há lectinas que não são glicoproteínas, como a Concanavalina A, as lectinas isoladas de

Dioclea grandiflora, *Dioclea guianense*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* (Moreira *et al.*, 1991), surge o questionamento do real papel dos carboidratos nas atividades desempenhadas por lectinas.

As lectinas de legumes geralmente são sintetizadas na forma de precursor, que posteriormente é convertido na proteína madura (Loris *et al.*, 1998). Nas lectinas que não são glicoproteínas, o processamento pós-traducional, envolve a remoção do grupo glicídico. Embora algumas não sejam produzidas na forma de precursor glicosado (Pusztai, 1991).

Os dados da composição global de aminoácidos mostram que CpL tem como aminoácidos mais freqüentes: treonina, valina, serina, leucina e alanina, além de alta concentração de Asx + Glx (23,5%). Estes mesmos resíduos também estão entre os mais freqüentes em *Crotalaria striata* (Kang *et al.*, 1990) e *Crotalaria juncea* (Ersson, 1977).

Entre os aminoácidos menos freqüentes de CpL estão histidina e arginina. Baixo número destes aminoácidos também é observado nas lectinas de *Crotalaria striata* (Kang *et al.*, 1990) e *Crotalaria juncea* (Ersson, 1977). A metodologia utilizada não possibilitou a detecção de resíduos de triptofano, pois este é suscetível à hidrólise ácida. Quanto aos resíduos de cisteína, a presença de grupos sulfidrilas livres não foi determinada e nenhuma correção para possíveis perdas durante a hidrólise ácida foi feita para o conteúdo de cisteína.

De acordo com Khang *et al.* (1990) a ausência de cisteína é uma característica das lectinas de leguminosas, do mesmo modo que baixas ou nulas concentrações de metionina e histidina são comuns nas proteínas de origem vegetal (Ryan, 1981, Kortt & Caldwell, 1990).

A seqüência N-terminal de CpL para seus primeiros nove primeiros resíduos foi: **LEEQSFSFTKFSSTDQQN** (figura 7). A presença de uma única seqüência N-terminal indica que a proteína é formada por quatro subunidades idênticas, corroborando as análises dos dados de eletroforese e cromatografia por gel filtração que indicavam trata-se de um tetrâmero.

Os estudos de homologia seqüencial para os 17 primeiros resíduos de CpL e as lectinas isoladas de *C. striata* (Kang *et al.*, 1990) e *C. juncea* (Foreis *et al.*, 1979) (figura 11) apontam uma homologia de 100% e superior a 80% respectivamente. As lectinas de leguminosas são caracterizadas pela alta homologia apresentada para a estrutura primária. Segundo Loris *et al.* (1998) das 50 seqüências de lectinas de legumes que já foram determinadas a taxa de identidade não é menor que 35%.

	1	10	20
<i>Crotalaria pallida</i>	LEEQSFSFTKFSSTDQQN		
<i>Crotalaria striata</i>	LEEQSFSFTKFSSTDQQNLILQAHY		
<i>Crotalaria juncea</i>	AEEQSFSSTKFSSTDQPNLILQGDA		

Pusztai (1991) relata que a comparação entre 26 lectinas mostrou 100% de conservação de resíduos de fenilalanina na posição 6 e 11, sendo que o resíduo 5 também se encontra altamente conservado em 23 das 26 lectinas utilizadas no estudo. O mesmo foi observado por Foriers *et al.* (1979) em relação a 11 seqüências amino terminal de diferentes lectinas e por Machuka *et al.* (1999) para lectinas específicas para galactose isoladas de *Sphenostyles stenocarpa*.

As três lectinas aqui comparadas também apresentam um resíduo de fenilalanina na posição 6 e 11. Embora o seqüenciamento N-terminal tenha envolvido apenas os 17 primeiros resíduos, podemos considerar que CpL também apresenta seqüência F-F—LILQ presente em *C. striata* e *C. juncea* e que se mostra consenso para lectinas de leguminosas (Machuka, 1999).

