

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

TESE DE DOUTORADO

LECTINA DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES, IMUNO-HISTOQUÍMICA  
E SEPARAÇÃO DAS ISOFORMAS.

---

Gilberto Dolejal Zanetti

PPGBOT

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**LECTINA DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES, IMUNO-HISTOQUÍMICA  
E SEPARAÇÃO DAS ISOFORMAS.**

Tese apresentada por **Gilberto Dolejal Zanetti** ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Botânica.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Magdolna Maria Vozári Hampe**

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

A comissão examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Tese de Doutorado

**LECTINA DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.: PURIFICAÇÃO,  
CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES, IMUNO-HISTOQUÍMICA  
E SEPARAÇÃO DAS ISOFORMAS.**

Elaborada por

**Gilberto Dolejal Zanetti**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Biológicas - Botânica

Comissão Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magdolna Maria Vozári Hampe \_\_\_\_\_  
(orientadora)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza dos Santos Correia \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Vera Maria Treis Trindade \_\_\_\_\_

Prof. Dr. João Henrique Corrêa Kanan \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Auler Mentz \_\_\_\_\_

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL  
2007

## AGRADECIMENTOS

*Todo verbo, que é forte,  
se conjuga no tempo  
perto ... longe ... onde for ...*

A título de agradecimentos aproveito para firmar nesta página mais que meus sinceros agradecimentos e deixo, necessariamente, registrado um pouco de mim.

Como é sabido, não teria como fazer este trabalho sozinho, e me sinto honrado em render meus agradecimentos a Professora Magdolna por ser o exemplo que é, e por ter apostado nesta pesquisa e em minha pessoa. Também quero prestar agradecimentos à UFSM, minha Universidade de origem, e em especial ao Departamento de Farmácia Industrial do qual sou membro integrante do quadro de pessoal, por ter possibilitado meu doutoramento. Neste tempo foram tantas pessoas, laboratórios e instituições por onde trabalhei que fico impossibilitado de citá-las. Assim é que manifesto agradecimentos, mesmo que de modo muito geral, e os faço ressaltando o nome do PPG-Botânica-UFRGS, bem como à Bioquímica, ao Laboratório de Lectinas, ao Laboratório de Anatomia Vegetal, à Biotecnologia, ao Laboratório de Peptídios e Enzimas Proteolíticas, ao Centro de Criação e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ao Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, ao Departamento de Ciências Morfológicas, à Faculdade de Farmácia e ao Laboratório de Proteínas Tóxicas da mesma Universidade, à Faculdade de Ciências Químicas Biológicas da Universidade Nacional de Córdoba (Argentina), ao Laboratório de Espectrometria de Massa CENARGEN-Brasília, ao Laboratório de Química de Proteínas da USP/Ribeirão Preto, ao Laboratório de Imunologia da PUC, ao Centro Integrado do Câncer da Universidade Luterana do Brasil, a Propesq/UFRGS e ao Programa de Centros Associados Brasil/Argentina/CAPES. pois quem me conhece sabe que ao falar em laboratórios e instituições, refiro-me fundamentalmente às pessoas que os constroem, e tive o prazer de conhecer e trabalhar com pessoas que fazem seus dias desta forma. Deixo meus agradecimentos aos Bolsistas de Iniciação Científica, em especial a Cristiana Beatriz Reimann e a Letícia Fellipon, pela dedicação, companheirismo e competência técnica. Também, agradeço a todos aqueles que, mesmo não estando em algum órgão específico, souberam colaborar - o que fizeram por acreditar em um mundo melhor onde cabe solidariedade entre os homens. Aos amigos de todas as horas, em especial a Roger Remy Dresch e Tiago Tasso de Souza, pelo apoio de sempre, meu muito obrigado. Por fim, mas não de forma menos importante, à minha família, que desde sempre investiu na formação que tenho, explico os meus maiores agradecimentos e deixo verdadeiramente registrado o quanto sou grato à vida por tê-los como meus companheiros.

Tenho a dizer da satisfação em atingir os objetivos escolhidos neste trabalho. Trago a certeza de que ousei, e terei de ousar outro tanto daqui para frente. Contudo, sei que a vida imprime dificuldades por si só. Sabendo disto vou fazendo caminho ao caminhar levando um gosto de felicidade na caminhada, até porque acredito no poeta quando diz *gente nasceu pra ser feliz!* Por isto deixo ainda meu testemunho de que é bem verdade que a vida imprime dificuldades, é claro, e por vezes nos encontramos no fim, mas de alguma forma se tem como chegar a uma estrada ... depois, a uma grande avenida. Lá, no fim da avenida, existe (sim) uma chance, uma sorte, uma nova saída... são coisas da vida, e por isso haverá (sempre) de valer a pena. No meu caso tem valido. Vou assim levando a vida, inspirando-me um pouco nas flores que se transformam em frutos, e um outro tanto nos frutos que mudam suas cores, trazendo novos aromas, novos sabores.

Para finalizar, de forma emocionada - que é como prefiro viver esta vida - firmo meu compromisso, de cidadão que sou desta aldeia Terra, em continuar acalentando a natureza, respeitosamente, a humanizando, ao mesmo tempo em que sou obrigatoriamente humanizado por ela. Deixo registrado assim o meu muito obrigado: Muito obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS		VI
LISTA DE TABELAS		X
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS		XII
RESUMO		XVI
ABSTRACT		XVII
INTRODUÇÃO		18
OBJETIVOS		40
CAPÍTULO I	Morfo-anatomia, histoquímica e perfil fitoquímico qualitativo dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	41
CAPÍTULO II	Isolamento, purificação e determinação de características da lectina obtida a partir dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	70
CAPÍTULO III	Propriedades biológicas da lectina GlcNAc específica extraída a partir dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	128
CAPÍTULO IV	Imunolocalização da ADL nos tecidos dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	161
CAPÍTULO V	ADL como marcador de células transformadas.	183
CAPÍTULO VI	Separação e determinação de características e propriedades das isoformas da ADL com ênfase na ADL-III.	200
DISCUSSÃO GERAL		231
CONCLUSÕES		239
REFERÊNCIAS		242

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação hipotética do domínio de reconhecimento de carboidratos de uma lectina e seus carboidratos ligantes.	23
FIGURA 2	Esquema referente a interação entre UDA e N,N',N''-triacetilquitotriose.	25
FIGURA 3	Classificação das lectinas vegetais conforme característica estrutural.	29
FIGURA 4	Aspecto geral de <i>Arundo donax</i> L.	38
FIGURA 5	Aspecto geral de <i>Arundo donax</i> L.	39
FIGURA I.1	Aspecto geral dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	50
FIGURA I.2	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – aspecto geral.	54
FIGURA I.3	Detalhe da secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. na região da epiderme e bainha de esclerênquima.	55
FIGURA I.4	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – detalhe de um feixe vascular colateral aberto.	55
FIGURA I.5	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. - detalhe de um feixe vascular colateral fechado.	56
FIGURA I.6	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. ao MO – detalhe do floema de um feixe vascular.	56
FIGURA I.7	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. em MEV – aspecto geral.	57
FIGURA I.8	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. em MEV – região cortical.	57
FIGURA I.9	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. em MEV – região de transição entre córtex e o cilindro central.	58
FIGURA I.10	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. em MEV – Detalhe do xilema no feixe vascular.	58
FIGURA I.11	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração com reagente de azul de Comassie Brilhante R-250 a 0,25 % em metanol, evidenciando a presença de proteínas totais.	60
FIGURA I.12	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração com tinta da China, evidenciando a presença de mucilagens.	60
FIGURA I.13	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração com reativo lugol, evidenciando a presença de grãos de amido.	61
FIGURA I.14	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração com KOH 5% em etanol e filtro de excitação 340-380 nm, evidenciando a presença de cumarinas.	61
FIGURA I.15	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração com reagente de Shinoda, evidenciando a presença de flavonóides.	61
FIGUR I.16	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração pelo reagente de Salkowsky, evidenciando a presença de saponinas.	61
FIGURA I.17	Secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L. – coloração com reagente de Dragendorff, evidenciando a presença de alcalóides.	62

FIGURA I.18	Imagens obtidas por EM TOF-MALDI, evidenciando a detecção espacial de proteínas na secção transversal do rizoma de <i>Arundo donax</i> L.	63
FIGURA II.1	Cromatograma obtido a partir do extrato bruto a 10 %, em PBS, dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., em coluna de afinidade em matriz de estroma de coelho-poliacrilamida.	95
FIGURA II.2	Cromatograma obtido em sistema HPLC – coluna C <sub>4</sub> .	96
FIGURA II.3	Cromatograma obtido em coluna de afinidade N-acetil-D-glicosamina-Agarose.	97
FIGURA II.4	Cromatograma obtido em coluna de gel permeação molecular.	98
FIGURA II.5	Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3 das etapas de purificação da ADL.	99
FIGURA II.6	Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3 da ADL.	100
FIGURA II.7	Eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) a 11 %, pH 3,2, da ADL .	101
FIGURA II.8	Eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) a 11 %, pH 8,5, da ADL.	101
FIGURA II.9	Gráfico de massa molecular relativa de ADL obtida a partir de coluna cromatográfica por gel-permeação molecular utilizando matriz Sephadex G-200.	102
FIGURA II.10	Eletroferograma obtido por SDS-PAGE em gel de poliácridamida a 13 %, pH 8,3.	103
FIGURA II.11	Gráfico de massa molecular relativa da ADL obtida a partir de SDS-PAGE em gel de poliácridamida a 13 %.	104
FIGURA II.12	Ponto isoeletrico de ADL obtido por focalização isoeletrica.	105
FIGURA II.13	Espectro de absorção da ADL entre 200-400 nm.	105
FIGURA II.14	Eletroferograma obtido por SDS-PAGE em gel de poliácridamida a 11%, pH 8,3, corada com reagente de Schiff.	107
FIGURA III.1	Inibição da germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> frente a amostras lectínicas de <i>Arundo donax</i> L.	147
FIGURA III.2	Indução de atividade citotóxica por ADL em células da linhagem HT-29.	148
FIGURA III.3	Indução de migração de neutrófilos humanos <i>in vitro</i> por ADL.	152
FIGURA III.4	Atividade mitogênica da ADL sobre células mononucleares do sangue periférico humanos <i>in vitro</i> .	153
FIGURA IV.1	Imunodeteção da ADL por ELISA.	172
FIGURA IV.2	Imunodeteção da ADL por <i>Western blotting</i> .	172
FIGURA IV.3	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., região de feixes vasculares - controle negativo da imunolocalização da ADL, com uso de soro de coelho pré-imunização.	173
FIGURA IV.4	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., região de um feixe vascular - controle negativo da imunolocalização da ADL, com a omissão do soro anti-lectina.	173
FIGURA IV.5	Secções transversais dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., região de feixe vascular, imunolocalização da ADL nas paredes de fibras.	174



FIGURA IV.6	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L. evidenciando a imunolocalização da ADL nas paredes das fibras esclerenquimáticas.	174
FIGURA IV.7	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., evidenciando cordão de fibras esclerenquimáticas do constituintes do periciclo e feixes vasculares com a imunolocalização da ADL.	175
FIGURA IV.8	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., evidenciando num um feixe vascular, por imunolocalização, a ADL na parede das fibras da bainha vascular.	176
FIGURA IV.9	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., região parenquimática – controle negativo da imunolocalização da ADL, com uso de soro de coelho pré-imunização.	177
FIGURA IV.10	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L., região parenquimática – controle negativo da imunolocalização da ADL, com a omissão do soro anti-lectina.	177
FIGURA IV.11	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L. - células parenquimáticas evidenciando a presença da ADL nas paredes por imunolocalização.	178
FIGURA IV.12	Secção transversal dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L. - detalhe de células parenquimáticas, evidenciando a presença da ADL nas paredes por imunolocalização.	178
FIGURA V.1	Representação esquemática da superfície celular de uma célula animal evidenciando os glicoconjugados desta estrutura (extraído da capa da revista <i>Science</i> , V. 291, nº 5512).	185
FIGURA V.2	Representação esquemática da superfície de uma célula animal (normal/tumoral) evidenciando os glicoconjugados desta estrutura.	186
FIGURA V.3	Marcação de células da linhagem HT29 com ADL biotinizada e revelada com estreptoavidina-FITC.	194
FIGURA V.4	Marcação de células da linhagem T47D com ADL biotinizada e revelada com estreptoavidina-FITC.	195
FIGURA V.5	Marcação de células da linhagem T24 com ADL biotinizada e revelada com estreptoavidina-FITC.	196
FIGURA VI.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10 %, pH 8,5, das isoformas da ADL.	209
FIGURA VI.2	Perfil densitométrico obtido a partir da eletroforese, em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10 %, pH 8,5 das isoformas da ADL.	209
FIGURA VI.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 13 %, pH 8,3, das isoformas da ADL.	210
FIGURA VI.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3 das isoformas da ADL.	210
FIGURA VI.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3, das isoformas da ADL.	211
FIGURA VI.6	Espectro da massa molecular da ADL-I obtido por TOF-MALDI.	213
FIGURA VI.7	Espectro da massa molecular da ADL-II obtido por TOF-MALDI.	213
FIGURA VI.8	Espectro da massa molecular da ADL-III obtido por TOF-MALDI.	213
FIGURA VI.9	Espectro da massa molecular da ADL-IV obtido por TOF-MALDI.	214

FIGURA VI.10	Espectro da massa molecular da ADL-V obtido por TOF-MALDI.	214
FIGURA VI.11	Espectro da massa molecular da ADL-VI obtido por TOF-MALDI.	214
FIGURA VI.12	Atividade mitogênica da ADL-III sobre células mononucleares do sangue periférico humano <i>in vitro</i> .	226

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Especificidade de ligação de lectinas vegetais a carboidratos conforme Van Damme <i>et al.</i> , 1998.	31
TABELA 2	Classificação das lectinas vegetais pela ocorrência, estrutura molecular e especificidade, conforme Van Damme <i>et al.</i> , 1998.	32
TABELA I.1	Análise histoquímica dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	59
TABELA I.2	Análise química qualitativa dos extratos dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L.	64
TABELA II.1	Gradiente de separação para a eluição dos PTC-aa.	87
TABELA II.2	Variação sazonal de proteínas totais e da atividade hemaglutinante dos rizomas de <i>Arundo donax</i> L. durante 12 meses consecutivos.	94
TABELA II.3	Purificação da ADL a partir dos rizomas frescos e pulverizados de <i>Arundo donax</i> L.	94
TABELA II.4	Recuperação e atividade hemaglutinante da ADL purificada em coluna de afinidade de estroma de coelho-poliacrilamida, e recromatografada por distintos métodos cromatográficos.	98
TABELA II.5	Coeficiente de extinção da ADL.	106
TABELA II.6	Composição centesimal de aminoácidos da ADL.	106
TABELA II.7	Verificação da presença de carboidratos na constituição da ADL.	107
TABELA II.8	Efeito da variação de temperatura na atividade hemaglutinante da ADL.	108
TABELA II.9	Efeito da variação de pH na atividade hemaglutinante da ADL.	109
TABELA II.10	Efeito de diferentes agentes desnaturantes e redutores na atividade lectínica da ADL.	110
TABELA II.11	Efeito de enzimas proteolíticas sobre a atividade lectínica da ADL.	111
TABELA II.12	Efeito de diferentes cátions divalentes na atividade lectínica da ADL.	112
TABELA II.13	Efeito de carboidratos e glicoproteínas sobre a atividade hemaglutinante da ADL frente eritrócitos nativos de coelho a 2 %.	113
TABELA III.1	Células transformadas utilizadas no estudo de citotoxicidade.	137
TABELA III.2	Atividade hemaglutinante da ADL sobre diferentes reitrócitos.	145
TABELA III.3	Potencial osmótico estimado pelo método de Chardakov.	146
TABELA III.4	Toxicidade aguda via intraperitoneal da ADL para camundongos.	149
TABELA III.5	Número de óbitos de <i>Dysdercus peruvianus</i> submetidos a dieta contendo 2 % de ADL em sementes pulverizadas de <i>Gossypium hirsutum</i> L.	150
TABELA III.6	Peso médio (mg) de <i>Dysdercus peruvianus</i> submetidos a dieta contendo 2 % de ADL em sementes pulverizadas de <i>Gossypium hirsutum</i> L.	150

TABELA III.7	Atividade nematicida da ADL.	151
TABELA V.1	Células transformadas utilizadas para marcação com ADL.	190
TABELA VI.1	Porcentagem relativa das isoformas da ADL, separadas por PAGE a 10 %, pH 8,5, obtida por densitometria e a quantidade recuperada a partir de 1 mg de ADL.	209
TABELA VI.2	Massa molecular total e das cadeias polipeptídicas da ADL determinada por espectrometria de massa.	212
TABELA VI.3	Pico máximo de absorvância das isoformas da ADL obtida por leitura em espectrofotômetro entre 200 – 400 nm.	215
TABELA VI.4	Coeficiente de extinção das isoformas da ADL.	215
TABELA VI.5	Composição centesimal de aminoácidos da ADL-III.	216
TABELA VI.6	Porção N-terminal das cadeias da ADL-III	217
TABELA VI.7	Efeito da variação de temperatura na atividade hemaglutinante da ADL-III.	218
TABELA VI.8	Efeito da variação de pH na atividade hemaglutinante da ADL-III.	219
TABELA VI.9	Efeito de diferentes agentes desnaturantes e redutores na atividade lectínica das isoformas da ADL.	220
TABELA VI.10	Efeito de enzimas proteolíticas sobre a atividade lectínica das isoformas da ADL.	221
TABELA VI.11	Efeito de diferentes cátions divalentes na atividade lectínica das isoformas da ADL.	222
TABELA VI.12	Atividade hemaglutinante das isoformas da ADL sobre diferentes eritrócitos.	223
TABELA VI.13	Efeito de carboidratos e glicoproteínas sobre a atividade hemaglutinante das isoformas da ADL frente eritrócitos nativos de coelho a 2 %.	225

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- aa = aminoácido.
- AAPH = azobis (2-metilpropionidina dicloridrato).
- ADL = Lectina extraída dos extratos a partir dos rizomas de *Arundo donax* L.
- ANOVA - análise de variância de uma via.
- APS = persulfato de amônio.
- ATCC = American Type Culture Collection.
- AZT = anilinoiazolinona.
- BSA = albumina bovina.
- CHAPS = 3-[3-colamidoproyl]dimetilamônio]-1-propanosulfonato.
- CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência.
- DAB = 3,3' Diaminobenzidina.
- DL<sub>50</sub> = dose letal.
- DMSO = Dimetil sulfóxido.
- DTT = ditioneitol.
- EDTA = etilenodiamino tetracetato.
- ELISA = ensaio imunoadsorvente com enzima ligada, do inglês “Enzyme linked immunoadsorbent assay”.
- EM = Espectrometria de massa.
- EPM = erro padrão da média.
- FDA = Food and Drug Administration.
- FPLC = cromatografia líquida rápida de proteínas.
- GlcNAc = N-Acetil-D-glicosamina.
- GalNAc = N-Acetil-D-galactosamina.
- HPLC = cromatografia líquida de alta pressão.
- IPG Buffer = tampão concentrado com anfólitos.
- ISO = isoforma.
- mA = miliamper.
- MALDI = matrix assisted desorption/ionization.
- MEV = microscópio eletrônico de varredura.
- MO = microscópio óptico.
- MTT = brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltetrazólio.
- OPD = ortofenilenediamina.
- PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas.

PBS = salina tamponada com fosfato 0,013 M, pH 7,2 contendo azida sódica a 0,002 %.

PITC = fenilisotiocianato.

PMSF = fenil-metil-sulfonil-fluoreto.

PVDF = poli(fluoreto de vinilideno)

PSA = persulfato de amônio.

PTC = feniltiocarbonil.

PTH = feniltiohidantoína.

PTH-S-CMCCYS = feniltiohidantoína-S-carboximetil cisteína.

RIP = proteína inativadora de ribossomos.

Rf = fator de retenção.

SDS = dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio com ou sem  $\beta$ -mercaptoetanol.

TCA = ácido tricloroacético.

TEA = trietilamina.

TEMED = N-N'-N''-N'''-tetrametiletilnodiamina.

TFA = ácido trifluoracético.

TMA = trimetilamina.

TOF = Tempo de vôo.

Tris = tris (hidroximetil)-aminometano.

Trizma = tris (hidroximetil)-aminometano.

UH/ml = Unidades hemaglutinantes por mililitro.

UI = Unidades internacionais.

UV = luz ultra-violeta.

VP 16 = inibidor de topoisomerase II

## Abreviações utilizadas para algumas lectinas vegetais

Lectina	Planta
AaL	<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertoloni) Otto Kuntze
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i> L.
ALOE	<i>Aloe arborescens</i> Miller var. <i>natalensis</i> Berger
ASAL	<i>Allium sativum</i> L.
CCL	<i>Zea mays</i> L.
CCL	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Mill.
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC.
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i> Mart. Ex. Benth.
CPL	<i>Crotalaria pallida</i> Aiton
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> L.
ESL	<i>Erythrina speciosa</i> Andr.
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> L.
GSL	<i>Griffonia simplicifolia</i> (Vahl ex DC.) Baill.
HEV	<i>Hevea brasiliensis</i> (Willd.) Muell. Arg.
JCA	<i>Artocarpus integrifolia</i> L.
LCA	<i>Lens culinaris</i> L.
LEL ou LT	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> L.
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
PWA	<i>Phytollaca americana</i> L.
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> L.
PEA	<i>Pisum sativum</i> L.
RCA	<i>Ricinus communis</i> L.
SBA	<i>Glycine max</i> (L.) Merrill
SNA	<i>Sambucus nigra</i> L.
STA	<i>Solanum tuberosum</i> L.
TEL	<i>Talisia sculenta</i> (St. Hil.) Radlk.
TGL	<i>Tulipa gesneriana</i> L.
UDA	<i>Urtica dioica</i> L.
VCA	<i>Vicia faba</i> L.
UEA	<i>Ulex europeus</i> L.
WGA	<i>Triticum vulgare</i> L.

## Abreviações para aminoácidos

<b>aminoácido</b>	<b>Três letras</b>
<b>Alanina</b>	Ala
<b>Arginina</b>	Arg
<b>Asparagina</b>	Asn
<b>Ácido aspártico</b>	Asp
<b>Cisteína</b>	Cys
<b>Glutamina</b>	Gln
<b>Ácido glutâmico</b>	Glu
<b>Glicina</b>	Gly
<b>Histidina</b>	His
<b>Isoleucina</b>	Ile
<b>Leucina</b>	Leu
<b>Lisina</b>	Lys
<b>Metionina</b>	Met
<b>Fenilalanina</b>	Phe
<b>Prolina</b>	Pro
<b>Serina</b>	Ser
<b>Treonina</b>	Thr
<b>Triptofano</b>	Trp
<b>Tirosina</b>	Tyr
<b>Valina</b>	Val



## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Botânica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### LECTINA DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, PROPRIEDADES, IMUNO-HISTOQUÍMICA E SEPARAÇÃO DAS ISOFORMAS.

Aluno: Gilberto Dolejal Zanetti

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Magdolna Maria Vozári Hampe

Algumas características como a falta de cristais de oxalato de cálcio, de estruturas secretoras e de tricomas, e a riqueza de fibras constituindo estratos localizados imediatamente abaixo da epiderme e limitando o parênquima cortical, e formando bainhas vasculares, subsidia a autenticidade dos rizomas de *Arundo donax*. Além disto, os rizomas contem amido, cumarinas, alcalóides, flavonóides e saponinas não hemolíticas. Uma lectina (ADL) específica para GlcNAc e seus derivados oligossacarídeos foi isolada e purificada dos rizomas de *Arundo donax* L. (Poaceae) por cromatografia de afinidade em matriz de estroma de coelho-poliacrilamida, resultando em uma purificação de 12,15 vezes, rendimento de 6,58% e recuperação de 80 % da atividade hemaglutinante. A lectina purificada é heterotrimérica com massa molecular aproximada de 32.900 estimada por gel de filtração e de 33.000 obtida por SDS-PAGE, em condições não desnaturantes e não redutoras. A lectina purificada possui elevado conteúdo de Glu/Gln, Asp/Asn, Gly e Cys, mas não é glicosilada. ADL é relativamente estável ao calor e ao pH, e resistente à digestão por enzimas proteolíticas. Ela aglutina eritrócitos nativos de coelho, porco e em menor intensidade de rato e humanos A, B, AB e sua atividade hemaglutinante independe de cátions divalentes, mas é diminuída por agentes desnaturantes e redutores. A lectina de *Arundo donax* L. tem efeito citotóxico para células transformadas da linhagem HT-29, efeito inseticida para *Dysdercus peruvianus* e nematocida para *Meloidogyne incognita*. A ADL causou decréscimo na germinabilidade e retardo na germinabilidade dos diásporos de *Lactuca sativa* L. e também apresentou significativo efeito mitogênico e quimiotáxico. A ADL produziu sinais de toxicidade por via intraperitoneal em camundongos na dose de 300 mg/Kg e com a dose de 800 mg/Kg, 100 % dos camundongos foram a óbito, após 30 horas de sua administração. Sete isoformas da ADL foram separadas por PAGE preparativa. Das seis estudadas todas são heterotriméricas com massas moleculares relativas de suas cadeias polipeptídicas de aproximadamente 8,5, 18,9 e 13,1 kDa, totalizando 40,6 kDa. As isoformas demonstraram ser estáveis face a vários fatores químicos e físico-químicos como a ADL, mas apresentaram desiguais intensidades na aglutinação de eritrócitos e inibição por carboidratos. A isoforma ADL-III é rica em resíduos de Glu/Gln, Gly, Asp/Asn e ainda Cys e as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  possuem resíduos de triptofano na porção N-terminal. A ADL-III apresentou atividade mitogênica significativa. A ADL foi capaz de ligar-se *in vitro* a células transformadas das linhagens T-47D, HT-29 e T-24. Por técnicas imunohistoquímicas, a ADL foi detectada na parede celular das fibras e em algumas poucas células do parênquima cortical do rizoma.

## ABSTRACT

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Botânica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### **ARUNDO DONAX L. RHIZOMES LECTIN: PURIFICATION, CHARACTERIZATION, PROPERTIES, IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND SEPARATIONS OF ISOFORMS.**

Author: Gilberto Dolejal Zanetti

Adviser: Dr<sup>a</sup> Magdolna Maria Vozári Hampe

Some characteristics like absence of calcium oxalate crystals, secretory structures and trichomes and the richness of fibers that form strata localized immediately under the epiderms and limiting the cortical parenchyma or forming bundle sheaths, subsidize the authenticity of these rhizomes. Besides the rhizomes contain amide, coumarins, alkaloids, flavonoids and nonhemolytic saponins. A lectin (ADL) specific to GlcNac and its oligosaccharides was isolated and purified from *Arundo donax L.* (Poaceae) rhizomes by affinity chromatography on rabbit stroma-polyacrilamide column. The lectin was purified 12.15 times, the yield of proteins was 6.58 % and the recovery of the hemagglutinating activity was 80 %. The purified lectin is heterotrimeric and has a molecular mass of 32,900 approximately estimated by gel filtration and of 33,000 by SDS-PAGE in non denaturing and non reducing conditions. The purified lectin is rich in Glu/Gln, Asp/Asn, Gly and Cys, but it is not glycosylated. ADL is relatively heat- and pH-stable and it is resistant to digestion by proteolytic enzymes. It agglutinates native rabbit, pig erythrocytes and with lower intensity rat and human A, B and AB erythrocytes, and its hemagglutinating activity is independent of divalent cations, but it is decreased by denaturing and reducing agents. *Arundo donax L.* lectin displays cytotoxic effect on *Dysdercus peruvianus* and nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. ADL decreases the germinability and delays the mean time for germinability of *Lactuca sativa L.* diaspores and also shows significant mitogenic and chemotactic effect. The lectin induce toxicity signals in mice by intraperitoneal injection with the dose of 300 mg/kg and 800 mg/kg caused 100 % death of the animals, 30 h after its administration. Seven isoforms of ADL were separated by preparative PAGE. The six isoforms studied are heterotrimeric, with polypeptide chains of molecular mass of 8.5, 13.1 and 18.9 kDa determined by mass spectroscopy and with 40.6 kDa of lectin molecular mass. The isoforms showed stability when subjected to the action of distinct chemical and physico-chemical factors as ADL showed. However, they exhibited unequal intensity of erythrocyte agglutination and carbohydrate inhibition. ADL-III is rich in Glu/Gln, Gly and Asp/Asn and Cys residues, and its N-terminal  $\alpha$  and  $\beta$  chains contain tryptophan residues. ADL-III showed significant mitogenic activity. ADL was able to bind to transformed cells from T-47D, HT-29 and T-24 lines *in vitro*. Immunohistochemical techniques allowed to localize ADL in the fiber cell walls and in some few cortical parenchyma cells of the rhizome.

# INTRODUÇÃO

## 1. LECTINAS

### ➤ SOBRE A DEFINIÇÃO DE LECTINAS

Tendo em vista a vasta aplicabilidade das lectinas, Potapov, no ano de 1968, fez pela primeira vez referência ao termo lectinologia. Este termo, atualmente, vem sendo bastante difundido no sentido de demarcar a área de conhecimento que se ocupa do estudo de lectinas. Contudo, o termo lectina, do latim *legere*, foi proposto, em 1954, por Boyd e Sharpleigh, enfatizando a propriedade de algumas proteínas aglutinarem seletivamente distintos tipos celulares, uma vez que o termo significa escolher, selecionar (Van Damme *et al.*, 1998; Zatta e Cummings, 1992).

Até a primeira metade do século passado, as lectinas eram tratadas por denominações como hemaglutininas, fitohemaglutininas ou aglutininas. No ano de 1898, Elfstrand propôs o termo hemaglutinina para proteínas vegetais, como a ricina, abrina e crotina, caracterizadas pela atividade hemaglutinante que desenvolviam, sendo que a primeira aglutinação de eritrócitos por extratos de plantas foi obtida em 1888, por Stillmark, com uma fração protéica tóxica de *Ricinus communis* L. (Olsnes e Kozlov, 2001). Todas estas denominações anteriores ao termo "lectina" foram introduzidas antes do mecanismo causador da hemaglutinação, visível macroscopicamente, ser entendido em nível molecular. Somente em 1952, Watkins e Morgan demonstraram que esta propriedade estava baseada na atividade específica de ligação de uma dada lectina a carboidratos (Van Damme *et al.*, 1998). O estudo de Watkins e Morgan foi antecedido por relatos registrados, desde o ano de 1936, com a lectina ConA, de *Canavalia ensiformis* (L.) DC., de que a aglutinação desenvolvida por estas moléculas poderia ser inibida por carboidratos

específicos (Zatta e Cummings, 1992).

Desde a caracterização das primeiras lectinas até a proposta de Boyd e Sharpleigh, duas questões básicas sofreram modificações: no começo do século XX, com o relato das primeiras lectinas não tóxicas, como as de *Pisum sativum* L. e *Lens culinaris* L., foi descartada a idéia de que a toxicidade era uma propriedade geral destas proteínas e, com a descoberta de lectinas em animais, vírus e outros organismos, também foi abandonada a suposição de que estas proteínas eram exclusivas de vegetais.

Tão logo o reconhecimento das lectinas como moléculas ligantes a carboidratos, as mesmas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base em critérios funcionais bem definidos.

Na década de 70 do século passado, o conceito de lectinas passou a ser aplicado às proteínas não imunes com capacidade de complexarem com carboidratos específicos. No início da década de 80, a preocupação maior com este grupo de proteínas foi a de destacar a ausência de atividade enzimática. Goldstein e colaboradores, no ano de 1980, propuseram uma definição para lectinas, adotada em 1981 pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica (IUPAC), ficando determinado que lectinas são proteínas de origem não imune, ligantes a carboidratos ou a glicoproteínas, capazes de aglutinarem células e/ou precipitarem glicoconjugados (Van Damme *et al.*, 1998). Contudo, esta definição foi, desde o início, alvo de inúmeras críticas, uma vez que o papel das lectinas nos organismos vivos é muito diversificado. Assim é que este conceito é frágil e se caracteriza apenas como uma definição que tem por base ensaios de atividade biológica *in vitro* demonstrando um caráter puramente prático, já que, por outro lado, não define estruturalmente os compostos que se propõe conceituar (Kocourek e Horejsi, 1981). Várias tentativas de conceituação foram propostas e, na metade da década de 90 do século passado, Peumans e Van Damme estabeleceram um conceito para lectinas, onde ressaltam questões estruturais destas proteínas de origem não imune, ao citarem a necessidade de um sítio não catalítico de interação a carboidratos na molécula protéica e que, além deste, a mesma

molécula poderia comportar outros tipos de sítios de natureza catalítica (Peumans e Van Damme, 1995).

Com o avanço do conhecimento, as definições referentes a lectinas foram ampliadas, ressaltando aspectos de sua atuação em sistemas biológicos, pois são as únicas proteínas capazes de reconhecerem e de se ligarem reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados. Deve ser observado que as lectinas se diferenciam de enzimas ligadoras de carboidratos como as glicosidases, as glucanases e as quitinases, porque não modificam a estrutura do carboidrato ao qual se ligam, o que ocorre em processos enzimáticos, apesar de haver lectinas que, além do sítio de ligação lectínico, possuem um sítio enzimático. Também deve ser observado que a origem não imune destas proteínas as distinguem de anticorpos, os quais possuem carboidratos como antígenos, agindo como aglutininas (Loris, 2002; Singh *et al.*, 1999; Cummings, 1997).

## ➤ ASPECTOS DA ESTRUTURA MOLECULAR DAS LECTINAS

As lectinas apresentam uma grande diversidade estrutural, e o aspecto comum entre estas moléculas é a presença de ao menos um sítio específico de ligação a carboidrato o “domínio de reconhecimento de carboidrato” em cada cadeia polipeptídica.

Em relação às cadeias polipeptídicas, as lectinas vegetais são caracteristicamente ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados e, encontram-se associadas por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e em alguns casos pontes de dissulfetos (Kennedy *et al.*, 1995; Rüdiger e Gabius, 1993). Pelo número de cadeias polipeptídicas, as lectinas são denominadas monoméricas quando apresentam apenas uma cadeia, como a lectina de *Solanum tuberosum* L., com 50 kDa (Allen e Neuberger, 1973), a heveína, com apenas 43 aminoácidos e 4 pontes de dissulfeto (Soedjanaatmadja *et al.*, 1995), e a arceína de *Phaseolus vulgaris* L. (Loris, 2002). Quando as lectinas

apresentam duas cadeias polipeptídicas elas são denominadas diméricas, com cadeias semelhantes ou diferentes entre si, ganhando respectivamente a denominação de lectinas homodiméricas ou heterodiméricas. *Erythrina speciosa* Andr. possui uma lectina homodimérica com 27,6 kDa por subunidade (Konozy *et al.*, 2003). Em *Ricinus communis* L. a lectina é heterodimérica, com uma subunidade de 32 kDa e outra de 34 kDa (Frigerio e Roberts, 1998), bem como a lectina de *Erythrina indica* Lam. com 65 kDa que é heterodimérica, com uma cadeia polipeptídica de 30 kDa e outra de 35 kDa (Konozy *et al.*, 2002).

Lectinas compostas por quatro subunidades são denominadas tetraméricas, como a lectina JCA, também denominada jacalina, com 66 kDa (Pratap *et al.*, 2002; Kabir, 1998). Também a SBA, com massa molecular de 120 kDa, é tetramérica e cada uma de suas subunidades possui massa molecular de 30 kDa, (Carvalho, 1990). Ocorrem outros tipos estruturais de lectinas, como as triméricas, pentaméricas, hexaméricas ou poliméricas. Uma lectina trimérica ocorre em *Geodia cydonium* com cadeias de massa molecular 12,2, 13,0 e 13,8 kDa, conforme Müller *et al.* (1983). Em *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze ocorre, nas sementes, uma lectina com 10 subunidades de 20 kDa, totalizando 200 kDa, e uma segunda lectina com massa molecular relativa de 204 kDa, hexamérica, com subunidades de 34 kDa, conforme Datta *et al.* (1991).

A maioria das lectinas apresenta um complexo glicídico, ligado covalentemente a sua estrutura, perfazendo em geral 4-10 % da massa total da molécula. A porção glicídica da lectina liga-se apenas a asparagina, serina ou treonina. Na asparagina pode ocorrer a ligação com GlcNAc em animais e também com GlcNAc em vegetais. Nos outros dois aminoácidos, em vegetais, apenas galactose é o açúcar ligante (Goodin e Mercer, 1988). Algumas lectinas não são glicoproteínas, como é o caso da lectina da *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. e a lectina dos frutos de *Sechium edule* L. (Vozári-Hampe *et al.*, 1992). Em *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke, a porção glicídica equivale a 7,9 % da massa molecular (Cavada *et al.*, 1998), em *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze equivale a 6,3 % (Datta *et al.*, 1991), enquanto que em *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk. atinge 18,8 % (Freire *et al.*, 2002) e na

jacalina permanece entre 7 a 10 % (Kabir, 1998). Na lectina de *Gracilaria verrucosa* Huds., uma alga marinha, a porção glicídica equivale a 92 % da molécula (Kano *et al.*, 1992).

A remoção da porção glicídica de uma lectina não afeta a atividade biológica da molécula, segundo Sharon e Lis (1989). A função da parte glicídica, comum entre as lectinas, tem sido questionada e justificada basicamente por amenizar a possibilidade de degradação proteolítica, a desnaturação por taninos e por influenciar a associação com outras moléculas, bem como na solubilidade e viscosidade em solução aquosa, e ainda por interferir na capacidade de atuar como agente anticoagulante e aumentar a estabilidade térmica (Kilpatrick, 1986).

Independentemente de a lectina ser ou não uma glicoproteína, existe na estrutura da molécula protéica um sítio de ligação ao carboidrato, denominado de “domínio de reconhecimento de carboidrato”, que desempenha papel de reconhecimento e de direcionamento do carboidrato para o qual a molécula tem afinidade. Cada subunidade polipeptídica possui, caracteristicamente, ao menos um destes sítios (Gabiús, 1994). Em fabáceas, conforme Prabu *et al.* (1998), das quatro cadeias polipeptídicas que se ligam ao carboidrato, três são altamente conservadas e apenas uma determina a especificidade ao carboidrato. Em *Phaseolus vulgaris* L., por exemplo, a lectina PHA é específica para N-acetil-D-galactosamina, além de um complexo sacarídico. No gérmen de trigo, a lectina WGA, apesar de ser dimérica, possui quatro sítios para ligação a carboidratos. Os inibidores da mesma são N-acetil-D-glicosamina e seus derivados oligossacarídeos e quitina, além de ácido siálico. Em *Dolichos biflorus* L., sua lectina tetramérica DBA possui apenas um sítio de ligação a  $\alpha$ -D-galactose e N-acetil-D-galactosamina (Carvalho, 1990; Nagata e Burger, 1972). Em *Urtica dioica*, a lectina UDA é monomérica e apresenta dois sítios de ligação (Saul *et al.*, 2000). A lectina de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze de 200 kDa apresenta especificidade para glicose, manose e seus oligossacarídeos (Datta *et al.*, 1991).

O domínio de reconhecimento, conforme Elgavish e Shaanan (1997), pode estar localizado na superfície da molécula protéica, como nas lectinas de fabáceas, ou em uma região mais profunda, como nas lectinas de bactérias. No sítio ligante a carboidratos os padrões de pontes de hidrogênio seguem a conformação espacial necessária para a complexação com o carboidrato. Na figura 1 tem-se a representação dos sítios de ligação de uma lectina hipotética, envolvendo três monossacarídeos (dois terminais e outro sub-terminal) da cadeia oligossacarídica, apresentando um arranjo espacial próprio.

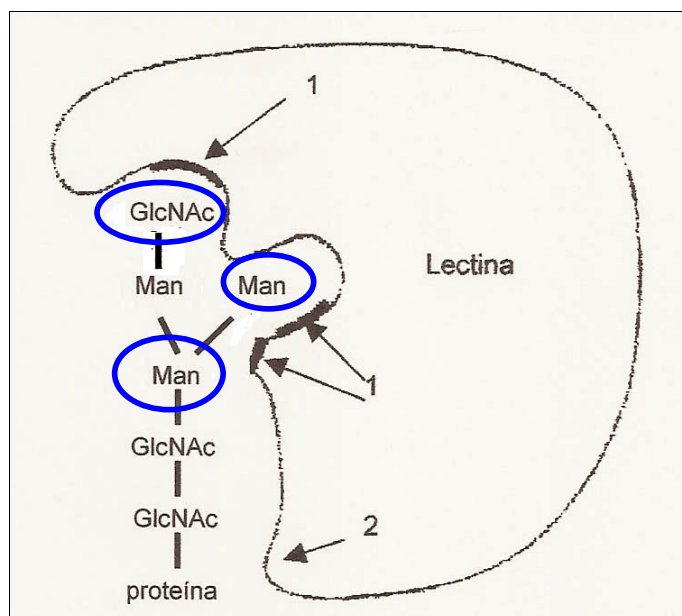


FIGURA 1. Representação hipotética do domínio de reconhecimento de carboidratos de uma lectina e seus carboidratos ligantes, modificado de Brooks *et al.*(1997). Legenda: 1. Sítio específico de reconhecimento lectínico ao açúcar; 2. Ligação hidrofóbica específica entre proteína-carboidrato.

A figura 1 ainda mostra que, por vezes, a parte não-glícídica do glicoconjugado também interage com a lectina, através de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, desempenhando um papel fundamental na complexação lectina-carboidrato.

A complexação lectina-carboidrato ocorre por meio de ligações não



covalentes, envolvendo o deslocamento de moléculas de água, associada ao grupo polar da proteína, e as que estão em torno do carboidrato, resultando o estabelecimento de novas redes de pontes de hidrogênio, que juntamente com forças de Van der Waals acabam estabilizando esta complexação (Kennedy *et al.*, 1995).

Deve ser observado que os carboidratos são moléculas extremamente flexíveis e além do movimento molecular, as configurações estruturais diferem entre si, o que dificulta e torna impossível um único modo de reconhecimento destes compostos químicos pelas lectinas. Apesar do sítio de ligação apresentar alta especificidade de reconhecimento, em nível milimolar, para aumentar a possibilidade da lectina complexar com o carboidrato, muito freqüentemente, sítios secundários, os subsítios, são ativados automaticamente, de forma que a proteína muda a conformação espacial, mas captura de imediato seu carboidrato específico. Este mecanismo é útil até mesmo quando é exigido que mais de uma subunidade contida em cadeias polipeptídicas, diferentes ou não, sejam ativadas, o que ocasiona uma diferenciação total na estrutura quaternária da proteína (Loris, 2002).

Na complexação carboidrato-lectina a configuração relativa de C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> do anel piranosídico do carboidrato foi detectado como uma região importante. Muitas lectinas toleram uma variação no C<sub>2</sub> do anel piranosídico. As lectinas manose-específicas podem interagir com glicose (seu epímero) e vice-versa (ConA), em contrapartida, poucas alterações são aceitas em C<sub>3</sub> e o grupamento OH de C<sub>4</sub> é crítico. Em geral, as lectinas galactose específicas não se ligam à glicose ou manose, nem manose/glicose ligam-se à galactose, assim como ocorre com lectinas específicas para GlcNAc que não interagem com N-acetil-D-Galactosamina e vice-versa. Algumas lectinas demonstram especificidade pelo anômero  $\alpha$  ou  $\beta$ -glicosídico do respectivo monossacarídeo. Outras demonstram preferência por glicosídeos aromáticos ao invés de alifáticos, sugerindo a presença de uma região hidrofóbica próxima ao sítio de ligação a carboidrato (Lins e Sharon, 1998; Rüdiger, 1998).

Estudos referentes a especificidade por açúcares simples e glicoproteínas de lectinas de plantas têm revelado que a grande maioria destas moléculas não apresentam afinidade por monossacarídeos. Esta menor afinidade por açúcares simples também pode ser verificada com lectinas de algas que são, em geral, mais específicas para oligossacarídeos complexos e muitas vezes por glicoproteínas (Rogers e Hori, 1993). Ocorre que a associação entre lectina-oligossacarídeo é entálpicamente favorecida e assim estas proteínas ligam-se, predominantemente, a oligossacarídeos com afinidade de até 1000 vezes maior que a monossacarídeos (Lis e Sharon, 1998; Rüdiger, 1998).