O alto grau de homologia da estrutura primária e da estrutura terciária das lectinas de leguminosa sugere uma conservação dos genes que codificam estas proteínas, permitindo sua utilização como marcadores filogenéticos (Rouge *et al.*, 1987).

Compostos químicos são usados extensivamente em sistemática de planta, nos estudos das variações infraespecíficas (Adams, 1977; Harborne e Turner, 1984) e na determinação de relações filogenéticas entre famílias e outros táxons (Dahlgren, 1975; Gershenzon e Mabry, 1983). A utilização de dados bioquímicos na classificação das plantas remonta a mais de século, embora características indiretas como odores, gostos e propriedades medicinais sejam aplicadas há muito mais tempo, retrocedendo à publicação de *Materia Medica* de Dioscorides (datada de 300 a.C.) e aos herbalistas que agrupava as plantas de acordo com suas propriedades médicas, que obviamente derivavam de suas substâncias químicas (Stuessy, 1990).

Dois grupos de substâncias químicas se mostram particularmente úteis nos estudos de sistemática: os compostos do metabolismo secundário e as macromoléculas: proteínas e ácidos nucleicos (DNA e RNA).

As variantes moleculares são ferramentas utilizadas na análise de problemas tradicionais da genética de populações e na inferência de relações filogenética. As seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos fornecem um

número muito elevado de caracteres e por isso são utilizadas com frequência para determinar padrões de filogenia.

As proteínas são usadas na sistemática de diferentes modos, principalmente por meio da análise de dados obtidos da seqüência de aminoácido, dos estudos sorológicos e do padrão de bandas de eletroforese.

Diferenças entre proteínas, reveladas por técnicas como a eletroforese, são utilizadas para estudar o fluxo gênico, a variação genética e a seleção natural. Dados eletroforéticos são mais úteis para espécies muito proximamente aparentadas (Futuyama, 1992). A eletroforese é muito útil no estudo de indivíduos de uma população ou no estudo de espécies relacionadas. Os padrões de bandas resultantes da eletroforese de semente ou proteínas de pólen (ou de tipos específicos de enzimas) podem ser comparados e a presença ou ausência de faixas particulares usadas como caráter taxonômico permitindo análises filogenéticas (Crawford e Julian, 1976; Crawford, 1979, 1983).

A seqüência de aminoácidos de uma proteína pode ser utilizada como caráter taxonômico, da mesma maneira que a seqüência de nucleotídeos do DNA e do RNA é usada para reconstruir relações filogenéticas. A determinação da seqüência de aminoácidos oferece a oportunidade de comparação de proteínas de um amplo número de plantas.

Proteínas como citocromo C, ferredoxina e ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase são usadas na determinação de relações filogenéticas de diversos grupos de organismos inclusive de angiospermas (Boulter *et al.* 1978; Fairbrothers *et al.*, 1975; Fairbrothers, 1983; Giannasi e Crawford, 1986; Martin *et al.*, 1985).

Em muitos casos, dados moleculares apoiam a sistemática estabelecida a partir de dados morfológicos. O mais importante é que os dados moleculares auxiliam quando há diferentes hipóteses quanto a uma classificação, principalmente nos casos onde as relações filogenéticas são conhecidamente problemáticas.

Além das já citadas aplicações biológicas, o estudo das lectinas pode se prestar à solução de problemas taxonômicos, como fonte de dados complementares no estudo de genealogias. O alto grau de homologia da estrutura primária e da estrutura tridimensional das lectinas sugere que estas foram pouco modificadas durante evolução. Estas relações evolutivas permitem que as lectinas sejam utilizadas como excelentes marcadores filogenéticos em estudos de biologia molecular dos processos de especiação (Rouge *et al.*, 1987).

Cabe aqui, abordar em relação ao gênero *Crotalaria*, as revisões de classificação de algumas espécies cuja validade têm sido questionada sistematicamente, pois nada menos que 10 espécies (Lista 1) perderam seu “status” e passaram a ser consideradas uma única espécie: *Crotalaria pallida* (ILDIS Legume Web, 2000). Assim, os dados publicados para estas espécies deveriam ser convalidados para *Crotalaria pallida*, pois do ponto botânico os trabalhos foram realizados com uma mesma espécie. Nesta condição estão os estudos conduzidos com *Crotalaria striata*, que segundo a revisão taxonômica é sinônimo de *Crotalaria pallida*.

Os dados aqui reunidos mostram que há similaridades e diferenças entre a lectina por nós estudada e a analisada por Khang *et al.* (1990). Ambas lectinas apresentam o mesmo comportamento eletroforético, com massa molecular aparente de 30 kDa se constituindo em um tetrâmero de 110-120 kDa e

homologia de 100% verificada para os primeiros 17 resíduos. Porém como já discutido anteriormente a alta homologia da estrutura primária é uma característica das lectinas, principalmente as de leguminosas. Por outro lado, enquanto a atividade destacada da lectina isolada por Khang *et al.* (1990) é a monoespecificidade, já que produz hemaglutinação apenas dos eritrócitos tipo A, a lectina por nós isolada contrariamente reage com as células A, B e AB, mas não possui atividade sobre os eritrócitos O. Entretanto, como discutido acima, espécimes de uma mesma espécie podem apresentar diferentes padrões de hemaglutinação.

Como já destacado anteriormente diferenças na estrutura quaternária podem ser responsáveis pelas diferentes propriedades biológicas apresentadas por lectinas altamente homólogas, como observado em relação a Con Br e Con A que possuem similaridade de 99% na seqüência de aminoácidos, mas apresentam tanto *in vivo* quanto *in vitro* marcantes diferenças.

Foge aos objetivos desta tese discutir a classificação taxonômica das espécies do gênero *Crotalaria*, porém não podemos desprezar os resultados aqui apresentados, mesmo que fornecidos por uma única proteína. Deste modo, a lectina purificada e caracterizada neste trabalho se constitui em um marcador molecular para estudos de evolução filogenética e especiação do gênero *Crotalaria*, mas sobretudo permite sua utilização como ferramenta biológica útil em várias áreas, como pesquisas sobre câncer e imunologia, que requerem a compreensão dos processos biológicos envolvidos no reconhecimento celular.

Lista 1 - Relação das espécies do gênero *Crotalaria* que perderam o “status” de espécie e passaram a ser consideradas sinônimos de *Crotalaria pallida*.

Crotalaria brownei

Crotalaria falcata

Crotalaria fertilis

Crotalaria hookeri

Crotalaria mucronata

Crotalaria pallida.

Crotalaria pisiformis

Crotalaria striata

Crotalaria striata var. *acutifolia*

Crotalaria tinctoria

Crotalaria zuccariniana

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

- Adams, R. P. Chemossystematics: Analyses of population differentiation and variability of ancestral and recent populations of *Juniperus ashei*. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 64: 184-209. 1977.
- Akedo, H., Mori, Y., Kobayashi, M., Okada, M. Chages of isoelectric points of concanavalin A induced by binding of carbohydrates. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 49:107-113. 1972.
- Aub, J.C. , Tieslau, C. e Lankester, A. Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50:613-619. 1963.
- Bladergroen, M.R. & Spaink, H. P. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-leguminosae symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 1:353-359. 1998.
- Becker, J.W., Reeke, G.N., Wang, J.L., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. The covalent and three-dimensional structure of peanut lectin-lactose complex. *J Biol Chem.*, 250:1513-1524. 1975.
- Boutler, D., Gleaves, J.T., Haslett, G.B., Peacock, D. & Jensen, U. The relationships of 8 tribes of the Compositae as suggested by plastocyanin amino acid sequence data. *Phytochemistry*, 17;1585-1589.
- Boyd, W.C. & Rugera, R. M. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family leguminosae. *The J. Immunol.*, 62:333-339. 1949.
- Boyd, W.C. & Sharpleigh, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119:419. 1954.