Um exemplo ilustrativo desta complexação lectina-carboidrato tem-se com a UDA VI (figura 2), uma lectina monomérica que possui, conforme estudos de Harat e Muraki (2000), dois domínios de reconhecimento de carboidrato, sendo que cada um destes está composto por três subdomínios.

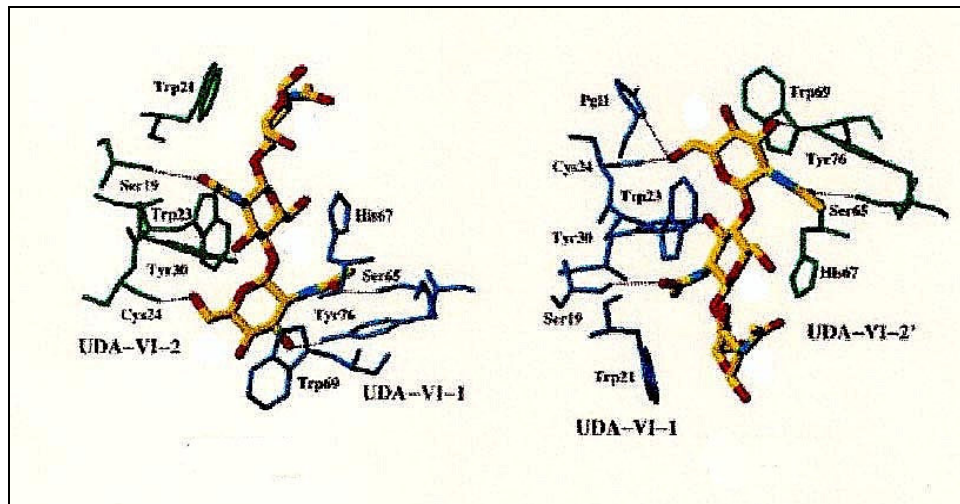


Figura 2. Esquema referente a interação entre UDA e N,N',N''-triacetilquitotriose. Extraído de Harata e Muraki (2000).

Neste caso, os autores consideram que a ligação do di e trissacarídeo de GlcNAc é entálpica, ocorrendo um aumento da acessibilidade dos demais resíduos em virtude da ligação do primeiro resíduo. A complexação ocorre pela

fixação da posição e orientação dos dois anéis piranose de tetra e pentassacarídeos pelos resíduos 21 e 22 (triptofanos) do domínio I da UDA-VI (Figura 2).

A figura 2 é referente à interação entre UDA e N,N',N''-triacetilquitotriose, destacando os aminoácidos envolvidos na interação com o ligante e o fato de que cada N,N',N''-acetilquitotriose interage com dois domínios que não fazem parte da mesma molécula da lectina, conforme Harat e Muraki (2000).

Neste caso, o resíduo 30 (Tyr) fixa o grupo acetil do segundo resíduo de açúcar, por contato face-a-face, e também reconhece o grupo hidroxil OH3. Adicionalmente, o resíduo 19 (Ser) do domínio 1, bem como o resíduo 65 (Ser), no domínio 2, comumente participam formando a ligação H com Oxigênio do grupo acetil dos resíduos de açúcar 1 e 2, respectivamente. O grupo N-acetilamino é único na estrutura da GlcNAc comparado com outros açúcares reconhecidos por lectinas, e o reconhecimento deste grupo é essencial para a ligação, exclusivamente, com quitina.

Muitas lectinas requerem a presença de íons metálicos divalentes, principalmente  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e/ou  $\text{Mn}^{++}$ , para poderem exercer suas atividades biológicas. Ficou demonstrado que, por exemplo, a ConA, necessita de íons  $\text{Ca}^{++}$  para se ligar ao seu carboidrato específico e que a lectina de *Erythrina speciosa* Andr. necessita de  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Ca}^{++}$  para capturar o carboidrato para o qual tem afinidade (Konozy *et al.*, 2003). A ocupação dos sítios metálicos por estes íons causa uma modificação na conformação estrutural da lectina, conferindo o reconhecimento ao carboidrato pelo qual tem afinidade, estabilizando a ligação ao sítio ligante e fixando as posições dos aminoácidos que interagem com o carboidrato ligante. As lectinas que não requerem íons metálicos já possuem a conformação estrutural necessária para o reconhecimento aos carboidratos (Sharon e Lis, 1990).

Nas moléculas lectínicas há uma região rica em aminoácidos hidrofóbicos, que forma uma cavidade na estrutura molecular. Este sítio

hidrofóbico possibilita uma interação entre a lectina e um grande número de compostos químicos distintos dos carboidratos, conferindo algum outro papel a estas proteínas, ainda muito pouco conhecido (Konozy *et al.*, 2003). Em um estudo com 42 lectinas, Barre *et al.* (2002) constataram que 32 % destes domínios hidrofóbicos são iguais, o que sugere uma forte conservação estrutural, sendo que, conforme os mesmos autores, hormônios vegetais, como as auxinas, são ligantes naturais desta cavidade hidrofóbica, além de outras moléculas como flavonas.

Na elucidação estrutural de lectinas obtidas de diferentes famílias e espécies vegetais é utilizada, desde a década de 70 do século passado, a difração de raio-X de alta resolução. Em 1989 a ConA foi a primeira lectina com a estrutura determinada por este método. A técnica é reconhecidamente a mais precisa na obtenção da conformação espacial de moléculas e está baseada nos ângulos existentes nas ligações que ocorrem entre os elementos formadores da estrutura molecular (Liu *et al.*, 2002; Lori, 2002). A ConA, em 1936, foi a primeira lectina cristalizada, apesar de Summer e Howell não terem conseguido eliminar completamente os carboidratos contaminantes (Lori, 2002; Carvalho, 1990).

Na obtenção da estrutura tridimensional um dos métodos utilizados é o do dicroísmo circular. Naeen *et al.* (2001) determinaram que a lectina de *Cajanus cajan* (L.) Mill. apresenta uma estrutura típica de lâmina  $\beta$  pregueada. Konozy *et al.* (2003) determinaram na lectina de *Erythrina speciosa* Andr. uma estrutura como sendo do tipo lâmina  $\beta$  pregueada. Prabu *et al.*, (1998), determinaram que a ConA apresenta uma estrutura lâmina  $\beta$  pregueada contígua, com seis alças em cada subunidade. A amarantina, obtida das sementes de *Amaranthus caudatus* L., é uma lectina dimérica, específica para galactose, que exhibe uma estrutura  $\beta$  trilaminar (Wright, 1997). A ricina exhibe 8 hélices e lâmina  $\beta$  pregueada com 6 alças (Van Damme *et al.*, 1998). Em *Lathyrus ochrus* (L.) DC., a isolectina I é um monômero com uma lâmina  $\beta$  pregueada de seis alças na face de trás e sete na face da frente, conectadas por laços estendidos, totalizando treze linhas antiparalelas (Barre *et al.*, 2001).

Conforme Oliveira *et al.* (2003), o espectro de dicroísmo circular na região do UV afastado, da lectina extraída dos frutos de *Caesalpinia tinctoria*, (HBK.) Dombey ex DC. de massa molecular de 12,5 kDa, indicou a presença de 10 % de  $\alpha$ -hélice, 38 % de folhas  $\beta$ , 19 % de voltas  $\beta$ , 28 % de estruturas desordenadas e 6 % da conformação P<sub>H</sub> (hélice poli-L-prolina II).

### ➤ CLASSIFICAÇÃO DAS LECTINAS VEGETAIS

Atualmente, tem-se basicamente três sistemas de classificação para as lectinas vegetais. Estes sistemas estão baseados em semelhanças na estrutura da molécula, na especificidade ao carboidrato ou então, na ocorrência, estrutura e especificidade destas moléculas.

➤ **Classificação das lectinas quanto a estrutura da molécula**

Conforme o domínio de reconhecimento de carboidrato, Van Damme *et al.* (1998), propuseram que as lectinas poderiam ser classificadas em quatro grupos, conforme a figura 4.

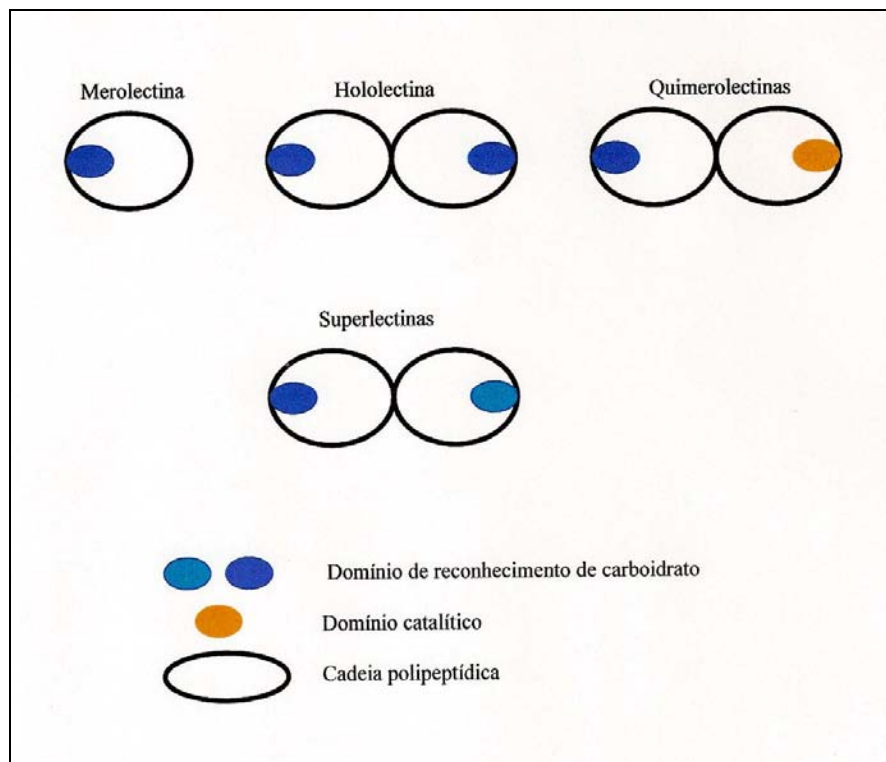


FIGURA 3. Classificação das lectinas vegetais conforme característica estrutural (Adaptado de Van Damme *et al.*, 1998).

1. **Merolectinas:** Moléculas protéicas com apenas um domínio de reconhecimento de carboidratos. Estas lectinas não apresentam atividade hemaglutinante. Um exemplo de merolectina é a heveína, isolada do látex de *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg. (Van Damme *et al.*, 1998; Wittsuwannakul *et al.*, 1998).

2. **Hololectinas:** Apresentam ao menos dois domínios de reconhecimento de carboidratos idênticos, ou com alto grau de homologia. Estas lectinas são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Conforme Van Damme *et al.* (1998), a ConA é um exemplo de hololectina.
  
3. **Quimerolectinas:** Sob esta denominação encontram-se as lectinas com um ou mais domínio(s) de ligação a carboidratos, associado(s) a outro domínio com atividade biológica, como por exemplo, atividade enzimática, independentemente da ligação a carboidratos. A ricina de *Ricinus communis* L. e a lectina de *Viscum album* L., exemplificam este grupo de lectinas (Olsnes e Kozlov, 2001; Van Damme *et al.*, 1998).
  
4. **Superlectinas:** Este grupo de lectinas apresentam exclusivamente ao menos dois domínios de reconhecimento de carboidratos, como as hololectinas, porém reconhecem carboidratos com estruturas diferenciadas. Podem ser consideradas como um grupo especial de quimerolectinas, compostas de dois domínios de ligações para carboidratos independentes estrutural e funcionalmente, como a lectina TGL da *Tulipa gesneriana* L., com um domínio e ligação à manose e outro para N-acetil-D-galactosamina (Van Damme *et al.*, 1998).

➤ **Classificação das lectinas quanto a especificidade ao carboidrato**

A especificidade que as lectinas apresentam por carboidratos é uma das características utilizadas para classificar as lectinas vegetais. Makela, no ano de 1957, apresentou uma classificação segundo a afinidade por açúcar simples. Goldstein e Poretz, no ano de 1986, ampliaram esta classificação e, recentemente, Van Damme *et al.* (1998) propuseram uma classificação mais abrangente com seis grupos de lectinas vegetais, conforme tabela 1.

TABELA 1. Especificidade de ligação de lectinas vegetais a carboidratos, conforme Van Damme *et al.* (1998).

<b>Grupo</b>	<b>Especificidade ao carboidrato</b>
Fucose	L-fucose
Galactose/N-acetilgalactosamina Exemplo: SBA	Galactose > Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc Galactose = Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc Galactose < Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc
N-acetil-D-glicosamina Exemplo: WGA	N-Acetil-D-glicosamina (GlcNAc) <sub>n</sub>
Manose Exemplo: ConA	Manose Manose/glicose Manose/maltose
Ácido siálico Exemplo: Lectina de <i>Limax flavus</i>	Ácido siálico Neu5Ac $\alpha$ (2,6)Gal/GalNAc Neu5Ac $\alpha$ (2,3)Gal/GalNAc
Grupo de glicanos complexos Exemplo: PHA	Complexos conhecidos Complexos desconhecidos



➤ **Classificação das lectinas quanto a ocorrência, estrutura molecular e especificidade aos carboidratos**

Van Damme *et al.* (1998), propuseram uma classificação que agrupa as lectinas das angiospermas em sete grupos (tabela 2) porém, neste mesmo trabalho, os autores ainda ressaltam as lectinas de euforbiáceas e lamiáceas. Este trabalho considera, mesmo que de forma muito incipiente, apesar de consistente, questões referentes a quimiotaxonomia e filogenia de grupos vegetais.

TABELA 2. Classificação das lectinas vegetais pela ocorrência, estrutura molecular e especificidade conforme Van Damme *et al.* (1998).

<b>Grupos</b>	<b>Número de lectinas identificadas</b>
Lectina de Leguminosas	> 100
Ligantes à quitina	> 100
Inativadoras de ribossomas (RIPs)	>20
Relacionada à jacalina	< 10
Monocotiledôneas ligantes de manose	> 50
Floema de cucurbitáceas	< 10
Família das amarantáceas	< 10

1. **Lectinas de leguminosas:** As lectinas de leguminosas freqüentemente consistem de 2 a 4 subunidades de 25-30 kDa, e cada subunidade apresenta um sítio de ligação para o carboidrato. Estas lectinas são muito semelhantes no que se refere às propriedades físico-químicas, mas diferem na especificidade ao carboidrato e em suas propriedades fisiológicas. Um número superior a 80 lectinas pertencentes a este grupo estão relatadas na literatura e as mais estudadas estão entre as papilionóideas, como a lectina ESL. Neste grupo de vegetais, as lectinas apresentam homologias na seqüência de aminoácidos, na estrutura primária e na conformação tridimensional, configurando uma evolução a partir de um ancestral comum (Rego *et al.*, 2002; Cavada *et al.*, 1998).
  
2. **Lectinas ligantes de quitina:** Estas lectinas estão presentes em papaveráceas, amarantáceas, urticáceas, solanáceas e poáceas, famílias que não estão relacionadas taxonomicamente. Todas as unidades estruturais que apresentam capacidade de se ligar à quitina estão classificadas neste grupo. Estas lectinas exibem um domínio de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos que exibe uma seqüência similar à lectina de *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg., por isto mesmo ficou estabelecido que estas lectinas contêm um “domínio heveína”. Nas poáceas as lectinas, como a WGA, apresentam seqüências homólogas de aminoácidos e semelhanças relacionadas à especificidade para N-acetil-D-glicosamina, quitina e ácido N-acetilneuramínico (Martinez-Cruz *et al.*, 2001; Bouckaert *et al.*, 1999).

3. **Lectinas inativadoras de ribossomos:** Este grupo de lectinas estão distribuídas em famílias botânicas não relacionadas taxonomicamente. São lectinas com uma cadeia A, cataliticamente ativa, ligada covalentemente por pontes de dissulfeto a uma cadeia B. Esta segunda cadeia possui sítio(s) de ligação a carboidratos. A cadeia B complexa-se com glicoreceptores de superfície celular e a cadeia A penetra por endocitose nas células. A cadeia A, no citosol, remove enzimaticamente resíduos de adenina, específicos de uma região altamente conservada na maior subunidade do RNAr, causando mudança conformacional no mesmo, o que impede a ligação do cofator de alongação ao ribossomo. Em geral estas lectinas, como a RCA, impossibilitam a síntese protéica, promovendo a morte celular pela remoção de múltiplos resíduos de adenina de vários polinucleotídeos como os de polimerases. (Agapov *et al.*, 1999).
  
4. **Lectinas relacionadas à jacalina:** Conforme Van Damme *et al.*, (1998), estas lectinas estão estruturalmente e evolutivamente relacionadas à família das moráceas ou convolvuláceas, formando dois subgrupos. As lectinas relacionadas com moráceas apresentam especificidade para N-acetil-D-galactosamina, enquanto que as relacionadas a convolvuláceas são manose/maltose específicas, como também o são as lectinas de asteráceas e musáceas.
  
5. **Lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose:** Este grupo de lectinas abrange aquelas com especificidade para manose, encontradas exclusivamente em monocotiledôneas. Estas lectinas foram descritas nas famílias das amarilidáceas, aliáceas, aráceas, liliáceas, bromeliáceas e orchidáceas, além de aloáceas – relatadas, por exemplo, para *Aloe arborescens* Mill. Nestas famílias, as lectinas apresentam estrutura tridimensional e seqüência de aminoácidos com alto grau de similaridade.

6. **Lectinas do floema de cucurbitáceas:** Nas cucurbitáceas, geralmente as lectinas são glicosiladas e apresentam um domínio específico, principalmente para quitina. Elas possuem uma seqüência de aminoácidos muito similar e uma massa molecular de aproximadamente 25 kDa. Estas lectinas formam um grupo particularizado, uma vez que apesar de apresentarem especificidade para quitina, não mostram o domínio heveína, característico para outras lectinas com especificidade a quitina.
  
7. **Lectinas de amarantáceas:** As amarantáceas possuem uma seqüência de aminoácidos similar entre si, massa molecular de aproximadamente 33 kDa e não são glicosiladas. Estas lectinas, como a ACA, são homodiméricas, apresentam especificidade para N-acetil-D-galactosamina e podem totalizar de 3 a 5 % do peso de suas sementes.

## 2. CONSIDERAÇÕES SOBRE POACEAE E *ARUNDO DONAX* L.

As poáceas formam uma família cosmopolita, com indivíduos que se reúnem em massas compactas, constituindo a fisionomia da paisagem natural em muitos locais, como os campos no sul do Brasil. Compreendem aproximadamente 8700 (Judd *et al.*, 2002) a 10000 espécies (Nicora e Rúggalo de Agrasar, 1987) distribuídas em 793 gêneros (Watson e Dallwitz, 1992). No Brasil estão registradas 1368 espécies, em 197 gêneros (Burman, 1985). No Rio Grande do Sul ocorrem cerca de 800 espécies em 110 gêneros (Schultz, 1985).

A estrutura vegetativa e floral das poáceas é altamente especializada, apresentando uma plasticidade fenotípica que reflete na adaptação de suas espécies em diferentes ecossistemas. Conforme Watson e Dallwitz (1992) e Clayton e Renvoize (1986) as poáceas, em geral, são ervas de pequeno porte, com caule do tipo colmo, de consistência herbácea a lenhosa e hábito cespitoso, estolonífero ou rizomatoso. As folhas são alternas, dísticas e não apresentam pecíolo. As inflorescências são espiguetas formadas por 1-50 reunidas em panículas, cachos ou espigas. As espiguetas são protegidas por uma ou duas brácteas, as glumas. Cada flor possui um perigônio formado por três verticilos e duas peças que constituem o antécio:

- Gineceu - bicarpelar, com ovário unilocular e uniovular, encimado por um par de estigmas bífidos e plumosos.
- Androceu - composto por dois ou três estames com filetes longos, anteras grandes e versáteis, que oscilam facilitando a polinização anemófila.
- Perianto – rudimentar, ao lado do ovário, constituído por um par de lodículas.
- Antécio - duas bractéolas (lema e pálea) que protegem a flor.

Durante a antese, as lodículas enturgescem, determinando a abertura do antécio, o que possibilita a saída dos estames e estigmas para a fertilização. O grão de pólen é muito característico, grande, monoporado e apresenta cromossomos monocêntricos. Na semente, o embrião é átropo ou apenas encurvado, e o endosperma é abundante. O pericarpo concrece com o revestimento da semente formando um fruto indeiscente do tipo cariopse.

A sistemática de Poaceae, comumente, agrupa seus representantes em cinco (Watson e Dallwitz, 1992), ou seis subfamílias (Clayton e Renvoize, 1986), mas, recentemente, Barker *et al.* (2000) designaram doze subfamílias, das quais Arundinoideae consta de duas tribos. A tribo Arundineae compreende plantas sublenhosas, perenes, de ciclo estival, que atingem até 5 metros de altura, e exibem grandes panículas plumosas, de 10 a 80 cm de comprimento. O gênero *Arundo* agrupa três a cinco espécies, originárias de regiões tropicais e temperadas, sendo destacadas, como características morfológicas, a lâmina foliar menor que um metro, lemas aristadas bidentadas e flores monóclinas (Danin, 2004).

*Arundo donax* (Figura 4 e 5) é uma planta rizomatosa de colmo oco, com 2 a 5 m de altura. Os rizomas são sólidos e atingem em média 9 cm de espessura. As folhas estão distribuídas, regularmente, até próximo à inflorescência. O afilho rompe a base da bainha foliar, desenvolvendo-se por fora da mesma, o que caracteriza inovações do tipo extravaginais. A panícula possui ráquis glabra e lemas com longos tricomas. A espiguetta está constituída por 2 a 4 flores de glumas agudas trinervadas e pálea com 2/3 do comprimento do lema. O grão de pólen é pequeno, esférico, psilado, caracterizando o tipo comum pulverulento adaptado para a anemofilia das poáceas, e a planta pode ser hexa ou nonaploide (Watson e Dallwitz, 1992; Clayton e Renvoize, 1986; Rosengurtt *et al.*, 1970).

Esta planta detém alto grau de adaptabilidade a diferentes condições ecológicas. Atinge 20-25 a 100 toneladas de massa seca por hectare, e constitui uma fonte de biomassa e fibras, que não madeira, podendo ser utilizada, principalmente, na fabricação de papel e instrumentos musicais

(Shatalov e Pereira, 2002; Neto *et al.*, 1997).

Em relação à fitoquímica de *Arundo donax*, foram detectados triterpenos nas folhas (Chaudhuri e Ghosal, 1970) e alcalóides indólicos nas flores (Glosal *et al.*, 1971). Miles *et al.* (1993) determinaram a presença de tetrametil-N,N'-bis(2,6-dimetilfenil)ciclobutano-1,3-diimina, além de sitosterol, stigmasterol, campferol, tricina e sitosterol-D-glucosideo. Neto *et al.* (1997) registraram a presença de arabino 4-O-metilglucurano-xilano e ligninas com unidades de guaiacil e siringil propano.



FIGURA 4. Aspecto geral de *Arundo donax* L. extraído de [www.co.monterey.co.us/ag/nax\\_weeds.htm](http://www.co.monterey.co.us/ag/nax_weeds.htm) (20/01/2007).



Figura 5A



Figura 5B

FIGURA 5. Aspecto geral de *Arundo donax* L. 5A. Aspecto geral da planta extraído de [www.co.monterey.co.us/ag/nax\\_weeds.htm](http://www.co.monterey.co.us/ag/nax_weeds.htm) (20/01/2007).; 5B. Aspecto geral da inflorescência.



## OBJETIVOS

### ➤ OBJETIVO GERAL

Este trabalho apresenta como objetivo geral o isolamento e purificação da lectina GlcNAc específica obtida a partir dos extratos protéicos dos rizomas de *Arundo donax* L. var. *variegata* Vilnorin, a separação de suas isoformas e a determinação de características e propriedades, além da imunolocalização da mesma no rizoma, e sua utilização como possível marcador de células transformadas, e ainda elenca caracteres morfo-anatômicos úteis no controle botânico de qualidade dos rizomas desta espécie vegetal.

### ➤ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar características morfo-anatômicas, histoquímicas e o perfil fitoquímico qualitativo dos rizomas de *Arundo donax*;
- Estabelecer novo protocolo para o isolamento e purificação da lectina GlcNAc-específica a partir de extratos protéicos dos rizomas de *Arundo donax* L.;
- Determinar características físico-químicas da lectina;
- Determinar características químicas da lectina;
- Determinar propriedades biológicas da lectina;
- Separar e determinar características físico-químicas, químicas e propriedades biológicas das isoformas da lectina;
- Detectar a lectina nos tecidos dos rizomas por imuno-histoquímica em MO de campo claro;
- Utilizar a ADL para a marcação de células transformadas em MO de imunofluorescência.

## **CAPÍTULO I**

### **MORFO-ANATOMIA, HISTOQUÍMICA E PERFIL FITOQUÍMICO QUALITATIVO DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.**

---

## I.1. INTRODUÇÃO

No controle de qualidade da matéria-prima vegetal, está bem definida a importância de estudos referentes a morfo-anatomia do órgão da planta que é comumente comercializado como insumo vegetal. Em decorrência deste fato tem-se, por exemplo, a obrigatoriedade do controle botânico de qualidade de drogas vegetais que são comercializadas pela indústria farmacêutica, desde a década de 90 do século passado, conforme rege a portaria 06/95 da Secretaria da Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde, e subseqüentes (Brito *et al.*, 1996).

Os trabalhos de determinação de características botânicas estabelecem parâmetros morfo-anatômicos que auxiliam na identificação e separam uma determinada espécie vegetal de outra, possibilitando a autenticidade do material e a determinação de adulterantes. Conforme Jorge e Markman (1994), mesmo quando sob a forma de pó, a planta pode ser padronizada botanicamente e identificada em condições laboratoriais, através de seus elementos histológicos característicos. Najera *et al.* (1985), padronizaram o pó de *Panax ginseng* C. A. Meyer e *Panax quinquefolius* L., e compararam diferentes amostras comerciais com o padrão, inferindo sobre a qualidade dos mesmos. Amat (1991), estudando os caracteres histofoliáres de *Ilex paraguariensis* St. Hil. chegou a conclusões que permitiram a identificação do pó das folhas desta espécie e de *Mangifera indica* L., planta utilizada como adulterante. Em 2001, Delaporte *et al.* realizaram estudos farmacognósticos das folhas de *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kunt., planta com comprovada ação antiinflamatória, analgésica e antiviral, por análise morfo-anatômica das folhas, com a finalidade de subsidiar a identificação da droga vegetal.

Na determinação de características referentes à anatomia funcional de um determinado órgão vegetal, a análise histoquímica é de grande utilidade. As

técnicas de histoquímica podem ser empregadas para a realização de um perfil fitoquímico, bem como para otimizar a preparação de extratos vegetais, favorecendo o isolamento de metabólitos, uma vez que as técnicas empregadas sinalizam a localização anatômica dos diversos grupos de compostos químicos.

Nos ensaios histológicos as reações químicas são detectadas microscopicamente, indicando a presença dos metabólitos nos vários tecidos da planta, com alta sensibilidade e reprodutibilidade. As análises, conforme Costa (1982) e Gattuso e Gattuso (1999), estão baseadas fundamentalmente em técnicas que promovem a coloração ou precipitação, para uma determinada classe de compostos químicos. As precipitações, formação de complexos insolúveis, ocorrem pela formação de sais, por reações ácido/base, e as formações cromáticas pela obtenção de um complexo entre o reagente e o grupo químico específico. Os experimentos são realizados tanto com material fresco como desidratado, sem qualquer prejuízo dos resultados, e os cuidados necessários com as técnicas histoquímicas estão centrados fundamentalmente na polaridade das substâncias utilizadas como substrato para as secções da peça botânica.

*Arundo donax* L. (Poaceae) é uma espécie originária do Mediterrâneo e aclimatada no Brasil (Lorenzi e Souza, 1999). Esta planta, conhecida popularmente como cana-do-reino, é perene, vigorosa e prefere solos úmidos, onde forma densos canaviais.

No Brasil, *Arundo donax* chega a ser cultivado como ornamental e seu rizoma é comercializado como medicinal ocorrendo, em algumas vezes, troca dos insumos farmacêuticos desta planta com os insumos de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw., planta conhecida popularmente como cana-do-brejo.

Segundo Alzugaray e Alzugaray (1984), o extrato aquoso de *Arundo donax*, obtido por infusão dos rizomas, é empregado popularmente como diurético nas afecções das vias urogenitais e, em homeopatia, é utilizado em condições catarrais. Passalacqua *et al.* (2007) registraram que, na região da

Calabria (Itália), *Arundo donax* é utilizado popularmente como emoliente e cicatrizante.

Enquanto que em medicina popular se utiliza os rizomas, os colmos de *Arundo donax* são muito usados na produção de instrumentos musicais, como flauta e, por isto, em algumas regiões esta planta é conhecido popularmente por cana-de-música. Esta planta é cultivada em algumas regiões de Cuba e França, dentre outros países, como uma planta produtora de biomassa vegetal, uma vez que é muito rica em fibras (Vernerson *et al.*, 2002; Neto *et al.*, 1997).

Este capítulo apresenta como objetivos a determinação de características morfo-anatômicas e histoquímicas dos rizomas de *Arundo donax* L., bem como o perfil fitoquímico qualitativo, visando o controle botânico de qualidade deste rizoma como matéria-prima vegetal.

## **I.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **I.2.1. Material vegetal**

O material vegetal consta de rizomas de *Arundo donax* L. var. *variegata* Vilnorin, coletados na cidade de Porto Alegre/RS e identificado pelo taxonomista Sérgio Bordignon, conforme exsicata ICN 144955 depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS.

### **I.2.2. Reagentes químicos**

Todos os reagentes utilizados foram do tipo “pró-análise”, e a procedência de alguns produtos químicos, foi a seguinte:

Solventes orgânicos, corantes, glutaraldeído e  $\alpha$ -cianohidróxicinâmico foram provenientes da Sigma, Chemical Company, USA.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada no sistema MILLI Q Plus, Millipore, Bedford, USA.

### **I.2.3. Análise macroscópica**

A análise macroscópica dos rizomas foi efetuada com auxílio de estereomicroscópio binocular.

#### **I.2.4. Fixação e desidratação do material vegetal para análise microscópica**

Porções de 2 x 2 mm dos rizomas frescos foram fixados em glutaraldeído 2 % em PBS e conservados, sob refrigeração, por 48 h. Com a fixação efetuada, o material foi desidratado em série etílica ascendente de 10 a 96 °GL – uma hora em cada álcool. Após a desidratação, o material botânico foi processado para microscopia óptica e eletrônica de varredura, e analisado segundo Dickison (2000) e Appezzato-da-Glória e Carmello-Guerreiro (2003).

#### **I.2.5. Processamento do material vegetal para MO**

O material botânico, previamente fixado e desidratado, conforme item I.2.4., foi incluído em blocos de hidroxietilmetacrilato, conforme Gerrits e Smidt (1983) e Ruetze e Schimitt (1986). Secções de 4 µm foram obtidas em micrótomo rotativo. Cada secção foi levada a banho histológico, repassada para lâmina e corada com azul de toluidina a 0,05 %, segundo Gerlach (1977). Após a coloração, a lamínula foi fixada sobre as secções com bálsamo do Canadá sintético. O material foi observado em microscópio de campo claro e registrado em desenho a nanquin, por Márcia Vignoli-Silva, com auxílio de câmara clara.

#### **I.2.6. Processamento do material vegetal para MEV**

O material botânico, previamente fixado e desidratado, foi repassado para acetona e neste solvente foi levado em aparelho de ponto crítico, onde a temperatura foi baixada até 4 °C, com 10 passagens do material em CO<sub>2</sub>, para a retirada gradual da acetona. Em seguida, o material foi aderido em suporte de alumínio, com o auxílio de fita dupla face de grafite, e metalizado com uma

fina camada de ouro, com 20 nm de cobertura, em 40 mA, por 1 min, através do sistema *sputten*, em aparelho marca Balzers SCD 050.

As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura, marca Jeol JSM 6060, no Centro de Microscopia Eletrônica – UFRGS, sob 20 kvolts, e registradas em microfotografias.

### **I.2.7. Análise histoquímica**

Para a análise histoquímica, lâminas semi-permanentes foram montadas com secções transversais, obtidas à mão livre, dos rizomas mantidos a fresco. As secções foram tratadas com reagentes indicativos de compostos específicos para amido, mucilagens, proteínas, óleos fixos e voláteis, cardioativos, isotiocianatos, alcalóides, saponinas, flavonóides, cumarinas, taninos, antracenosídeos e antocianinas, conforme Sass (1951), Costa (1982) e Gattuso e Gattuso (1999). As imagens foram obtidas em microscópio de campo claro, e as cumarinas em microscópio de fluorescência com filtro de excitação entre 340-380 nm, e registradas por microfotografias.

### **I.2.8. Detecção e localização de proteínas nos rizomas por EM**

Os rizomas frescos de *Arundo donax* foram seccionados transversalmente e imediatamente foi feito um *imprint* do material, por contato, durante 10 min, contra membrana de nitrocelulose, e após foi aplicada sobre o material solução saturada de  $\alpha$ -cianohidroxicinâmico.

As membranas, contendo o material aderido, foram afixadas ao porta-amostra do espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II, operado no modo linear positivo. Os espectros foram obtidos com espaçamento de 300  $\mu\text{m}$  em uma área de 1-2  $\text{cm}^2$ . Foi direcionado laser de nitrogênio pulsado com intensidade de 30 a 40 %, contra a superfície de interesse, em espaços de 300



µm. Um espectro global foi gerado para uma imagem, após 10 a 15 pulsos de laser em cada posição.

Imagens espectrais dos componentes com maior ionização foram registradas e um software de análise de imagem funcional (Flex Imaging) foi utilizado para a obtenção de mapas iônicos baseados na intensidade para os componentes moleculares, na faixa de 5 e 30 kDa.

A localização espacial das moléculas correspondentes aos espectros foi determinada pela sobreposição com a imagem da secção anatômica obtida em microscopia óptica.

### **1.2.9. Análise química qualitativa**

Os ensaios para a análise qualitativa das distintas classes de metabólitos dos rizomas de *Arundo donax* seguiu metodologia conforme Lúcio (2000). Para tanto, os rizomas pulverizados sofreram extração à quente com éter, seguido de extração com etanol e após extração com água, em extrator tipo Soxhlet.

Para a caracterização de isotiocianatos foram realizados ensaios segundo Costa (1982), e a caracterização de saponinas hemolíticas e cardioativos conforme Moreira (1979).

### I.3. RESULTADOS

#### I.3.1. Análise macroscópica

*Arundo donax*, conforme a figura I.1, apresenta rizomas predominantemente de cor amarelo-parda a acastanhada, pouco lúzida quando jovem. Os rizomas possuem, em média, 9 cm de diâmetro, atingindo comumente 3 a 12 cm de diâmetro e apresentam aspecto cilíndrico-tortuoso, levemente achatado para as laterais e também ventralmente. Este órgão mostra-se com numerosas ramificações sinuosas.

A superfície dos rizomas apresenta saliências anulares oblíquas, com espaçamento entre 0,5 a 1 cm, caracterizando as regiões nodais e internodais. A superfície é lisa quando o órgão é jovem, mas posteriormente mostra, freqüentemente, algumas estrias entre as saliências anulares, e contudo, não possui aspecto piloso ou áspero. Estes rizomas são, caracteristicamente, muito rígidos e possuem consistência extremamente endurecida. Apresentam grande resistência a pressões, denotando a presença de altas concentrações de material lignificado.

As raízes são finas projetam-se dos rizomas em profusão. Atingem em média 2 a 3 mm de diâmetro e são cilíndricas, apresentando aspecto robusto e coloração mais clara do que a dos rizomas. Comumente, a queda destas raízes deixa cicatrizes lenticulares muito evidentes na superfície de todo o rizoma.

A secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* revelou um aspecto bastante lenhificado, com uma porosidade muito fina e uma coloração amarelo-palha. Esta secção mostra, a poucos milímetros de sua margem um anel periférico contínuo e mais claro que apesar de tênue, separa nitidamente a zona cortical da medula, de cor mais acentuada.

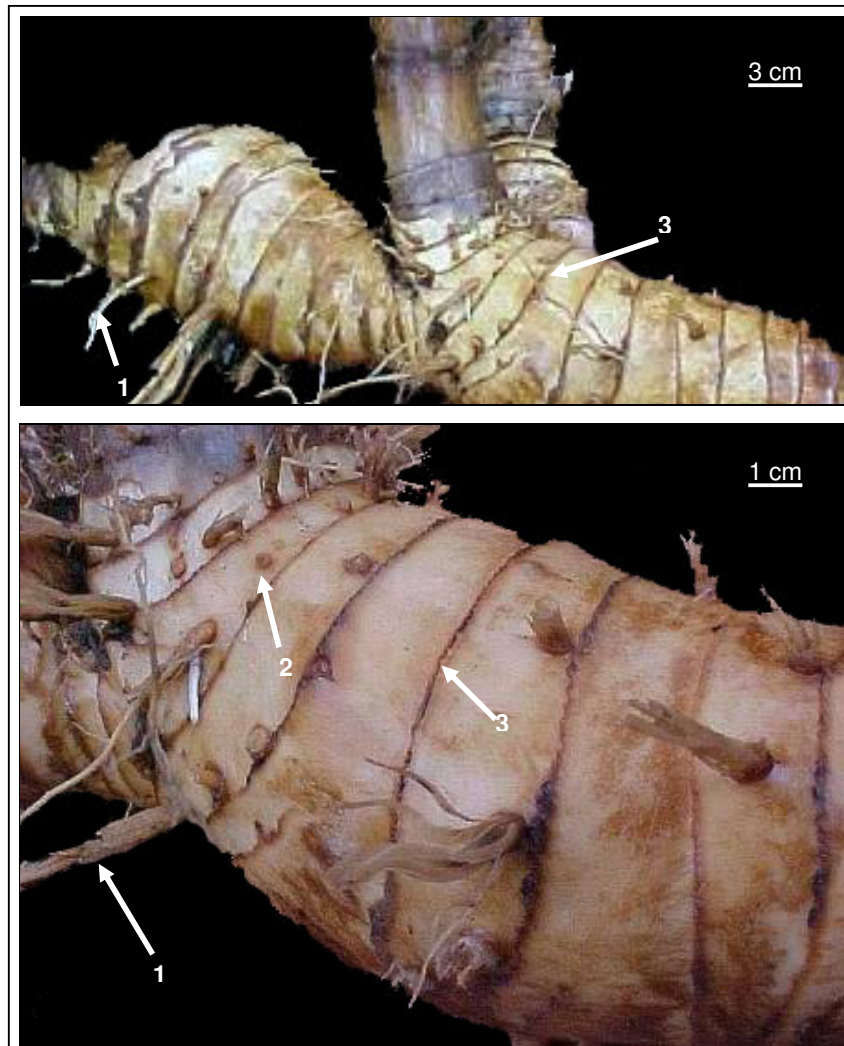


Figura I.1

FIGURA I.1. Aspecto geral dos rizomas de *Arundo donax* L. Legenda: 1. raízes; 2. cicatrizes; 3. saliências anulares.

### **I.3.2. Análise microscópica**

Em secção transversal o rizoma de *Arundo donax* apresenta uma epiderme uniestratificada, contínua e persistente. As células epidérmicas são pavimentosas, com a parede periclinal maior do que a anticlinal. Estas células apresentam paredes celulares espessas e encontram-se recobertas externamente por uma cutícula, que apesar de tênue, é contínua. Nesta única camada de epiderme faltam tricomas tectores e glandulares (figuras I.3 e I.8).

Na região subjacente à epiderme tem-se uma bainha de fibras. Esta bainha de fibras é constituída, em média, por 3 a 14 camadas de células. As fibras apresentam diâmetro variável, mas a parede celular das mesmas é mais espessa nos ângulos em contato com as células vizinhas (figura I.3).

Imediatamente abaixo da bainha de fibras citada ocorre um parênquima de reserva, caracterizando a região cortical do rizoma. As células deste parênquima de reserva, geralmente, são ovais e possuem parede celular espessa. Em conjunto apresentam 30 a 50 camadas de células parenquimatosas. O espaço intercelular que ocorre nesta região é muito reduzido, caracterizando o tipo meato. As duas primeiras camadas de células parenquimáticas que se encontram mais próximas das fibras possuem forma isodiamétrica bem definida. As células que constituem o parênquima de reserva geralmente possuem o citoplasma rico em grãos de amido. Os grãos de amido são pequenos, ovóides, simples e homogêneos (figuras I.2 e I.8).

Uma segunda bainha de fibras é visualizada após o parênquima cortical, estando constituída, em média, de 8 a 10 camadas de fibras (figura I.3, 1.7 e 1.9). Esta região pode ser caracterizada como sendo o periciclo. Em contrapartida, a visualização da endoderme, em geral, é muito dificultada, o que se deve possivelmente ao alto grau de lignificação desenvolvido pelas células que compõem o periciclo.

Após a segunda bainha de fibras segue um parênquima que constitui a

medula do rizoma. Esta região é muito desenvolvida, constituindo a maior parte do rizoma. No parênquima que constitui a medula, as células são ovais e possuem o tamanho aumentado à medida que se afastam do periciclo. Por outro lado, apesar das células parenquimáticas que formam a medula serem maiores do que as células do parênquima cortical, a parede celular é mais delgada do que as paredes daquelas células que se encontram no parênquima de reserva da região cortical. O espaço intercelular, em toda a medula, é muito reduzido, caracterizando o tipo meato (figuras 1.3, 1.5 e 1.9).

Os feixes vasculares encontram-se dispersos por todas as regiões parenquimatosas do rizoma, evidenciando uma estrutura atactostélica muito característica.

Na região cortical os feixes vasculares, que estão mergulhados no parênquima de reserva, são do tipo colateral aberto e bem menores do que aqueles da medula. Estes feixes vasculares apresentam, em sua face periférica, uma calota de fibras e, em geral, 2 a 3 camadas de células de parede espessa. Também apresentam células parenquimáticas, bem menores do que as do entorno, associadas aos elementos de tubo crivado (figura 1.4).

Os feixes vasculares da região da medula são do tipo colateral fechado, estando protegidos por uma bainha de fibras relativamente bem desenvolvida (figura 1.5). Estes feixes são maiores à medida que se distanciam do periciclo. Os elementos de vaso encontram-se separados das fibras por algumas poucas células parenquimáticas internas no feixe vascular (figura 1.3 e 1.5). O protoxilema apresenta elementos de vaso de menor diâmetro margeados por células de parede fortemente espessadas. O metaxilema está mais desenvolvido e seus elementos de vaso são grandes, volumosos e com parede celular reticulada. Associadas e ao seu redor ocorrem células parenquimáticas com parede celular fortemente lignificada. O floema é muito pouco desenvolvido e encontra-se separado do xilema por poucas camadas de células levemente alongadas e de parede celular mais espessa. As células do floema são pequenas e apresentam parede celular fina e delicada (figuras 1.5 e 1.6).

A secção transversal do rizoma revela a ausência de idioblastos contendo drusas e outras inclusões de oxalato de cálcio. Também se faz ausente, em todas as regiões destes rizomas, qualquer tipo de células ou cavidades secretoras.

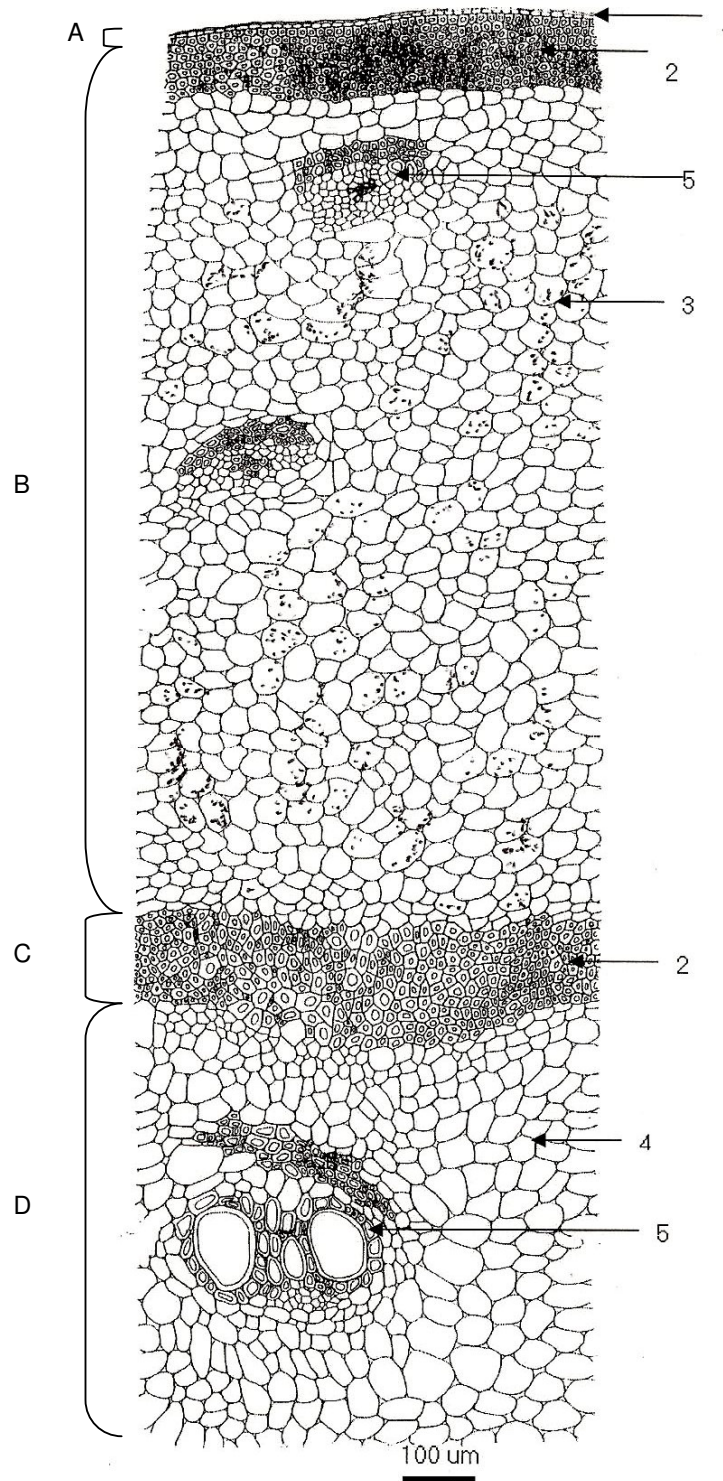


FIGURA I. 2. Secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. – aspecto geral. Legenda: A. epiderme; B. córtex; C. periciclo; D. medula; 1. células da epiderme com cutícula; 2. Fibras corticais; 3. células do parênquima cortical com amido; 4. células do parênquima medular; 5. feixes vasculares.



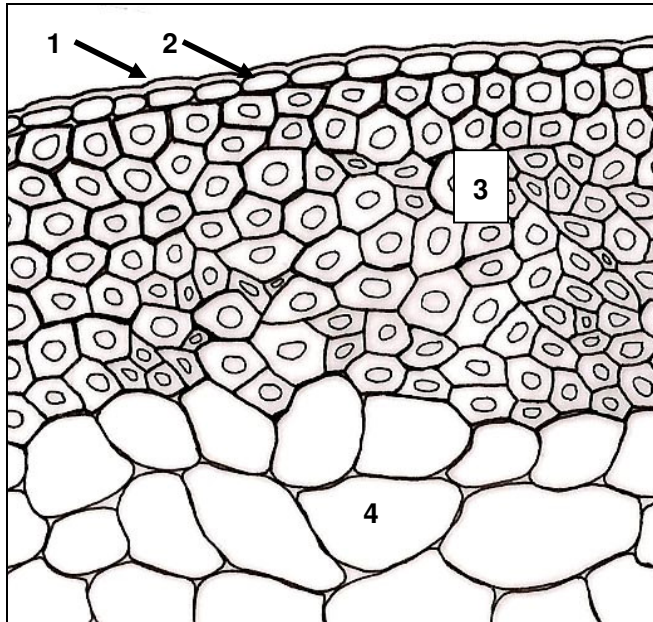


FIGURA I.3. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. na região da epiderme e bainha de esclerênquima. Legenda: 1. cutícula; 2. células epidérmicas; 3. fibras esclerenquimáticas; 4. célula parenquimática.

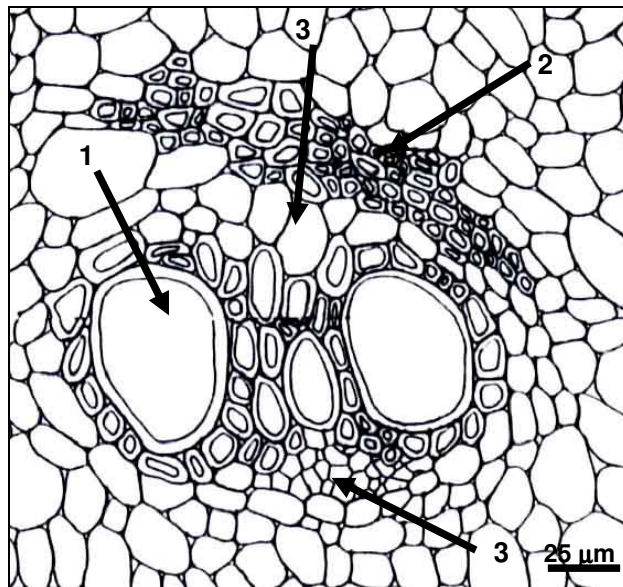


FIGURA I.4. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. – detalhe de um feixe vascular colateral aberto. Legenda: 1. xilema; 2. fibras esclerenquimáticas; 3. células parenquimáticas.



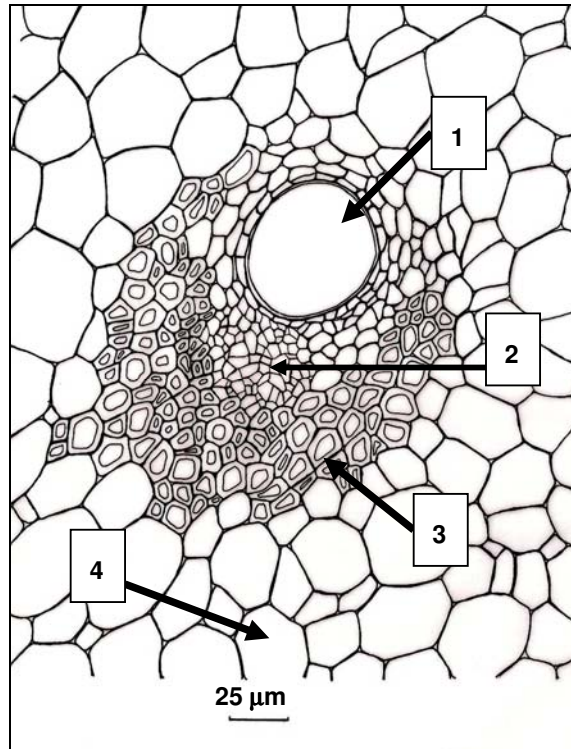


FIGURA I.5. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região de um feixe vascular colateral fechado. Legenda: 1. xilema; 2. células do floema; 3. bainha vascular; 4. células parenquimáticas.

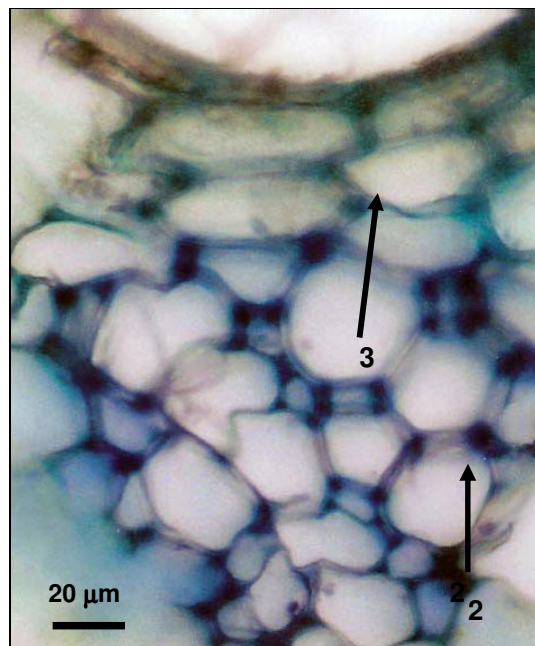


FIGURA I.6. Secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. ao MO corado com azul de toluidina a 0,05 % – detalhe do floema de um feixe vascular. Legenda: 1. tubo crivado; 2. células companheiras; 3. células parenquimáticas.

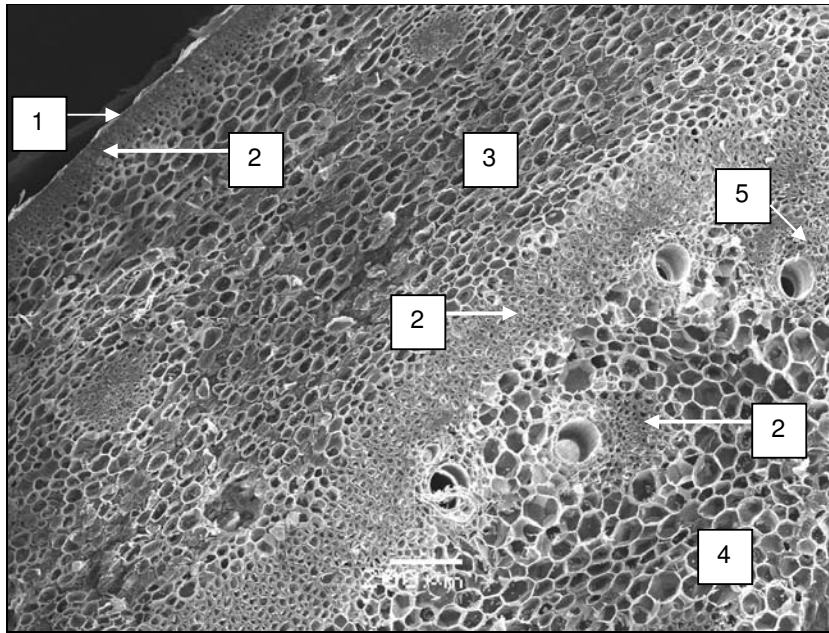


FIGURA I.7. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. em MEV – aspecto geral. Legenda: 1. epiderme; 2. bainha de fibras esclerenquimáticas; 3. parênquima cortical; 4. parênquima medular; 5. feixe vascular.

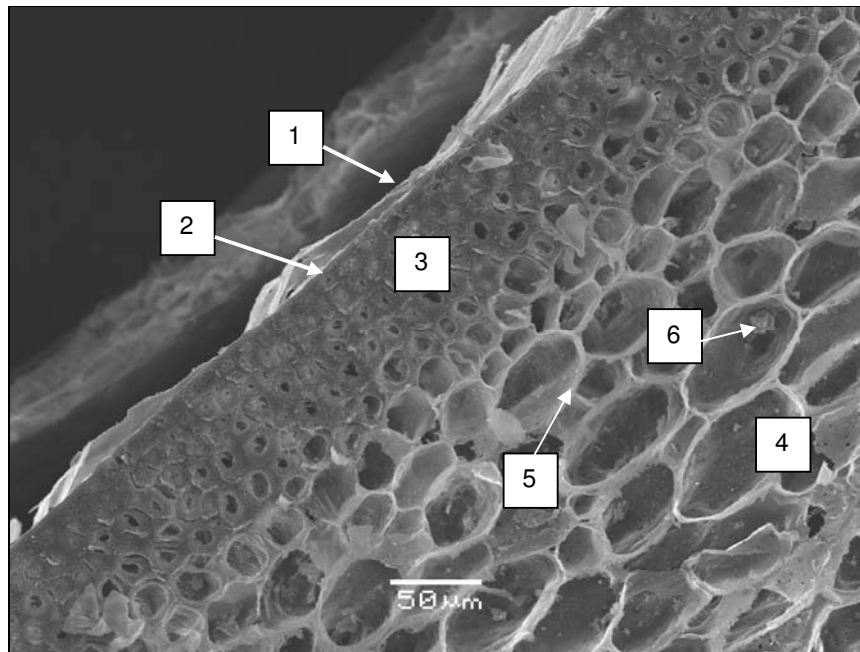


FIGURA I.8. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. em MEV – região cortical. Legenda: 1. cutícula; 2. epiderme; 3. bainha de fibras esclerenquimáticas; 4. parênquima cortical; 5. amido; 6 meato.

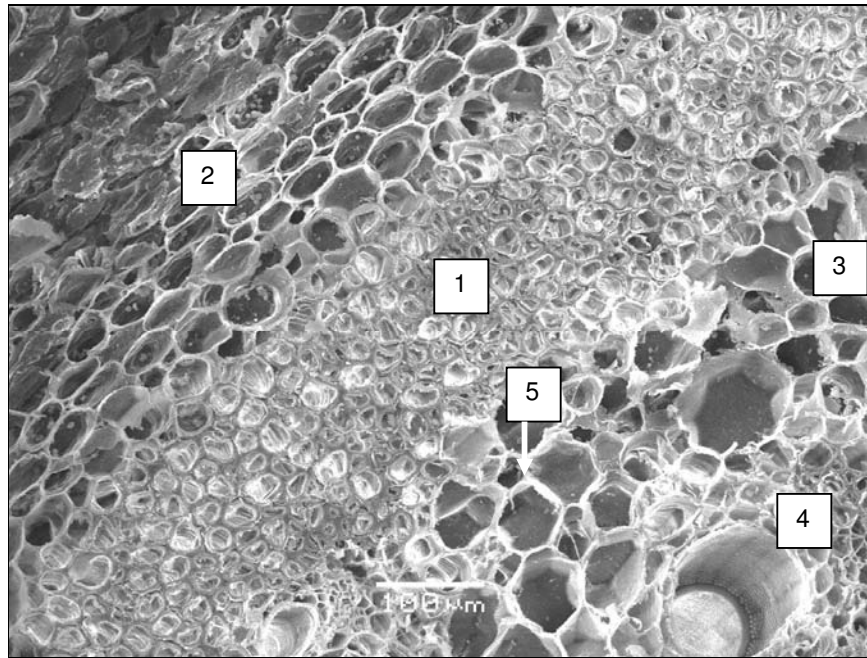


FIGURA I.9. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. em MEV – região de transição entre córtex e a medula. Legenda: 1. bainha de fibras esclerenquimáticas; 2. parênquima cortical; 3. parênquima medular; 4. parte de um elemento de vaso; 5. meato.

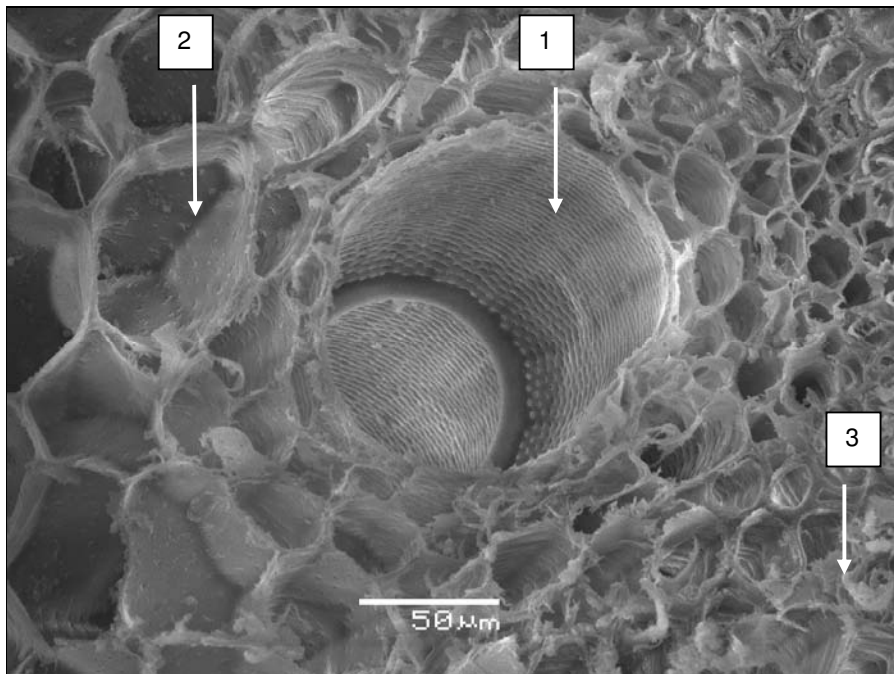


FIGURA I.10. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. em MEV – Detalhe do xilema no feixe vascular. Legenda: 1. elemento de vaso com espessamento reticulado na parede celular; 2. células parenquimáticas; 3. fibras.

### I.3.3. Análise histoquímica

A análise histoquímica das secções transversais dos rizomas de *Arundo donax*, mostra que flavonóides, saponinas, mucilagens, alcalóides e cumarinas são os grupos de metabólitos presentes e encontrados em regiões anatômicas específicas, conforme tabela I.1 e figuras I.11 a I.17, e ainda, que o amido está disperso no parênquima cortical e nas células parenquimáticas, e, as fibras de esclerênquima são ricas em proteínas.

TABELA I.1 – Análise histoquímica dos rizomas de *Arundo donax* L.

<b>Compostos analisados</b>	<b>Localização histoquímica</b>
Proteínas	Em células parenquimáticas, e também nas fibras esclerenquimáticas (Figura I.11).
Mucilagens	Em grupos de células parenquimáticas localizadas profundamente na medula (Figura I.12).
Amido	Disperso em células do parênquima cortical (Figura I.13).
Oxalato de cálcio	Não observado.
Cumarinas	Profundamente no parênquima da medula (Figura I.14).
Flavonóides	Nas fibras esclerenquimáticas do sistema vascular (Figura I.15).
Saponinas	Nas fibras esclerenquimáticas da bainha e dos feixes vasculares (Figura I.16).
Taninos	Não observado.
Cardioativos	Não observado.
Antracenosídeos	Não observado.
Antocianinas	Não observado.
Isotiocianatos	Não observado.
Alcalóides	Em células do parênquima próximo ao periciclo e em elementos de vaso do xilema (Figura I.17)
Óleos voláteis	Não observado.

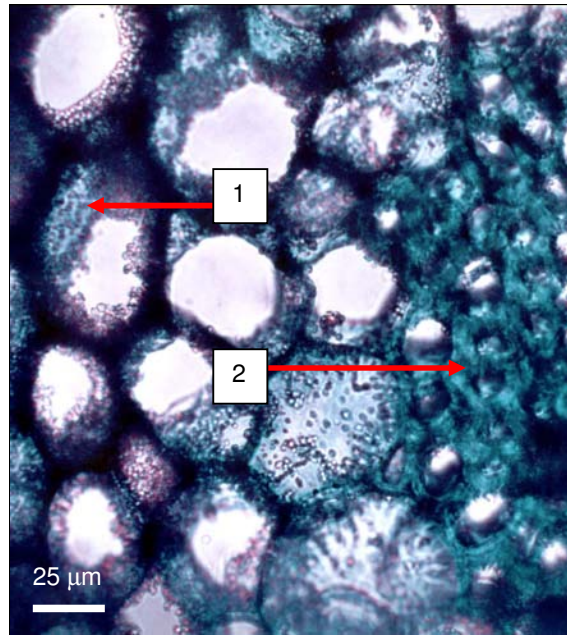


FIGURA I.11. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração com reagente de azul de Comassie Brilhante R-250 0,25% em metanol, evidenciando a presença de proteínas nas células do parênquima (1) e nas fibras (2).

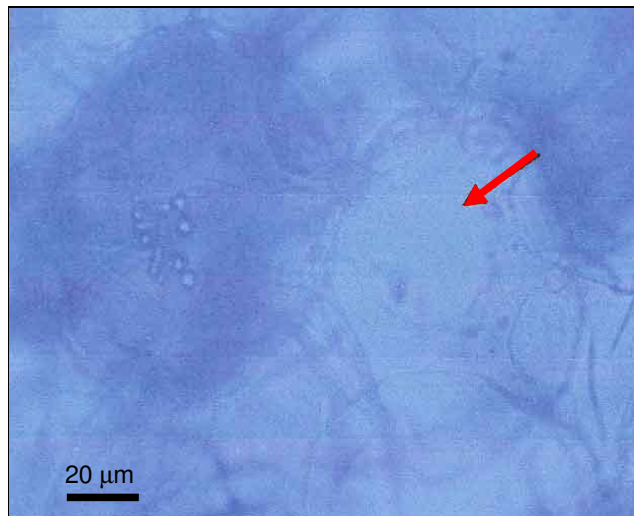


FIGURA I.12. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração com tinta da China, evidenciando a presença de mucilagens no parênquima medular.



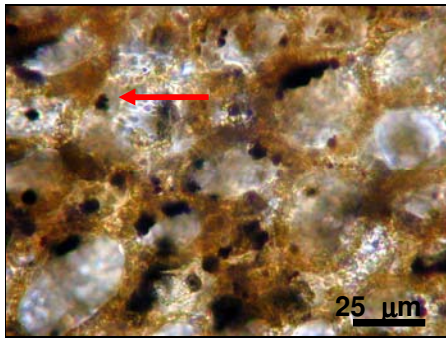


Figura I.13

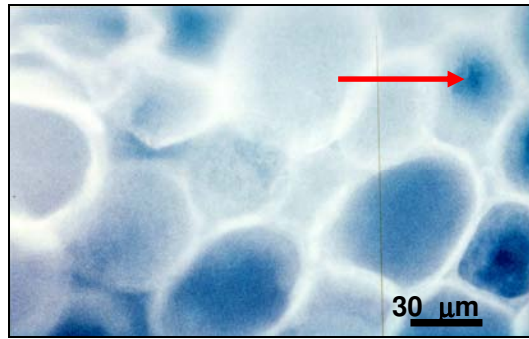


Figura I.14

FIGURA I.13 Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração com reativo de lugol, evidenciando a presença de grãos de amido no parênquima cortical.

FIGURA I.14. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração com KOH 5% em etanol e filtro de excitação em UV 340-380 nm, evidenciando a presença de cumarinas no parênquima medular.

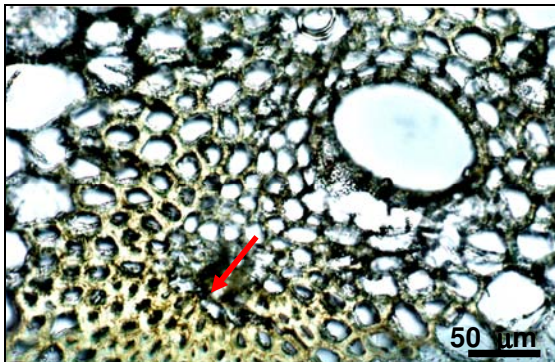


Figura I.15

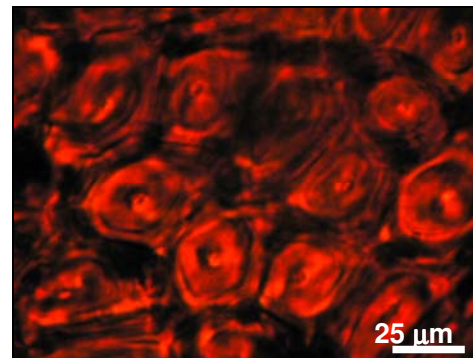


Figura I.16

FIGURA I.15. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração com reagente de Shinoda, evidenciando a presença de flavonóides nas fibras dos feixes vasculares.

FIGURA I.16. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração pelo reagente de Salkowsky, evidenciando a presença de saponinas nas fibras da bainha que formam o periciclo.

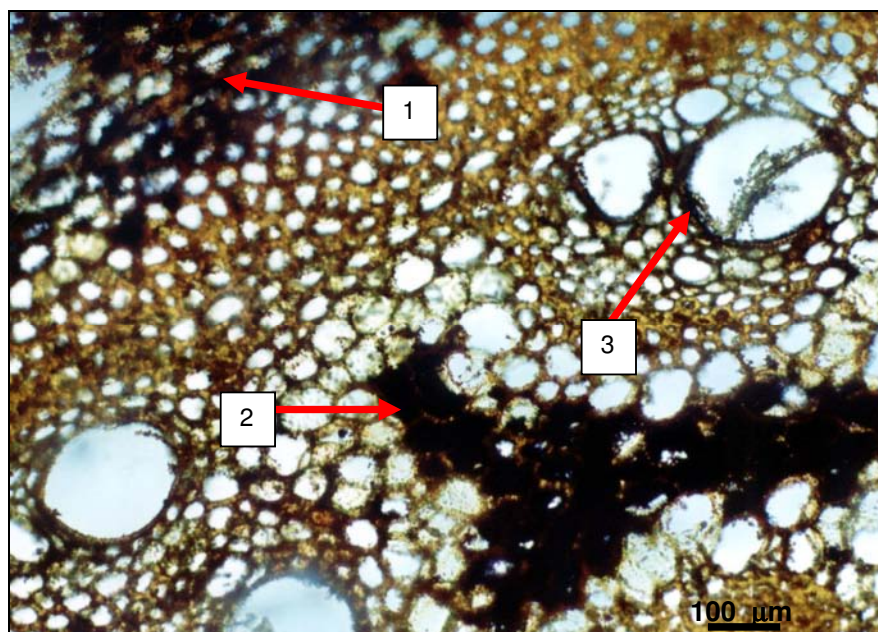


FIGURA I.17. Detalhe da secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. - coloração com reagente de Dragendorff, evidenciando a presença de alcalóides no parênquima cortical (1) e parênquima medular (2), próximo ao periciclo, e elementos de vaso do xilema (3) .

#### I.3.4. Detecção e localização espacial de proteínas por EM

Através de espectrometria de massa foram detectados componentes protéicos nos rizomas de *Arundo donax* L. com massa molecular entre 5-30 kDa. Para a realização desta técnica, as secções utilizadas na obtenção das imagens deveriam ser frescas e semi-finas, com aproximadamente 4-6  $\mu\text{m}$ , fator limitante no trabalho, pois a alta lignificação do órgão em análise não permitiu secções a mão livre com estas dimensões. Assim é que a obtenção de imagens espectrais foi possível pela utilização de uma membrana de nitrocelulose. As proteínas com massa molecular superior a 10 kDa são detectadas por esta técnica, porém a imagem gerada não permite sua localização puntual, por limitações da técnica.

As proteínas com massa molecular de 5-8 kDa apresentaram maior

abundância nos rizomas de *Arundo donax* e as imagens mostraram uma discreta co-localização destas proteínas (Figura I.18).

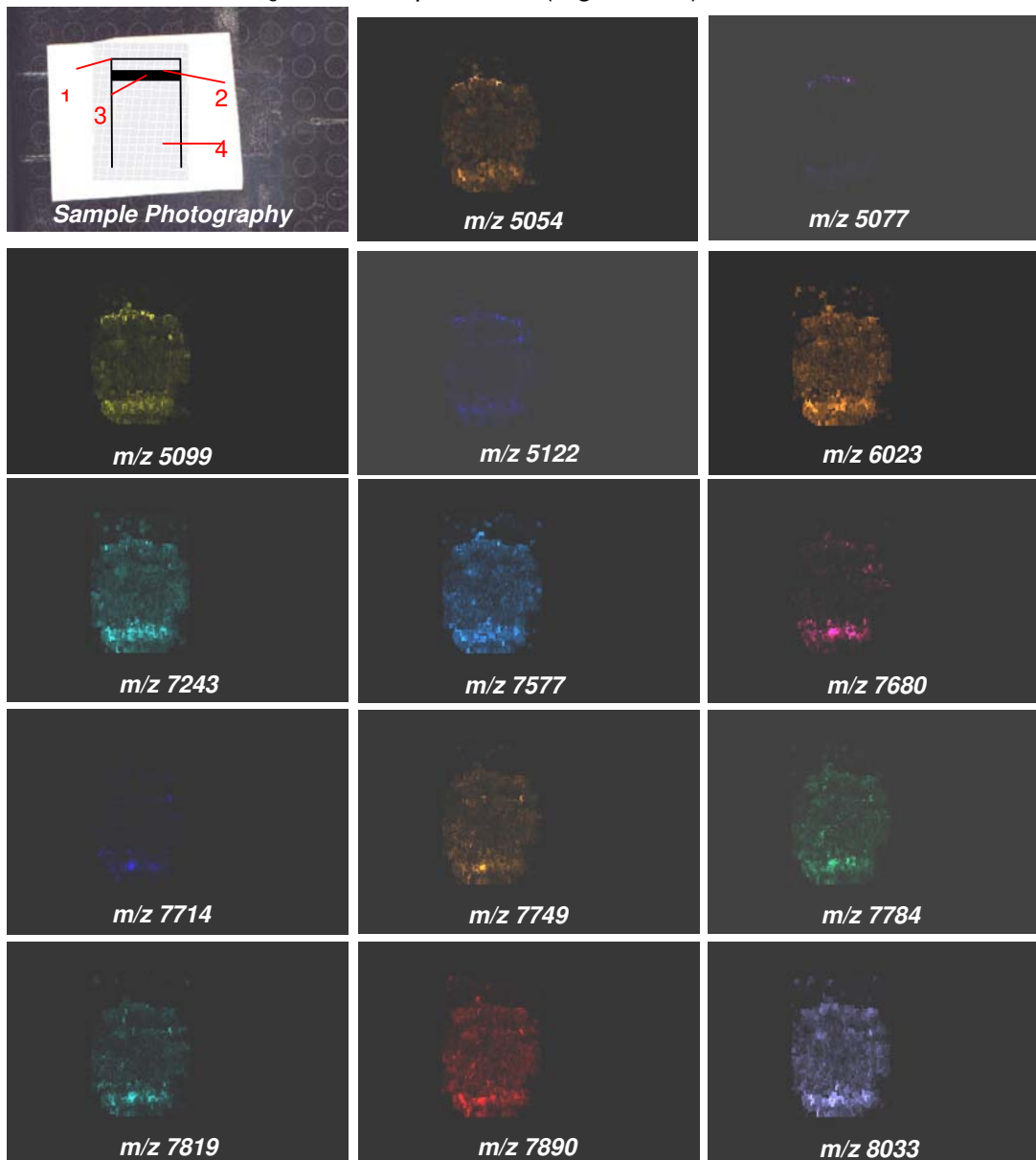


FIGURA I.18. Imagens obtidas por espectroscopia de massa MALDI-TOF/TOF, evidenciando a detecção espacial de proteínas na secção transversal do rizoma de *Arundo donax* L. com massas moleculares entre 5 e 8 kDa. Legenda da amostra fotográfica: 1. epiderme; 2. bainha de fibras e parênquima cortical; 3. periciclo; 4. medula. m/z: massa molecular correspondente a cada proteína detectada puntualmente.

### I.3.5. Perfil fitoquímico qualitativo



A análise química qualitativa dos extratos, obtidos a quente, dos rizomas de *Arundo donax* pulverizados está registrada na tabela I.2, sendo destacada a presença de saponinas não hemolíticas no extrato aquoso, flavonóides no extrato aquoso e etanólico, alcalóides no extrato etanólico, mucilagens e óleos fixos no extrato etéreo e de cumarinas e triterpenos esteroidais no extrato etéreo, etanólico e aquoso.

TABELA I.2. Análise química qualitativa dos extratos dos rizomas de *Arundo donax* L.

Ensaio	Extrato etéreo	Extrato etanólico	Extrato aquoso
Mucilagem	+	*	*
Óleos voláteis	-	*	*
Óleos fixos	+	*	*
Triterpenos/esteróis	+	+	+
Cumarinas	+	+	+
Flavonóides	*	+	+
Alcalóides	*	+	*
Taninos gálicos	*	-	-
Taninos catéquicos	*	-	-
Antocianinas	*	-	-
Antracenosídeos	*	-	-
Cardioativos	*	-	-
Isotiocianatos	*	-	-
Saponinas	*	*	+
Saponinas hemolíticas	*	*	-

Legenda: + resultados positivo; - resultados negativo; \* não analisado.

#### I.4. DISCUSSÃO

Os parâmetros adotados na definição de rizoma são discutíveis e abarcam basicamente, questões referentes à ocorrência de material de reserva, ao tipo de crescimento que apresenta e também à ontogenia do órgão (Alonso e Moraes-Dallaqua, 2004). No presente trabalho foi assumido o termo rizoma para o órgão subterrâneo de *Arundo donax* L. tomando-se por base a definição de Font Quer (1993), uma vez que esta estrutura lembra a forma de raízes, apresenta crescimento indefinido, exhibe nós e entre-nós evidentes e possui um estoque reduzido de amido como substância de reserva.

Na análise morfológica dos rizomas de *Arundo donax* pode ser destacado o diâmetro de até 12 cm e a forma tortuosa, levemente achatada, que este órgão apresenta, mostrando saliências anulares e oblíquas por toda sua extensão. A grande resistência que oferece, e o aspecto liso, por vezes luzidio, bem como a cor amarelo-parda, são elementos úteis na caracterização deste órgão para a planta em questão. Estas características auxiliam na diferenciação deste rizoma, quando comparado com outros de valor medicinal. Rizomas de *Imperata brasiliensis* Trin. (Poaceae), por exemplo, também apresentam aspecto rígido e luzidio, porém atingem um diâmetro de apenas 3 a 5 cm, com entre-nós com 0,5 a 1 cm e apresentam cor brancacenta ou amarelo-palha (Oliveira *et al.*, 1991), o que as diferenciam dos rizomas de *Arundo donax*. Os mesmos autores, descrevendo rizomas, destacam os de *Acorus calamus* L., dentre outras plantas reconhecidas como medicinais, e assinalam que os rizomas desta planta possuem saliências oblíquas com 1 a 2 cm de distância, porém atingem no máximo 3 cm de diâmetro e apresentam uma superfície rugosa, características estas, diferentes das encontradas em *Arundo donax*.

Na análise microscópica foi detectada que, caracteristicamente, drusas e outras inclusões de oxalato de cálcio estão ausentes nos rizomas de *Arundo*

*donax*. Este fato pode servir para uma boa orientação na averiguação da autenticidade deste material vegetal. Estruturas de oxalato de cálcio são comuns em outras famílias de monocotiledóneas como, por exemplo, em costáceas e comelináceas (Metcalf, 1960). Em *Smilax goyazana* A. DC., por exemplo, representante da família Smilacaceae, as células da medula estão repletas de cristais de oxalato de cálcio (Phalhares e Silveira, 1985). Outro exemplo da presença de cristais de oxalato de cálcio em tecidos do rizoma pode ser verificado no gênero *Costus* (Martins *et al.*, 1995).

Em *Arundo donax* não foi observada a presença de células e cavidades secretoras em todas as regiões do rizoma. Speck e Spatz (2003) também não assinalaram nenhuma estrutura secretora nestes rizomas. A falta destas estruturas anatômicas concorda com os resultados obtidos com a análise histoquímica do presente trabalho, bem como com os resultados obtidos com a análise química qualitativa dos rizomas, pois não foi detectado a presença de óleos voláteis neste órgão.

Com a análise microscópica dos rizomas de *Arundo donax* ficou evidente que a epiderme é contínua e persistente, e a cutícula mostrou-se como uma estrutura constante. Em *Smilax goyazana* A. DC. também ocorre uma epiderme uniestratificada associada a uma exoderme esclerificada, porém, diferentemente de *Arundo donax*, esta epiderme apresenta muitos estômatos (Palhares e Silveira, 2005). Para *Imperata brasiliensis* Trin., Oliveira *et al.* (1991) destacam que as células epidérmicas são irregulares tanto na forma como no tamanho e os espaços intercelulares do parênquima são caracteristicamente meatos triangulares. Estas características são muito distintas das observadas em *Arundo donax*, que exibe uma epiderme de forma e tamanho bem regular, e meatos que raramente apresentam a forma triangular. Oliveira *et al.* (1991), destacam para os rizomas de *Gentiana lutea* L., uma região suberosa muito espessa, e, ao contrário dos rizomas de *Arundo donax*, estes outros não contém amido. Por outro lado, em toda a estrutura dos rizomas de *Gentiana lutea* L., como em *Arundo donax*, não ocorrem cristais de oxalato de cálcio. Também ficou bem demarcada a grande quantidade de células esclerenquimáticas, protegendo os feixes vasculares, e formando

bainhas de fibras em várias camadas. Speck e Spatz (2003) salientam que os rizomas são estruturas conectantes entre as raízes e o caule e destacam que o custo real da ancoragem, realizado por este órgão, está representado por uma produção adicional de um material capaz de os fortalecer. Isto ocorre com o aumento da lignificação deste órgão, que se caracteriza como sendo a principal ferramenta de ancoragem dos colmos. A endoderme dos rizomas de *Arundo donax*, não é observável, pois sua detecção torna-se muito difícil nos rizomas maduros, diferentemente dos de *Alpinia speciosa* L., que conforme Bell e Tom Linson (1980), exibe uma endoderme bem pronunciada. O rizoma de *Canna edulis* Kerr-Gawler também mostra um córtex com endoderme evidente (Alonso e Moraes-Dallaqua, 2004).

Há casos em que algumas fibras, como as que ocorrem em palmeiras e em *Sambucus*, mesmo depois de diferenciadas, permanecem com seus protoplastos ativos. Nestes casos, as fibras são caracterizadas pela presença de septos, e pelo acúmulo de substâncias químicas como óleos, amido e cristais (Scatena e Scremin-Dias, 2003). No caso em questão dos rizomas de *Arundo donax*, pode-se observar a presença de protoplasto em algumas fibras, fato muito perceptível com o uso de reagentes como azul de Comassie brilhante R-250 a 0,25 % corante de proteínas. Na parede celular, conforme Showalter (1993), muito comumente ocorrem proteínas das quais destacam-se as HRGPs (glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas), GRPs (proteínas ricas em glicinas), as PRPs (proteínas ricas em prolinas) e ainda as AGPs (proteínas arabinogalactanos). Todas estas proteínas são estruturais e interferem no estado de defesa das plantas contra patógenos invasores. Em caules e tecidos que sofrem torção, é comum observar no lenho de torção e em sistemas subterrâneos fibras com parede celular muito espessada (figura 10.B). A redução do lume acaba por ocasionar, em geral, a perda do protoplasto na maturidade destas células (Scaneta e Scremin-Dias, 2003). Este fato não se traduz necessariamente na inatividade da parede celular das fibras, pois são elementos que fornecem principalmente proteção e sustentação aos órgãos onde se fazem presentes. A constituição química que comumente as fibras apresentam em suas paredes celulares, são apontadas como elementos que fornecem proteção e sustentação em órgãos como caules, sementes e frutos

imaturos. Conforme Scaneta e Scremin-Dias (2003) o alto grau de lignificação que estas células atingem é um fator que confere função de proteção ao vegetal, pois as ligninas não são digeridas pelos animais, constituindo, assim, uma forma de defesa para as plantas.

Os ensaios de histoquímica, realizados com os rizomas de *Arundo donax*, mostraram resultados concordantes com os obtidos no perfil fitoquímico qualitativo dos extratos obtidos a quente, a partir dos rizomas pulverizados. As saponinas foram evidenciadas nas fibras esclerenquimáticas dos feixes vasculares por coloração intensa desenvolvida quando a secção transversal do rizoma foi tratado com o reativo de Salkowsky. Possivelmente, estes metabólitos apresentam a função de proteção contra a invasão de microrganismos, que eventualmente passam pelos vasos, visto que, geralmente, as saponinas apresentam potente função antimicrobiana (Costa, 1982). Contudo, não foi encontrado para *Arundo donax*, na literatura pesquisada no presente trabalho, qualquer menção neste sentido. Para alcalóides, os testes de Dragendorff apresentaram resultados positivos e com grande intensidade. Estes resultados concordam com trabalhos de Glosal *et al.* (1971) e Miles *et al.* (1993) que detectaram a presença destes metabólitos nitrogenados em *Arundo donax*. No sistema vascular, em especial nas fibras esclerenquimáticas, foi caracterizada a presença de flavonóides pelo forte desenvolvimento de coloração amarela, apontando um alto grau de conjugação. Os flavonóides, conforme Farias (1999), em presença de HCL concentrado e magnésio, desenvolvem cor amarela, por apresentarem um núcleo  $\alpha$ -benzopirona. Para a localização histológica das cumarinas foi utilizado como reagente KOH a 5 %. Conforme Costa (1982), em meio alcalino, ocorre a abertura do anel lactônico destas estruturas. Este fato propicia um destaque na fluorescência azul quando o material é visualizado em UV. A caracterização de mucilagens foi observada em células parenquimáticas da medula, após análise com tinta da China. Segundo Costa (1982), o teste realizado com tinta da China é muito prático, tirando-se proveito da propriedade que as mucilagens têm em reter água, o que acaba por tornar as células onde estes metabólitos encontram-se armazenados mais claras que as outras ao seu redor. Este mesmo autor destaca que, dentre os diferentes grupos

taxonômicos, a localização destes compostos mucilaginosos é constante, característica que torna-se importante na identificação de inúmeras espécies e conseqüentemente na autenticidade do material botânico.

Uma grande quantidade de proteínas foi evidenciada por coloração com azul de Comassie brilhante R-250, principalmente no citoplasma das células parenquimáticas e nas paredes das fibras esclerenquimáticas. A detecção espacial, localização e distribuição de proteínas no rizoma, também foi obtido por espectrometria de massa. Por esta técnica a distribuição puntual de proteínas em um órgão ou tecido, conforme Chaurand *et al.* (2002), pode ser obtido diretamente da superfície do órgão seccionado, ou em membranas de nitrocelulose que sofreram um *imprint* com o órgão seccionado. Esta técnica é relativamente nova. A varredura *in situ* tem sido divulgada recentemente por Caprioli e colaboradores (Chaurand *et al.*, 2006; Chaurand *et al.*, 2002). Em *Arundo donax* a intensidade relativa de proteínas com 5 a 8 kDa foi mais pronunciada no parênquima medular. Contudo, algumas proteínas apresentaram localização apenas na epiderme, enquanto que outras proteínas foram localizadas nas camadas de fibras esclerenquimáticas, subjacentes à epiderme ou abaixo da região cortical. Houve componentes protéicos com localização restrita ao parênquima cortical e/ou medular enquanto que poucos apresentaram-se em todas as regiões citadas.

## **CAPÍTULO II**

### **ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DA LECTINA OBTIDA A PARTIR DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.**

---

## II.1. INTRODUÇÃO

Uma grande variedade dos produtos naturais tem origem no metabolismo de vegetais, com substâncias que diferem na complexidade química e atividade biológica. Os estudos destes metabólitos auxiliam, especialmente, a compreensão da fisiologia das plantas, da quimiotaxonomia e na busca de protótipos para novos fármacos e medicamentos. Dentre os compostos químicos de interesse estão as lectinas, proteínas de origem não imune que possuem um ou mais sítios de ligação para carboidratos sem modificá-los (Sol *et al.* 2006; Gabius *et al.*, 2002; Van Damme *et al.*, 1998).

Desde os primeiros trabalhos com lectinas, no final do século XIX, com a purificação da ricina e abrina, os estudos com esta classe de proteínas têm apresentando um grande número de distintas propriedades biológicas tais como a aglutinação de células, vírus, bactérias e fungos, mitogenicidade, toxicidade, dentre outros. Isto tem estimulado o isolamento e purificação destas moléculas e ampliado sua utilização no transporte de fármacos em lipossomas, como sondas na identificação de células transformadas, como ferramentas em diagnósticos laboratoriais, e ainda em inúmeros ensaios em biotecnologia e terapia gênica (Arbós *et al.*, 2002; Loris, 2002; Wang *et al.*, 2000; Carvalho, 1990).