- Bukantz, C.S.C., Rein, L.C.C.R. & Kent, C.J.F. Studies in complement fixation. Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixtures (modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *J Lab Clin Med.*, 31:394. 1946.
- Calvete, J.J., Thole, H.H., Raida, M., Urbanke, C., Romero, A., Granjeiro, T.B., Ramos, M.V., Rocha, I.M.A da, Guimarães, F.N. & Cavada, B.S. Molecular characterization and crystallization of *Diocleinae* lectins. *Biochem. Biophys. Acta*, 1430:367-375. 1999.
- Carvalho, H.F. Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. *Ciência e Cultura*, 42:884-893. 1990.
- Cavada, B. S. Lectinas uma visão Geral. In: Livro de resumos da 48º Congresso Nacional de Botânica. Crato-CE, Brasil. 1997.
- Cavada, B.S., Santos, C.F., Granjeiro, T.B., Nunes, E.P., Sales, P.V.P., Ramos, R.L., De Sousa, F.A.M., Crisostomo, C.V. & Calvete, J.J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochem.*, 49:675-680. 1998.
- Cavalcanti, M.S.M. Purificação e caracterização de um alectina e de um inibidor de serinoproteinase de sementes de *Swartzia pickellii* Killip. 1994. Tese. Escola Paulista de Medicina.
- Chrispeels, M.J. & Raikhel, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, 3:1-9. 1991.

- Correia, M.T.S. Purificação e caracterização de uma lectina de *Cratylia molis* Mart. (feijão camaratú) e de soro antilectina acompanhado de conjugação e respectivas avaliações. Recife, 1989. Tese. Universidade Federal de Pernambuco.
- Crawford, D. J. and Julian, E. A. Seed protein profiles in the narrow-leaved species of *Chenopodium* of the western United States: Taxonomic value and comparasion with distribution of flavanoid compounds. *Am. J. Bot.* 63:302-308. 1976.
- Crawford, D. J. Allozyme variation in several closely related diploid species of *Chenopodium* of the western United States. *Am. J. Bot.* 66:237-244. 1979.
- Crawford, D. J. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In *Isozymes in plant genetics and breeding, part A*, S. D. Tanksley and T. J. Orton (eds.), 257-287. Elsevier, Amsterdam. 1983.
- Dahlgren, R. A system of classification of the angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters. *Bot. Notiser* 128;119-147. 1975.
- Dahlgren, R. General aspects of angiosperm evolution and macrosystematics. *Nordic J. Bot.* 3: 119-149. 1983.
- Dempsey, D.A., Silva, A. & Klessing, D.F. Engineernig disease and pest resistance in plants. *Trends in Microbiology*, 6:54-61. 1998.
- Dickerson, R.G. & Geis, J The structure and action of proteins. Harper & Row, Publishers. New York, p. 67-97. 1969.

Dickison, W.C. Evolutionary Relationship of the Leguminosae, In: Advances in Legume systematics, Polhill, R. M. & Raven, P. H (Eds) p: 35-51. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AE, England. 1981.

Dixon, H. B. F. Defining a lectin. *Nature*, 292:192. 1981.

Döbereiner, J. A. Importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* (versão online) 2000 [capturado 2000, fev 10]; 1:[4 telas]. Disponível em <http://www.biotecnologia.com.br>.

Drickamer, K. Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. *Prog. Nucl. Acid Res.*, 45:207-232. 1993.

Drickamer, K. and Taylor M.E. Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 9:237-264. 1993.

Duke, J.A. Handbook of Legumes of World Economic Importance, p: 61-70. Plenum Press, New York and London. 1980.

Edman, P. & Begg, G. A protein sequenator. *Eur.J.Biochem.*, 1: 80-91. 1967.

Ersson, B., Aspberg, K. & Porath, J. The Phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). Purification by biospecific affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* 310:446-452. 1973.

Ersson, B. A phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). II Purification by a high capacity biospecific adsorbent and its physicochemical properties. *Biochem. Biophys. Acta.* 494:51-60. 1977.