Basicamente, duas descobertas relacionadas à utilização das lectinas colocaram em evidência esta classe de proteínas e proporcionaram grande impacto na área de imunologia e oncologia. Primeiramente, Paul Ehrlich, em 1891, estabeleceu os princípios básicos da resposta imunitária, injetando em camundongos pequenas e repetidas doses de ricina ou de abrina. Verificou, experimentalmente, que o soro dos animais inibia, especificamente, os efeitos tóxicos do extrato correspondente. Também demonstrou que a imunidade adquirida pelos animais era transferida para a prole. Ehrlich, através destes estudos, estabeleceu alguns dos fundamentos da imunologia moderna (Zatta e



Cummings, 1992; Liener, 1986). Passado mais de meio século duas outras descobertas trouxeram as lectinas em evidência. Em 1960, Nowell verificou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* L. (PHA) possuía ação mitogênica em cultura *in vitro* de linfócitos. Por sua vez, no ano de 1963, Joseph Aub e colaboradores, utilizando WGA, observaram que células transformadas eram aglutinadas com maior intensidade que as células normais, concluindo que alterações malignas eram acompanhadas por mudanças nas superfícies celulares (Carvalho, 1990; Zatta e Cummings, 1992; Lis e Sharon, 1986).

Em botânica, uma aplicação das lectinas está na utilização destas moléculas em taxonomia, uma vez que se prestam como marcadores em determinados grupos vegetais onde ocorrem de forma endógena, possibilitando inferências referentes à evolução do grupo (Loris, *et al.*, 1998). Fernández-Alonso *et al.* (2003), fizeram um estudo quimiotaxonômico de lamiáceas da Colômbia, tomando por base a presença de lectinas em seus frutos. Yong *et al.* (1985), trabalharam com quimiotaxonomia de leguminosas (Caesalpinoidea) e Moreira *et al.* (1993) com a quimiosistemática do gênero *Canavalia*. Por outro lado, lectinas exógenas podem ser aproveitadas para marcar e determinar certas subespécies ou variedade de organismos, dada a especificidade que estas moléculas apresentam com os mesmos (Miralles *et al.*, 2002; Nenoff *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 1999).

Em vegetais as lectinas foram isoladas e purificadas de muitas famílias botânicas, destacando-se as leguminosas pelo grande número de trabalhos em lectinologia, com espécies desta família. Poucas lectinas de poáceas foram isoladas até o momento. A lectina mais conhecida, e a que primeiro foi isolada desta família, é a WGA, obtida a partir do embrião das sementes de *Triticum vulgare* L.

A WGA é uma lectina dimérica, não glicosilada, com as cadeias polipeptídicas associadas covalentemente com pontes de dissulfeto que estabilizam o dímero. Cada monômero da WGA é composto por quatro domínios de reconhecimento de carboidratos, do tipo heveína. Na forma dimérica os domínios de ligação a carboidratos estão localizados na interface

entre os monômeros sendo responsáveis pela estabilidade do dímero. Dos oito sítios de ligação, não mais que quatro são ocupados simultaneamente. Quando as duas cadeias polipeptídicas se separam, o que ocorre em pH ácido, cada monômero acaba por apresentar um domínio de reconhecimento de carboidratos por domínio heveína (Espinosa *et al.*, 2000).

O termo domínio heveína faz menção a uma pequena proteína de 43 aminoácidos, 4,5 kDa, extraída do látex de *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg. Todas as unidades estruturais com seqüência similar à heveína, e que possuem capacidade de ligar-se à quitina, são denominadas possuidoras do domínio heveína. Estruturalmente a heveína é especialmente rica em resíduos de cisteína e glicina e está mantida por quatro pontes dissulfeto, o que lhe confere uma estabilidade notável. Estas características estruturais são observadas nas demais lectinas com este domínio (Van Damme *et al.*, 1998). Os pontos de ligação da heveína e dos oligossacarídeos de quitina envolvem um resíduo de serina (Ser 19) e dois resíduos de triptofanos (Trp 21 e 23). A afinidade com oligômeros de GlcNAc é maior do que com o monossacarídeo uma vez que a interação é entalpicamente favorecida. O anel de GlcNAc exibe uma forte interação hidrofóbica com um resíduo aromático, no caso o Trp 23, o que é permitido pela falta de grupos axiais em GlcNAc. Uma ligação adicional ocorre entre GlcNAc e Trp 21. Também existe uma interação polar entre a Ser 19 e o grupo carboxil de GlcNAc (Neuman *et al.*, 2004; Espinosa *et al.*, 2000).

Em geral, pode-se dizer que em poáceas, as lectinas são muito semelhantes estruturalmente, fato que denota uma ancestralidade comum. Estas lectinas foram extraídas de sementes como em *Oryza sativa* L., *Zea mays* L., mas também foram extraídas a partir de raízes e folhas, como é o caso da lectina de *Hordeum vulgare* L. (Van Damme *et al.*, 1998; Willy *et al.*, 1986).

As lectinas de poáceas apresentam, de modo geral, composição de aminoácidos com um grande percentual de glicina e cisteína. Estas lectinas são GlcNAc específicas, no entanto a de *Zea mays* L. é específica para N-GalNAc e manose. As lectinas desta família enquadram-se na classe das

hololectinas e apresentam domínios de ligação a carboidratos idênticos ou muito similares, complexando-se ao mesmo tipo de açúcar ou a açúcares similares (Van Damme *et al.*, 1998; Santiago *et al.*, 2000).

Este capítulo apresenta como objetivo estabelecer um protocolo para o isolamento e purificação da lectina GlcNAc específica a partir de extratos protéicos dos rizomas de *Arundo donax* L., e determinar características físico-químicas e químicas desta lectina.

## II.2. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.2.1. Material vegetal

O material vegetal constou de rizomas de *Arundo donax* L. var. *variegata* Vilmorin, coletados na cidade de Porto Alegre/RS. A espécie foi identificada pelo taxonomista Sérgio Bordignon, conforme exsicata ICN 144955 depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS.

As coletas do referido rizoma foram realizadas a cada três meses do ano de 2003 a 2004, totalizando 3 kg de material vegetal. Com o material coletado todos os ensaios desta tese foram realizados, inclusive os ensaios de sazonalidade da lectina. Logo após a coleta, os rizomas foram lavados, reduzidos a pó em moinho de facas e armazenados a -18 °C para posterior utilização.

### II.2.2. Reagentes químicos

Todos os reagentes utilizados foram do tipo “pró-análise”, e a procedência de alguns produtos químicos foi a seguinte:

Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Comassie Brilliant Blue R-250, Sephadex G-100 e G-200 foram obtidos da Pharmacia Fine Chemical Ab. Uppsala, Suécia. Bio Gel P-100 obtida da Bio-Rad, USA.

$\beta$ -mercaptoetanol provenientes da Merck, Alemanha. Albumina bovina cristalina fração V (BSA), carboidratos e proteínas padrões eletroforéticos, N-acetil-D-glicosamina-Agarose foram provenientes da Sigma, Chemical Company, USA.

Dodecil Sulfato de sódio e N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina, fornecidos pela Inlab, Intermat, Indústria e Comércio LTDA, Brasil.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada no sistema MILLI Q Plus, Millipore, Bedford, USA.

### **II.2.3. Eritrócitos**

Amostras de sangue humano foram obtidos junto ao Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia/UFRGS. As amostras de sangue de camundongo, coelho e rato foram obtidas junto ao biotério da Faculdade de Farmácia/UFRGS, e as amostras de sangue de boi, cabra, cachorro, cavalo, galinha, ovelha e porco, junto à Faculdade de Veterinária/UFRGS.

Todas as amostras de sangue foram coletadas por punção venosa sobre solução de EDTA 0,1 M, pH 7,2. O sangue, assim obtido, foi diluído quatro vezes com PBS (tampão fosfato de sódio a 0,013 M em cloreto de sódio 0,15 M, pH 7,2), centrifugado a 3000 rpm por 10 min. O sobrenadante do centrifugado foi desprezado e o sedimento resuspenso em PBS para nova centrifugação. Este procedimento foi repetido mais 3 vezes. Uma alíquota da última suspensão foi usada na determinação do percentual dos eritrócitos, em tubos de hematócrito, e a suspensão final foi acertada para 2 % (v/v) em PBS.

Eritrócitos glutarizados também foram utilizados em alguns ensaios, sendo obtidos conforme Nowak *et al.* (1976). A glutarização dos eritrócitos, previamente lavados e resuspenso em PBS na concentração de 30 %, foi obtida pela adição de glutaraldeído à suspensão na concentração final de 2 %. Após 1 h de agitação lenta, foi adicionado ao material glicina 0,1 M em PBS, na proporção de 1:1 (v/v), permanecendo o sistema em repouso, a 4 °C, durante 20 h. O material assim tratado, foi centrifugado a 3000 rpm e lavado com PBS, sendo a suspensão final acertada para 2 % (v/v) em PBS, com albumina bovina 1,5 % e azida sódica 0,005 %.

#### **II.2.4. Obtenção do extrato protéico**

Para a obtenção da lectina, os rizomas frescos de *Arundo donax* foram pulverizados em moinho de facas. A partir de 10 g do rizoma pulverizado foi realizada extração das proteínas em 100 ml de PBS, a 4 °C, por 30 min sob agitação lenta. Após este tempo, o material foi filtrado e o resíduo foi reextraído com volume de 30 ml de PBS, nas condições descritas. Os filtrados foram reunidos, centrifugados a 25000 g por 20 min, a 4 °C, e o sedimento obtido foi desprezado. O sobrenadante da centrifugação foi adicionado de PBS de modo a se obter uma concentração final do extrato de 10 % (m/v), e quando não utilizado de imediato foi armazenado a -18°C até posterior utilização.

#### **II.2.5. Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). O método está baseado na medida a 540 nm da cor desenvolvida pela proteína com o reagente de Folin-Ciocalteu e cobre. Como padrão foi utilizado albumina bovina, fração V, Sigma.

#### **II.2.6. Determinação da atividade hemaglutinante**

A atividade hemaglutinante foi determinada pelo método de dupla diluição serial em placas de microtitulação. A solução lectínica em PBS (0,1 mg/ml) foi diluída serialmente no mesmo volume de PBS, previamente pipetado em cada poço. Após este procedimento, em todos os poços, foi adicionado o mesmo volume de suspensão de eritrócitos nativos a 2 % em PBS. A hemaglutinação foi verificada a olho nú, após 2 h de incubação, à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C.

A atividade hemaglutinante foi expressa em UH/ml, considerando unidades hemaglutinantes o inverso da diluição mais alta de 25 µl de solução de lectina, extrapolados para 1 ml, de acordo com Kilpatrick e Yeomann (1978).

Os testes foram realizados em duplicata, e os resultados finais obtidos foram expressos pela média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

### **II.2.7. Especificidade a carboidratos e a glicoproteínas**

A inibição da atividade hemaglutinante frente a diferentes carboidratos e glicoproteínas foi determinada por dupla diluição serial em placas de microtitulação. Solução de carboidrato ou de glicoproteína em PBS, diluído serialmente no mesmo volume de PBS, e acrescentado o mesmo volume de solução lectínica em PBS (0,1 mg/ml) em todos os poços, com 30 min de incubação, à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de suspensão de eritrócitos nativos de coelho a 2 %. A leitura da atividade hemaglutinante foi realizada a olho nú, após 2 h de incubação à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C.

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

## **II.2.8. MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO**

### **II.2.8.1. Cromatografia de afinidade em gel de estroma-poliacrilamida**

O extrato protéico obtido a partir dos rizomas de *Arundo donax* foi passado por coluna cromatográfica de afinidade de estroma-poliacrilamida com dimensões de 2,5 x 10 cm. A matriz foi preparada a partir de eritrócitos de coelho e os estromas incorporados em gel de poliácrlamida, conforme Betail *et al.* (1975).

Na obtenção dos estromas, o sangue de coelho foi lavado com PBS, conforme item II.2.3, e lavado mais 3 vezes com NaCl a 0,9 %, do mesmo modo que anteriormente com PBS. Os eritrócitos, assim obtidos, foram adicionados a uma solução aquosa de ácido acético 0,0004 %, na proporção de 2:8 (v/v), e incubados por 18 h, a 4 °C sob lenta agitação. O material foi centrifugado a 3000 rpm, à temperatura ambiente, e o sedimento lavado seqüencialmente com ácido acético 1 mM, pH 5, PBS e NaCl a 0,9 %. O material suspenso em NaCl 0,9 % foi incubado a 100 °C por 1 h. Para a preparação da matriz cromatográfica, os estromas foram homogeneizados em solução contendo acrilamida a 14,2 %, bis acrilamida a 0,76 %, APS a 0,90 % e TEMED a 0,90 %, na proporção de 1:1 (v/v). Após polimerização, o gel obtido foi finamente seccionada, por extrusão, para a formação da matriz cromatográfica.

No processo cromatográfico a coluna de estroma-poliacrilamida foi lavada com PBS, seguido de solução com NaCl a 0,9 %: NH<sub>4</sub>OH a 25 % (1: 0,006) (v/v), e equilibrada com PBS até pH 7,2. Após aplicação da amostra protéica na coluna, a mesma foi lavada com PBS. A fração protéica retida na matriz foi eluída com NaCl a 0,9 %: NH<sub>4</sub>OH a 25 % (1: 0,006) (v/v), e a coluna foi lavada com PBS até obtenção de pH 7,0. Todas as trocas de soluções respeitaram a obtenção de absorvância menor que 0,010, medidas a 280 nm, e



ausência de atividade hemaglutinante.

A fração ativa eluída da coluna, foi submetida a um processo de diálise contra 1l de água purificada, com agitação, a 4 °C e troca de água purificada a cada 2 h, por 3 vezes. O dialisado foi centrifugado durante 10 min, a 15000 g, 0°C e o sobrenadante concentrado à vácuo (speed-vac). O material resultante foi armazenado a -18 °C até o momento de uso.

### **II.2.8.2. Cromatografia em sistema HPLC**

O grau de pureza da lectina, obtida por cromatografia de afinidade em matriz de estroma-poliacrilamida, foi verificado por cromatografia em HPLC, com sistema de bombas binárias e coluna C<sub>4</sub> Sephasil TM Protein (0,46 x 25 cm). A cromatografia foi desenvolvida à 38 °C ± 1 °C, e o detector de UV com comprimento de onda fixado em 280 nm e 216 nm. Na fase móvel foi usada uma mistura binária de solventes, com acetonitrila e água purificada, com gradiente crescente de acetonitrila, e fluxo de 1 ml/min. A coluna foi equilibrada em 10 min com água, e a limpeza realizada com acetonitrila a 100 %. A amostra lectínica (1 mg) foi aplicada em 100 µl de água purificada.

### **II.2.8.3. Cromatografia de afinidade em gel N-acetil-D-glicosamina-Agarose**

O grau de pureza da lectina, obtida por cromatografia de afinidade em matriz de estroma-poliacrilamida, foi verificado por cromatografia de afinidade em coluna com gel de N-acetil-D-glicosamina-Agarose, de 2 x 0,5 cm, previamente lavada e equilibrada com PBS. Após a aplicação da amostra lectínica (1 mg), a coluna foi lavada com PBS até a obtenção de absorvância menor que 0,010, a 280 nm, e ausência de atividade hemaglutinante. A fração retida na matriz cromatográfica foi eluída com solução de N-acetil-D-

glicosamina 0,2 M, dialisada contra água purificada e concentrada à vácuo (speed-vac).

#### **II.2.8.4. Cromatografia de gel permeação molecular**

O grau de pureza da lectina, obtida por cromatografia de afinidade em matriz de estroma-poliacrilamida, foi verificado por cromatografia de gel-permeação molecular, em matriz de Sephadex G-100, de 1m x 2,5 cm, previamente lavada e equilibrada com PBS. A amostra lectínica (1mg) foi eluída com PBS, até a obtenção de absorvância menor que 0,010, a 280 nm, e ausência de atividade hemaglutinante. O material com atividade lectínica foi dialisado contra água e concentrado à vácuo (speed-vac).

#### **II.2.8.5. Eletroforese em gel de poliácridamida**

- **Eletroforese SDS-PAGE**

A eletroforese em gel de poliácridamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi desenvolvida segundo método de Laemmli (1970). O sistema empregado foi descontínuo sendo composto por um gel de concentração com poliácridamida a 5 % em solução tampão Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 e gel de resolução com poliácridamida a 11 % em solução tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8. Géis de resolução com acrilamida em concentrações de 11 e 13 % também foram utilizados.

As amostras protéicas (10 a 20 µg) foram aplicadas no gel de concentração em solução tampão constituída de Tris-HCl, 0,0625 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10 %, azul de bromofenol a 0,004 %, SDS a 1 % e β-mercaptoetanol a 5 % ou DTT 100 mM. Antes da aplicação das amostras protéicas no gel, as mesmas foram ou não submetidas a banho de água a 100 °C durante 5 min.

Inicialmente, os géis foram submetidas à corrente de 15 mA aumentada para 20 mA após a entrada das proteínas no gel de resolução. A diferença de potencial foi de 60 V durante 2 h e em seguida de 100 V, por mais 3 h de migração, à temperatura de  $20 \pm 1$  °C. O tampão de cuba eletroforética foi constituído de solução tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS a 0,1 %.

Após o desenvolvimento eletroforético, o gel foi corado com solução de azul de Comassie R-250 a 0,2 % em ácido acético glacial: metanol: água purificada (10: 50: 40) durante 2 h, à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C, e o excesso de corante do gel foi removido com solução contendo ácido acético glacial: metanol: água purificada (9: 22: 69).

Para coloração de glicoproteínas foi realizada coloração das bandas protéicas, utilizando o reagente de Schiff, conforme método de Segrest e Jackson (1972). Para tanto, o gel permaneceu 18 h, a 4 °C, em reagente de Schiff. Previamente à coloração de glicoproteínas por este reagente, o gel foi fixado numa solução de etanol: ácido acético glacial: água (40: 5: 55), à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C, por 18 h, e sequencialmente tratado com ácido periódico a 0,7 % em ácido acético a 5 %, e após uma solução contendo metabisulfito de sódio a 0,2 % em ácido acético a 5 %, permanecendo 3 h em cada solução. Por fim, foi utilizada uma solução composta por metanol: ácido acético: água ( 7: 14: 79) para intensificar a cor das bandas de glicoproteínas.

- **Eletroforese PAGE**

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em meio ácido (pH 3,2), ou em meio alcalino (pH 8,5).

A eletroforese em pH alcalino foi realizada como descrito anteriormente (SDS-PAGE), porém todos os agentes redutores e desnaturantes foram substituídos por água purificada. As amostras lectínicas (15 µg) foram diluídas em tampão de amostra no mesmo pH em que o gel foi preparado.

A eletroforese em pH 3,2 foi realizada tomando por base Panyim e Chalhahley (1969). Por este método, nos géis de concentração e de resolução, foi substituído o tampão Tris por ácido acético a 5,4 %. A amostra lectínica foi diluída em solução tampão contendo ácido acético glacial: glicerol: água purificada (1,3: 2,5: 1,16), e o tampão de cuba foi constituído de ácido acético 0,9 M.

## **II.2.9. DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DA ADL**

### **II.2.9.1. Massa molecular**

A massa molecular da proteína foi determinada por espectrometria de massa e estimada por cromatografia de gel filtração e eletroforese SDS-PAGE e pelos resultados da análise de aminoácidos constituintes.

- **Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

A massa molecular das cadeias polipeptídicas foi estimada, tomando por base a migração paralela dos padrões protéicos utilizados em SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970) em condições redutoras em gel de poliacrilamida a 11 % ou 13 % utilizando padrões de massa molecular conhecida. A massa molecular da proteína não desnaturada foi estimada nas mesmas condições experimentais, omitindo-se no tampão de amostra o redutor e mantendo a amostra protéica a 0 °C sem ter sido submetida à desnaturação a 100 °C antes da aplicação no gel. Os resultados foram registrados por meio de um gráfico do logaritmo decimal da massa molecular pela mobilidade relativa, obtida pelo método de regressão linear.

- **Cromatografia por gel-permeação molecular**

A lectina purificada foi cromatografada em coluna de gel-permeação molecular em matriz Sephadex G-200, de 1 m x 1 cm, previamente equilibrada com PBS. A amostra lectínica (2 mg) foi diluída em 200 µl de PBS e aplicada na coluna e eluída com PBS, do mesmo modo que as amostras de albumina bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa) e citocromo C (12,4 kDa), usadas como padrões de referência de massa molecular. O volume morto da coluna foi determinado com azul de dextrano. O monitoramento dos eluatos foi realizado por leitura em espectrofotômetro a 280 nm e para azul de dextrano a 540 nm. Os resultados foram registrados em um gráfico do logaritmo decimal da massa molecular pela mobilidade relativa, obtido pelo método de regressão linear.

### **II.2.9.2. Ponto isoelétrico**

A determinação do ponto isoelétrico da ADL foi realizada por focalização isoelétrica tomando por base Westermeier (1997). A ADL foi resuspensa em solução contendo uréia 8 M, CHAPS a 2 %, azul de bromofenol a 0,002 %, DTT 0,1 M e anfólitos carregadores a 0,5 % (IPG Pharmacia), na proporção de

2: 18 (p/v). As amostras resuspensas nesta solução foram colocadas em contato com gel de poliacrilamida a 5 %, com 11 cm de comprimento e 5 mm de espessura, e gradiente de pH imobilizado (3-10 distribuídos uniformemente) permanecendo em repouso por 10 h.

Para a migração eletroforética nos primeiros 30 min foi ajustado 300 volts, 1 miliamper e 5 Watts. Nas 5 h seguintes a voltagem utilizada foi 3000 volts, a 20 °C. Após a migração eletroforética os géis foram corados, por 10 h, em Comassie blue G-250 a 0,079 % em solução contendo água purificada: ácido sulfúrico 1 M: NaOH 10 M: TCA a 100 % (25: 25: 5,6; 7,75), (v/v/v/v), sendo que os dois últimos produtos foram adicionados após 3 h de agitação constante. O excesso de corante foi retirado com água purificada.

### **II.2.9.3 Espectro de absorção**

O espectro de absorção da ADL foi determinado em espectrofotômetro HP Helett Packard 8452 A, na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm, a ADL foi dissolvida em água purificada (0,1 mg/ml), e água purificada usada como referência.

### **II.2.9.4. Coeficiente de extinção**

A determinação do coeficiente de extinção da ADL foi obtida pela leitura em espectrofotômetro HP Helett Packard 8452 A, a 280 nm. Para tanto a lectina foi previamente diluída em NaCl 0,15 M (0,1 mg/ml).

### II.2.9.5. Aminoácidos constituintes

A constituição dos aminoácidos das amostras lectínicas foi realizada pelo método feniltiocarbonil (PTC), conforme Atherton (1989), Bidlingmeyer *et al.* (1984) e Henrikson e Meredith (1984).

A hidrólise foi realizada em tubos de borosilicato, previamente pirolisados a 350 °C, com 10 µg da proteína, acondicionados em frasco de hidrólise, no qual foi depositado 30 µl de solução de HCl 6 N bidestilado: fenol a 0,1 % (v/p). Com auxílio de banho de nitrogênio líquido, o frasco de hidrólise foi submetido à vácuo e incubado por 48 h, à 110 °C. O excesso do reagente foi retirado em concentrador rotatório speed-vac, à 50 °C, por 30 min.

O resíduo resultante da hidrólise foi alcalinizado com 20 µl de solução contendo metanol: água: trietilamina (2: 2: 1), e levado a concentrador rotatório speed-vac, à 50 °C, por 15 min. Para a derivatização foram adicionados 20 µl de solução contendo metanol: água: trietilamina: fenilisotiocianato (7: 1: 1: 1), com incubação de 20 min, e novamente levado a concentrador rotatório speed-vac, por 1 h, à temperatura ambiente de 20 ± 1 °C. O procedimento de derivação também foi realizado com o *pool* de padrões de aminoácidos, usando-se 20 µl de uma solução 125 nmol/ml.

A separação dos derivados PTC-aa, para a quantificação dos mesmos, foi realizada em HPLC, com sistema de bombas binárias e coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Pico-Tag Waters (3,9 x 150 mm). A cromatografia foi desenvolvida à 38 ± 1 °C, detector de UV com comprimento de onda fixado em 254 nm e célula de fluxo contínuo de 10 µl. Na fase móvel foi usada uma mistura binária de solventes, onde o solvente A foi uma solução de acetato de sódio 0,14 M: trietilamina a 0,06 %, pH 5,7, e o solvente B uma mistura de acetonitrila: água (60: 40) (v/v), com gradiente crescente de acetonitrila (tabela II.1), e fluxo de 1 ml/min.

TABELA II.1. Gradiente de separação para a eluição dos PTC-aa.

Tempo (min)	Sol B. (%)	Fluxo (ml/min)	Tempo (min)	Sol B. (%)	Fluxo (ml/min)
0,0	10	1,0	10,0	54	1,0
2,2	15	1,0	11,5	100	1,0
2,5	17	1,0	12,0	100	1,0
3,0	21	1,0	12,3	100	1,5
5,5	26	1,0	16,5	100	1,5
6,0	35	1,0	17,0	100	1,0
6,5	36	1,0	17,5	10,0	1,0
8,0	42	1,0	27,5	10,0	1,0

A coluna foi equilibrada por 10 min, com 5 % do solvente B, e para limpeza foi usado 100 % do solvente B. As amostras (*pool* de padrões de aminoácidos e lectina) foram resuspensas respectivamente em 500  $\mu$ l de uma solução contendo acetonitrila a 5 %, acetato de sódio 0,14 M e trietilamina a 0,06 %, pH 7,5. Apenas 20  $\mu$ l foi injetado na coluna, de forma que o volume aplicado do *pool* de padrões de aminoácidos continha 100 pmol de cada aminoácido.

A quantificação dos PTC-aa foi baseada na área de cada pico de aminoácido, tomando como referência a área do pico do padrão de cada aminoácido, com concentração conhecida e derivatizados nas mesmas condições que a amostra. Todo o processo foi realizado em duplicata de hidrólise, com coeficiente de variação  $\leq$  a 10 % - critério de confiança do método. Esta forma de cromóforo é detectada a partir de 1 picomol.

Os resíduos de triptofanos foram determinados conforme Edelhoeh (1967).

#### II.2.9.6. Verificação de glicídios constituintes

A verificação de carboidratos neutros na ADL foi realizada pelo método de Dubois *et al.* (1956). Foi usado como padrão solução de D-glicose a 0,1 % e 1 mg de amostra lectínica, com leitura espectofotométrica a 490 nm. Para eliminar possíveis contaminantes glicídicos, a lectina purificada foi previamente



cromatografada em coluna de gel filtração em matriz Bio Gel P-150, equilibrada e eluída com PBS. A amostra lectínica foi dialisada contra água purificada e concentrada à vácuo (speed-vac) e usada nos testes.

## **II.2.10. ESTABILIDADE DA ADL FRENTE A DIFERENTES FATORES**

### **II.2.10.1. Efeito da temperatura**

A estabilidade da ADL (0,1 mg/ml) frente a diferentes temperaturas foi determinada pela atividade hemaglutinante, por dupla diluição serial, usando eritrócitos nativos de coelho a 2 %. Previamente à microtitulação, as amostras lectínicas em PBS foram submetidas à ação do calor a distintas temperaturas, em banho de água durante 10 min, e imediatamente resfriadas em banho de gelo. O mesmo ensaio foi repetido para as temperaturas em que as amostras se mostraram termoestáveis no tempo de 10 min, porém a nova incubação foi de 30, 60 ou 90 min. Quando da formação de precipitado de proteínas por efeito de calor, as amostras foram centrifugadas, em centrífuga clínica, a 11000 rpm, durante 10 min à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C.

Os dados foram registrados em tabela como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

### **II.2.10.2. Efeito do pH**

A estabilidade da ADL (0,1 mg/ml) frente a diferentes pHs foi determinada pela atividade hemaglutinante, por dupla diluição serial. As amostras lectínicas foram dissolvidas em solução tampão Tris 0,02 M, com distintos valores de pH, e serialmente diluídas no mesmo tampão em que se encontravam. Passado o período de incubação de 1, 2 ou 6 h, a 4 °C, foi adicionado suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho a 2 % e incubados por mais 1 h.

Os dados foram registrados em tabelas como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

### **II.2.10.3 Efeito de agentes desnaturantes e redutores**

A lectina (0,1 mg/ml) foi incubada 30 min em PBS contendo DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol a 5, 10 ou 20 mM, ou de uréia 4 ou 8 M. Após incubação à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C, a atividade lectínica foi avaliada pelo método de dupla diluição serial, usando-se eritrócitos glutarizados de coelho a 2 %, com leitura após 1 h de incubação. Como controle foi utilizada ADL (0,1 mg/ml) sem agente redutor ou desnaturante.

Os dados foram representados graficamente como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

### **II.2.10.4. Efeito de enzimas proteolíticas**

A estabilidade da ADL frente a enzimas proteolíticas foi determinada pela atividade hemaglutinante, tomando por base Rios *et al.* (1996).

Um volume de 50  $\mu$ l de ADL na concentração de 250  $\mu$ g/ml foi incubado em meio HCL 0,1 N com igual volume de solução de pepsina na concentração de 0,1 mg/ml, durante 2 h a 37 °C. A reação foi cessada pela adição de 13  $\mu$ l de solução tampão Tris-HCl, 1 M, pH 8,9. Em seguida, 12,5  $\mu$ l de PBS (10 vezes concentrado) foi adicionado à mistura e a atividade hemaglutinante da preparação foi avaliada pelo método de dupla diluição serial usando-se eritrócitos glutarizados de coelho a 2 % e a leitura efetuada após 1 h de incubação a  $20 \pm 1$  °C.

Para verificar o possível efeito da tripsina e da quimotripsina sobre a ADL, a técnica utilizada foi a descrita acima, substituindo-se a pepsina por tripsina ou por quimotripsina, o meio HCl 0,1 N por solução tampão Tris-HCl

0,1 M, pH 8,1 e o tempo de incubação foi de 3 h. A reação foi interrompida pela adição de 13 µl de solução de fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) em etanol (1 µg/µl), diluído em tampão tris-HCl 0,1 M, pH 8,1, na proporção de 3:1 (v/v).

Como controle foi utilizada solução lectínica sem tratamento enzimático, tratado com as mesmas condições experimentais da respectiva enzima, e também solução lectínica somente em PBS.

Os dados foram representados graficamente como média ± EPM de três experimentos independentes.

#### **II.2.11. Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre a atividade aglutinante da ADL**

A dependência de cátions divalentes sobre a atividade da ADL, especificamente  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , foi determinada pela atividade hemaglutinante, por dupla diluição serial, usando EDTA como agente quelante, conforme Pajic *et al.* (2002).

A lectina foi diluída em EDTA 50 ou 250 mM em PBS, na concentração de 0,1 mg/ml, e incubada por 30 min. Após este período, foi adicionado cloreto de cálcio, sulfato de magnésio ou sulfato de manganês, na concentração final de 40 mM, com nova incubação de 30 min. As amostras assim tratadas foram diluídas serialmente em PBS, quando então os eritrócitos nativos de coelho a 2 % foram acrescentados.

Paralelamente, a atividade da lectina foi determinada após incubação com EDTA 50 ou 250 mM, e ainda após incubação com os cátions divalentes sem tratamento prévio com EDTA. Como controle foi utilizado somente solução da lectina.

Os dados foram representados graficamente como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes.

## II.3 RESULTADOS

### II.3.1 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA ADL

Para o isolamento e purificação foram realizadas coletas trimestrais de todos os órgãos vegetativos de *Arundo donax*, e durante o segundo trimestre do ano coletou-se suas inflorescências. Com este material verificou-se a atividade hemaglutinante para eritrócitos nativos de coelho a 2 % e, em todos os ensaios, apenas os rizomas apresentaram atividade hemaglutinante para os eritrócitos testados. Em todas as vezes foi determinada a concentração total de proteínas para os rizomas. Conforme os resultados obtidos, expressos na tabela II.2, pode-se verificar que durante o intervalo dos 12 meses em que estes testes foram realizados, apesar de ter ocorrido uma oscilação nos valores, não foi observada uma variação sazonal significativa para a atividade hemaglutinante e mesmo para a concentração de proteínas totais nos rizomas, indicando não haver variação sazonal na atividade lectínica do rizoma.

O protocolo de isolamento e purificação da ADL, por cromatografia de afinidade em matriz de estroma-poliacrilamida obtida a partir de eritrócitos de coelho, resultou em um cromatograma que apresentou um pico (P1) de material não retido na coluna e apenas um pico (P2) com atividade hemaglutinante, eluído com NaCl 0,9 %: NH<sub>4</sub>OH a 25 % (1: 0,006) (v/v), conforme consta na figura II.1. No processo de purificação utilizado partiu-se de 100 ml de um extrato bruto a 10 % de rizomas frescos contendo 158 mg de proteínas totais. Após a cromatografia de afinidade, obteve-se 10,400 mg de proteínas com atividade lectínica, resultando em um rendimento em proteínas de 6,58 % e uma purificação de 12,15 vezes e uma recuperação de 80,0 % de atividade hemaglutinante (tabela II.3). Levando em consideração todas as perdas comumente sofridas em um processo de purificação, pode-se inferir que os rizomas de *Arundo donax* contém ao menos 1,58 g % de proteínas totais e 0,10 g % da ADL.

O grau de pureza da proteína foi verificado em princípio pela recromatografia da ADL purificada, em sistema HPLC - coluna C<sub>4</sub>, em cromatografia de afinidade em matriz N-Acetil-D-glicosamina-Agarose e em cromatografia de gel permeação molecular em matriz Sephadex G-100.

Nos cromatogramas obtidos tanto por HPLC (figura II.2), como por coluna de afinidade (figura II.3) e em gel permeação molecular (figura II.4), foi possível evidenciar apenas um pico protéico detectado a 280 nm. A recuperação da proteína aplicada, em cada um dos 3 processos cromatográficos foi elevada (de 88,6 a 96,4 %), sem que tenha havido variação na atividade específica da lectina, exceto quando da cromatografia pelo sistema HPLC, com eluente acetonitrila (tabela II.4), quando houve perda da atividade lectínica.

Por SDS-PAGE, realizada em gel de poliacrilamida 13 %, pH 8,5, ficou evidente a presença de apenas uma única banda protéica, quando a amostra lectínica foi submetida ou não a banho de água a 100 °C durante 5 min sem a presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Em presença do redutor, com ou sem desnaturação em banho de água a 100 °C durante 5 min, a ADL desdobrou-se em três bandas protéicas (figura II.6) indicando que a lectina seria constituída de 3 cadeias polipeptídicas ligadas por pontes S-S. As três bandas da lectina purificada possuíam bandas correspondentes em amostras do extrato protéico bruto dos rizomas submetidas às mesmas condições experimentais (figura II.5). Conforme a molaridade do DTT utilizada no tampão em que as amostras foram dissolvidas para posterior migração eletroforética, a ADL se desdobrou em duas ou três bandas protéicas (figura II.6).

A ADL obtida pelo protocolo de isolamento e purificação estabelecido, quando submetida a PAGE, utilizando gel de poliacrilamida a 11 % e pH 3,2 apresentou apenas uma banda protéica (figura II.7). No entanto, em gel de poliacrilamida a 11 %, pH 8,5 (PAGE), a lectina purificada desdobrou-se em seis bandas, visíveis a olho nú após a coloração do eletroferograma com azul

de Comassie-R 250 (figura II.8), indicando que a ADL seria constituída de isoformas.

TABELA II.2. Variação sazonal de proteínas totais e da atividade hemaglutinante dos rizomas de *Arundo donax* L. durante o intervalo de 12 meses consecutivos.

	Março 2004	Junho 2004	Setembro 2004	Dezembro 2004
<b>Concentração de proteínas (mg/ml)</b>	1,354	1,642	1,309	1,517
<b>Atividade hemaglutinante (UH/ml)</b>	2 560	2 560	2 560	2 560

TABELA II.3. Rendimento obtido com o processo de isolamento e purificação da ADL a partir de 10 g de rizomas frescos e pulverizados de *Arundo donax* L.

<b>Etapas</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade total (UH)</b>	<b>Atividade específica (UH/mg)</b>	<b>Purificação (X)</b>	<b>Rendimento Proteína (%)</b>	<b>Rendimento UH (%)</b>
<b>Extrato a 10 % em PBS</b>	158	256 000	1 620,25	1	100	100
<b>Cromatografia de afinidade estroma-acrilamida</b>	10,400	204 800	19 692	12,15	6,58	80,0

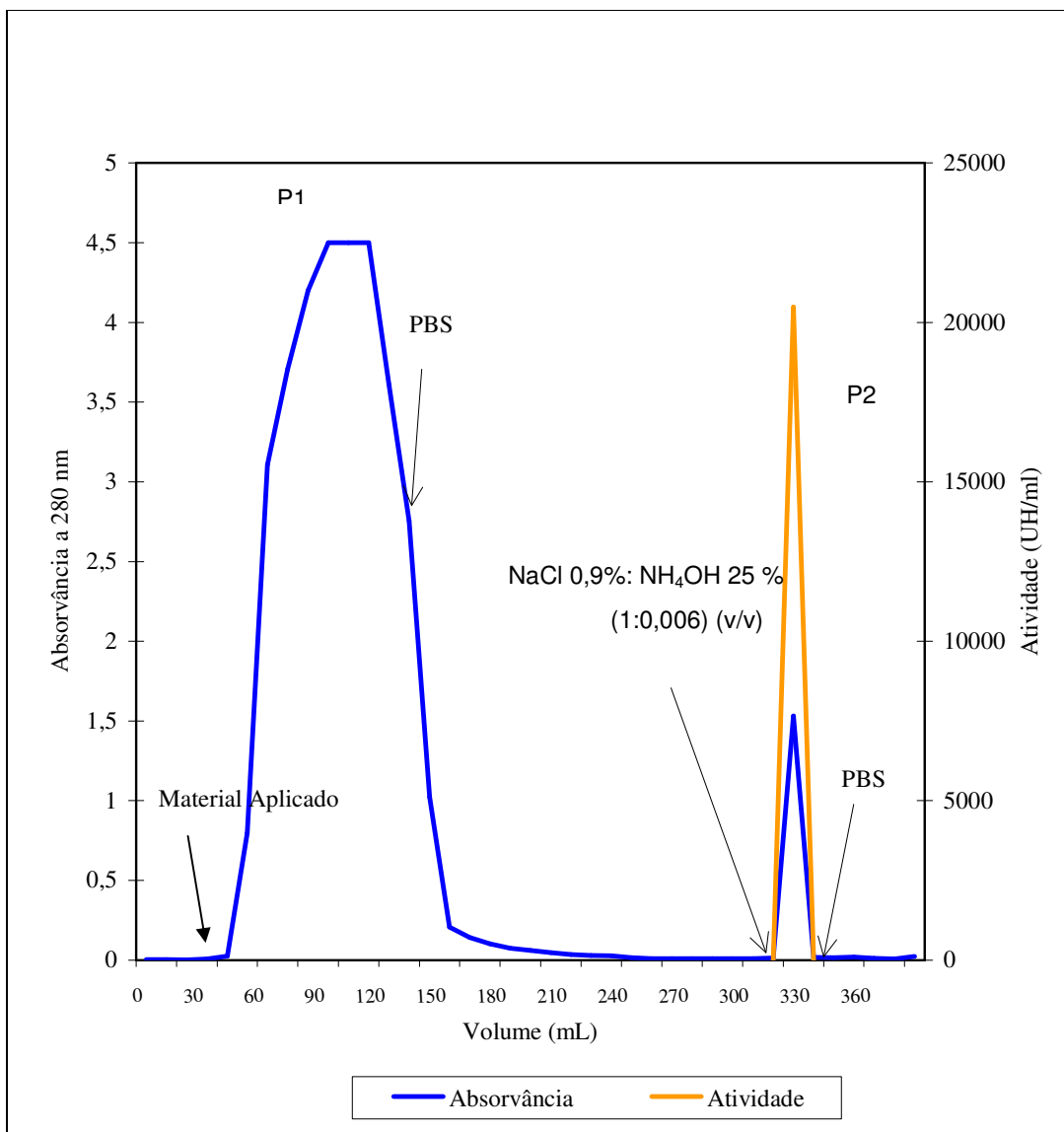


FIGURA II.1. Cromatograma obtido a partir do extrato bruto a 10 %, em PBS, dos rizomas de *Arundo donax* L., em coluna de afinidade (2,5 x 10 cm), em matriz de estroma de coelho-poliacrilamida, equilibrada e eluída com solução de NaCl 0,9%: NH<sub>4</sub>OH 25% (1:0,006) (v/v), e frações coletadas em volume de 5 ml e com fluxo de 3 ml/min. Material aplicado: 158 mg de proteínas totais.



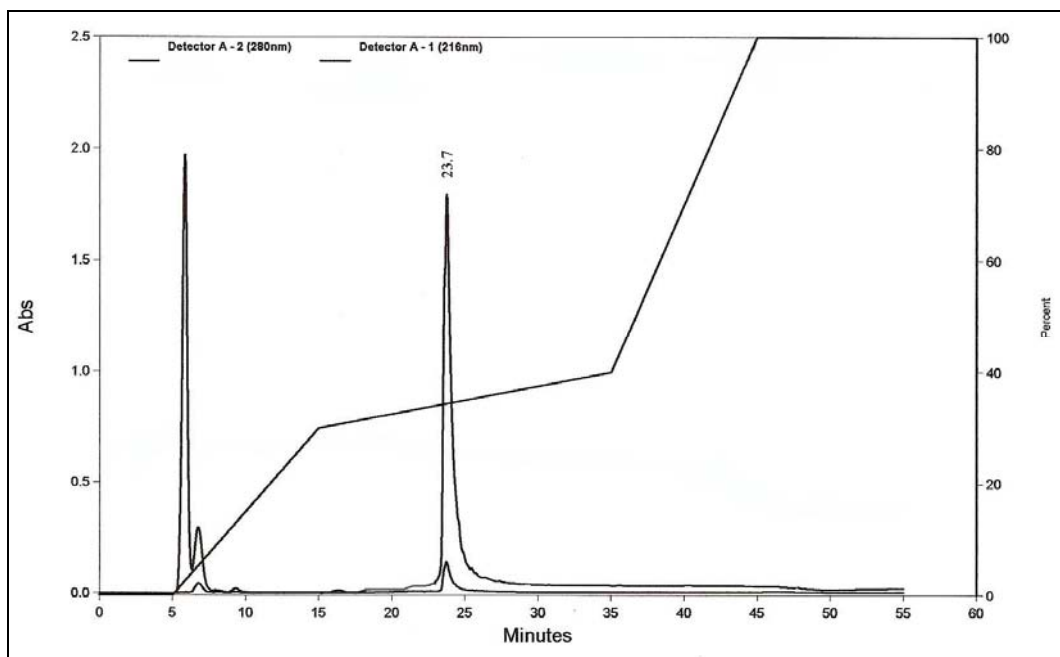


FIGURA II.2. Cromatograma obtido em sistema HPLC – coluna C<sub>4</sub> (0,46 x 25 cm), a partir de 1 mg da ADL, purificada em coluna de afinidade com matriz de estroma de coelho-poliacrilamida e eluída com mistura binária crescente de água purificada e acetonitrila, em volume de 1 ml. Fluxo de 1 ml/min.

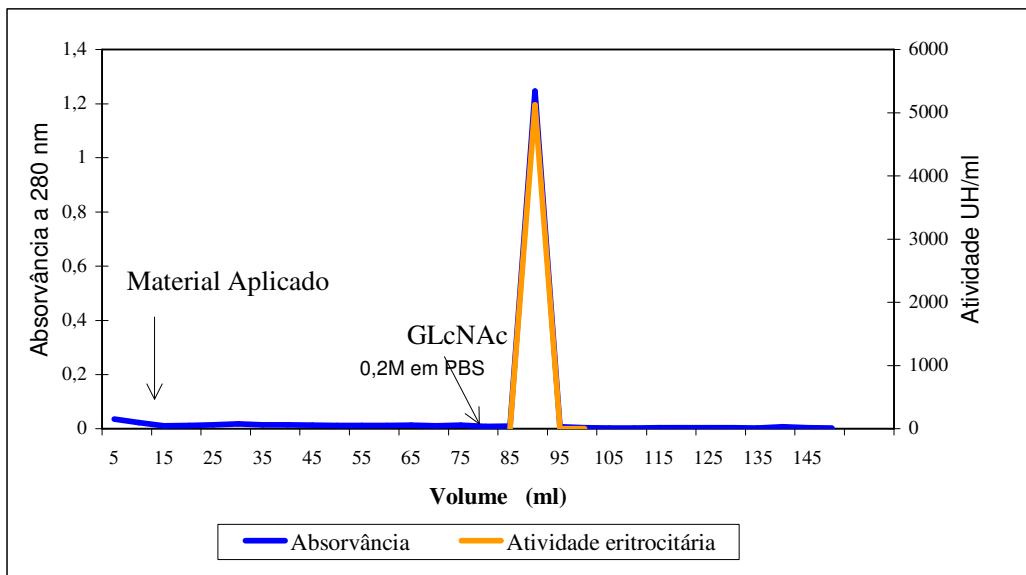


FIGURA II.3. Cromatograma obtido em coluna de afinidade N-acetil-D-glicosamina-Agarose (0,5 x 2 cm), a partir de 1 mg de ADL, purificada em coluna de afinidade em matriz de estroma de coelho-poliacrilamida e eluída em frações de 5 ml com GlcNAc 0,2 M e fluxo de 2 ml/min.

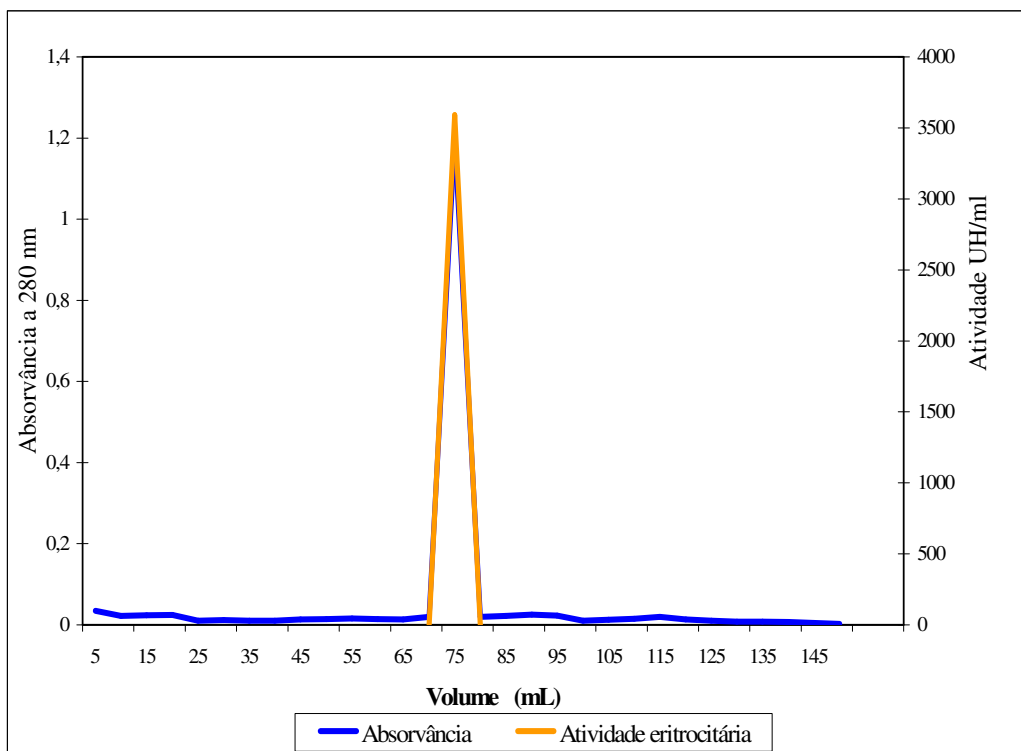


FIGURA II.4. Cromatograma obtido em coluna de gel permeação molecular em matriz Sephadex G-100 (2,5 cm x 1 m), a partir de 1 mg de ADL, purificada em coluna de afinidade em matriz de estroma de coelho-poliacrilamida e eluída com PBS, em frações coletadas em volume de 5 ml e fluxo de 4 ml/min.

TABELA II.4. Recuperação e atividade hemaglutinante da ADL purificada em coluna de afinidade estroma de coelho-poliacrilamida e recromatografada por distintos métodos cromatográficos.

Método cromatográfico	ADL (mg)	Lectina Recuperada (mg)	Porcentagem de recuperação em proteínas (%)	Atividade específica (UH/mg)
Sistema HPLC coluna C <sub>4</sub>	1,0	0,964	96,4	0,0
Coluna de afinidade N-Acetil-D-glicosamina-Agarose	1,0	0,949	94,9	21 562
Coluna de gel permeação molecular Sephadex G-100	1,0	0,886	88,6	22 750

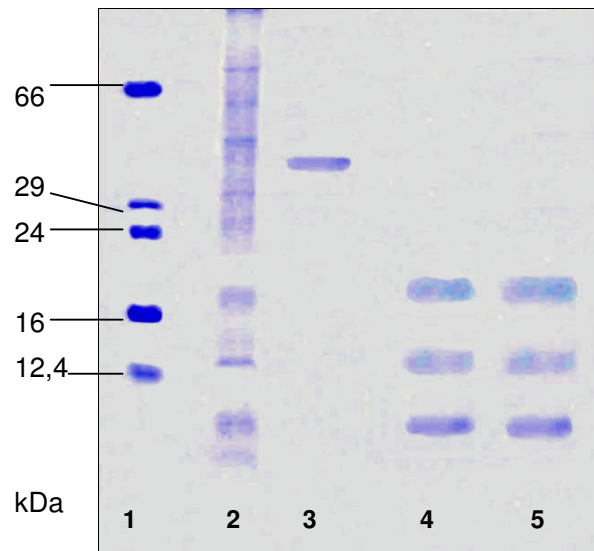


FIGURA II.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3, em condições redutoras do extrato protéico total obtido a partir dos rizomas de *Arundo donax* L. e da ADL purificada em coluna de afinidade. Legenda: 1. Marcadores moleculares: albumina bovina (66 kDa), anidrase carbônica (29 kDa); tripsinogênio (24 kDa).  $\beta$ -lactoglobulina (16 kDa), citocromo C (12,4 kDa); 2. Extrato protéico total (40  $\mu$ g); 3. ADL não reduzida e não desnaturada por calor (20  $\mu$ g); 4. ADL reduzida e não desnaturada por calor (20  $\mu$ g); 5. ADL reduzida com  $\beta$ -mercaptoetanol e desnaturada por calor (20  $\mu$ g).

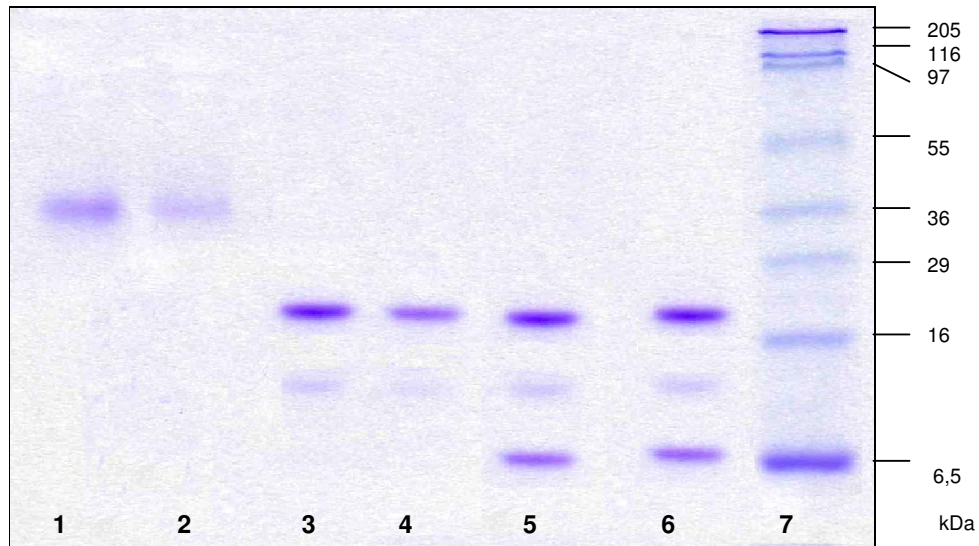


FIGURA II.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3, em condições redutoras e/ou desnaturantes da ADL purificada em coluna de afinidade. Legenda: 1. ADL não reduzida e não desnaturada por calor (4  $\mu$ g); 2. ADL não reduzida e desnaturada por calor (4  $\mu$ g); 3. ADL reduzida por DTT 20 mM e não desnaturada por calor (4  $\mu$ g); 4. ADL reduzida por DTT 20 mM e desnaturada por calor (4  $\mu$ g); 5. ADL reduzida com  $\beta$ -mercaptoetanol a 5 % e não desnaturada por calor (4  $\mu$ g); 6. ADL reduzida com  $\beta$ -mercaptoetanol a 5 % e desnaturada por calor (4  $\mu$ g); 7. Pool de padrões: miosina (205 kDa);  $\beta$ -galactosidase (116 kDa); fosforilase B (97 kDa); glutâmico desidrogenase (55 kDa); gliceraldeído-3-fosfato (36 kDa); anidrase carbônica (29 kDa);  $\beta$ -lactoglobulina (16 kDa); apotina (6,5 kDa).

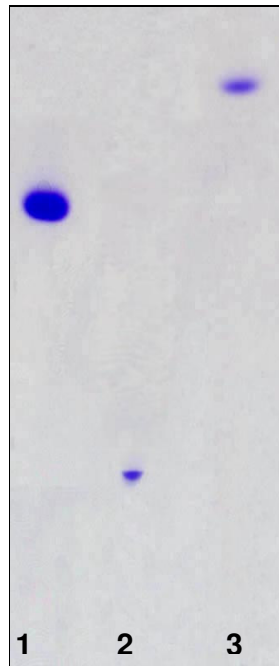


Figura II.7



Figura II.8

FIGURA II.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 11 %, pH 3,2, da ADL purificada. Legenda 1. albumina bovina; 2. citocromo C; 3. ADL (20  $\mu$ g).

FIGURA II.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 11 %, pH 8,5 da ADL purificada. Legenda 1. albumina bovina; 2. ADL (20  $\mu$ g).

## II.3.2 DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DA ADL

### II.3.2.1 Massa molecular

A massa molecular da ADL, estimada por gel filtração molecular, em matriz Sephadex G-200, e calculada por regressão linear, foi de 32,93 kDa, conforme registrado na figura II.9. Por eletroforese SDS-PAGE, conforme figura II.10 e II.11, a massa molecular desta lectina foi estimada em 42,04, e suas cadeias polipeptídicas apresentaram massa molecular relativa de 19,0, 14,2 e 8,7.

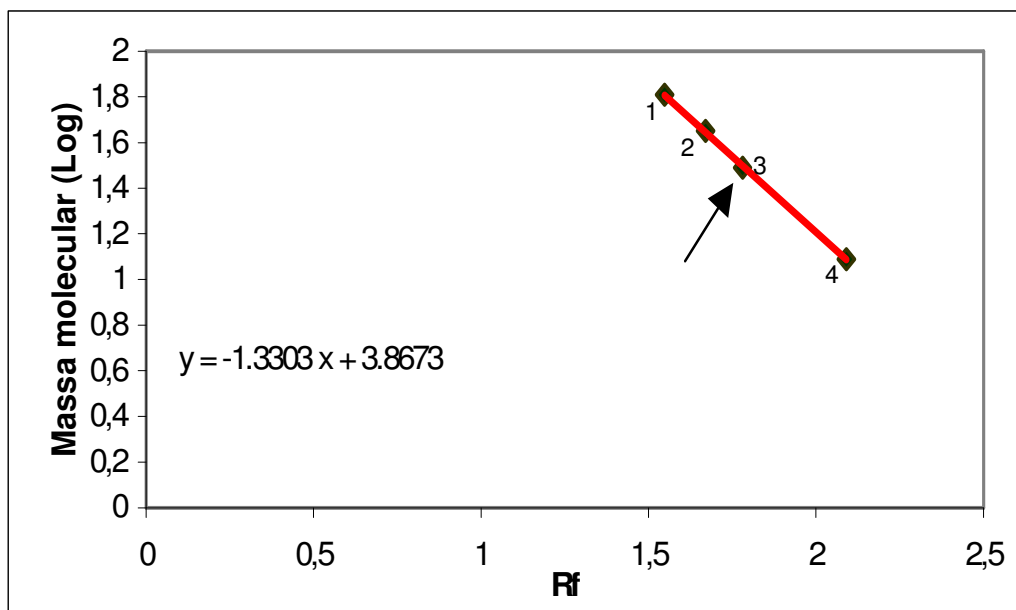


FIGURA II.9. Gráfico com a massa molecular relativa da ADL obtida a partir de coluna cromatográfica de gel-permeação molecular utilizando matriz Sephadex G-200. Legenda: 1. Albumina bovina (66 kDa); 2. Ovalbumina (45 kDa); 3. ADL (32,93 kDa); 4. Citocromo C (12,4 kDa).

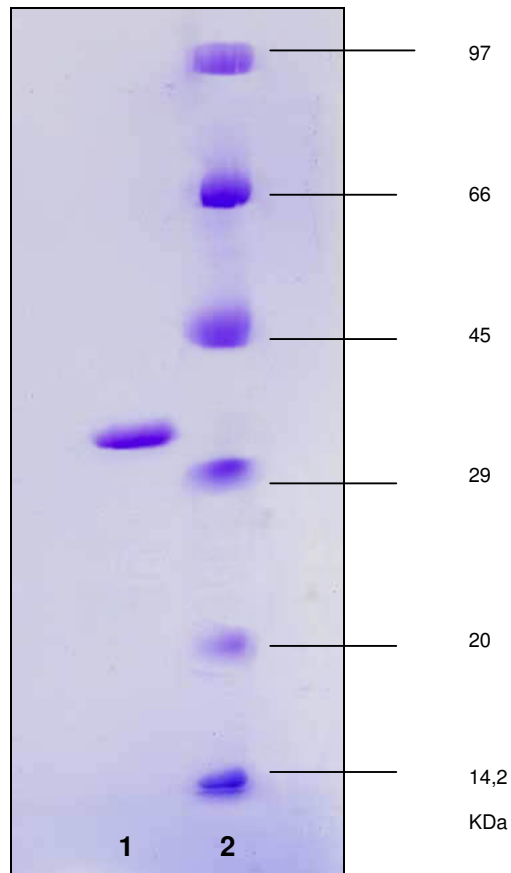


FIGURA II.10. Eletroferograma obtido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 13 %, pH 8,3. Legenda: 1. ADL não reduzida (4  $\mu$ g); 2. Pool de padrões: fosforilase B (97 kDa); albumina bovina (66 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (29 kDa); inibidor de tripsinogênio (20 kDa);  $\alpha$ -lactoglobulina(14,2 kDa).



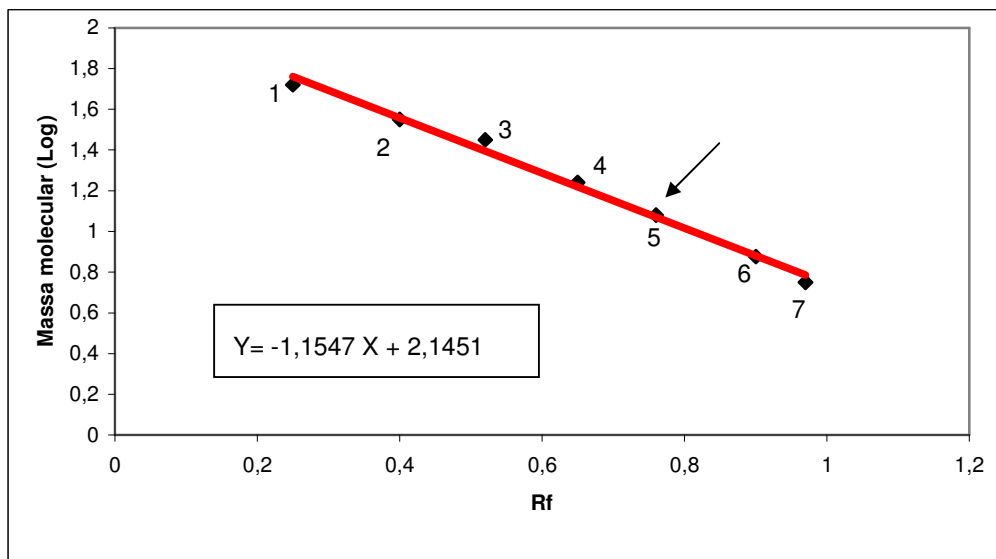


FIGURA II.11. Gráfico com a massa molecular relativa da ADL obtida a partir de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 13 %. Legenda: 1. fosforilase B (97 kDa); 2. albumina bovina (66 kDa); 3. ovalbumina (45 kDa); 4. anidrase carbônica (29 kDa); 5. ADL não reduzida (33 kDa); 6. inibidor de tripsinogênio (20 kDa); 7. α-lactoglobulina (14,2 kDa).

### II.3.2.2 Ponto isoelétrico

Na determinação do Ponto isoelétrico da ADL ficou evidenciada a presença de quatro bandas protéicas no eletroferograma bem definidas (2, 3, 4 e 5) e duas difusas (1 e 6), conforme pode ser verificado na figura II.12. Para as bandas 2, 3, 4 e 5 estimou-se os valores do ponto isoelétrico em 3,80; 3,95; 4,20 e 4,45, respectivamente. Para a banda 1 estimou-se o valor do ponto isoelétrico como sendo igual a 3,70 e para a banda 6, mais difusa, como sendo de 5,12 respectivamente.



FIGURA II.12. Ponto isoelétrico de ADL obtido por focalização isoelétrica. Legenda 1 a 6: bandas protéicas.

### II.3.2.3 Espectro de absorção

No espectro de absorção no UV a ADL apresentou pico de absorvância máxima a 276 nm, conforme verificado na figura II.13.

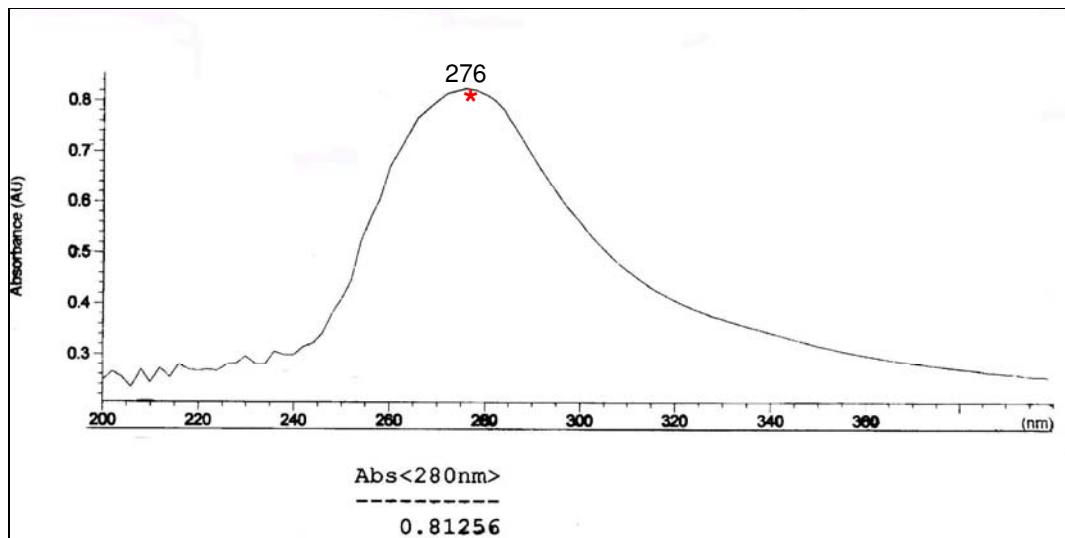


FIGURA II.13. Espectro de absorção da ADL entre 200-400 nm.

### II.3.2.4 Coeficiente de extinção

O coeficiente de extinção da ADL foi determinado com leitura em espectrofotômetro a 280 nm e o resultado obtido foi utilizado para calcular o coeficiente de extinção molar desta proteína, conforme tabela II.5.

TABELA II.5. Determinação do coeficiente de extinção e coeficiente de extinção molar da ADL.

Amostras protéicas	Coeficiente de extinção ( $\epsilon_{cm}^{1\%}$ )	Coeficiente de extinção molar ( $cm^2/mol$ )
ADL	17,83	$0,7247 \times 10^5$

### II.3.2.5 Aminoácidos constituintes

Os resultados obtidos da análise da composição centesimal dos aminoácidos da ADL (tabela II.6) mostraram a presença de um percentual elevado de Ácido glutâmico/Glutamina (14,38 %), Glicina (13,40 %), Ácido aspártico/Asparagina (11,58 %) e cisteína (12,86 %), na constituição desta lectina, enquanto que isoleucina, histidina e metionina participam com percentuais inferiores a 1 % na constituição da mesma.

TABELA II.6. Composição centesimal de aminoácidos da ADL.

Aminoácidos	mg %
Asp/Asn	11,48
Glu/ Gln	14,38
Ser	6,64
Gly	13,40
His	0,62
Arg	3,69
Thr	2,74
Ala	5,29
Pro	4,85
Tyr	7,74
Val	1,17
Met	0,94
Cys	12,86
Ile	0,33
Leu	4,80
Phe	3,53
Lys	5,54
Trp	2,50

### II.3.2.6 Natureza glicoprotéica

Através da dosagem de glicídios neutros, realizada pelo método de Dubois, conforme tabela II.7, verificou-se que a ADL não apresenta resíduos de glicídios neutros significativos em sua composição molecular. Estes resultados foram confirmados através de SDS-PAGE da ADL a qual foi corada com reagente de Schiff, conforme figura II.14, onde apenas a fetuína, que possui 15 % de glicídios em sua constituição, foi corada, e portanto a ADL não teria natureza glicoprotéica.

TABELA II.7. Verificação da presença de carboidratos na constituição da ADL.

ADL (mg)	Carboidratos neutros mg (%)
1	0,00885

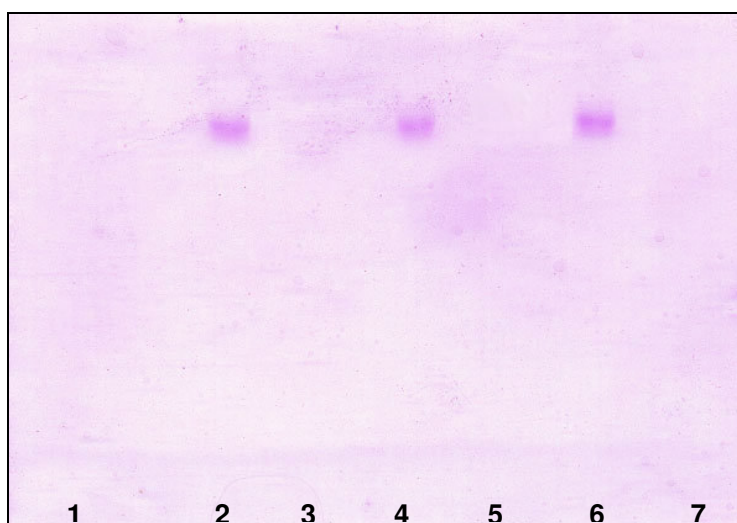


FIGURA II.14. Eletroferograma obtido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 11 %, pH 8,3, corada com reagente de Schiff. Legenda: 2, 4, 6. fetuína; 1, 7. Albumina bovina; 3, 5. ADL. não reduzida e não desnaturada (20 µg).

### II.3.2.7 Estabilidade da ADL frente a diferentes fatores

#### ➤ Efeito da temperatura

O efeito da variação da temperatura sobre a atividade lectínica da ADL está registrado na tabela II.8. A ADL mostrou-se estável em uma ampla faixa de temperatura. Quanto à atividade lectínica, somente após 60 min em banho de água a 70 °C, ocorreu um decréscimo na atividade hemaglutinante da ADL, e apenas a temperatura de 95 °C, durante 10 min, não foi mais registrada atividade hemaglutinante.

TABELA II.8. Efeito da variação de temperatura na atividade hemaglutinante da ADL.

Temperatura ( ° C)	Atividade hemaglutinante (UH/ml)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
10	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
20	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
30	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
40	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
50	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
60	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
70	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
80	640 ± 0,0	320 ± 0,0	160 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
90	160 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
95	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0

### ➤ Efeito do pH

A atividade hemaglutinante da ADL mostrou-se estável em uma larga faixa de pH, conforme pode ser verificado na tabela II.9. Mesmo em pHs extremos (2 e 10 ou mais), durante um período de até 6 h, apesar de ter ocorrido redução na atividade hemaglutinante, não houve a perda total da mesma, sendo estável em pHs entre 3 e 9 por até 2 h. Estes dados caracterizam uma grande estabilidade da ADL frente a diferentes pHs.

TABELA II.9. Efeito da variação de pH na atividade hemaglutinante da ADL.

pH	Atividade hemaglutinante (UH/ml)		
	1 h	2 h	6 h
2	640 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
3	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0
4	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0
5	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
6	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
7	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
8	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
9	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0
10	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
11	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
12	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0

➤ **Efeito de agentes desnaturantes e redutores**

Ficou demonstrado que a ADL apresenta comportamento similar frente aos diferentes agentes desnaturantes (uréia 8,0 M e SDS a 1 %) com perda total da atividade lectínica. Em presença de uréia 4,0 M, verificou-se abrupta diminuição na atividade hemaglutinante para ADL. Houve diminuição da atividade hemaglutinante das amostras lectínicas, em presença de agentes redutores ( $\beta$ -mercaptoetanol 5 -20 mM e DTT 5-20 mM), com uma diminuição de 62,5 % na atividade hemaglutinante, o que pode ser verificado na tabela II.10.

TABELA II.10. Efeito de diferentes agentes desnaturantes e redutores na atividade lectínica da ADL.

<b>Amostras</b>	<b>Atividade hemaglutinante (UH/ml)</b>
<b>Controle</b>	2560 $\pm$ 0,0
<b>SDS a 1 %</b>	0,0 $\pm$ 0,0
<b>Uréia 4 M</b>	160 $\pm$ 0,0
<b>Uréia 8 M</b>	0,0 $\pm$ 0,0
<b>DTT 5 mM</b>	160 $\pm$ 0,0
<b>DTT 10 mM</b>	160 $\pm$ 0,0
<b>DTT 20 mM</b>	160 $\pm$ 0,0
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol 5 mM</b>	160 $\pm$ 0,0
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol 10 mM</b>	160 $\pm$ 0,0
<b><math>\beta</math>-mercaptoetanol 20 mM</b>	160 $\pm$ 0,0

➤ **Efeito de enzimas proteolíticas**

A estabilidade da ADL frente à ação proteolítica de tripsina, pepsina ou quimotripsina está registrada na tabela II.11. Os resultados mostraram que, nas condições experimentais testadas, nenhuma amostra lectínica perdeu a atividade hemaglutinante por efeito destas enzimas.

TABELA II.11. Efeito de enzimas proteolíticas sobre a atividade lectínica da ADL.

<b>Amostras</b>	<b>Atividade hemaglutinante (UH/ml)</b>
<b>Controle</b>	2560 ± 0,0
<b>Pepsina</b>	2560 ± 0,0
<b>Quimotripsina</b>	2560 ± 0,0
<b>Tripsina</b>	2560 ± 0,0



### III.2.8. Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre a atividade hemaglutinante da ADL

Foi utilizado EDTA como agente quelante para verificar se a ADL necessita ou não de cátions divalentes no desempenho de suas bioatividades, o que sinalizaria, mesmo que de forma inespecífica, a necessidade destes íons para a estabilidade das mesmas. Também foram utilizados íons  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  para verificar se os mesmos interferem na atividade das amostras lectínicas testadas.

Os resultados mostraram que o EDTA não exerceu efeito sobre a atividade hemaglutinante da ADL e que a adição de íons  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  em presença ou não de EDTA, não aumentou a atividade da lectina, conforme a tabela II.12.

TABELA II.12. Efeito do EDTA e diferentes cátions divalentes na atividade lectínica da ADL.

<b>Amostras</b>	<b>Atividade hemaglutinante (UH/ml)</b>
<b>Controle</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA (50 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA (250 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b><math>\text{Ca}^{++}</math> (40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b><math>\text{Mg}^{++}</math> (40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b><math>\text{Mn}^{++}</math> (40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA + <math>\text{Ca}^{++}</math> (50 mM + 40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA + <math>\text{Ca}^{++}</math> (250 mM + 40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA + <math>\text{Mg}^{++}</math> (50 mM + 40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA + <math>\text{Mg}^{++}</math> (250 mM + 40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA + <math>\text{Mn}^{++}</math> (50 mM + 40 mM)</b>	2560 ± 0,0
<b>EDTA + <math>\text{Mn}^{++}</math> (250 mM + 40 mM)</b>	2560 ± 0,0

### II.3.2.8 Especificidade a carboidratos e glicoproteínas

A especificidade lectínica da ADL a carboidratos e glicoproteínas, determinada pela atividade hemaglutinante frente a eritrócitos nativos de coelho a 2 %, está registrada na tabela II.13.

GlcNAc inibiu a atividade hemaglutinante da ADL, sendo que seus derivados oligossacarídeos foram mais efetivos. A quitotriose, em concentração 625 vezes menor, mostrou ser o melhor inibidor dentre os testados. N-acetil-D-manosamina, epímero da GlcNAc, mostrou ser fraco inibidor.

A ovalbumina não inibiu a hemaglutinação da ADL, assim como os carboidratos D-glicose, D-manose, D-galactose, L-fucose, L-ramnose, Ácido glicurônico, 2-desoxi-D-glicose, D-glicosamina, D-galactosamina, D-arabinose, L-arabinose, D-xilose, D-lixose, D-desoxiribose, Me- $\beta$ -galactosideo, Me- $\alpha$ -galactosideo, GalNAc, BZL- $\alpha$ -GalNAc, P-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosideo, PhL- $\alpha$ -GalNAc, sacarose,  $\beta$ -D-lactose, D-maltose,  $\alpha$ -(D)-melibiose, D-trealose L-sorbose, rafinose, D-celobiose, dextrano, glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato.

TABELA II.13. Efeito de carboidratos e glicoproteínas sobre a atividade hemaglutinante da ADL frente a eritrócitos nativos de coelho a 2 %.

Carboidratos e glicoproteínas	Concentração para 50 % da inibição (mM)
N-acetil-D-manosamina	100,0
N-acetil-D-glicosamina	12,5
Benzil- $\alpha$ -GlcNAc	5,00
Benzil- $\beta$ -GlcNAc	10,0
N, N'-diacetilquitobiose	0,25
N, N', N''-triacetilquitotriose	0,10
N, N', N'', N'''-tetraacetilquitotetraose	0,02
Quitina *	0,125
Fetuina *	1,00

Legenda: \* resultado obtido em porcentagem.

## II.4 DISCUSSÃO

### ➤ ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DA ADL

Ao contrário dos metabólitos secundários, que apresentam uma grande variação sazonal, proteínas e outros metabólitos primários, geralmente, possuem apenas uma leve oscilação sazonal (Santos, 1999; Gottlieb, *et al.*, 1996). Em algas ficou registrado que lectinas podem apresentar variação sazonal, como a que ocorre para a lectina de *Ulva lactuca* L. Nesta alga foi verificado um aumento substancial na concentração da fração lectínica durante os meses de março, setembro e dezembro (Sampaio *et al.*, 1996). Cabe ressaltar que em alguns casos de estresse observa-se que a concentração de algumas lectinas é aumentada, o que ocorre por exemplo, na lectina N-acetil-D-glicosamina, específica das folhas de *Nicotiana tabacum* L. (Peumans *et al.*, 2000; Rüdiger e Gabius, 2001; Van Damme *et al.*, 2004).

Dos órgãos vegetativos e flores, apenas os rizomas de *Arundo donax* apresentaram atividade lectínica, obtida por hemaglutinação, em ensaios com material coletado trimestralmente, durante um intervalo de tempo de 12 meses. Tendo em vista que a atividade hemaglutinante dos extratos, preparados nas mesmas condições experimentais, sempre produziu o mesmo número de UH/ml (tabela II.2) pode-se inferir que não há variação sazonal na quantidade de lectina. Por outro lado, a variação em proteínas totais acusadas pela dosagem realizada pelo método de Lowry (1951) deve ser atribuída à presença de interferentes como polifenóis, e assim a variação sazonal seria em metabólitos como xantinas e polifenóis.

Os métodos utilizados para a extração e purificação da ADL foram aqueles comumente usados para proteínas vegetais, que envolvem extração salina e/ou ácida, precipitação por solventes orgânicos ou por sais e

fracionamento por técnicas cromatográficas, baseados em processos de troca iônica, gel permeação molecular e afinidade entre outros (Berlitz e Weder, 1990). A escolha de um solvente para efetuar a extração protéica depende da solubilidade das proteínas nas quais se tem interesse. Segundo Duranti e Gius (1997) albuminas são solúveis em soluções salinas, prolaminas solúveis em solventes orgânicos (etanol) e as glutelinas e ureases são solúveis em soluções alcalinas. Assim é que se pode considerar a solubilidade de proteínas como um fator variável.

Neste trabalho, isolou-se uma lectina dos rizomas de *Arundo donax* L. O extrato protéico bruto dos rizomas foi obtido em PBS a 10 % e a etapa de precipitação salina com sulfato de amônio foi abolida, tendo em vista a grande perda do material e a purificação alcançada por ser pouco maior de 1 vez. Optou-se por cromatografar diretamente o extrato protéico obtido a partir dos rizomas de *Arundo donax*. Na otimização do protocolo de isolamento e purificação da ADL, a cromatografia de afinidade, utilizando matriz de estroma de coelho-poliacrilamida, foi a que, efetivamente, mostrou os melhores resultados na purificação da lectina em questão.

O emprego de cromatografias em matrizes de afinidade representa uma etapa importante em muitos protocolos de purificação de lectinas, desde a metade da década de 60 do século passado, quando esta técnica foi introduzida. O processo permite a remoção de outros compostos do material aplicado. A lectina é eluída com alto grau de pureza.

O perfil cromatográfico obtido com a aplicação do extrato protéico bruto de *Arundo donax* em cromatografia de afinidade apresentou um pico pigmentado (P1) de coloração marrom-clara, não retido na coluna. O pico (P2), eluído da coluna com solução NaCl a 0,9 %: NH<sub>4</sub>OH a 25 % (1: 0,006) (v/v), (figura II.1), encerrava toda a atividade hemaglutinante, mostrando-se incolor e com uma purificação média de 12 vezes, rendimento de 6,58 % de proteínas e uma recuperação de 80,0 % da atividade hemaglutinante (tabela II.3).

Com o intuito de averiguar a pureza da ADL purificada pela

cromatografia em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida seguiu-se recromatografando a mesma, utilizando outros processos cromatográficos. Em sistema HPLC, utilizando-se coluna C<sub>4</sub> (figura II.2), a fração protéica foi eluída com aproximadamente 35 % de acetonitrila em apenas um pico. Este resultado indica que a lectina em questão encontrava-se com um grau elevado de purificação e que a mesma se ligou fracamente à matriz cromatográfica, pois a sua eluição não necessitou de concentrações elevadas de solvente orgânico. Nos outros dois processos cromatográficos que foram realizados com a ADL previamente purificada, para averiguar-se a purificação da mesma, não foi utilizado sistema cromatográfico de alta pressão, mas sim colunas abertas que sofrem apenas pressão da gravidade. Tanto na cromatografia de afinidade, utilizando como matriz N-acetil-D-glicosamina-agarose (figura II.3), como na cromatografia de gel permeação molecular, utilizando como matriz Sephadex G-100 (figura II.4), obteve-se apenas um pico protéico com rendimento de 94 e 89 %, respectivamente. Nestes dois procedimentos cromatográficos, o material protéico continuava aglutinando eritrócitos nativos de coelho a 2 % sem que tenha havido alteração significativa na atividade específica da lectina. O contrário foi observado com a utilização do sistema em HPLC, no qual a proteína perdeu a propriedade de aglutinação de eritrócitos. Isto se deve possivelmente, ao fato da ADL se mostrar sensível à presença de acetonitrila, o que ocorre com inúmeras proteínas que se desnaturam quando em presença de um determinado solvente orgânico.

Com a utilização destes três processos cromatográficos, que diferem entre si, sempre foi obtido apenas um pico protéico, demonstrando portanto, que o procedimento de purificação, por meio de cromatografia em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida utilizado neste trabalho, para a obtenção da ADL, foi adequado e eficaz.

A purificação de várias lectinas foi obtida em apenas uma etapa por cromatografia de afinidade. A purificação da lectina de *Zea mays* L., por exemplo, foi obtida através de cromatografia em coluna de afinidade utilizando a matriz lactose-Sepharose (Martinez-Cruz *et al.*, 2001). No processo de purificação da lectina de *Caesalpinia tinctoria* Domb. ex DC. empregou-se

apenas uma coluna de afinidade, utilizando matriz de quitina (Oliveira *et al.*, 2003). Irazoqui *et al.* (1992) obtiveram a purificação da lectina de *Agaricus bisporus* utilizando apenas uma única coluna de estroma-poliacrilamida.

A lectina de *Arundo donax*, purificada em matriz estroma de coelho-poliacrilamida, quando em sistema SDS-PAGE, sem a presença de redutor, com ou sem prévio aquecimento a 100 °C por 5 min, mostrou uma única banda protéica com massa molecular relativa de 33 kDa. No entanto, quando em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol obteve-se três bandas protéicas em SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida a 13 %. Estes resultados indicam que a ADL seria constituída de pelo menos três cadeias polipeptídicas associadas entre si por pontes de dissulfeto, que se dissociam na presença de agentes redutores. Todavia, quando o redutor utilizado foi DTT em concentrações inferiores a 100 mM no tampão de amostra, apenas duas bandas protéicas foram visualizadas nos eletroferogramas após coloração com azul de Comassie R-250. No entanto, quando em presença de DTT em concentrações molares superiores e iguais a de  $\beta$ -mercaptoetanol, também foram obtidas três bandas protéicas com massas moleculares similares às obtidas quando em presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Estes resultados novamente fazem supor que a lectina de *Arundo donax* é estruturada por três cadeias polipeptídicas associadas entre si por pontes S-S. Contudo, não se pode afirmar, até o presente momento, se a lectina de *Arundo donax* seria dimérica ou se a terceira banda protéica com massa molecular relativa de aproximadamente 8,7 kDa seria obtida por separação de uma das cadeias sob ação de concentrações adequadas de redutor.

Dentre as lectinas de poáceas, a de *Oryza sativa* L. é rica em cisteína e possui massa molecular de 38 kDa e é constituída por duas cadeias polipeptídicas com massa molecular relativa de 18 e 19 kDa, mas que podem ser clivadas em polipeptídeos menores de 8 e 10 kDa (Takahashi *et al.*, 1973). Por outro lado, a WGA é uma lectina dimérica, com massa molecular de 36 kDa. Assim como a lectina de *Oryza sativa* L., a WGA possui altas concentrações de meia-cisteínas (Nagata e Burger, 1972). No entanto, a

lectina 2-amino-2-deoxihexose específica de *Hordeum vulgare* L., com massa molecular de 31 kDa não possui cisteína na molécula, como a lectina de *Zea mays* L., que possui massa molecular de 88,7 kDa (Martínez-Cruz *et al.*, 2001). Em 1982, uma lectina foi isolada do embrião das sementes de *Secale cereale* L., com massa molecular relativa de 56 kDa, que se dissociava em duas cadeias polipeptídicas de 35 kDa e 19 kDa em presença de uréia e SDS, contendo também alto teor de meia cisteína (Kubanek *et al.*, 1982). Em monocotiledôneas há a ocorrência de lectinas triméricas manose específicas, como a lectina de *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger.

O material lectínico apresentou uma banda protéica em SDS-PAGE, sem desnaturação térmica e em condições não redutoras (figura II.5 e II.6), e quando submetido a eletroforese sob condições nativas não desnaturantes (PAGE) mostrou-se com um comportamento diferenciado, conforme o pH ácido ou básico ao qual era submetido. Em pH ácido a ADL apresentou apenas uma banda protéica (figura II.7), enquanto que em pH básico o mesmo material se desdobrou em sete bandas protéicas detectadas por densitometria ou seis bandas, visíveis a olho nú, quando corado com azul de Comassie (figura II.8). Este comportamento obtido com ADL em eletroforese PAGE sugere que o material protéico obtido seja constituído por um conjunto de sete isoformas.

Kaur *et al.* (2005) isolaram uma lectina GlcNAc específica a partir dos rizomas de *Arundo donax*. A lectina foi obtida por precipitação salina com sulfato de amônio 20-40 % de saturação seguida de cromatografia de afinidade em coluna de N-acetil-D-glicosamina-epoxi-activated-Sepharose-6 B, obtendo no final deste processo 3,02 vezes de purificação e 0,19 % de rendimento em proteína, inferior aos por nós obtidos usando-se coluna de estroma de coelho-poliacrilamida (tabela II.3). Estes autores concluíram que se tratava de uma lectina homodimérica constituída por duas cadeias polipeptídicas de aproximadamente 14,4 kDa. Estes resultados divergem sensivelmente dos obtidos neste trabalho. Kaur *et al.* (2005) utilizaram para a separação das cadeias polipeptídicas e estimação da massa molecular das mesmas por SDS-PAGE um gel de poliácridamida a 8 %, o que poderia ter ocasionado superposição de bandas protéicas na frente de migração eletroforética,

inclusive a dos padrões. Alfenas (1998) preconiza que a SDS-PAGE deve ser realizada em gel de poliacrilamina com concentração em torno de 15 % toda vez que o material protéico possuir massa molecular inferior a 15 kDa, que é o caso de duas das bandas protéicas separadas neste trabalho. Por outro lado, ignora-se a variedade de *Arundo donax*, utilizada pelos autores.

Kaur *et al.* (2005) relataram a presença de três isolectinas separadas por PAGE, pH 8,3. O maior número de isoformas presentes em nossas preparações (sete isoformas) pode ser atribuído ao fato de Kaur *et al.* (2005) terem usado como matéria prima para seus estudos uma fração protéica obtida por precipitação com sulfato de amônio 20-40 % de saturação, por apresentar máxima atividade lectínica desprezando as demais frações. No presente trabalho, utilizou-se o extrato bruto protéico. Por outro lado, deve ser considerado que apesar de se ter trabalhado com a mesma espécie vegetal, a variação obtida com o número de isoformas pode ter ocorrido devido à variedade botânica da planta que se empregou nos trabalhos. Apesar de Kaur *et al.* (2005) não terem indicado a variedade de *Arundo donax* utilizada em seus trabalhos, esta questão não pode ser descartada.

#### ➤ **DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DA ADL**

A massa molecular e a constituição química das lectinas é bastante variada, uma vez que elas apresentam ampla ocorrência na natureza e pelo fato de um conceito eminentemente funcional agrupar este tipo de proteína (Sol *et al.* 2006; Carvalho, 1990). *Zea mays* L., por exemplo, apresenta massa molecular estimada em 88,7 kDa (Martinez-Cruz *et al.*, 2001) e *Caesalpinia tinctoria* Domb. ex DC. massa molecular de 12,5 kDa (Oliveira *et al.*, 2003). A lectina de *Erythrina indica* Lam., por SDS-PAGE em condições redutoras é de 30 e 33 kDa, e por gel filtração é 58 kDa (Konozy, 2002), o que indica tratar-se de uma estrutura dimérica. A lectina de *Erythrina speciosa* Andrews., tem massa molecular de 27,6 kDa por monômero, determinada em espectrômetro de massa (Konozy *et al.*, 2003). Por SDS-PAGE a massa molecular relativa da ADL foi estimada em 33 kDa (figuras II.10 e II.11) respectivamente.



Em geral, a massa molecular das lectinas de poáceas situa-se em torno de 38 kDa, sendo que a da WGA é de 36 kDa (Etzler, 1985). A massa molecular relativa da ADL foi de 32,418 kDa estimada por cromatografia em gel permeação molecular em coluna de Sephadex G-100. Este valor é próximo ao referido por Kaur *et al.* (2005), que obtiveram o valor de 32 kDa estimada por cromatografia em gel permeação molecular, em matriz Biogel P-200. Pela análise de aminoácidos constituintes, a massa molecular da lectina foi estimada, neste trabalho, em 35,450 kDa.