- Etzler, M.E. Plant lectins: Molecular and biological aspects. *Annual Review of Plant Physiology*, 36:209-234. 1985.
- Fairbrothes, D. E.; Mabry, T. J.; Scogin, R. L. and Turner, B. L. The bases of angiosperm phylogeny: Chemotaxonomy. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 765-800. 1975.
- Fairbrothes, D. E. Evidence from nucleic acid and protein chemistry, in particular serology. *Nordic J. Bot.* 3: 35-41. 1983.
- Ferrari, T.E., Bruns, D., Wallece, D.H. Isolation of plant glycoprotein involved with the control on intercelular recongnition. *Plant. Physiol.*, 67:270-277. 1981.
- Foirers, A., Neve, R. & Strosberg, A. D. Lectin sequences as a tool for chemotaxonomical classification. *Phisiol. Vég.*, 17:597-606. 1979.
- Futuyma, D.J. *Biologia Evolutiva*. Coord. De tradução Mario de Vivo. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto. 1992.
- Gabius, H.J. Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. *Int. J. Biochem.*, 26: 469-477. 1994.
- Gershenzon, J. e Mabry, T. J. Secondary metabolites and the higher classification of angiosperms. *Nordic J. Bot.* 3: 5-34. 1983.
- Giannasi, D.E. & Crawford, D.J. Biochemical systematycll. A reprise. *Evol. Biol.* 20:25-248. 1986.
- Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa,T. & Sharon, N. What should be called a lectin. *Nature*, 285: 66. 1980.

- Granjeiro, T.B., Schriefer, A., Calvete, J.J., Raida, M., Urbanke, C., Barral-Neto & Cavada, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *FEBS*, 248:43-48. 1997.
- Greenwood, J.S., Stinissen, H.M., Peumans, W.J. & Chrispeels, M.J. *Sambucus nigra* agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of the bark. *Planta*, 167:257-258. 1986.
- Hankins, C. N., Kindinger, J. I. & Shannon, L. M. The lectins of *Shophora japonica*. II. Purification, properties and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark. *Plant Physiology*, 86:67-70. 1988.
- Harborne, J. B. e Turner, B. L. Plant Chemosystematics. Academic Press, London. 1984.
- Hardman, K.D., Ainsworth, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 11:4910-4919. 1972.
- Hardman, K.D., Agarwal, R.C., Freiser, M.J. Manganese and calcium binding sites of concanavalina A. *J. Mol. Biol.*, 157:69-89. 1982.
- Heywood, V.H. The Leguminosae - a systematic purview, In: Chemotaxonomy of the Leguminosae. Harborne, J.B., Boulter, D. and Turner, B.L., eds., p: 1-29. Academic Press, London and New York. 1971.
- Hirabayashi, J.; Kusunoki, T. and Kasai K-I. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. *J. Biol. Chem.*, 266:2320-2326. 1991.

- Hirsch, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.* 2:320-326. 1999.
- Higuchi, M., Ohtani, Y. & Iwai, K. Purification and characterization of the acidic lectin from winged bean seeds. *Agrici. Biol. Chem.*, 50:1847-1853. 1986.
- Horejsi, V.; Haskovec, C. and Kocourek, J. Isolation and characterization of the lectin from Black Locust Bark (*Robinia pseudocacia* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, 532:98-104. 1978.
- International Legume Database & Information Service – Legume Web. *List of names matching "Crotalaria mucronata"*. 2000 [capturado 2000 fev 06]. Disponível em <http://www.biodiversity.soton.ac.uk/LegumeWeb>
- Käss, E. & Wink, M. Molecular Phylogeny of the Papilionoideae (family Leguminosae): rbcL gene sequences versus chemical taxonomy. *Bot. Acta*, 108:149-162. 1995.
- Khang, N.Q., Jean-Luc, G. & Johan, H. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1033:210-213. 1990.
- Kocourek, J. & Horejsi, V. Note on the recent discussion on definition of the term 'lectin'. *Nature, News & Views* 290:66. 1981.
- Korn, E.D. and Wright, P.L. Macromolecular composition of an amoeba plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, 248:439-447. 1973.