O número de bandas coradas com azul de Comassie R-250 obtidas por focalização isoeétrica foi de seis, sendo duas difusas (figura II.12) O valor do ponto isoeétrico das mesmas situa-se dentro da faixa de pH 3,7 a 5,1. Estes resultados indicam a presença de grande número de grupamentos ácidos dissociáveis presentes nas subunidades da ADL e presentes nas isoformas da ADL. Kauer *et al.* (2005) encontraram, por focalização isoeétrica, oito bandas protéicas situadas dentro da faixa de pH entre 4,1 a 5,4, valores superiores aos obtidos neste trabalho.

As proteínas, em geral, apresentam um espectro de absorção com pico máximo próximo a 280 nm. A ADL apresentou espectro de absorção com pico máximo estabelecida no comprimento de onda relativo a 276 nm.

A 280 nm há absorção dos cromóforos da cadeia lateral dos aminoácidos aromáticos. A 280 nm ocorre a absorção máxima do triptofano e a 276 nm, a absorção máxima da fenilalanina e tirosina. Assim é que as proteínas, em geral, apresentam um espectro de absorção com pico máximo próximo a 280 nm. Altas concentrações de cisteína, em moléculas protéicas, podem interferir na leitura do espectro de absorção em 275,5 nm (Edelhoch, 1967). Tendo em vista que a ADL contém 2,5 % de triptofano, obtido pelo método de Edelhoch (1967), e 7,74 % de tirosina e 12,8 % de cisteína, obtidos através da análise centesimal de aminoácidos, justifica-se o pico máximo em 276 nm.

Conteúdos altos de resíduos de glicina, alanina, prolina e serina estão presentes em muitas proteínas isoladas de parede celular de várias plantas. Por outro lado, baixas concentrações de metionina e histidina são comuns nas proteínas de origem vegetal (Kortt e Caldwell, 1990; Allen e Neuberger, 1973). Em *Galanthus nivalis* L., conforme Van Damme *et al.* (1987), foi observado alto conteúdo de asparagina/ácido aspártico, glicina, serina e leucina na lectina, mas nenhum resíduo de metionina.

As lectinas isoladas e caracterizadas de plantas pertencentes a família Poaceae, conforme Rüdiger & Gabius (1993), possuem uma quantidade elevada de cisteína e são estabilizadas intensamente através de pontes de dissulfetos. Contudo, a lectina isolada a partir de *Zea mays* L. apresentou uma quantidade baixa de cisteína e metionina, mas com uma grande porcentagem de resíduos de glicina, seguida de glutamina e ácido aspártico (Martinez-Cruz *et al.*, 2001).

A análise da composição de aminoácidos presentes em ADL demonstrou percentuais elevados de Glu/Gln, Gly e Cys seguidos de Asp/Asn. Dentre os aminoácidos de mais baixa porcentagem em sua composição, destacam-se isoleucina, histidina e metionina, representando percentuais inferiores a 1 % em sua composição centesimal. A WGA também apresenta uma maior porcentagem em glicina, além de asparagina e glutamato (Le Vine, 1972), e cada quinto aminoácido constituinte é meia cisteína. Também possui baixas concentrações de histidina. À excessão da lectina de cevada e de *Zea mays* L., as lectinas de poáceas contêm alto teor de cisteína e de glicina, mas baixo teor de histidina e metionina (Van Damme *et al.*, 1998).

As lectinas isoladas de sementes de leguminosas, como as de *Phaseolus vulgaris* L. e de *Glicine max* (L.) Merrill., por exemplo, são caracterizadas pela ausência de resíduos de cisteína e de metionina. No entanto, em cucurbitáceas as subunidades protéicas possuem elevado conteúdo de cisteína (Van Damme *et al.*, 1998; Kortt e Caldwell, 1990). Em ADL os resíduos de cisteína contribuem para a manutenção da estrutura trimérica da lectina, em vista da separação das cadeias polipeptídicas

constituintes ocorrer por SDS-PAGE, apenas em condições redutoras.

A grande variabilidade na composição dos resíduos de aminoácidos das lectinas é menos freqüente quando trata-se de uma mesma família botânica ou de um mesmo gênero, porém reflete o fato destas proteínas estarem agrupadas por um conceito eminentemente funcional e não estrutural (Sol *et al.* 2006).

Um grande número de lectinas, dentre as que se encontram isoladas e caracterizadas, possuem natureza glicoprotéica, como a lectina de *Zea mays* L., que apresenta 12 % de carboidratos em sua estrutura (Martínez-Cruz, 2001). No entanto, algumas lectinas como a ConA, a WGA e a lectina de *Sechium edule* (Jacq.) Sw., apresentam-se não glicosiladas, embora possam ser geradas a partir de precursores glicosilados (Sol *et al.* 2006; Gabius *et al.*, 2002; Van Damme *et al.*, 1998; Carvalho, 1990).

Não foi possível confirmar, no presente trabalho, a presença de carboidratos neutros na ADL pelo método químico de Dubois *et al.* (1956), nem por método de coloração para glicoproteínas em gel de poliacrilamida, segundo Segrest e Jackson (1972). Este resultado opõe-se ao de Kaur *et al.* (2005), que obtiveram o valor de 2,1 % de carboidratos na constituição molecular da ADL pelo método de Antrona. Por outro lado, deve-se considerar o fato de que a eluição da ADL em coluna de afinidade foi realizada sem o uso de carboidratos de qualquer espécie, seguida de recromatografia em coluna de gel filtração molecular em matriz Bio Gel P-150. Assim é de supor-se não haver qualquer possível contaminante de natureza glicídica adsorvida na molécula durante a fase de purificação que não tenha sido eliminado durante a diálise.

Por outro lado, também os resultados obtidos com a coloração dos eletroferogramas da ADL, com o reagente de Schiff foram negativos para a ADL, sendo a fetuína corada (figura II.15).

Vários ensaios realizados para a verificação da estabilidade de moléculas protéicas frente a diferentes fatores de natureza química e/ou físico-

química são comumente realizados visando estabelecer características da molécula, além de parâmetros que venham a contribuir na otimização do manuseio destas moléculas, com o propósito de preservar a sua atividade biológica.

Um dos fatores importantes no estudo da estabilidade de moléculas protéicas é a temperatura. Um grande número de lectinas vegetais suporta temperaturas relativamente altas por um período razoável de tempo (Carvalho, 1990). Assim é que a lectina de *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk., é estável até a temperatura de 80 °C quando perde 50 % da sua atividade hemaglutinante (Freire *et al*, 2001) e a lectina de *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke., mantém 55 % de sua atividade hemaglutinante após 5 minutos de exposição a 100 °C (Cavada *et al.*, 1998).

Quando submetida a tratamento térmico, a ADL mostrou ser estável até a temperatura de 70 °C, por 60 minutos, oferecendo pouca resistência para temperaturas superiores, neste mesmo tempo, mas ainda mostrando atividade lectínica mesmo quando exposta por 10 minutos a 90 °C. Kaur *et al.* (2005) descreveram para ADL resultados bastante similares aos do presente trabalho, mas com diferenças no que se refere à diminuição à exposição da leitura a 60°C por 15 minutos. Neste mesmo intervalo de tempo à 85 °C, a atividade lectínica da ADL foi considerada nula pelos autores.

Um outro fator relevante no estudo da estabilidade da molécula protéica é o pH da solução na qual a mesma se encontra. Comumente, ocorre uma tendência de redução da atividade hemaglutinante das lectinas vegetais em pHs extremos. Valores de pH inferiores a 3 e superiores a 10, geralmente, são desestabilizadores da atividade hemaglutinante. A lectina de *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk., suporta variação de pH numa faixa de 3 a 9, sem alteração de sua atividade hemaglutinante (Freire *et al.*, 2002).

A atividade hemaglutinante da ADL diminuiu após duas horas de exposição a pH inferior a 3,0 e superior a 9, sem que tenha havido perda total

da atividade. Para a mesma lectina, Kaur *et al.* (2005) obtiveram resultados nos quais a ADL apresentou um máximo de atividade lectínica quando exposta em presença a pH entre 7 e 9, por um período de 15 minutos, diminuindo a atividade em 50 % em pH 10 e em pH de 5 a 6 é mantida a atividade residual.

O estudo da estabilidade lectínica frente a agentes redutores e desnaturantes também é muito relevante. As pontes de hidrogênio presentes na ADL parecem ser essenciais para sua atividade lectínica, pois quando submetida ao tratamento em presença de SDS, ou em presença de uréia 8 M, a mesma perdeu completamente a atividade hemaglutinante. Em presença de uréia 4 M ainda era observada uma baixa atividade lectínica (160 UH/ml). Kaur *et al.* (2005), ao verificarem o efeito de desnaturantes sobre a atividade lectínica da ADL, obtiveram resultados próximos ao que foi obtido no presente trabalho, observando que esta atividade foi completamente anulada após uma hora em presença de uréia 3 M.

Em condições redutoras, com a utilização de DTT ou  $\beta$ -mercaptoetanol, houve uma redução considerável na atividade hemaglutinante da ADL, apesar desta redução na atividade não ser drástica, como foi observado quando em presença de agentes desnaturantes. Assim é que resíduos de cisteína podem estar presentes no domínio de reconhecimento de carboidratos da molécula, e/ou as pontes de dissulfeto, dissociadas por ação dos redutores, podem interferir na conformação espacial desta molécula protéica, afetando a conformação do seu sítio de reconhecimento. Desta forma, os resíduos de cisteínas e mesmo as pontes de dissulfeto apresentam condição efetiva para a atividade hemaglutinante da ADL. Resultados semelhantes a estes foram obtidos por Palánová e Volf (1997), em trabalhos com a lectina de *Phlebotominae sandflies*, quando foi verificado que ao ser exposta a agente redutor sua atividade hemaglutinante diminuía consideravelmente. Este efeito foi atribuído à ação do DTT sobre as quantidades significativas de cisteína desta proteína.

A dependência de íons metálicos por lectinas (metaloproteínas) é um

fato comum para a maioria das lectinas vegetais para o reconhecimento do seu carboidrato específico como, por exemplo, a lectina extraída a partir de *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radik., que necessita íons  $\text{Ca}^{++}$  para desempenhar atividade biológica (Freire *et al.*, 2002). Ocorre que estes cátions divalentes são responsáveis por estabilizarem a ligação ao domínio de reconhecimento de carboidratos e também por fixarem as posições dos aminoácidos que interagem com o açúcar ligante (Weis e Drickamer, 1996). A atividade hemaglutinante da ADL mostrou-se não dependente da presença de cátions divalentes, quando submetida à ação cátion quelante em presença do EDTA. Este resultado é concordante com os obtidos por Kaur *et al.* (2005). Também assemelha-se ao resultado encontrado para a lectina de *T. sculenta* (Freire *et al.*, 2001) que não depende da adição de íons em suas amostras para a manutenção da atividade hemaglutinante, bem como a lectina isolada das sementes de *Artocarpus incisa* L. (frutalina), que não requer qualquer cátion divalente para sua atividade (Moreira *et al.*, 1998).

O tratamento da ADL com enzimas proteolíticas não afetou a atividade hemaglutinante desta proteína. Distintamente da ADL, a lectina de *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg., conforme Wititsuwannakul *et al.*, (1997) quando tratada com enzimas proteolíticas chegou ao mínimo de sua atividade hemaglutinante. Também as lectinas obtidas a partir de *Canavalia ensiformes* (L.) DC., *Canavalia brasiliensis* Mart. ex. Conth., *Canavalia floribunda*, *Dioclea virginata* e *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff, diminuíram sua atividade hemaglutinante após o tratamento com enzimas proteolíticas (Rios *et al.*, 1996).

Rios *et al.* (1996), afirmam que tem-se demonstrado, experimentalmente, que algumas lectinas são muito resistentes às enzimas do trato digestório e podem ser encontradas ainda ativas em fezes de ratos ou humanos, que ingerem alimentos contendo estas proteínas. Este fato aponta a importância para o estudo do papel nutricional destas moléculas, uma vez que os aminoácidos do domínio de reconhecimento dos carboidratos das lectinas intactas ou parcialmente digeridas possam vir a se ligar às células epiteliais do intestino (King *et al.*, 1980). Na LT foi observado experimentalmente que

continuam ativas mesmo após terem passado pelo sistema digestório de ratos (Kilpatrick et al., 1985). Tendo como inibidores os derivados oligoméricos da GlcNAc, a LT liga-se à membrana em escova das células do intestino delgado sem causar efeitos antinutricionais. Devido a este fato, a LT tem sido estudada com fins de ser usada como veículo de medicamentos orais de difícil ou lenta absorção intestinal. Não foi realizado teste para verificação se ADL possui ou não efeitos antinutricionais quando ingerida via oral.

As lectinas interagem com os carboidratos através de pontes de hidrogênio, dado o grande número de hidroxilas disponíveis nas moléculas dos açúcares, que acabam por agir como doadores e receptores de hidrogênio. Interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals em sítios específicos da molécula lectínica denominado domínio de reconhecimento de carboidratos também participam de ligações com os carboidratos (Loris et al., 1998).

Segundo Kauer et al. (2005), a atividade hemaglutinante da ADL é inibida por N-acetil-D-glicosamina sendo seus derivados oligossacarídeos melhores inibidores. Estes resultados são similares aos encontrados neste trabalho, usando a ADL purificada por cromatografia de afinidade em coluna de estroma de coelho-poliacrilamida. Também demonstraram o fato postulado por Rogers e Hori (1993) de que as lectinas possuem uma maior especificidade para estruturas mais complexas que os carboidratos simples, como ocorre com a lectina de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, não inibida por carboidratos livres, senão apenas por glicoproteínas, no caso específico, a asialofetaina (Silva, 2000). Ainda mais, a associação lectina-oligossacarídeo é entalpicamente favorecida e portanto as lectinas ligam-se a oligossacarídeos com constante de afinidade até 1000 vezes maior que a monossacarídeos (Lis e Sharon, 1998; Rüdiger, 1998). Os resultados deste trabalho mostraram que a N,N',N'',N'''tetraacetilquitotetraose é 625 vezes mais ativa como inibidor da ADL que o monômero GlcNAc.

De um modo geral as lectinas de poáceas possuem como inibidores de sua atividade hemaglutinante GlcNAc e, mais efetivamente, seus derivados oligoméricos exemplificado pela WGA. Por outro lado a ADL pode ser uma

lectina ligada à defesa da planta, tendo em vista a quitina, polímero de GlcNAc, ser constituinte da parede celular de fungos e do exoesqueleto de insetos.



### **CAPÍTULO III**

#### **PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA LECTINA GlcNAc ESPECÍFICA EXTRAÍDA A PARTIR DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.**

---

### III.1. INTRODUÇÃO

O papel biológico das lectinas em vegetais carece de maiores definições, contudo, a propriedade biológica singular que estas moléculas apresentam em complexarem-se com um carboidrato específico, ou a um determinado grupo de carboidratos, deflagra uma série de mudanças em nível celular, e estas proteínas assumem um papel crítico em inúmeros eventos biológicos (Sharon e Lis, 2004; Zatta e Cummings, 1992). Este mecanismo de ação culmina na capacidade das células distinguirem determinados carboidratos, o que de fato ocorre, e acaba por promover processos de reconhecimento celular (Bouwman, *et al.* 2006; Carvalho, 1990; Etzler, 1985). Assim é que as lectinas são moléculas que atuam como mediadores no reconhecimento celular.

Uma das funções mais comentadas para as lectinas em vegetais, relacionada à propriedade destas moléculas ligarem-se a carboidratos, é a de que as mesmas atuam como proteínas de defesa (Barre *et al.*, 2002). A função de defesa, que as lectinas desempenham nas plantas deve-se ao reconhecimento e interação com glicoconjugados que podem estar fora da planta. A especificidade dirigida a determinados carboidratos ausentes em vegetais é um forte argumento a favor do papel das lectinas contra patógenos/predadores (Follmer *et al.*, 2004; Ripoll *et al.*, 2003; Pneumans.e Van Damme, 1995). Estes carboidratos estariam expostos em parede celular de microrganismos, bem como na cutícula, ou no aparelho gastrointestinal de herbívoros e fitófagos aos quais a lectina poderia se ligar.

Em *Urtica dioica* L. ocorre uma lectina (UDA) que perturba a síntese da quitina alterando o desenvolvimento do micélio e inibindo o crescimento de fungos (Saul *et al.*, 2000). Em *Zea mays* L., uma lectina galactose específica, conforme Santiago *et al.* (2000), inibe o crescimento de fungos e também a

germinação de esporos. A heveína, extraída do látex de *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg., também é outra lectina que apresenta atividade fungicida (Parijs et al., 1991). Um outro exemplo é a lectina das sementes de *Talisia esculenta* (St. Hil.) Radlk. que também possui atividade antifúngica, conforme Freire et al. (2002). A lectina N-glicolilneuramínico específica de *Morus alba* L. desenvolve atividade antibacteriana, como as lectinas de *Arachis hypogaea* L., *Lens culinaris* L. e *Triticum vulgare* L. (WGA), conforme Ratanapo et al. (2001). Por outro lado, a lectina manose específica que ocorre nas raízes de *Galanthus nivalis* L., ao se ligar a glicoconjugados da cutícula de nematóides, apresenta atividade nematicida (Ripoll et al., 2003). Nas folhas de *Allium sativum* L. ocorre uma lectina com atividade inseticida moderada (Bandyopadhyayo et al. 2001). As lectinas de *Arachis hypogaea* L. e de *Pisum sativum* L., mesmo apresentando similaridade na especificidade para manose, quando utilizadas em experimentos contra larvas de *Chilo partellus*, apenas a lectina de *Arachis hypogaea* L. (PNA) apresentou atividade inseticida, com até 46,2 % de redução no número dos insetos (Law e Kfir, 1997). Este fato corrobora a efetiva especificidade que as lectinas apresentam para uma determinada estrutura glicana. Com este exemplo, fica claro que a conformação que a estrutura do carboidrato assume em um determinado glicoconjugado da qual faz parte integrante, é fator importante para o sítio ativo da lectina reconhecer efetivando a complexação lectina-carboidrato.

Pode ocorrer, por exemplo, dada a complexação lectina-carboidrato, um bloqueio na mobilidade de parasitas como em diversos casos com bactérias e nematóides, fato que acarreta o definhamento dos mesmos, por trazer dificuldades em manter fatores basais de sobrevivência destes parasitas, ao menos em alguma fase de suas vidas (Silva et al., 2002). Em relação à atividade inseticida que algumas lectinas desempenham, a mesma é efetivada por um de três tipos possíveis de interação: ligação lectina-quitina da membrana peritrófica, ligação lectina-glicoconjugados das células epiteliais ao longo do trato digestivo ou ligação das lectinas a enzimas digestivas glicosiladas (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Pneumans.e Van Damme, 1995).

As lectinas atuam, desta forma, em um sistema passivo de defesa,

como uma adaptação evolutiva do vegetal, aproveitando enzimas do trato digestivo e glicoconjugados das mucosas que ficam expostas na digestão, bem como cutículas, paredes celulares e outras estruturas (Peumans e Van Damme, 1995; Etzler, 1985). O sítio de ação destas macromoléculas é local ou sistêmico e a ação patofisiológica provocada se dá pela desestabilização do metabolismo do patógeno/predador, pela formação de complexos com carboidratos do mesmo, mecanismo que permite à lectina alcançar os diversos tecidos, por exemplo, ao atravessar a barreira gastrointestinal. Estas moléculas aumentam a atividade metabólica das células nas quais penetram, causando retardo no crescimento e mesmo a morte do patógeno/predador. Por outro lado, o predador acaba por reconhecer a planta causadora da ação tóxica e com isto não mais se alimenta da mesma, fato que culmina favorecendo a defesa da planta e, por conseqüência, da espécie vegetal como um todo (Zoccatelli *et al.*, 2003; Van Damme *et al.*, 1998).

Uma função de suma importância destas proteínas reside na contribuição das lectinas na formação de nódulos para a fixação de nitrogênio, em pêlos radiculares de diversas plantas (Limpens e Bisseling, 2003; Hochleitner *et al.*, 2003). Nas raízes de *Cajanus cajan* (L.) Mill. ocorre uma lectina específica para manose e glicose que, conforme Naeem *et al.* (2001), apresenta interação com bactérias do gênero *Rhizobium*. Neste tipo de interação as lectinas participam dos processos iniciais na formação dos nódulos, ligando os receptores específicos da superfície de células dos pêlos radiculares com carboidratos expostos na parede bacteriana, dando suporte para a ancoragem e fixação do microrganismo na planta (Naeem *et al.*, 2001; Machuka, 2000).

Outra função lectínica fundamental é a promoção da interação específica do grão de pólen com o estigma apropriado, em processos de reconhecimento celular. A interação resulta na liberação de água pela célula estigmática, hidratando o grão de pólen e promovendo sua germinação. Este processo, bem caracterizado no gênero *Brassica* (Brassicaceae), é responsável pela ancoragem do grão de pólen no estigma, e sobretudo pela incompatibilidade entre pólen e estigma de espécies diferentes (Barre *et al.*,

2002; Carvalho, 1990; Varki *et al.* 1997; Wallace, 1979). As proteínas responsáveis pelo reconhecimento entre grão de pólen com estigma, conforme Gibbs e Ferguson (1987), são sintetizadas nas anteras, mais especificamente no *tapetum*. Estas proteínas seriam levadas junto à parede do grão de pólen por ocasião de sua saída da estrutura estaminada da flor. O enrolamento, acomodamento e transporte destas moléculas seria facilitado pelas ornamentações que o grão de pólen exhibe, bem como pela própria estrutura interna da parede dos mesmos.

Alonso-Plaza *et al.* (2001) e Hirsch (1999) ressaltam a atividade que as lectinas desempenham no controle do crescimento vegetal, uma vez que se ligam a fitormônios como auxinas e citocininas. Além de se ligarem a fitormônios, também possuem papel estabelecido em sistemas de sinalização celular, envolvendo mecanismos de interação na liberação de sinais reconhecíveis pela célula alvo. Nestes casos, atuam, em geral, através de reações desencadeadas por receptores localizados ao nível de superfície celular (Wang *et al.*, 2000; Varki *et al.* 1997; Carvalho, 1990). Estudos sugerem a atuação das lectinas com papel crítico em eventos específicos da biologia celular, na embriomorfogênese, na organização celular e no armazenamento e também no transporte de carboidratos (Varki *et al.*, 1997). É de se destacar que durante a germinação de plântulas e outras fenofases de um vegetal, estas moléculas podem sofrer processos de degradação, fornecendo aminoácidos livres e nitrogênio para a síntese de novos compostos químicos, pois constituem até 10 % do nitrogênio presente na planta (Hirsch, 1999).

Por outro lado, as lectinas são muito usadas como padrões em estudos de mitogenicidade, quimiotaxia e citotoxicidade. As lectinas com atividade mitogênica induzem à secreção de citocinas nas células. As citocinas, pequenas moléculas proteicas, sintetizadas nos linfócitos, desempenham importante função na regulação da resposta imune, como sinalizadores em inflamação, remodelação de tecidos e desenvolvimento embrionário. A maior consequência da indução de proliferação linfocitária pelas lectinas, via ativação do processo mitótico, é a produção de citocinas, principalmente interferon- $\gamma$  e de interleucina-2 (IL-2), além de imunoglobulinas pelos linfócitos B, entre

outros eventos que participam da regulação da resposta imune (Fernández *et al.*, 2003; Konozy *et al.*, 2003; Konozy *et al.*, 2002). As lectinas, por serem agentes mitogênicos, também são utilizadas em estudos genéticos, na preparação de mapas cromossômicos para cariotipagem, determinação do sexo e de anomalias cromossômicas (Roitt, 2003).

A habilidade das lectinas de causarem a morte ou a proliferação celular, resulta em dois diferentes processos de citotoxicidade. No primeiro caso, exercem papel direto, como a lectina de *Viscum album* L., em que uma de suas subunidades liga-se à galactose na superfície celular e, por endocitose, a outra subunidade penetra na célula promovendo a inativação dos ribossomos, (Agapov *et al.*, 1999). No segundo caso, lectinas como a ConA e a arceina, ativam a produção de linfócitos e promovem a ligação entre estes linfócitos e as células-alvo, facilitando a atividade citolítica dos linfócitos. Certas lectinas acabam promovendo modificações na superfície das células-alvo, o que facilita o reconhecimento das mesmas pelas células T. Este fato tem propiciado estudos relacionados à regulação de metástases em células malignas, e na função biológica dos carboidratos nas interações intercelulares (Ohba *et al.* 2003; Valentiner *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2000).

As lectinas agem em processos infecciosos, onde atuam de forma antagonica, promovendo ou combatendo infecções. De modo semelhante ao que ocorre na formação de nódulos em raízes de fabáceas, por bactérias simbióticas, lectinas proporcionam o reconhecimento e ancoragem de vários parasitas, seguida de infecção. *Trichophyton mentagrophytes*, fungo causador de uma grave dermatite, conhecida popularmente por “tinha”, apresenta uma lectina que possibilita a infecção na presença de galactose e GlcNAc (Esquenazi *et al.*, 2003). Em qualquer processo infeccioso, no organismo humano, outras lectinas denominadas de selectinas, envolvem-se em etapas subseqüentes aos descritos anteriormente, combatendo a infecção pela facilitação de adesão que proporcionam entre células endoteliais e leucócitos. Desta forma, as lectinas representam alvos moleculares no combate a agentes patogênicos. Assim é que estas proteínas são úteis como modelos para estudos de quimiotaxia, ou então para a geração de fármacos no tratamento de

inflamações devido a microrganismos patogênicos, e problemas como, por exemplo, artrite reumatóide, psoríase, gripe e asma. Se não tóxicas, estas proteínas podem servir como ferramentas para guiar lipossomas contendo diversos fármacos a encontrar alvos específicos no organismo (Song *et al.*, 2003; Arbós *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1999; Kennedy, 1995).

Este capítulo apresenta como objetivo a determinação de propriedades biológicas da ADL para melhor compreender o papel fisiológico que a mesma desempenha no vegetal e indicar possíveis aplicações desta lectina.

## **III.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **III.2.1. Material vegetal**

O material vegetal constou de rizomas de *Arundo donax* L. var. *variegata* Vilmorin, coletados na cidade de Porto Alegre/RS e identificado pelo taxonomista Sérgio Bordignon, conforme exsicata ICN 144955 depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS.

O material coletado foi lavado imediatamente, e após reduzido a pó em moinho de facas e armazenado a -18 °C.

### **III.2.2. Obtenção da ADL**

A ADL foi obtida conforme a metodologia de isolamento e purificação descrita no capítulo II deste trabalho.

### **III.2.3. Reagentes químicos**

Todos os reagentes utilizados foram do tipo “pró-análise”, e a procedência de alguns produtos químicos, foi a seguinte:

Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Comassie Brilliant Blue R-250, Sephadex G-100 e G-200 foram obtidos da Pharmacia Fine Chemical Ab. Uppsala, Suécia. Bio Gel P-100 obtida da Bio-Rad, USA.



$\beta$ -mercaptoetanol provenientes da Merck, Alemanha. Albumina bovina cristalina fração V (BSA), carboidratos e proteínas padrões eletroforéticos, PHA-L, Ficoll-Hipaque, RPMI 1640, N-acetil-D-glicosamina-Agarose foram provenientes da Sigma, Chemical Company, USA.

Dodecil Sulfato de sódio e N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina, fornecidos pela Inlab, Intermat, Indústria e Comércio LTDA, Brasil.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada no sistema MILLI Q Plus, Millipore, Bedford, USA.

#### **III.2.4. Animais**

Para a determinação da atividade quimiotática, foram utilizados 2 ratos Wistar, albinos adultos, com peso médio de 150 g para cada experimento.

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada com 6 grupos de 5 camundongos albinos adultos tipo CF1, com peso médio de 31 g.

Os animais citados acima foram provenientes do Centro de Criação e Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Básicas de Saúde/UFRGS, e mantidos no Biotério da Faculdade de Farmácia, UFRGS, a temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C e com ciclo de 12 h-luz.

Para a determinação da atividade inseticida foram utilizados grupos de 15 ínstares de *Dysdercus peruvianus*, hemíptero que ataca sementes de *Gossypium hirsutum* L., comumente denominado de algodoeiro. Os insetos foram cultivados no Departamento de Biofísica da UFRGS, mantidos em câmara incubadora no insetário do Laboratório de Proteínas Tóxicas.

Para a determinação da atividade nematocida foram utilizados nematóides da espécie *Meloidogyne incognita*, infestantes das raízes de tomateiros

(*Solanum lycopersicon* L.), na forma de galhas, mantidos em casa de vegetação no Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEM/Brasília).

### III.2.5. Células transformadas

As células transformadas (tabela III.1), foram obtidas junto ao Centro Integrado do Câncer (CICAM) da Universidade Luterana do Brasil, e junto aos Departamentos de Biofísica e de Bioquímica da UFRGS.

TABELA III.1. Células transformadas utilizadas no estudo de citotoxicidade.

Linhagens	Denominação	ATCC
H460	Carcinoma de pulmão humano	HTB-177
HT-29	Adenocarcinoma colorretal humano	HTB-38
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário humano	HTB-161
RXF-393	Carcinoma renal humano	*
MCF 7	Carcinoma mamário humano	HTB -22

Legenda: \* uso restrito controlado pelo Instituto Nacional do Câncer (Estados Unidos da América).

Todas as linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10 %. Foi adicionado ao meio L-glutamina (0,2 mg/ml) e como antibióticos foram utilizados penicilina (100 U/ml) ou streptomina (100 µg/ml). As células foram mantidas em placas de 6 poços com  $3 \times 10^6$  células cada poço, a 37 °C em estufa com atmosfera úmida, contendo CO<sub>2</sub> a 5%.

### III.2.6 Especificidade eritrocitária

A especificidade eritrocitária foi determinada por diluição serial em placa de microdiluição, conforme capítulo II, utilizando eritrócitos nativos a 2 % de diversos animais e também eritrócitos de humanos (A, B, AB,O).

### III.2.7. Fitotoxicidade

A fitotoxicidade da ADL foi determinada por ensaios de inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* L., em solução aquosa com a lectina de *Arundo donax*, nas concentrações de 0,1 e 0,5 %, à temperatura de  $20 \pm 1$  °C.

Em cada experimento foram semeados 30 diásporos por placa de Petri (9 mm de diâmetro) sobre camada tripla de papel de filtro, umedecida com 5 ml da solução em análise. A leitura da germinabilidade e observações do estado geral das plântulas foram realizadas a cada 24 h, com auxílio de lupa (aumento 10 x), durante 4 dias.

O ensaio teve como controle água purificada, e também albumina a 0,2%.

Os dados foram representados graficamente como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes e a análise estatística feita pelo teste 't' de *Student* por intervalo de confiança, tomando como referência o tempo médio de germinabilidade. Diferenças acima de 95 % foram consideradas estatisticamente significativas.

A viabilidade dos diásporos não germinados foi determinada pelo desenvolvimento de coloração rósea na parte interna dos mesmos ao serem expostos por secção transversal. Para tanto, os diásporos passaram 24 h no escuro e à temperatura de 30 °C, em solução aquosa de cloro-2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a 1 %.

O potencial osmótico da solução lectínica foi estimado pelo método de Chardakov, utilizando soluções de sacarose de 0,1 M até 0,9 M (Salisbury e Ross, 1994) e registrado em tabela.

### III.2.8. Citotoxicidade

A atividade citotóxica da ADL foi realizada tomando como base os trabalhos de Monks *et al.* (2002) e Skeham *et al.* (1990).

Células das linhagens HT-29, H460, RXF-393, MCF e OVCAR-3, conforme tabela 2, foram inoculadas em microplacas estéreis de microcultura de células, contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino endógeno, na proporção de  $2,5 \times 10^4$  cel/ml, as três primeiras linhagens, e de  $5 \times 10^4$  cel/ml as outras duas linhagens. A ADL foi adicionada, em distintas concentrações, após 24 h, no mesmo volume de RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino, totalizando um volume final de 200  $\mu$ l por poço. Este cultivo foi mantido durante 72 h, a 37 °C, em atmosfera umidificada, contendo CO<sub>2</sub> a 5%.

A determinação do crescimento celular foi realizada através de método colorimétrico. Para tanto, foi adicionado 50  $\mu$ l de ácido tricloroacético a 50 %, a cada microcultura, e após 1 h de incubação os poços foram lavados com água purificada, e adicionados de solução de sulforodamina B a 0,4 % em ácido acético a 1 %. Após 10 min de incubação, a solução fluorescente foi desprezada com nova lavagem com água purificada. Na placa, seca à temperatura ambiente, foi adicionado Trizma, 10 mM, pH 10,5, e após 10 min de incubação foi efetuada a leitura a 540 nm em leitora de ELISA.

A amostra foi considerada citotóxica quando os valores de densidade óptica foram inferiores ao valor de referência em tempo zero, e o crescimento celular após 24 h de incubação, sem adição de lectina. Como controle positivo foi utilizado VP16, nas mesmas condições experimentais.

Os resultados foram expressos graficamente em forma de média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes. Os dados foram avaliados por teste “t” de *Student*. Diferenças acima de 95 % foram consideradas estatisticamente significativas.

### III.2.9. Toxicidade aguda via intraperitoneal

A toxicidade aguda da ADL foi determinada pelo método de Brito (1994), em camundongos albinos adultos CF1 (45 dias), separados em grupos de 5 indivíduos cada. O grupo controle recebeu NaCl 0,145 M, e cada um dos outros grupos recebeu uma dose específica da amostra lectínica diluída em NaCl 0,145 M: 150, 300, 600, 800 e 1200 mg/kg de peso em administração única por via intraperitoneal, sendo considerado o volume de 0,1 ml/10 g de peso corporal. Os animais receberam água e alimento *ad libitum* somente 3 h após a administração da lectina.

Foram realizadas observações dos animais nos primeiros 10, 30, 60, 120, 240 e 360 min posteriores à administração das amostras, e a cada 24 h durante os 14 dias que se seguiram. Os parâmetros de toxicidade avaliados e registrados, diariamente, foram o número de mortes e estado geral de comportamento e atipias: depressão, excitação, convulsão, salivação, piloereção, micção, lacrimejamento, defecação e efeitos sobre respiração e locomoção.

### III.2.10. Atividade inseticida

A atividade inseticida da ADL foi determinada utilizando como modelo *Dysdercus peruvianus*, durante o estágio 2. Os insetos foram separados em grupos de 15 indivíduos mantidos em frascos de vidros transparentes, de boca larga, fechados com tecido. Em cada frasco foi colocado um bebedouro com água destilada e uma cápsula com 300 mg de sementes de algodoeiro, previamente pulverizadas em moinho de facas, contendo a amostra de lectina a 2 % com ou sem GlcNAc 0,2 M, desidratado à vácuo (speed-vac) e homogeneizado.

Posteriormente ao início da dieta com a ADL, foi realizada a observação e pesagem dos insetos a cada 24 h durante os 15 dias que se seguiram. Os

parâmetros de toxicidade avaliados e registrados, diariamente, foram o número de insetos sobreviventes e a perda de peso dos mesmos.

Os grupos controles negativo e positivo receberam, respectivamente, água destilada e azida sódica a 0,02 % na semente em pó.

Os dados obtidos foram registrados, graficamente, como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes analisados estatisticamente por ANOVA de uma via e Dunett.

### **III.2.11. Atividade nematicida**

A atividade nematicida da ADL foi determinada tomando por base o método de Hussey e Barker (1973), utilizando como modelo *Meloidogyne incognita*.

As galhas foram excisadas do sistema radicular das plantas, trituradas com solução de hipoclorito de sódio a 0,5 %, e a suspensão resultante foi acertada para concentração de 10 %, passando por uma seqüência de tamizes com água corrente abundante para ser retirado o excesso de hipoclorito. Os ovos retidos em tamiz com malha de 500 mesh foram recolhidos e, imediatamente, depositados em papel toalha sobre a peneira de uma câmara de eclosão que continha água destilada.

Os ovos eclodiram em juvenis, que migraram espontaneamente para a água. Após 48 h, os juvenis foram coletados por centrifugação a 3000 rpm, durante 15 min e dispostos em placas de Petri de 5 cm de diâmetro na quantidade de 100 indivíduos por placa. Cada placa de Petri recebeu amostra lectínica a 0,2 % diluída em 5 ml de água e o ensaio foi mantido a 26° C. Após 48 h, os sobreviventes foram contados com auxílio de estereomicroscópico.

Como controle negativo foi utilizada água destilada.

Os resultados foram expressos, graficamente, como média  $\pm$  EPM de três experimentos independentes e analisados estatisticamente por ANOVA de uma via e Dunnett.

### **III.2.12. Atividade quimiotóxica**

A atividade quimiotóxica da ADL foi determinada pela inibição ou não da quimiotaxia de leucócitos, conforme técnica de Boyden (1962) modificada por Zigmond e Hirsch (1973).

Para a obtenção da suspensão de neutrófilos foram injetados, intraperitonealmente, em 2 ratos Wistar machos de 200 g, 20 ml de glicogênio a 1 % em NaCl a 0,9 %. Após 4 h, os animais foram sacrificados com auxílio de éter. Imediatamente após, injetou-se em cada animal, por via intraperitoneal, 10 ml de solução de Hanks contendo 0,1 g de heparina. A cavidade abdominal foi aberta, para os neutrófilos serem coletados em solução de Hanks, e o material obtido foi centrifugado a 3000 rpm, em centrífuga clínica, por 5 min à temperatura ambiente. O sedimento foi resuspenso em solução de Hanks de modo a se obter  $1,5 \times 10^6$  células/ml.

As amostras lectínicas (160  $\mu$ g), inibidas ou não com GlcNAc a 0,2 M, foram resuspenso em 250  $\mu$ l de plasma homólogo de rato, ativado a 37 °C por 30 min, e diluídas em 12,25 ml de solução de Hanks. A partir desta solução foram obtidos, por sucessivas diluições em solução de Hanks, as concentrações testadas da ADL.

Na determinação da atividade quimiotóxica dos leucócitos, foi empregado câmara de Boyden, com compartimentos de 500  $\mu$ l de capacidade, separados por 1 filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8  $\mu$ m. Os compartimentos inferiores foram preenchidos com amostras da ADL

em diferentes concentrações. Os compartimentos superiores foram preenchidos com suspensão de neutrófilos (500  $\mu$ l). Todos os testes foram realizados em duplicata. Após 1 h de incubação, a 37 °C, os filtros foram fixados em álcool etílico, corados com hematoxilina a 0,05 %, diafanizados em xilol por 12 h e montados entre lâmina e lamínula com bálsamo sintético do Canadá. A leitura foi realizada em microscópio óptico (objetiva 40 x) com foco no plano superior do filtro. Com a visualização do tapete de neutrófilos, o plano de observação foi aprofundado até que apenas 2 células fossem visíveis. A distância entre o plano superior e o inferior foi medida em micrômetros. A leitura foi realizada em 5 campos por filtro.

O controle positivo foi constituído por solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) a 0,0005 %, tratado da mesma forma que as amostras. Um volume de 1 ml desta solução foi diluída 25 vezes na suspensão de neutrófilos, e os compartimentos inferiores da câmara de Boyden foram preenchidos com esta solução, com ou sem GlcNAc 0,2 M. No controle negativo os compartimentos inferiores da câmara de Boyden foram preenchidos com plasma homólogo de rato ativado, sem fator quimiotáxico e com ou sem GlcNAc 0,2 M.

Os resultados foram expressos, graficamente, como média  $\pm$  EPM, de três experimentos independentes e analisados estatisticamente, aplicando-se seqüencialmente ANOVA de uma via e Dunett.



### III.2.13. Atividade mitogênica

A atividade mitogênica da ADL foi determinada conforme Maciel *et al.* (2004) e Sladowski (1993), em placa estéril de microcultura de células, utilizando a ADL, em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino endógeno, com incubação em diferentes concentrações, com sangue periférico humano.

Células mononucleares foram preparadas a partir de sangue humano obtido por punção venosa e coletado sobre EDTA 0,1 M. As células mononucleares foram isoladas do resto do sangue por centrifugação a 3000 g durante 10 min em gradiente de Ficoll. Cada microcultura continha  $3 \times 10^5$  células/ml em 200  $\mu$ l de meio RPMI 1640, por poço. A placa foi incubada a 37 °C em atmosfera umidificada, contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 72 h.

Quatro horas antes de completar o tempo de incubação foi adicionado, a cada microcultura, MTT a 0,5 % em RPMI 1640. Após o período de incubação das 4 h restantes, o sobrenadante foi retirado e substituído por DMSO. Imediatamente após este procedimento foi realizada leitura das absorvâncias em 540 e 620 nm em leitora de ELISA.

Como controle positivo foi usado PHA-L na concentração de 1 %, e como controle negativo apenas RPMI 1640, ou RPMI 1640 com células mononucleares ou ainda GlcNAc 0,2 M com células mononucleares e ADL em presença de GlcNAc.

Os resultados foram registrados, graficamente, como média  $\pm$  EPM e analisados estatisticamente, aplicando-se seqüencialmente ANOVA de uma via e Dunett.

### III.3. RESULTADOS

#### III.3.1. Especificidade eritrocitária

A especificidade eritrocitária, determinada pela atividade hemaglutinante da ADL frente a eritrócitos nativos de diferentes animais e humanos, consta na tabela III.2. Esta lectina apresentou maior atividade hemaglutinante para eritrócitos de coelho e de porco. Para eritrócitos humanos não foi obtida atividade hemaglutinante somente para os do tipo O.

TABELA III.2. Atividade hemaglutinante da ADL sobre diferentes eritrócitos.

Eritrócitos	Atividade hemaglutinante (UH/ml)
Boi	---
Cabra	---
Cachorro	---
Camundongo	----
Cavalo	---
Coelho	2560
Galinha	---
Ovelha	---
Pombo	---
Porco	2560
Rato	160
Humano A	160
Humano B	160
Humano AB	320
Humano O	---

### III.3.2. Fitotoxicidade

Na presença da ADL a 0,1 % constatou-se, conforme figura III.1, um retardo no tempo médio de germinabilidade dos diásporos de *Lactuca sativa* L. Este efeito sofreu um decréscimo de 13,4 % da germinabilidade destes diásporos em presença de ADL a 0,5 %.

Os aquênios que não germinaram passaram pelo teste do tetrasólio, e por este ensaio foi constatado que os mesmos não eram viáveis, não havendo a formação da cor rosa na semente seccionada quando em presença do tetrasólio.

O potencial osmótico da solução lectínica estimado pelo método de Chardakov para soluções de sacarose a 20°C e 1 atmosfera de pressão, calculada de acordo com a equação de Van't Hoff. O potencial osmótico de cada amostra lectínica apresentou valores inferiores a -0,167 MPa, valor extremo que permite a viabilidade da germinabilidade dos diásporos de *Lactuca sativa* L (tabela III.3).

TABELA III.3. Potencial osmótico estimado da solução da ADL pelo método de Chardakov para soluções de sacarose a 20 °C e 1 atmosfera de pressão, calculada de acordo com a equação de Van't Hoff.

<b>Concentração da ADL (%)</b>	<b>Potencial osmótico (Mpa)</b>
<b>0,1</b>	- 0,024
<b>0,5</b>	- 0,073

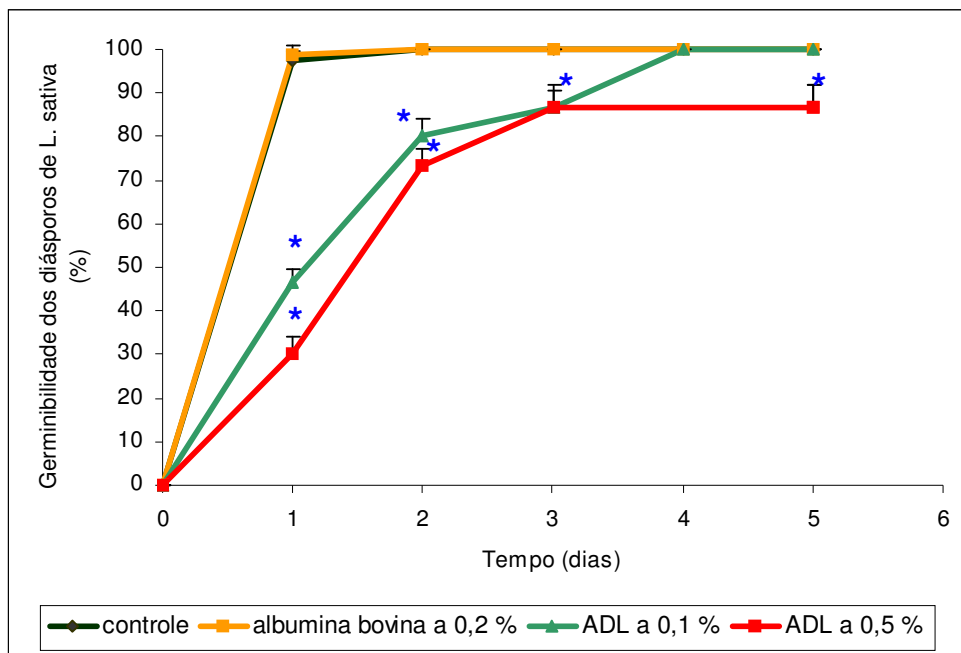


Figura III.1. Inibição da germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. frente a amostras lectínicas de *Arundo donax* L. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Legenda: \* P < 0,05 comparado com o controle negativo (Teste 'T' de Student por intervalo de confiança)

### III.3.3. Citotoxicidade

Após 72 h, em presença da ADL em distintas concentrações, pela determinação do crescimento das células das linhagens HT-29, H 460, RXF-393, MCF E OVCAR-3 (tabela III.2), verificou-se que a lectina apresentou citotoxicidade apenas para as células da linhagem HT-29. Para estas células de adenocarcinoma colorretal humano, a ADL nas concentrações de 5 a 20  $\mu\text{g/ml}$ , apresentou atividade citotóxica próxima a obtida com o controle positivo (VP16) utilizado neste experimento, conforme pode ser verificado na figura III.2.

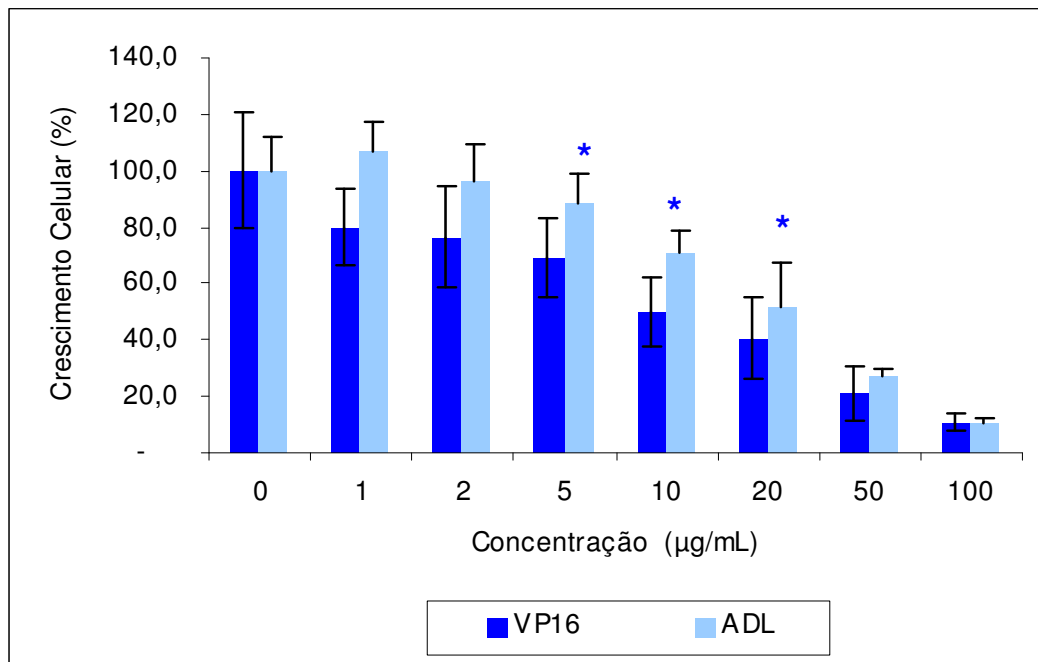


FIGURA III.2. Indução de atividade citotóxica por ADL em células da linhagem HT-29. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Legenda: \*  $P < 0,05$  comparado com o controle (Teste 'T' de *Student*).

### III.3.4. Toxicidade aguda

A lectina de *Arundo donax*, conforme tabela III.4, apresentou toxicidade aguda para camundongos na dose de 300 mg/kg, porém os animais se recuperaram dos sinais de toxicidade após 30 h da aplicação intraperitoneal da amostra lectínica. Não foi possível determinar a DL<sub>50</sub>, neste experimento. Contudo com 800 mg/kg todos os animais foram a óbito nas primeiras 30 h após a aplicação da amostra lectínica. Esta toxicidade é cerca de 2800 vezes menor que a ricina, via oral e pouco inferior a da PHA, de sementes de *Phaseolus vulgaris* L. var. Kidney bean

TABELA III.4. Toxicidade aguda via intraperitoneal da ADL para camundongos.

Dose da ADL por animal (mg/kg)	Parâmetros avaliados
150	Nenhum sinal de toxicidade foi verificado.
300	Após as primeiras 6 h da aplicação até o final de 30 h, os animais apresentaram pouca mobilidade, recuperando-se
600	Após as primeiras 6h da aplicação até o final de 30 h os animais apresentaram torpor, recuperando-se.
800	Os animais entraram em torpor após as primeiras 6 h e no final de 30 h todos os animais foram a óbito.
1 200	Os animais entraram em torpor após as primeiras 6 h e no final de 30 h todos os animais foram a óbito.

### III.3.5. Atividade inseticida

A ADL apresentou atividade inseticida para *Dysdercus peruvianus*, conforme pode ser verificado na tabela III.5. Os resultados obtidos mostraram que no final de 15 dias, 60 % dos insetos foram a óbito ao ingerirem sementes de *Gossypium hirsutum*, em pó, contendo ADL a 2 %. Por outro lado, a dieta lectínica induziu, nos insetos testados, perda de peso acentuada e letalidade, quando comparado em relação ao controle, durante o período de 15 dias que levou o ensaio (tabela III.6), demonstrando-se, deste modo, a toxicidade da lectina para os insetos (tabela III.5 e III.6).

TABELA III.5. Número de óbitos de *Dysdercus peruvianus* submetidos à dieta, contendo 2 % de ADL em sementes pulverizadas de *Gossypium hirsutum* L. durante 15 dias consecutivos.

Dieta	D i a s										Óbitos total	Óbitos (%)
	1	2	3	4	5	6	9	10	12	15		
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 ± 0	0
Azida sódica 0,02 %	-	-	2	3	5	3	2	-	-	-	15 ± 0	100,0
GlcNAc 0,2 M + ADL 2%	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2 ± 1	13,3
ADL 2 %	-	-	-	-	1	3	3	1	1	-	9 ± 2	60,0

TABELA III.6. Peso médio (mg) de *Dysdercus peruvianus* sobreviventes submetidos à dieta, contendo 2 % de ADL em sementes pulverizadas de *Gossypium hirsutum* L., durante 15 dias consecutivos.

Dieta	D i a s										
	1	2	3	4	5	6	9	10	12	15	
Controle	4,0	5,2	5,8	7,7	7,9	19,8	22,5	22,7	23,8	42,3	
Azida sódica 0,02 %	3,7	3,5	4,0	4,3	6,6	8,0	9,2	---	---	---	
GlcNAc 0,2 M + ADL 2%	4,3	4,7	4,9	6,9	7,0	8,4	12,4	16,5	19,3	22,5	
ADL 2 %	4,0	4,1	4,0	4,7	5,8	7,3	8,5	9,4	11,3	14,9	

### III.3.6. Atividade nematicida

A atividade nematicida da ADL foi determinada utilizando-se como modelo *Meloidogyne incognita*. Após 48 h de incubação dos fitonematóides em água contendo 0,2 % de ADL, constatou-se que apenas 22 % dos animais ainda permaneciam vivos, demonstrando-se deste modo a atividade nematicida da ADL (Tabela III.7).

TABELA III.7. Atividade nematicida da ADL.

Amostras	nº de nematóides 0 h	nº de sobreviventes 48 h	Sobreviventes (%)
H <sub>2</sub> O	101 ± 2	96 ± 3	95
ADL a 0,2 %	100 ± 2	22 ± 6	22



### III.3.7. Atividade quimiotática

Quando testada *in vitro*, sobre a migração de neutrófilos humanos, em placa de Boyden, a ADL demonstrou atividade quimioatraente significativa dose-dependente em 0,8 µg/ml, diminuindo com concentrações superiores (figura III.3). Observou-se que mesmo na concentração de apenas 0,2 µg/ml, a ação quimiotática foi significativa. A migração máxima correspondente à dose de 0,8 µg/ml da ADL, foi superior ao do controle positivo (lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - LPS).

Também foi verificado, conforme figura III.3, que GlcNAc a 0,2 M, testada nas mesmas condições experimentais apresentou atividade quimiotática significativa. No entanto, em presença de GlcNAc 0,2 M a migração dos neutrófilos caiu para valores inferiores ao do próprio controle negativo.

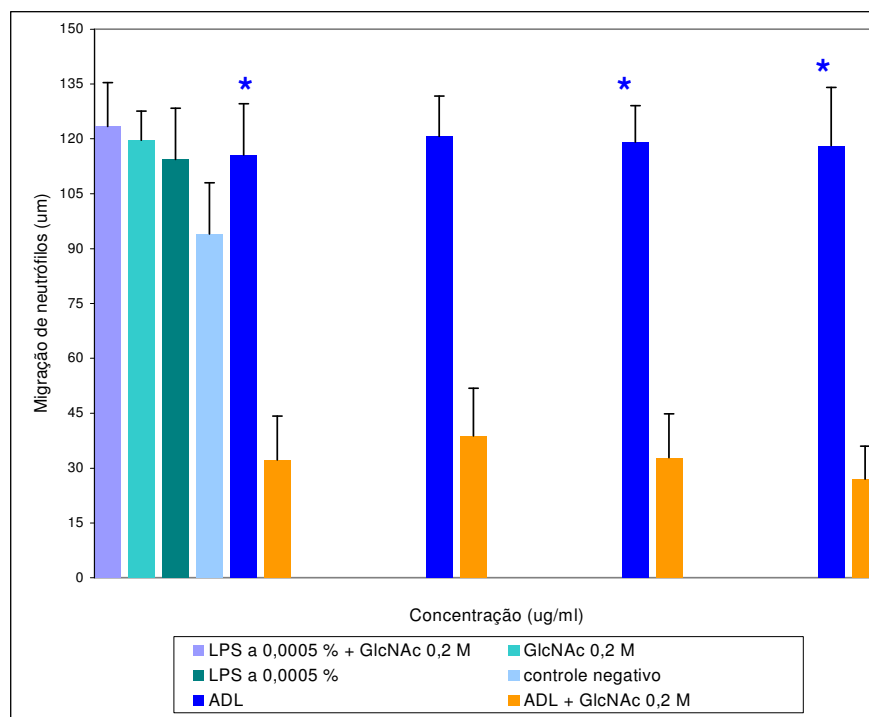


FIGURA III.3. Indução de migração de neutrófilos humanos *in vitro* por ADL. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \* P < 0,05 comparado com o controle positivo (ANOVA seguido de teste de Dunett).

### III.3.8. Atividade mitogênica

A ADL apresentou atividade mitogênica para as células mononucleares do sangue periférico humano. Conforme pode ser verificado na figura III.4, as concentrações superiores a 10 µg/ml apresentaram resultados que indicam atividade mitogênica significativa.

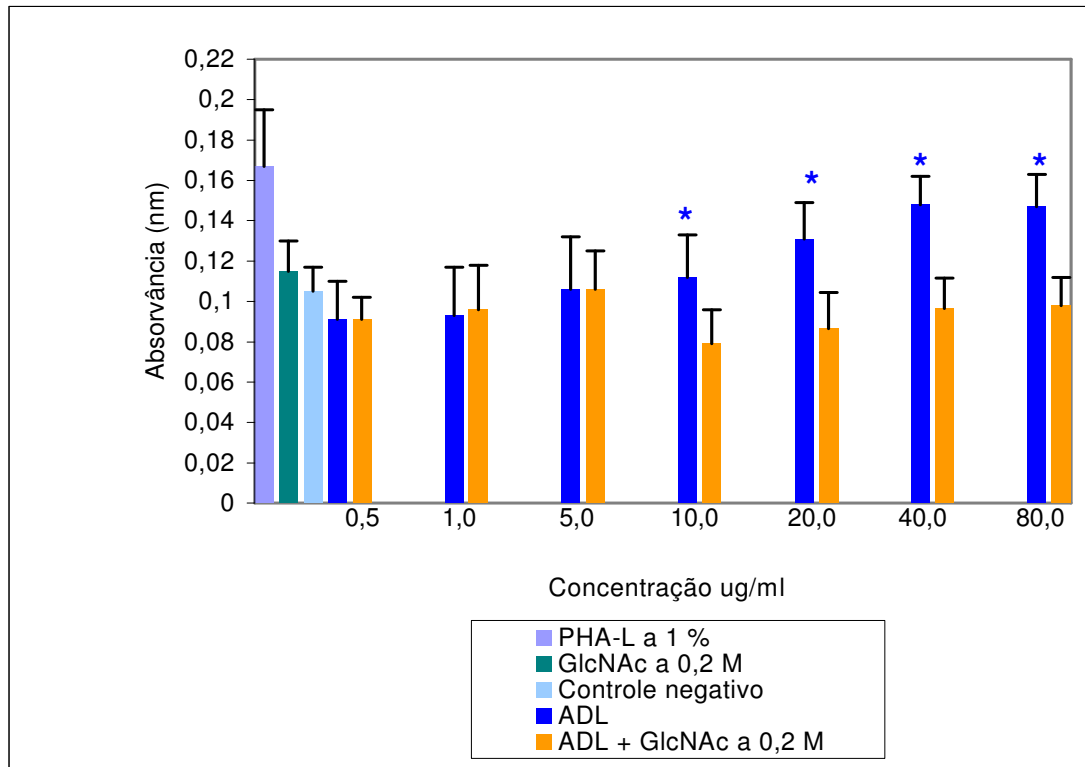


FIGURA III.4. Atividade mitogênica da ADL sobre células mononucleares do sangue periférico humano *in vitro*. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  comparado com o controle negativo (ANOVA seguido de teste de Dunett).

### III.4. DISCUSSÃO

O teste de hemaglutinação por dupla diluição serial em placas de microtitulação, apesar de não refletir a função fisiológica das lectinas, conforme Rego *et al.* (2002), é relativamente eficiente, porém não detecta as lectinas monovalentes com um único domínio de reconhecimento de carboidratos. Dois ou mais domínios de reconhecimentos ao carboidrato, ou seja, a divalência ou polivalência, permitem a interação da lectina com os carboidratos que ocorrem na superfície celular. Este método é muito prático, pois a utilização de células vermelhas facilita a visualização, a olho nú, da aglutinação. A ADL apresentou maior aglutinação para eritrócitos de coelho e porco, sendo que em todos os ensaios foram utilizados eritrócitos de coelho, dada a maior facilidade de obtenção, inclusive para o monitoramento de outras atividades biológicas que esta lectina possa apresentar.

Os vegetais, comumente, liberam no meio ambiente em que se encontram inúmeros metabólitos primários e secundários que podem influenciar de alguma forma no desenvolvimento da vegetação adjacente ao vegetal que os liberou. Este fenômeno de interferência é denominado de alelopatia e a simulação *in vitro* deste fenômeno tem sido denominado de fitotoxicidade.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados, utilizando aquênios de *Lactuca sativa* L., como indicadores de fitotoxicidade da ADL, em diferentes concentrações, mostraram que a lectina interferiu na fisiologia da germinação dos aquênios, alterando o comportamento germinativo dos mesmos. No presente trabalho foi utilizado *Lactuca sativa* L. por ser uma espécie que apresenta uma larga faixa de potencial osmótico, abaixo de -0,167 Mpa conforme Elakovich (1999).

O tempo médio da germinação dos aquênios, em presença de ADL 0,1

a 0,5 % aumentou (figura III.1), o que é um indicativo da fitotoxicidade desta lectina. Ferreira e Aquila (2000) frisaram que algumas vezes podem ser observados casos de alelopatia em que ocorrem efeitos significativos sobre o tempo médio de germinação de algumas plantas e nenhuma diferença na germinabilidade das mesmas.

Assim como a ADL, que causou um retardo na germinação dos aquênios de *Lactuca sativa* L., Masaschin-Silva e Aqüila (2006) verificaram que extratos das folhas de *Cecropia pachystachya* Trec., *Sapium glandulatum* (Vell.) Pax., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Psychotria leiocarpa* Cham. & Schltld., e *Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg., Lanj. & Boer também causaram retardo sobre o tempo médio de germinabilidade dos aquênios, sem indicarem o composto causador do efeito.

Não foi encontrado na literatura, até o momento, nenhum estudo sobre fitotoxicidade causados por lectinas sobre aquênios de *Lactuca sativa* L.

Diversas lectinas, como a PHA-L, ConA e a WGA apresentam efeito citotóxico para determinadas linhagens celulares. A determinação do crescimento das células das linhagens conforme tabela III.2, revelou que a ADL também apresentou atividade citotóxica *in vitro* significativa para células da linhagem HT-29. Em concentração de 2 µg/ml houve pequeno declínio na proliferação celular, e nas concentrações de 20, 50 e 100 µg/ml o declínio da proliferação celular foi muito próximo aos obtidos com VP16, substância utilizada como padrão positivo. No entanto a ADL não demonstrou atividade citotóxica para as linhagens celulares H 460, RXF-393, MCF e OVCAR-3 testadas paralelamente, neste experimento. Kaur *et al.* (2005) descreveram atividade antiproliferativa para células da linhagem HT-29, e também para as das linhagens T-47D, SiHa, SW-620, SK-N-SH, SK-N-MC, Hep-2, PC-3, OVCAR-5, as quais não foram testadas neste trabalho.

O fato da ADL não ter exercido efeito citotóxico sobre diversas linhagens de células transformadas, faz supor a não interação com as mesmas, e neste

caso, o declínio na proliferação celular das células HT-29 demonstra que a lectina de *Arundo donax* é capaz de distinguir diferenças na composição dos glicoconjugados da membrana de células transformadas e exercer sua ação antiproliferativa. A exemplo da lectina de *Datura stramonium* L., cujo inibidor também é GlcNAc e seus derivados oligoméricos, e que inibe a proliferação *in vitro* de células de glioma de rato da linhagem C6 (Kilpatrick *et al.*, 1978) a ADL poderia ser utilizada como ferramenta no estudo de alterações ao nível dos glicoconjugados da membrana celular durante os processos das transformações malignas.

A ADL apresentou sinais de toxicidade para camundongos quando administrada intraperitonealmente com 300 mg/kg. Com a dose de 800 mg/kg os animais não mais tiveram seus sinais vitais recuperados, sendo que no final de 30 h, após a administração intraperitoneal, todos os animais foram a óbito. Este tipo de experimento, em que fica caracterizada a toxicidade de um produto de origem vegetal, faz-se necessário, principalmente, quando a população faz uso e costuma ingerir a planta. A exposição do homem e de animais às lectinas de origem vegetal é praticamente inevitável, pois já se isolou lectinas de muitas plantas comestíveis como é o caso do *Persea americana* Mill., *Sechium edule* (Jacq.) Sw., e *Artocarpus integrifolia* L. Por outro lado, a toxicidade das lectinas tem sido observada por envenenamento acidental de humanos, pela ingestão de alimentos que tiveram, por exemplo, seu preparo feito sem os cuidados necessários. Pusztai *et al.*, (1977), destacam o mau preparo de *Phaseolus vulgaris* L. A PHA não é degradada ou inativada pelas enzimas digestivas do estômago, causando hiperplasia e hipertrofia do intestino, náuseas, vômitos e diarreia (Reynoso-Camacho, 2003; Wedar *et al.* 1997; Pusztai *et al.*, 1996).

*Viscum album* L. possui uma lectina muito tóxica, sendo que uma das suas subunidades liga-se à galactose na superfície celular e, por endocitose, a outra subunidade penetra na célula promovendo a inativação dos ribossomas (Agapov *et al.*, 1999). A lectina do *Solanum lycopersicum* L. não apresentou toxicidade para ratos (Kilpatrick, 1985). No presente trabalho não foi examinada a toxicidade oral para mamíferos.

No entanto, testes realizados com camundongos, que receberam ADL intraperitonealmente, mostraram que esta lectina exerceu toxicidade para os animais, levando-os a óbito nas doses de 800 mg/kg. Em doses menores, observou-se sinais de toxicidade nas primeiras horas após a administração da ADL, havendo recuperação dos sinais no prazo de 30 horas.

A ADL diminuiu o desenvolvimento de *Dysdercus peruvianus* quando presente na dieta destes insetos na proporção de 2 % na dieta. A redução em 35,22 % no peso dos insetos e a morte de 60 % dos mesmos, durante os 15 dias de duração do experimento, indica que a ADL apresenta toxicidade oral para estes insetos e portanto possui atividade inseticida.

À exceção de algumas enzimas como quitinases, glucanases e glicosidases, as lectinas são as únicas proteínas capazes de reconhecer e se ligar a glicoconjugados presentes na superfície externa de microrganismos, como bactérias e fungos, ou glicoconjugados expostos ao longo da superfície do trato intestinal de predadores de plantas (Peumans e Van Damme, 1996), ou ainda de glicoconjugados expostos na cutícula de nematóides (Ripoll *et al.*, 2003).

Carlini *et al.* (2002) postularam que lectinas vegetais GlcNAc específicas possuem atividade inseticida o que não é uma regra geral. As lectinas de *Triticum vulgare* L., *Galanthus nivalis* L. e *Allium sativum* L. apresentam atividade inseticida com a desestabilização do metabolismo do patógeno (Bondyopadhyay *et al.*, 2001).

Huesing *et al.* (1991) testando lectinas de *Oryza sativa* L, e de *Triticum vulgare* L., além da lectina de *Urtica dioica* L., todas GlcNAc específicas, em ensaios na dieta com *Callosobruchus maculatus* (coleóptero que ataca o gênero *Vigna*), observaram que a WGA foi a mais eficaz na atividade inseticida, apesar de as três lectinas exibirem níveis similares de toxicidade. A razão pela qual lectinas GlcNAc específicas são fatais para alguns insetos está baseada no fato do intestino médio dos insetos possuírem quitina, um polímero de

GlcNAc, na membrana peritrófica (Ricards *et al.*, 1977).

Embora seja muito provável que a toxicidade das lectinas esteja baseada na ligação específica de glicoconjugados em alguma região do intestino médio dos insetos, o mecanismo de ação não é conhecido, mas os resultados obtidos com a ADL sugerem que a mesma possa ser empregada em estudos mais aprofundados, que envolvam o mecanismo de defesa de plantas ao ataque de insetos.

Na concentração de 0,02 % no meio líquido que continha os fitonematóides, ao final de 48 h, apenas 22 % de *Meloidogyne incognita* permaneceram vivos.

São poucos os estudos relacionados com a atividade nematicida de lectinas. No entanto, a busca de novas alternativas, objetivando o controle de nematóides, é uma preocupação mundial, visto o grande problema econômico causado pelas infestações destes animais, sobretudo em plantas de interesse comercial (Rippol *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2002).

O controle de fitonematóides passa pelo desenvolvimento de novos processos que, por exemplo, venham utilizar compostos químicos que interferem na resposta sensorial dos nematóides, uma vez que este fator é indispensável em algumas fases do ciclo de vida, como a fase em que ocorre a atração e direção ao hospedeiro (Silva *et al.*, 2002).

O primeiro estudo de lectinas com potencial fitonematóide é do início da década de 80 do século passado. Zuckerman (1983) constatou, em seus trabalhos, que as lectinas poderiam atuar bloqueando as reações do sistema quimiorreceptor de nematóides, e com isto contribuindo para uma alteração no quimiotropismo. Marban-Mendonza *et al.* (1987), utilizando a ConA, obtiveram resultados significativos (78 % de óbitos de *M. incognita*). Contudo, Ponte *et al.* (1996), ao testar a lectina obtida a partir de *Canavalia brasiliensis* Mart., sobre *M. incognita*, não obtiveram resultados satisfatórios e consideraram a lectina de *C. brasiliensis* pouco eficaz no controle deste nematóide. Assim é que a atividade nematicida da ADL torna-a uma lectina promissora em estudos de

mecanismos dos processos referentes à atividade nematocida de lectinas, e também como um modelo visando o controle de fitonematóides.

*In vitro*, a ADL foi capaz de induzir a migração de neutrófilos de modo dose dependente. A indução de migração de neutrófilos na concentração de 0,8 µg/ml de lectina apresentou resposta quantitativamente similar a aquela obtida com LPS a 0,0005 %, utilizado como controle positivo. Na presença de GlcNAc houve diminuição na migração, indicando o envolvimento direto da ligação da lectina em questão, neste processo.

Indução da migração de neutrófilos também foi obtida por Dias-Baruffi *et al.* (2000) com a lectina do látex de *Euphorbia milii* Des Moul. “Breonii”, por Cavada *et al.* (1996) com a lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* Lind., e com a lectina obtida a partir das sementes de *Annona cairica* (L.) Sweet. (Coelho *et al.*, 2006). Outras lectinas, como a obtida a partir das sementes de *Persea americana* Mill. (Meade, 1980), bem como (Santos de Oliveira *et al.*, 1994), a lectina obtida das sementes de *Artocarpus integrifolia* L., inibida por GalNAc, não apresentam atividade quimiotática.

A observação de que lectinas podem atuar, diretamente, nos processos de quimioatração de neutrófilos, confirma a sugestão prévia de que mecanismos independentes de células do sistema imune são responsáveis pela indução da migração de neutrófilos para o local da inflamação. Este fato torna a ADL passível de aplicação em estudos de mecanismos dos processos inflamatórios.

Desde a descoberta de Nowell (1960), muitas lectinas foram descritas como tendo a habilidade de induzir blastogênese em células mononucleares, fenômeno importante por ser chave na resposta imune (Roitt *et al.*, 2003). As lectinas mais utilizadas como padrões em estudos de mitogenicidade são PHA-L, inibida por um complexo de oligossacarídeos, a ConA, inibida por manose e glicose, e a PMW, inibida por GlcNAc.

A ADL apresentou atividade mitogênica, em relação aos controles, para



células mononucleares de sangue periférico humano. Os resultados foram significativos, (figura III.4). Kauer *et al.* (2005), utilizando como controle positivo a ConA, cuja estimulação da blastogênese em células mononucleares é inferior a da PHA-L, relataram atividade mitogênica significativa para a ADL na única concentração de 10 µg/ml. Quanto à intensidade da atividade mitogênica não é possível fazer comparações devido ao fato dos experimentos terem sido realizados em laboratórios diferentes.

Não foi especificado neste trabalho qual o tipo de população linfocitária que respondeu ao estímulo, ou seja, se a ação da lectina foi sobre os linfócitos T ou B, ou sobre ambos.

Dentre as lectinas de poáceas, a WGA apresenta mitogenicidade em condições especiais (Lis e Charon, 1986), assim como a lectina das sementes de *Oryza sativa* L. que é mitogênica para linfócitos de camundongo e de sangue periférico humano. No entanto a lectina de sementes de *Secale cereale* L. não apresenta atividade mitogênica (Tsuda *et al.*, 1979; Takahashi *et al.*, 1973).

## **CAPÍTULO IV**

### **IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ADL NOS TECIDOS DOS RIZOMAS DE *ARUNDO DONAX* L.**

---

#### IV. INTRODUÇÃO

As lectinas são moléculas protéicas que, embora isoladas em maior número de vegetais, principalmente de sementes de leguminosas, apresentam ampla ocorrência, o que de certa forma sinaliza a importância destas proteínas para os seres vivos em geral. Um grande número destas proteínas já foi isolada e purificada a partir de vírus, bactérias, fungos, protozoários, vegetais e animais (Sol *et al.* 2006; Carvalho, 1990).

No vírus ebola, por exemplo, mais de 50 % de seu peso é devido a uma proteína de superfície fortemente glicosilada, a lectina GP, que viabiliza sua entrada nas células endoteliais e macrófagos (Simmons *et al.*, 2003). Em *Entamoeba histolytica*, conforme Hughes *et al.* (2003), ocorre uma lectina que ancora a menor subunidade da molécula, enquanto que a subunidade maior apresenta um domínio transmembrana envolvido no recrutamento de moléculas necessárias para a defesa do parasita contra espécies reativas de oxigênio. No homem ocorrem, por exemplo, as selectinas, que promovem a diapedese dos linfócitos e, principalmente dos neutrófilos em processos infecciosos. A selectina E é encontrada na superfície de células endoteliais dos vasos sanguíneos, enquanto que a selectina P ocorre na superfície de plaquetas e endotélio, e a selectina L na superfície de linfócitos (Song *et al.*, 2003; Arbós *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 1999; Kennedy, 1995).

Nas plantas as lectinas formam um grupo de proteínas bem conservadas durante a evolução (Martinez-Cruz *et al.*, 2001). Em algas verdes tem sido isolada uma série de lectinas, como a purificada a partir de *Ulva lactuca* L., uma lectina fucose específica (Gilboa-Garber, 1988). Nas angiospermas existe uma ampla ocorrência de lectinas. As lectinas ocorrem principalmente em sementes, frutos, rizomas, bulbos, folhas e tubérculos. As concentrações em que são encontradas nos órgãos vegetais variam muito,

podendo perfazer aproximadamente 6 a 11 % das proteínas totais (Wang *et al.*, 2000; Van Damme *et al.*, 1998). Foram detectadas principalmente nas sementes de solanáceas (Etzler, 1985), sementes de amarantáceas (Martínez-Cruz *et al.*, 2001), frutos de moráceas (Kabir, 1998), caule e frutos de cucurbitáceas (Vozári-Hampe *et al.*, 1992), látex de euforbiáceas (Stirpe *et al.*, 1993), cotilédones de fabáceas (Liener, 1986), em tubérculos e sementes de aráceas, sementes de poáceas, e em bulbos de amarilidáceas, orquidáceas, aliáceas e liliáceas (Wright, 1997; Shangary *et al.*, 1995).

A presença das lectinas nos diversos órgãos e tecidos vegetais é um indicativo das diferentes funções que estas proteínas desempenham nas inúmeras espécies de plantas. O papel fisiológico das lectinas nas plantas ainda é pouco conhecido, no entanto, é fato a atuação destas proteínas no reconhecimento celular, sendo admitido que algumas lectinas estariam orientadas contra glicanos exteriores ao vegetal, onde se encontram endoginamente (Peumans e Van Damme, 1995). Estas proteínas cumpririam um papel importante atuando contra patógenos/predadores, em simbiose entre planta e microrganismos, nos processos de polinização ou ainda atuariam como proteínas de reserva e no transporte de glicoconjugados (Sol *et al.* 2006; Ng, 2004; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002; Gabius *et al.*, 2002; Loris *et al.*, 1998; Van Damme *et al.*, 1998; Jacobson e Doyle, 1996; Carvalho, 1990).

Com freqüência, as espécies vegetais possuem um tipo específico de lectina. No entanto, há casos, em que diferentes lectinas ocorrem na mesma espécie vegetal, devido à necessidade de diferirem sobretudo na especificidade ao carboidrato. Há de se ressaltar que as lectinas apresentam localização em um determinado órgão, ou ainda, estrutura ou tecido específico de um órgão do vegetal onde ocorre. Este fato se verifica, por exemplo, em sementes de *Artocarpus integrifolia* L. Neste órgão, 30 a 65 % da atividade lectínica corresponde à jacalina, lectina galactose ligante, enquanto que o restante corresponde à artropina, lectina manose ligante (Pratap *et al.*, 2002).

Poucos trabalhos têm se ocupado da imunolocalização de lectinas.

Contudo, a detecção de lectinas por métodos imunológicos nos próprios tecidos dos órgãos de onde ela é extraída, é um método que garante a origem da lectina para um dado organismo em nível celular, e proporciona estabelecer questões referentes à função que desempenha no referido vegetal (Galanina *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 1990).

Nas células vegetais, conforme Hirsch (1999), as lectinas podem ser encontradas em vacúolos, parede celular, ou então no espaço intercelular. As lectinas de reserva, por exemplo, são depositadas, densamente empacotadas, formando os corpos protéicos, por processos secretores da célula e com autoagregação por interações eletrostáticas, através dos íons de  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , ou por dependência da força iônica e pH do meio (Ferreira *et al.*, 2003). Neste caso específico, após a síntese protéica, as lectinas são localizadas intracelularmente nos corpos protéicos, organelas formadas a partir do complexo de Golgi. Outro exemplo é o das lectinas inativantes de ribossomas, como a ricina. Conforme Frigerio e Roberts (1998), durante a biossíntese destas lectinas, as mesmas são direcionadas ao vacúolo celular, como uma estratégia adequada que evita o suicídio celular. No caso citado, a ricina é primeiramente codificada como pró-ricina, translocada para o lúmen do retículo endoplasmático, onde é glicosilada, e após esta etapa ela passa a ser transportada ao complexo de Golgi, chegando posteriormente ao vacúolo, onde é processada, proteoliticamente. No vacúolo ocorre a síntese da toxina madura, quando as duas subunidades da molécula se ligam por uma ponte de dissulfeto (Sol *et al.* 2006; Van Damme *et al.*, 1998).

Este capítulo apresenta como objetivo a detecção da ADL nos tecidos dos rizomas de *Arundo donax* L., por técnicas imunológicas em MO de campo claro.

## **IV. 2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.2.1. Material vegetal**

O material vegetal constou de rizomas de *Arundo donax* L. var. *variegata* Vilmorin, coletados na cidade de Porto Alegre/RS e identificados pelo taxonomista Sérgio Bordignon, conforme exsicata ICN 144955 depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS.

### **IV.2.2. Obtenção da ADL**

A ADL foi obtida conforme a metodologia de isolamento e purificação descrita no capítulo II deste trabalho.

### **IV.2.3. Reagentes químicos**

Todos os reagentes utilizados foram do tipo “pró-análise”, e a procedência de alguns produtos químicos foi a seguinte:

Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, foram obtidos da Pharmacia Fine Chemical Ab. Uppsala, Suécia. Bio Gel P-100 obtida da Bio-Rad, USA.

Adjuvante de Freund's, glutaraldeído, paraformaldeído,  $\beta$ -mercaptoetanol provenientes da Merck, Alemanha. Albumina bovina cristalina fração V (BSA), foi proveniente da Sigma, Chemical Company, USA.

Anti IgG de coelho, conjugado à peroxidase, foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada no sistema MILLI Q Plus, Millipore, Bedford, USA.

#### **IV.2.4. Animais**

Para a obtenção dos anti-corpos policlonais contra a lectina, para o ensaio de imunolocalização da lectina na planta, foi utilizado um coelho Nova Zelândia albino adulto. O coelho foi proveniente do Centro de Criação e Experimentação Animal, do Instituto de Ciências Básicas de Saúde/UFRGS, e mantido no Biotério da Faculdade de Farmácia, UFRGS, a temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C e com ciclo de 12 h-luz.

#### **IV.2.5. Produção de anticorpos policlonais**

A produção dos anticorpos policlonais foi realizada por aplicação intradérmica multipontual, em coelhos adultos, de 1 mg da lectina purificada e emulsificada com adjuvante completo de Freund's. Após um intervalo de 15 dias, 4 outras aplicações, com intervalos de 4 dias entre cada uma, foram administradas com o adjuvante incompleto. Após 5 dias da última aplicação foi retirado 10 ml de sangue da veia periférica da orelha do coelho.

O sangue foi centrifugado a 1200 rpm, por 15 min, à temperatura ambiente e o soro obtido foi recentrifugado. Por fim, o sobrenadante foi armazenado a -18 °C, para uso posterior.

#### IV.2.6. Determinação da presença de anticorpos anti-ADL

Os anticorpos policlonais anti-ADL foram detectados por teste de ELISA e também por *Western blotting* tomando por base Towbin *et al.* (1979). Como controle negativo foi utilizado soro de coelho antes da produção de anticorpos.

##### ➤ Teste de ELISA para antígeno/anticorpo

Alíquotas das distintas diluições da ADL (1:1; 1:2; 1:4), em tampão carbonato/bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,016 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,033 M e azida sódica a 0,002 g, pH 9,0), foram pipetados nos poços das diferentes linhas da placa de ELISA. Após 2 h de incubação o líquido foi succionado e acrescentou-se aos poços de cada coluna da placa de ELISA, uma das diluições dos anticorpos (1:1; 1:2; 1:4), em solução de PBS contendo Tween 20 (99:0,01) (v/v). No final de 2 h de incubação, a placa foi lavada com solução de PBS contendo Tween 20 (99:0,01) (v/v), por 5 min (3 vezes) e os anti-anticorpos anti-ADL, diluídos em solução de PBS contendo Tween 20 já mencionado (1:2000) (v/v), foram adicionados a cada poço, seguindo-se 1 h de incubação e finalmente a placa foi lavada como anteriormente.

A revelação foi obtida com solução contendo OPD (Ortofenilenediamina) a 0,1 % em tampão citrato constituído de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,083 M e ácido cítrico 0,036 M, pH 5,0, contendo peróxido de hidrogênio a 0,9 % e após 10 min de repouso, no escuro, foi acrescentado ácido sulfúrico para uma concentração final de 6,25 % em cada poço. A placa foi levada para leitura a 490 nm em leitora de ELISA em no máximo 30 min no escuro.



➤ **Imunodeteção por *Western blotting***

Amostras de lectina foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 10 %, pH 8,5 (PAGE), ou em gel de poliacrilamida a 11 %, pH 8,3 (SDS-PAGE), realizada segundo Laemmli (1970) em condições não redutoras.

A transferência das amostras lectínicas presentes em cada um dos géis foi conduzida por eluição eletroforética, utilizando-se uma célula “Trans-blot” (Bio-Rad).

Para cada gel foi montado um sanduíche de transferência na célula “trans-blot” da seguinte forma: sobre duas folhas de papel de filtro Whatman 3 MM, dispostas seqüencialmente e embebidas em tampão de transferência (Tris-NaOH 0,025 M, glicina 0,192 M, pH 8,3 em metanol a 10 %) e antecedidas por um feltro poroso, foi colocado o gel seguido de uma membrana de nitrocelulose, previamente equilibrada em tampão de transferência. Sobre a membrana de nitrocelulose foram colocadas mais duas folhas de papel de filtro Whatman 3 MM e o feltro poroso, também embebidos no mesmo tampão. Em todo o processo teve-se o cuidado de retirar qualquer bolha de ar para não interferir na transferência das proteínas. Após este procedimento, a célula “Trans-blot” foi fechada e a eletrotransferência realizada por um período de 3 h, sob corrente constante de 1 mA/cm<sup>2</sup> do gel, utilizando o tampão de transferência mencionado anteriormente. Passado este período, o sanduíche de transferência foi desfeito.

Uma parte da membrana de nitrocelulose, correspondente a cada gel, foi utilizada para a verificação da eficiência do processo realizado. Para tanto, as bandas protéicas foram coradas com vermelho de Ponceau S a 0,2 % em tampão PBS contendo ácido tricloroacético a 3 % e ácido sulfúrico a 3 %, durante 2 h, e o excesso de corante foi retirado com várias lavagens com água destilada.

A outra parte da membrana de nitrocelulose, com as mesmas amostras lectínicas que a parte anterior, foi utilizada para a imunodeteção. Para tanto, a membrana de nitrocelulose foi imersa em PBS contendo leite em pó a 5 % com Tween 20 a 0,01 % e, seqüencialmente, na solução contendo anticorpos policlonais anti-ADL, na proporção de 1: 100 (v/v), e, por fim, na solução contendo soro de cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado com peroxidase, na proporção de 1: 1000 (v/v). com incubação de 1 h em cada uma destas três etapas, sendo que as soluções, contendo os anticorpos, foram preparadas em PBS, como citado anteriormente. Após o tratamento com cada solução de anticorpos, o material foi lavado com PBS contendo Tween 20 a 0,01 %, durante 30 min, com troca de solução a cada 15 min.

Para a detecção das bandas protéicas foi utilizada uma solução com DAB (3,3'- diaminobenzidina) a 0,05 %, contendo peróxido de hidrogênio 30 volumes a 0,3 %. Após 10 min de incubação no escuro, a membrana de nitrocelulose foi lavada várias vezes com água destilada, seca entre papel de filtro Whatman 3 MM e fotografada.

#### **IV.2.7. Imunolocalização da ADL nos rizomas de *Arundo donax* por MO de campo claro**

No ensaio de imunolocalização da ADL nos rizomas de *Arundo donax*, foram utilizadas secções transversais, obtidas em vibrátomo, com 10-30 µm de espessura, imersas imediatamente em solução contendo paraformaldeído a 1 % e glutaraldeído a 0,1 %, a 4 °C por 2 h. As peças botânicas foram lavadas em PBS por 15 min com troca de solução a cada 5 min e, em seguida, tratadas com albumina bovina a 2 % em PBS, por 2 h, seguido de lavagem em PBS.

O material, assim preparado, foi incubado, com o antisoro anti-ADL, previamente diluído (1: 200) com PBS contendo albumina bovina a 1 %, durante 24 h, seguido de nova lavagem com PBS. Em seguida, aplicou-se sobre as secções anti-IgG de coelho marcado com peroxidase, previamente

diluído em 1 ml de albumina bovina a 1 % em PBS na proporção de 1:100 (v/v). No término de 4 h de incubação, o material foi novamente lavado com PBS.

A revelação foi realizada conforme Graham Jr. e Karnovsky (1966), utilizando solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6, contendo 1,5 mg de DAB em peróxido de hidrogênio a 0,01 % (volume 10), seguido de lavagens com solução de sulfato de cobre a 0,5 % em PBS (p/v), e montagem entre lâmina e lamínula.

A peroxidase endógena foi desativada com metanol: peróxido de hidrogênio 10 volumes (97: 3), (v/v), durante 30 min, antes da incubação do material botânico com o antisoro.

O material foi observado em microscópio óptico de campo claro e os resultados foram registrados por microfotografias.

Como controle negativo foram utilizadas imunoglobulinas de coelho do soro pré-imunização conjugadas à peroxidase, ou também pela omissão do antisoro anti-lectina no experimento.

### IV.3. RESULTADOS

A presença de anti-corpos policlonais contra a ADL no soro de coelho imunizado com a proteína foi verificada por ELISA (figura IV.1), e por *Western-blotting* realizada após SDS-PAGE e PAGE pH 8,5 (figura IV.2). Os resultados mostrados na figura IV.2B indicam que a ADL é constituída por uma mistura de isoformas, para os quais também houve a formação de anti-corpos.

A análise das secções transversais dos rizomas com espessura de 10 a 30  $\mu\text{m}$ , realizada em MO, após tratamento das mesmas durante 24 h com o anti-soro contra a ADL, seguido de incubação por mais 4 h com anti IgG de coelho marcado com peroxidase e de revelação com DAB, mostrou que houve reação imuno-histoquímica positiva nas fibras em suas diferentes localizações. A parede das fibras esclerenquimáticas ficaram bem marcadas demonstrando a presença da ADL nesta região celular, como pode ser constatado nas figuras IV.5 a IV.8. Por vezes, também foi observado reação imunoquímica na parede de algumas poucas células do parênquima cortical (figuras IV.7 e IV.11-IV.12).

Secções transversais do rizoma tratado, nas mesmas condições experimentais, com soro de coelho pré-imunização substituindo o soro anti-ADL, ou omitindo-se a incubação com anti-IgG de coelho (controles negativos), não produziram resultados positivos para a ADL (figuras IV.3, IV.4 e IV.9, IV.10).