- Kortt, A.A & Caldwell, J.B. Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine rich albumin. *Phytochemistry*, 9: 2805-2810. 1990.
- Law, I.J. & Strijdom, B.W. Properties of lectins in the root and seed of *Lotomis bainesii*. *Plant Physiology*, 74:773-778. 1984.
- Leach, J.E., Cantrell, M.A. & Serqueira, L. Hydroxproline-rich bacterial agglutinin from the potato. Extraction, purification and characterization. *Plant Physiology*, 70:1358-1358. 1982.
- Laemmli V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. 1970.
- Lis, H. & Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.*, 98:637-674. 1998.
- Lis, H. & Sharon, N. Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.*, 55:35-67. 1986.
- Lis, H. & Sharon, N. Lectins in higher plants. *Biochem. Plants*, 6: 371-447. 1981.
- Lis, H. & Sharon, N. The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinin). *Annu. Rev. Biochem.*, 42:541-574. 1973.
- Lis, H. & Sharon, N. Soy bean (*Glycine max*) agglutinin. *Meth.Enzimol.*, 28:360-365. 1972.
- Loris, R., Hamerlyck, T., Bouckaert, J.& Wyns, L. Legume lectin structure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1383:9-36. 1998.

- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 193:265-275. 1951.
- Machuka, J.S., Okeola, G.O., Van Damme, E.J.M., Chirispeels, M.J., Van Leuven, F. & Peumans. Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*, 51:721-729. 1999.
- Machuka, J. Characterization of seed proteins of velvet bean (*Macuna pruriens*) from Nigeria. *Food Chemistry*, 68:421-427. 2000.
- Martin, P. G. ; Boulter, D. and Penny, D. Angiosperm phylogeny using sequences of five macromolecules. *Taxon* 34: 393-400. 1985.
- Mo, H., Goldstein, I. J. Isolation and characterization of a Forssman antigen-binding lectin from velvet bean (*Mucana derringia*) seeds. *Glycoconjugate Journal*, 11:424-431. 1984.
- Moreira, R. A., Ainouz, I. L., de Oliveira, J.T.A. & Cavada, B.S. Plant lectin, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 86:211-218. 1991.
- Nagata, Y., Burger, M. M. Wheat germ agglutinin. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 247:2248-2254. 1972.
- Nowell, P. Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Research*, 20:462-464. 1960.

- Nsimba-Lubaki, M. & Peumans, W.J. Seasonal fluctuation of lectins in barks of Elderberry (*Sambucus nigra*) and Black locust (*Robinia pseudoacacia*). *Plant Physiology*, 80:747-751. 1986.
- Ogilvie, M.L.; Byl J.A.W. & Gartner, T.K. Platelet aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. *Thromb. Haemostasis*, 62:704-707. 1989.
- Paiva, P.M.G & Coelho, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectins isoform from *Cratylia mollis* Mart. (Caramatu bean). *Appl Biochem. Biotechnol.*, 36:113-117. 1992.
- Pando, L.A. Purificação, caracterização físico-química e atividade biológica de inibidores de serinoproteinases de sementes do gênero *Crotalaria*. 1996. Campinas. Tese. Universidade Estadual de Campinas.
- Peumans, W.J., Nsimba-Lubaki, M., Peeters, B. & Broekaert, W.F. Isolation and partial characterization of a lectin from ground elder (*Aegopodium podagraria*) rhizomes. *Planta*, 164:75-82. 1985.
- Peumans, W. J., Nsimba-Lubaki, M., Carlier, A. R. e Van Driessche, E. A lectin from *Bryonia dioica* root stocks. *Planta*, 160:222-228. 1984.
- Pusztai, A. Plant lectin. Cambridge University Press, Cambridge. 1991
- Pusztai, A., Croy, R.R.D., Grant, G. & Stewart, J.C. Seed lectins: Distribution, location and biological role. In Seed Proteins (Daussant, J., Mosse, J. & Vaughan, J. eds.), pp. 53-82. Academic Press, New York. 1983a.

- Pusztai, A., Greer, F., Silva Lima Grant, M. de G., Prouvost-Danon, A. & King, T.P. Local and systemic response to dietary lectins. In *Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins* (Etzler, M.E. & Goldstein, I.J. eds), pp. 271-272. Alan R. Liss, Inc. New York. 1983b.
- Quinn, J.M. & Etzler, M.E. Isolation and characterization of a lectin from roots of *Dolichos biflorus*. *Archives of Biochem. Biophysics*, 258:535-544. 1987.
- Quijcho, F.A. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 287-315. 1986.
- Renkonen, K.O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae. *Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae*, 26:66-72. 1948.
- Rouge, P., Richardson, M., Ranfaing, P., Yarwood, A. & Sousa-Cavada, B. Single and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15:341-348. 1987.
- Ryan C.A. & Walker-Simons, M. Plant proteinases. *The Biochemistry of Plants*, vol. 6 Academic Press, p: 321-350. 1981.
- Rüdiger, H. Isolation of plant lectins. In: *Lectins and Glycobiology*. (Gabijs, H. J. & Gabius, S. eds.). Berlin:Springer-Verlag. 1997.
- Saint-Paul, M. Les hemagglutinines végétales. *Transfusion*. 4:3-37. 1961.
- Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Granjeiro, T.B., Calvete, J.J. & Cavada, S.B. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between

- its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, 405:114-118. 1997.
- Sengupta, S., Singh, S., Sengupta, L.K. & Bisen, P.S. Phytolectins: natural molecules with immense biotechnological potential. *Indian J. Exp. Biol.*, 35:103-110. 1997.
- Scheinberg, S.L. & Reckel, R.P. Detection of red cell agglutinogens in chickens by lectins. *Fedn. Proc.*, 19:68. 1960.
- Sharon, N. Lectin-carbohydrates complexes of plants and animals. An atomic view. *Trends Biochem. Sci.*, 18:221-226. 1993.
- Sharon, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. *Adv. Immunol.*, 34:213-298. 1983.
- Sharon, N. & Lis, H. Legumes lectins—a large family of homologous proteins. *FASEB*, 4:3198-3208. 1990.
- Sharon, N. & Lis, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-234. 1989.
- Sharon, N & Lis, H. A century of lectin research (1888-1988). *Trends Biochem. Sci.*, 12:488-491. 1987.
- Siddhuraju, P., Vijayakumari, K. & Jarnardhanan, K. Chemical composition and protein quality of the little-know legume, velvet bean (*Macuna pruriens* (L.) DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44,2626-2641. 1996.

- Sikdar, S., Chatterjee, B. P. Chemical modification studies on a blood group A-specific lectin, crotalarin (*Crotalaria striata*) and its effect on hemagglutinating activity. *Mol. Cell Biochem.*, 96:107-116. 1990.
- Stuessy, T. F. Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data. Columbia University. New York. 1990.
- Tobiska, J. Die Phythämagglutinine. Akademie Verlag, Berlin. 1964. Apud. Toms, G.C. Lectins in Leguminosae. In: Advances in Legumes Systematic (Polhill, R.M. & Raven, P.H., eds.). Royal Botanic Garden, Kew. 1981.
- Toms, G.C., Western, A. Phytohaemagglutinins In: Chemotaxonomy of the Leguminosae (Harbone, J.B., Boulter, D. & Tumes, B.L., eds.). Academic Press, London. 1971.
- Toms, G.C. Lectins in Leguminosae. In: Advances in Legumes Systematic (Polhill, R.M. & Raven, P.H., eds.). Royal Botanic Garden, Kew. 1981.
- Udeliba, A. B. I., and Carlini, C.R. Brazilian *Mucuna pruriens* seeds (velvet bean) lack hemagglutinating activity. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*, 46: 1450-1452. 1989.
- Vijayan, M. & Chandra, N. Lectins. *Curr Opin Struct Biol.*, 9:707-714. 1999.
- Xavier-Filho, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Fortaleza-CE. Sem data.
- Zatta, P.F. and Cummings, R.D. Lectins and their uses as biotechnological tools. *Biochem. Edu.*, 20:2-9. 1991.