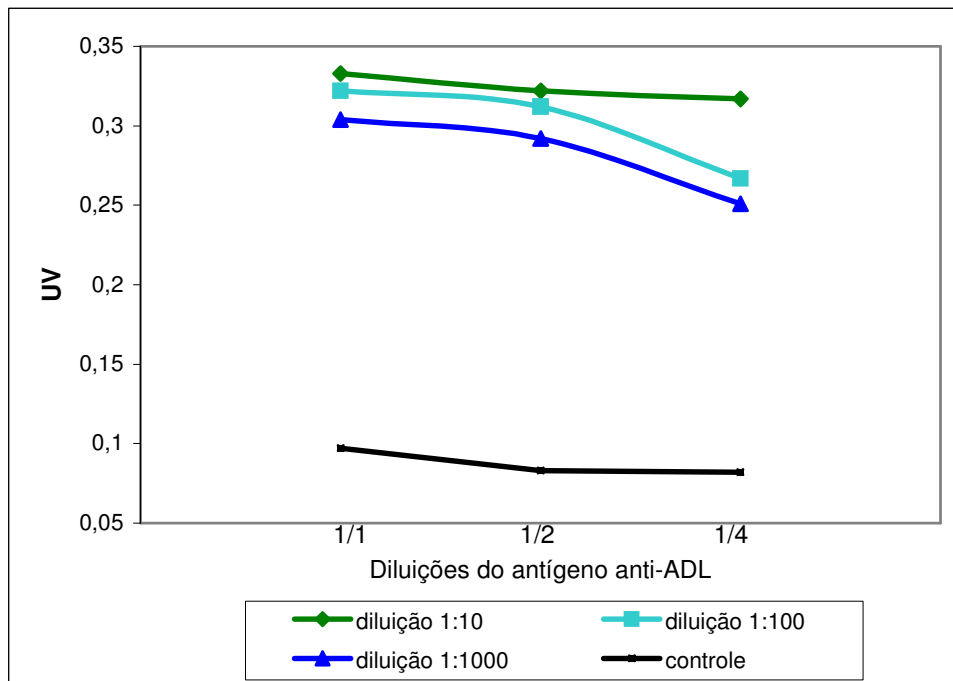


FIGURA IV.1. Imunodeteccção da ADL por ELISA através de anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho e detectados usando OPD.

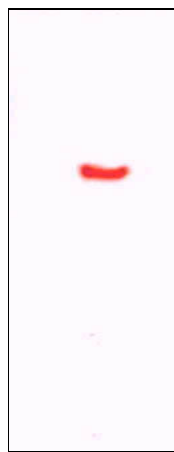


Figura IV.2A



Figura IV.2B

FIGURA IV.2. Imunodeteccção da ADL por *Western blotting* com anticorpos policlonais anti-ADL (1:200) produzidos em coelho e revelados por DAB. IV.2A. Imunodeteccção da ADL a partir de SDS-PAGE pH 8,5 em condições não redutoras; IV.2B Imunodeteccção das isoformas da ADL a partir de PAGE.

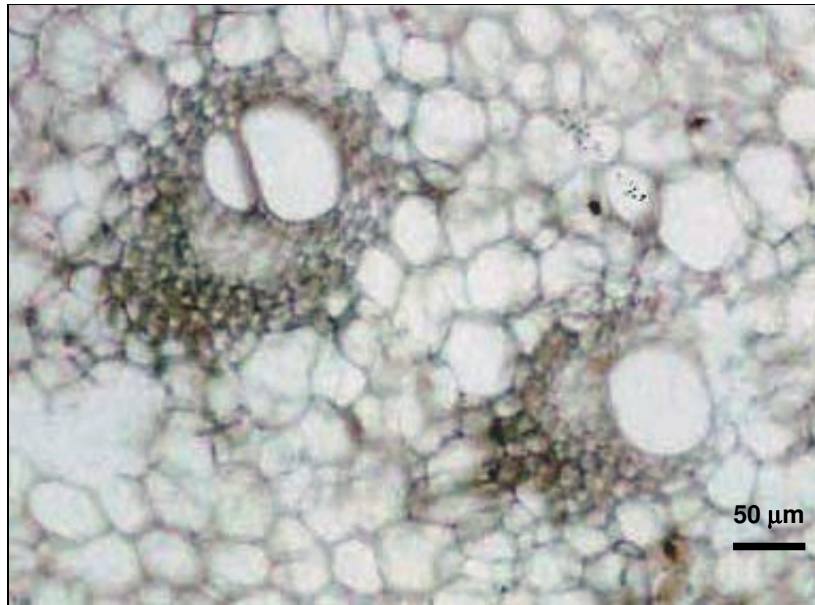


Figura IV.3

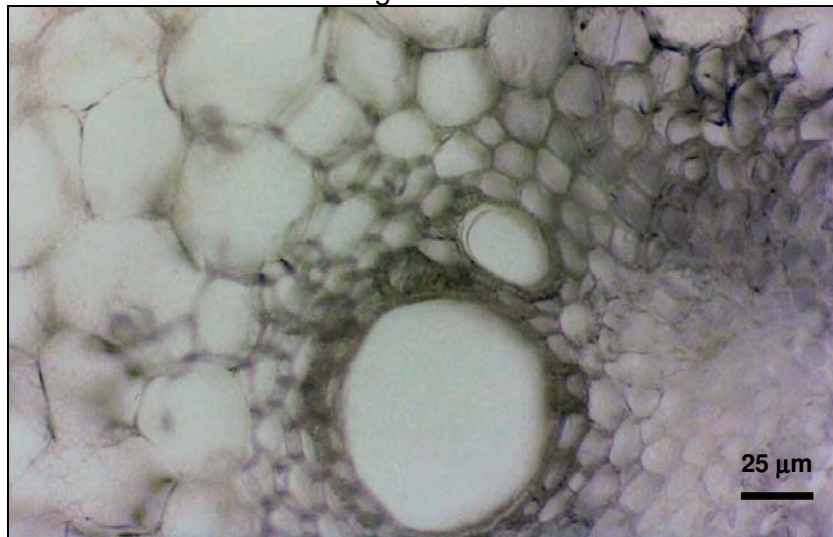


Figura IV.4

- FIGURA IV.3. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região da medula com feixes vasculares - controle negativo da imunolocalização da ADL, com uso de soro de coelho pré-imunização seguido de conjugação com anti IgG de coelho marcado com peroxidase.
- FIGURA IV.4. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região da medula com um feixe vascular - controle negativo da imunolocalização da ADL, com a omissão do soro anti-lectina.



FIGURA IV. 5 Secções transversais dos rizomas de *Arundo donax* L., região de feixe vascular – imunolocalização da ADL nas paredes de fibras, com anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho, seguido de conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase revelado com DAB.

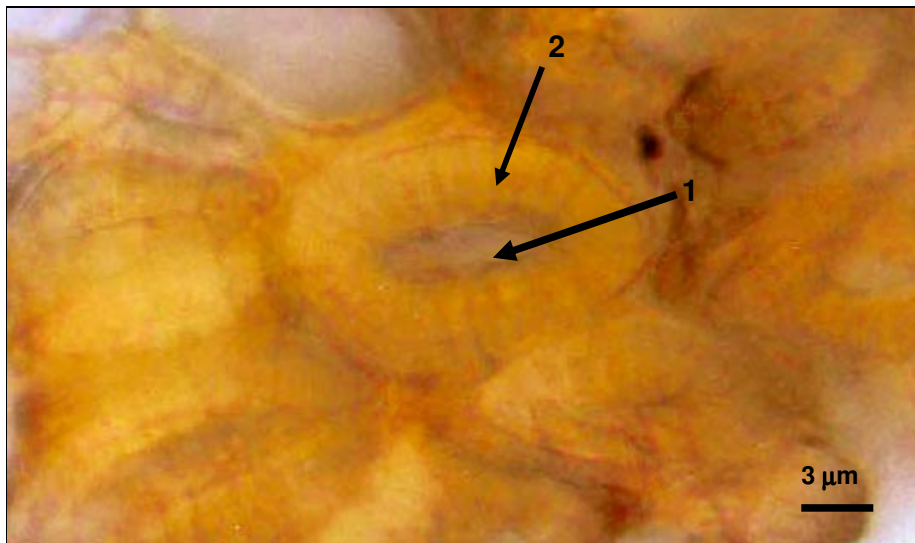


FIGURA IV.6. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L.- imunolocalização da ADL nas paredes das fibras esclerenquimáticas, com anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho, seguindo-se conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase, revelado com DAB. Legenda: 1. Protoplasto; 2. Parede celular secundária septada evidenciando a presença da ADL.



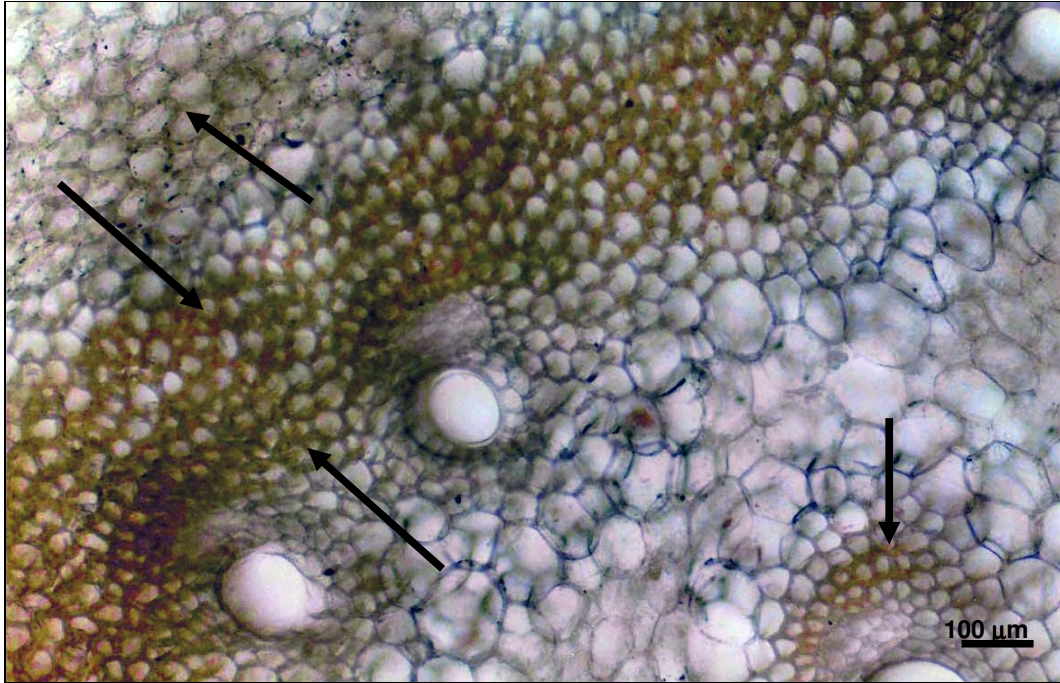


FIGURA IV.7. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., evidenciando bainha de fibras e feixes vasculares – imunolocalização da ADL com anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho, seguido de conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase, revelado com DAB.



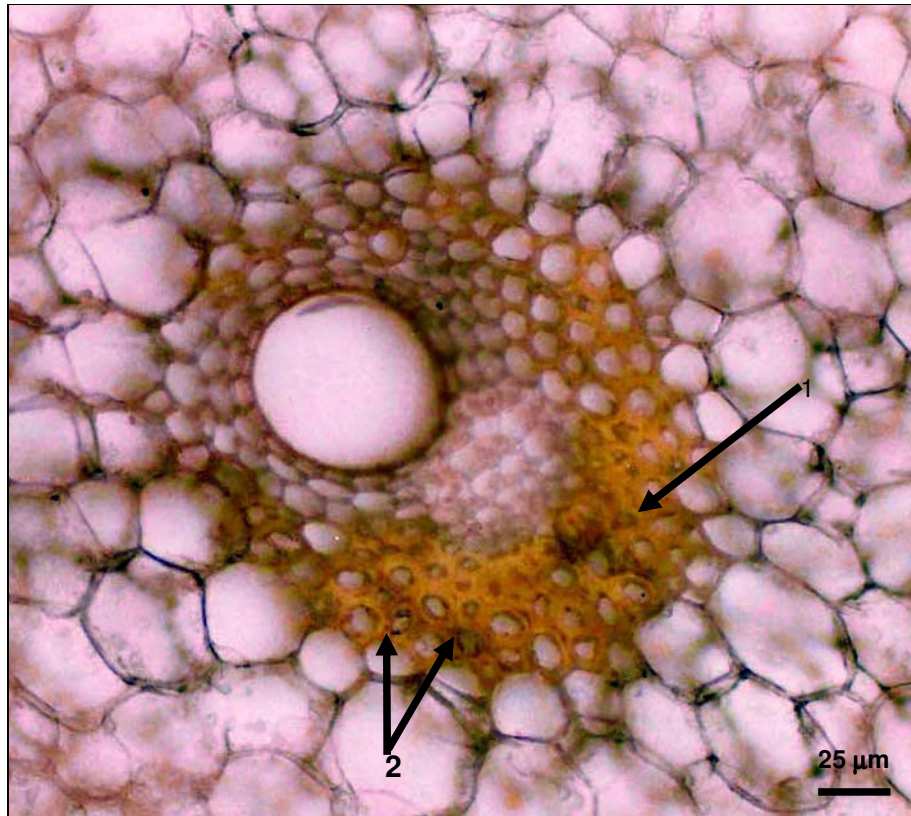


FIGURA IV.8. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região de um feixe vascular fechado – imunolocalização da ADL na parede das fibras da bainha vascular, com anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho, seguido de conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase, revelado com DAB. Legenda: 1. fibras da bainha vascular evidenciando ADL na parede celular; 2. Protoplasto nas fibras celulares.

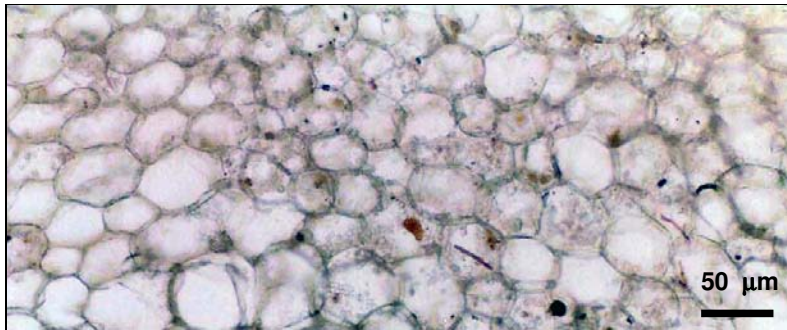


Figura IV.9



Figura IV.10

FIGURA IV.9. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região do parênquima cortical - controle negativo da imunolocalização da ADL, com uso de soro de coelho pré-imunização seguido de conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase.

FIGURA IV.10. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região do parênquima cortical - controle negativo da imunolocalização da ADL, com a omissão do soro anti-lectina.

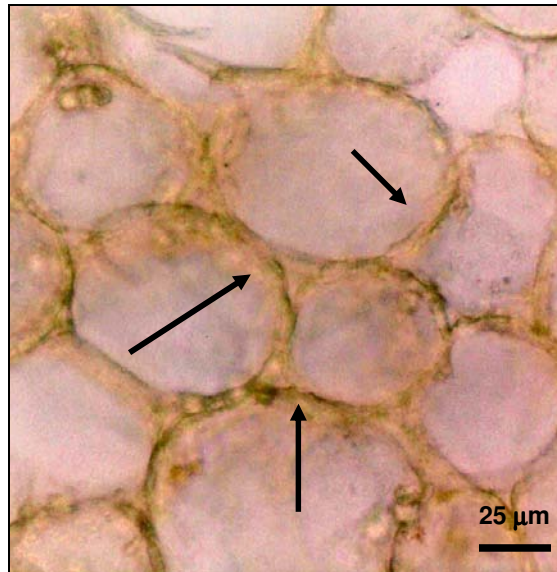


FIGURA IV.11. Detalhe da secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., na região do parênquima cortical, evidenciando a presença da ADL nas paredes por imunolocalização com anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho, seguido de conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase, revelado com DAB.

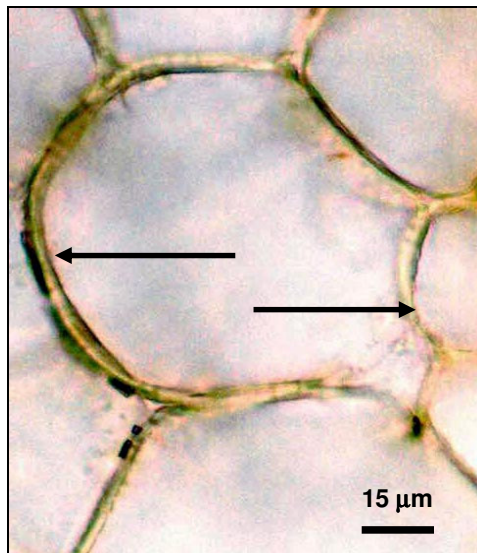


FIGURA IV.12 Secção transversal dos rizomas de *Arundo donax* L., - detalhe de células do parênquima cortical, evidenciando a presença da ADL nas paredes por imunolocalização com anticorpos policlonais anti-ADL produzidos em coelho, seguido de conjugação com anti-IgG de coelho, marcado com peroxidase, revelado com DAB.

#### IV.4. DISCUSSÃO

As lectinas vegetais foram descritas em diferentes órgãos e nos mais diferentes tecidos de plantas (Etzler, 1985). A ocorrência de lectinas em poáceas foi relatado em *Triticum vulgare* L., *Oryza sativa* L., *Hordeum vulgare* L., *Zea mays* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. e *Agropyrum repens* P. Bauv. Nesta família a grande maioria das lectinas foram isoladas a partir de sementes, no entanto, a lectina de *Hordeum vulgare* L., foi isolada a partir de raízes e folhas, e a lectina de *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud., a partir de folhas. A ADL tem ocorrência nos rizomas de *Arundo donax*, de acordo com os resultados do presente trabalho, confirmando os achados por Kaur *et al.* (2005), os primeiros a publicarem o isolamento da lectina em rizomas de poáceas.

Diversos trabalhos tem relatado a ocorrência das lectinas vegetais em nível histológico. Em cucurbitáceas, como é o caso do *Sechium edule* (Jacq.) Sw., (Vozári-Hampe *et al.*, 1992), as lectinas encontram-se localizadas apenas na região do floema dos frutos. Em algumas euforbiáceas, como em *Euphorbia marginata* Pursh, as lectinas ocorrem apenas no látex (Stirpe, *et al.*, 1993; Van Damme *et al.*, 1998). No caso das poáceas, em especial, foi mostrado que a WGA encontra-se confinada nos tecidos periféricos da raiz do embrião (Peumans e Cammue, 1986). Constatou-se, por imuno-histoquímica, que a ADL tem ocorrência nas fibras que encontram-se presentes nos rizomas de *Arundo donax*.

Verificou-se que, nos rizomas de *Arundo donax*, as fibras encontram-se formando duas bainhas que estão constituídas por várias camadas e, também, protegendo os feixes vasculares, o que está de acordo com os resultados de Speck e Spatz (2003).

Nos rizomas de *Arundo donax*, as bainhas de fibras, apesar de próximas, estão localizados em regiões anatômicas distintas, constituindo uma bainha cortical, abaixo da epiderme e o periciclo. Desta forma, o parenquima cortical, que está formado por um parênquima de reserva, rico em grãos de amido, encontra-se entre estas bainhas de fibras onde a ADL foi detectada. Faz-se necessário frisar que a bainha de fibras corticais está imediatamente abaixo da epiderme, tecido limite, que, por isto mesmo, encontra-se em contato direto com o meio exterior da planta. Em *Arundo donax* a epiderme apresenta-se apenas com uma camada de células pavimentosas e uma cutícula persistente na parede externa destas células. Também é necessário salientar que a maior parte dos rizomas de *Arundo donax* está constituído da medula e, antes desta região, encontra-se a segunda bainha de fibras, local onde também foi detectada a ocorrência da ADL. Por outro lado, a ADL também encontra-se nas fibras que constituem a bainha dos feixes vasculares. Assim é que esta lectina ocorre em todas as três formações fibrosas presentes nos rizomas de *Arundo donax*. Por último, constatou-se que esta lectina ocorre em algumas poucas células do parênquima cortical localizadas muito próximas do periciclo.

Tem sido descrito que muitas lectinas que ocorrem em órgão de estocagem encontram-se organizadas em organelas celulares especiais, formadas a partir de vacúolos do complexo de Golgi, denominadas de corpos protéicos (Sharon e Lis, 1990; Baba *et al.*, 1991). Porém é sabido que as lectinas também ocorrem em parede celular, em vacúolos e, inclusive, fora do ambiente celular. Lectinas de *Solanum tuberosum* L., ocorrem em parede celular (Allen e Neuberger, 1973). A lectina de *Hevea brasiliensis* (Willd.) Muell. Arg. (Wittsuwannakul *et al.*, 1998) ocorre no látex, junto às cascas do caule. A lectina de *Nicotiana tabacum* L. tem ocorrência no citoplasma de células parenquimáticas. Em monocotiledôneas, as lectinas que são ligantes de manose, também ocorrem no citoplasma celular (Van Damme *et al.*, 2004; Peumans *et al.*, 2000; Rüdiger e Gabius, 2001). Assim, pode-se afirmar que, a localização intracelular das lectinas é bastante variável, ocorrendo basicamente em corpos protéicos, em vacúolos ou então na parede celular, como é o caso

da ADL. Neste trabalho a ADL foi detectada, exclusivamente, na parede celular de poucas células do parênquima cortical e na parede celular das fibras que ocorrem no rizoma. Com isto, a ADL apresenta localização especificamente intracelular, podendo ser agrupada junto as lectinas de parede celular.

As fibras, com uma certa normalidade, apresentam um espessamento acentuado na parede celular, o que resulta na redução do lume destas células, e acaba por ocasionar, em geral, a perda do protoplasto na maturidade destas células (Scaneta e Scremin-Dias, 2003). Este fato não se traduz necessariamente na inatividade da parede celular das fibras, pois são elementos que fornecem principalmente proteção e sustentação aos órgãos onde se fazem presentes. A constituição química que comumente as fibras apresentam em suas paredes celulares, são apontadas como elementos que fornecem proteção e sustentação em órgãos como caules, sementes e frutos imaturos. Conforme Scaneta e Scremin-Dias (2003) o alto grau de lignificação que estas células atingem é um fator que confere função de proteção ao vegetal, pois as ligninas não são digeridas pelos animais, constituindo, assim, uma forma de defesa para as plantas. Além disto, na parede celular, conforme Showalter (1993), muito comumente ocorre proteínas das quais destaca-se as HRGPs (glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas), GRPs (proteínas ricas em glicinas), as PRPs (proteínas ricas em prolinas) e ainda as AGPs (proteínas arabinogalactanos). Todas estas proteínas são estruturais e, conforme Bowles (1990), interferem no estado de defesa das plantas contra patógenos invasores. Estes dados são esclarecedores e explicitam o quanto a parede celular é envolvida na defesa da planta.

Conforme Moreira *et al.* (1990), a localização histológica e celular de uma lectina é importante na avaliação de algumas hipóteses relacionadas com as funções que a referida lectina possa vir a desempenhar no vegetal em questão. No caso particular de *Arundo donax*, de acordo com os resultados obtidos pelos métodos imuno-histoquímicos, esta lectina desempenharia alguma função de defesa, uma vez que foi mostrado que a ADL encontra-se localizada na parede celular em células do rizoma que formam uma barreira logo após a epiderme, no periciclo, e, também, nas calotas de fibras que



acompanham os feixes vasculares ou na bainha que protege estes feixes.

## **CAPÍTULO V**

### **ADL COMO MARCADOR DE CÉLULAS TRANSFORMADAS**

---



## V.1. INTRODUÇÃO

A importância dos trabalhos de isolamento e caracterização de lectinas reside, fundamentalmente, na ampla aplicação destas proteínas devido à propriedade de que as mesmas apresentam em se complexarem com carboidratos de forma reversível e sem afetar a estrutura dos mesmos (Sol *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000). Devido à alta especificidade da complexação de uma dada molécula lectínica à estrutura glicídica, e a grande variabilidade destas estruturas oligossacarídicas existentes nos organismos vivos, algumas lectinas têm sido utilizadas como moléculas marcadoras na seleção de tipos celulares e no estudo da expressão de glicanos nas mais variadas fases de crescimento e diferenciação celular, sobretudo, em alterações patológicas (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003; You, 2001; Xu *et al.*, 2000). Apesar das lectinas se complexarem com glicoconjugados presentes no citoplasma e no núcleo, as atenções têm recaído sobretudo na complexação das mesmas com glicoconjugados de superfície de membranas.

Os glicoconjugados que ocorrem em superfície são característicos para os diferentes tipos de células e para o estado de diferenciação em que as mesmas se encontram. Contudo, ao contrário do que se poderia imaginar, apenas nove carboidratos simples ocorrem na superfície celular (glicose, galactose, manose, L-fucose, arabinose, N-Acetil-D-Glicosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido idurônico e ácido siálico). A partir destes nove carboidratos simples, dada a complexação que os mesmos sofrem na constituição dos mais variados glicanos, tem-se uma gama muito grande de estruturas que são possíveis de ocorrer, e que de fato ocorrem, na superfície de células (figura V.1) (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003; Micucci e Camps, 1987). A diversidade estrutural que a porção glicídica assume nos glicoconjugados faz com que os resíduos dos carboidratos formadores dos glicoconjugados de superfície celular tragam em suas estruturas uma grande quantidade de informações que são codificadas por unidades de monômeros.

O número e o tipo de resíduos de açúcares, tipo de ligação anomérica, ausência ou presença de ramificação, entre outras características acabam por definir, por complexidade e heterogeneidade da estrutura fina dos glicanos, o pacote informacional destas moléculas (Gabius *et al.*, 2002; Rüdiger *et al.*, 2000; Nelson e Cox, 2000; Xu *et al.*, 2000).

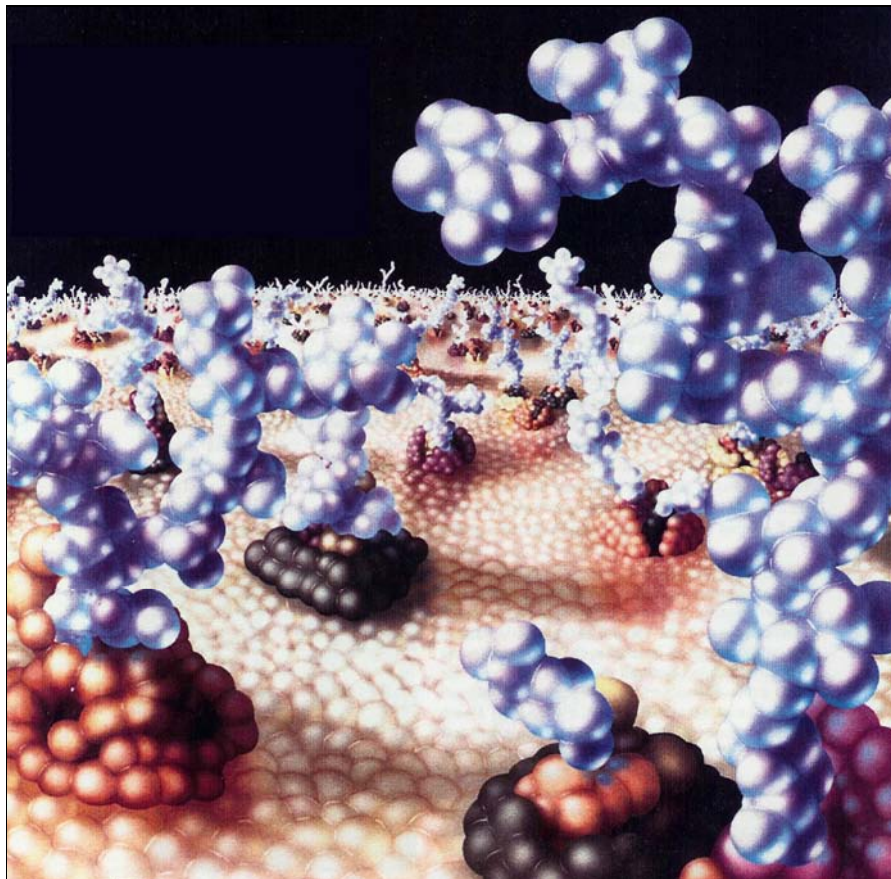


FIGURA V.1. Representação esquemática da superfície de uma célula animal normal evidenciando os glicoconjugados desta estrutura (extraído da capa de Science, 2001, V. 291, nº 5512).

O fato dos carboidratos estarem envolvidos em inúmeras mudanças bioquímicas no ambiente celular reflete a importância que os mesmos desempenham em processos fisiológicos e patofisiológicos dos organismos vivos, estando relacionados inclusive com o potencial metastático que as células podem vir a desenvolver (Xu *et al.*, 2000; Sharon e Lis, 1989).

Padrões de glicosilação aberrante associados a células tumorais são modelos universais e, por isto mesmo, mudanças no perfil da glicosilação de estruturas constituídas por carboidratos são bons marcadores para estudos que objetivam detalhar a progressão de processos neoplásicos (Villanueva, 2002; You, 2001; Gheri *et al.*, 1999; Dabelsteen *et al.*, 1992). As diferenciações quali e quantitativas dos glicoconjugados expressos na superfície de células transformadas (figura V.2) ocorrem, possivelmente, pela diferenciação no nível de expressão de glicosiltransferases ou glicosidases envolvidas em mecanismos biossintéticos das células (Xu *et al.*, 2001; Monsigny *et al.*, 1988).

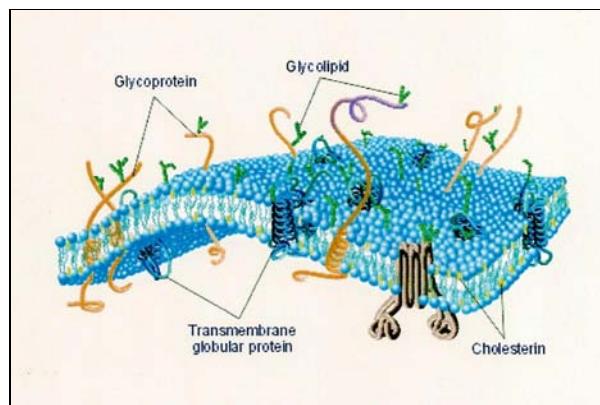


Figura V.2 A

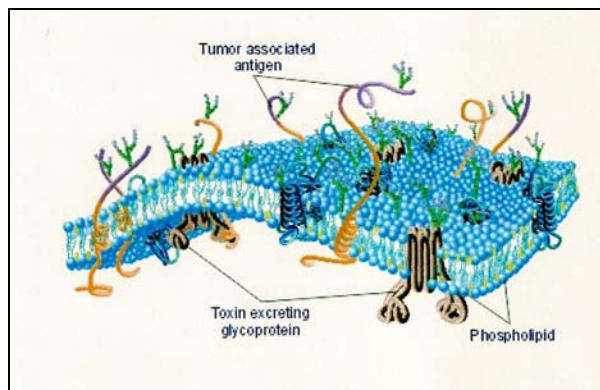


Figura V.2B

FIGURA V.2. Representação esquemática da superfície de uma célula animal evidenciando os glicoconjugados desta estrutura. V.2A. Célula normal; V.2B. Célula tumoral (extraído de <http://www.anticancer.net/resan/basis.html> em 24.01.2007).

A superexpressão de algum tipo de glicano na superfície de células neoplásicas faz com que as mesmas aglutinem, ou sejam marcadas, mesmo

com o emprego de baixas concentrações de lectinas (geralmente 10-15 µg/ml), enquanto que as células normais aglutinam com 10 a 20 vezes esta concentração da mesma lectina (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003; Micucci e Camps, 1987).

As lectinas, por apresentarem uma alta sensibilidade quando empregadas como sondas em secções histológicas, e por deterem grande especificidade, passaram a ser usadas em estudos na obtenção de um perfil de glicosilação para um dado tipo celular, ou mesmo para apenas um dado período no desenvolvimento de tipos celulares. Por outro lado, em anatomopatologia, estão sendo utilizados, rotineiramente, protocolos com lectinas comerciais. Este fato tem amenizado a problemática enfrentada em alguns casos, os quais, pela alta diferenciação do tumor, não se têm mais qualquer indício da estrutura indicativa do tecido de origem. Deve ser ressaltado que é citológica ou histológica a definição do diagnóstico da malignidade, bem como a determinação da diferenciação (grau) em que o tumor se encontra e da invasividade tumoral (estágio), e que as lectinas têm se mostrado bons reagentes histo e citoquímicos (You, 2001; Thies, *et al.*, 2001; Bacchi *et al.*, 1999).

Metodologias variadas são usadas em técnicas que se valem desta propriedade das lectinas para utilizá-las como marcadores em diferentes tecidos, tumores e células. Dois métodos gerais são comumente empregados em trabalhos que objetivam a distinção de tipos celulares (Medina-Bolivar *et al.*, 2003; Martinez-Cruz *et al.*, 2001; Sharon, 1977).

Na detecção de carboidratos por histoquímica, a técnica inclui um transportador, um marcador e um sacarídeo. Geralmente, utiliza-se a conjugação prévia da lectina à biotina e emprega-se partículas fluorescentes, ouro coloidal ou enzimas como a peroxidase. Este método é muito utilizado para diversos diagnósticos ou prognósticos (Medina-Bolivar *et al.*, 2003; Galanina *et al.* 2001). Uma outra metodologia que também é utilizada envolve a imobilização de uma lectina em um suporte sólido, num processo semelhante

à cromatografia por afinidade, para adsorção de um dado tipo celular (Sharon, 1977). Desta forma é que lectinas imobilizadas servem de matrizes de afinidade na purificação de frações subcelulares e celulares, ou ainda para a purificação de um determinado glicoconjugado para a posterior análise estrutural (Konozy *et al.*, 2003; Amano *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Varki *et al.*, 1997).

Este capítulo tem como objetivo a exploração do potencial da ADL como marcador molecular histoquímico de células transformadas em MO de imunofluorescência.

## **V.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **V.2.1. Obtenção da ADL**

A ADL utilizada nestes ensaios foi obtida por processos de isolamento e purificação, conforme metodologia indicada no capítulo II deste trabalho.

### **V.2.2. Reagentes químicos**

Todos os reagentes utilizados foram do tipo “pró-análise”, e a procedência de alguns produtos químicos, foi a seguinte:

avidina-peroxidase, 4-Naftol e dimetilformamida provenientes da Merck, Alemanha. Estreptoavidina-FITC, N-hidroxisuccinimidabiotina, Albumina bovina cristalina fração V (BSA) e GlcNac foram provenientes da Sigma, Chemical Company, USA.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada no sistema MILLI Q Plus, Millipore, Bedford, USA.

### **V.2.3 Células transformadas**

As células transformadas (tabela V.1), foram obtidas junto ao Laboratório de Culturas do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, da Universidade Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina, também junto ao Centro Integrado do Câncer (CICAM) da Universidade Luterana do Brasil, e junto ao Departamento de Biofísica e de Bioquímica da UFRGS.

Todas as linhagens foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino a 10 %. A linhagem V 79-4 foi mantida em meio DMEM.

Foi acrescentado ao meio L-glutamina (0,2 mg/ml) e como antibióticos foram utilizados penicilina (100 U/ml) ou estreptomicina (100 µg/ml), e as culturas foram mantidas em placas de 6 poços com  $3 \times 10^6$  células cada poço, a 37 °C em estufa com atmosfera úmida, contendo CO<sub>2</sub> a 5 %.

TABELA V.1. Células transformadas utilizadas para marcação com ADL.

Linhasgens	Denominação	ATCC
—	Astrócito de rato ( <i>Rattus norvegicus</i> ) - cultura primária	—
C6	Glioma de rato ( <i>Rattus norvegicus</i> )	CCL-107
H460	Carcinoma de pulmão humano	HTB-177
HT-29	Adenocarcinoma colorretal humano	HTB-38
MCF7	Carcinoma mamário humano	HTB-22
OVCAR-3	Adenocarcinoma de ovário humano	HTB-161
RXF-393	Carcinoma renal humano	*
T-24	Carcinoma de bexiga humano	HTB-4
T-47D	Adenocarcinoma mamário ductal humano	HTB-133
U-138 MG	Glioblastoma de cérebro humano	HTB-16
V79-4	Fibroblasto de pulmão de Hamster Chinês ( <i>Cricetulus griseus</i> )	CCL-93

Legenda: \* uso restrito controlado pelo Instituto Nacional do Câncer (Estados Unidos da América)

#### V.2.4. Biotinização da ADL

A ADL foi biotinizada conforme Jorgensen *et al.* (2000). Para tanto, a ADL em PBS (0,2 mg/ml), pH 9,0, foi adicionada a uma solução contendo N-hidroxi-succinimidobiotina a 1 % em dimetilformamida, na proporção de 25:1, seguindo-se incubação de 2 h. Este procedimento foi seguido de diálise contra PBS, a 4 °C, durante 2 h, com troca de água a cada 2 h por mais 3 vezes. O material dialisado foi centrifugado a 11000 rpm, por 10 min, a 4 °C, para obtenção do sobrenadante.

- **Verificação da biotinação da ADL**

Em uma mesma membrana de nitrocelulose foram pipetados, pontualmente, e em paralelo, 0,2 µg de ADL que havia passado pelo processo de biotinação, como descrito anteriormente, e uma amostra da ADL não biotinizada. Como controle positivo foi utilizada albumina bovina biotinizada. Esta membrana de nitrocelulose contendo as amostras foi tratada, durante 15 min, com PBS contendo albumina bovina a 0,5 % e Tween 20 a 0,1 %. Passado o tempo de 15 min, o material foi lavado 3 vezes, por 1 min, em PBS, quando então foi adicionada uma solução contendo avidina-peroxidase a 0,0005 % em água purificada e glicerol (1:1) (v/v), e diluída com PBS contendo Tween 20 a 0,05 % na proporção de (1: 5000) (v/v). Decorrido o tempo de 1 h o material foi novamente lavado com PBS, como descrito anteriormente, e colocado por 3 min na presença de uma solução de tampão Tris, pH 7,0, contendo 4-cloronaftol a 0,00015 % e peróxido de hidrogênio a 0,003 %. A formação de cor azul-violeta a cinza indica a efetiva biotinação da molécula em teste.

#### **V.2.5. Marcação de células transformadas com ADL biotinizada**

As lamínulas com as células a serem analisadas foram lavadas com PBS e fixadas por imersão em acetona, durante 5 min a 0 °C. Todos os procedimentos após a fixação das células foram realizados à temperatura ambiente de 20 ± 1 °C. O material foi bloqueado com albumina bovina a 1 % em PBS, durante 1 h, seguido de tratamento com solução lectínica biotinizada diluída em PBS com albumina bovina a 1 % (1: 20), por 2 h. O material foi novamente lavado com PBS e incubado com estreptoavidina-FITC, diluído em PBS (1: 1000), durante 35 min, no escuro. Após nova lavagem com PBS, o material foi montado entre lâmina e lamínula, com bálsamo do Canadá sintético.



As células assim tratadas foram visualizadas em microscópio óptico de fluorescência, utilizando filtro com excitação em 445 nm e emissão em 575 nm. Os resultados foram registrados por micrografias.

Como controle negativo foi utilizado em células uma solução lectínica biotinizada, previamente incubada com GlcNAc 0,2 M, ou ainda apenas material bloqueado sem lectina nas mesmas condições experimentais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### V.3. RESULTADOS

A ADL previamente biotinizada foi utilizada na marcação de 10 linhagens de células transformadas, além da cultura primária de astrócito de rato. Nos ensaios realizados, a ADL marcou apenas as linhagens HT-29, T-24 e T-47 D, conforme figuras V.3 aV.5.

A figura V.3 mostra que a ADL marcou, intensamente, por ligação direta, as células da linhagem HT-29 de adenocarcinoma colorretal humano em toda a extensão do invólucro celular, visualizada por microscopia de fluorescência.

Nas células da linhagem T-47D, a ADL foi visualizada de forma granulada intensamente (figura V.4), indicando ligação da lectina com receptores no citoplasma, sendo alguns retículo justo-nucleares ou na própria membrana do núcleo.

As células T-24 foram marcadas uniformemente e intensamente em toda a extensão do citoplasma celular, de modo perinuclear, com o núcleo celular sem marcação (figura V.5).

Afora as células das linhagens HT-29, T-47D e T-24, todas as demais células transformadas analisadas (tabela V.1) e também os astrócitos de rato - cultura primária - não apresentaram marcação com a ADL.

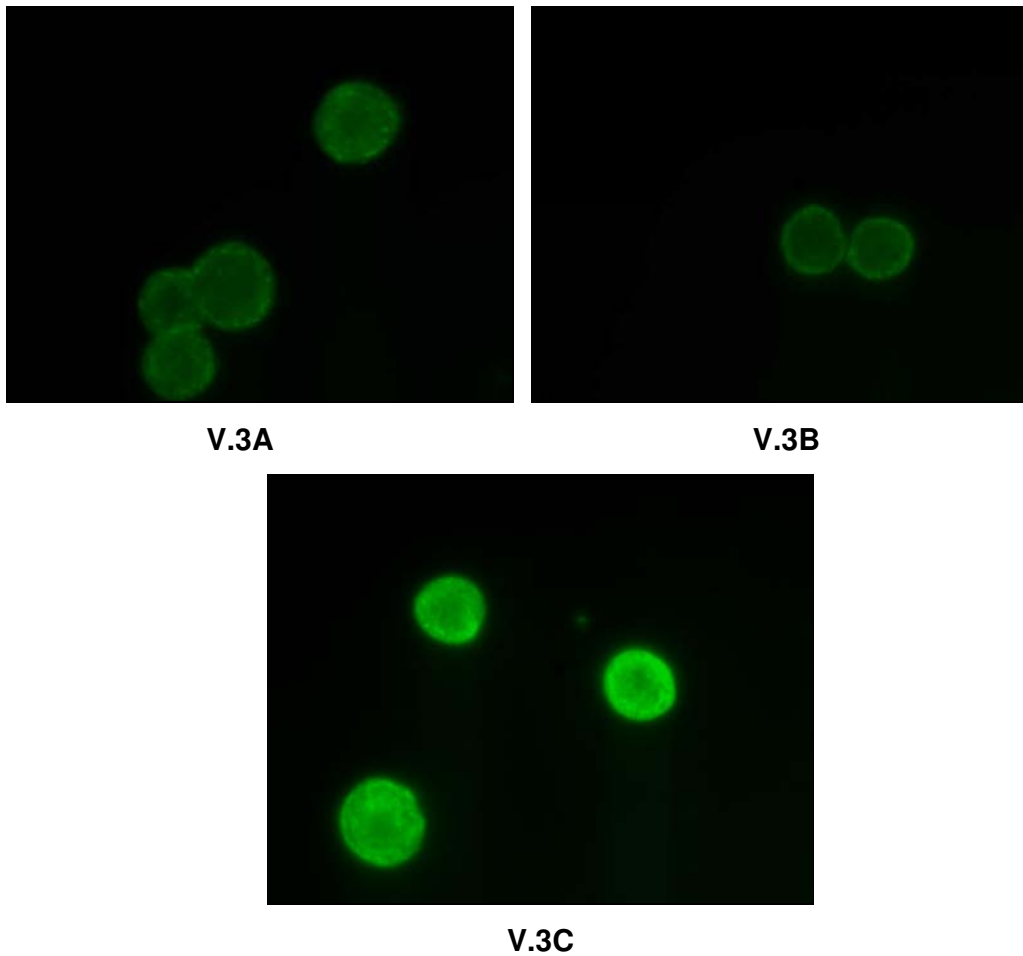


FIGURA V.3. Marcação de células da linhagem HT-29 com ADL biotinizada e revelada com Estreptoavidina-FITC (aumento de 1000 x). V.3A. Controle 1: células tratadas com Estreptoavidina-FITC sem ADL; V.3B Controle 2: células tratadas com ADL inibida por GlcNAc a 0, 2 M e, posteriormente, com Estreptoavidina-FITC; V.3C. Células tratadas com ADL biotinizada e revelada com Estreptoavidina-FITC.

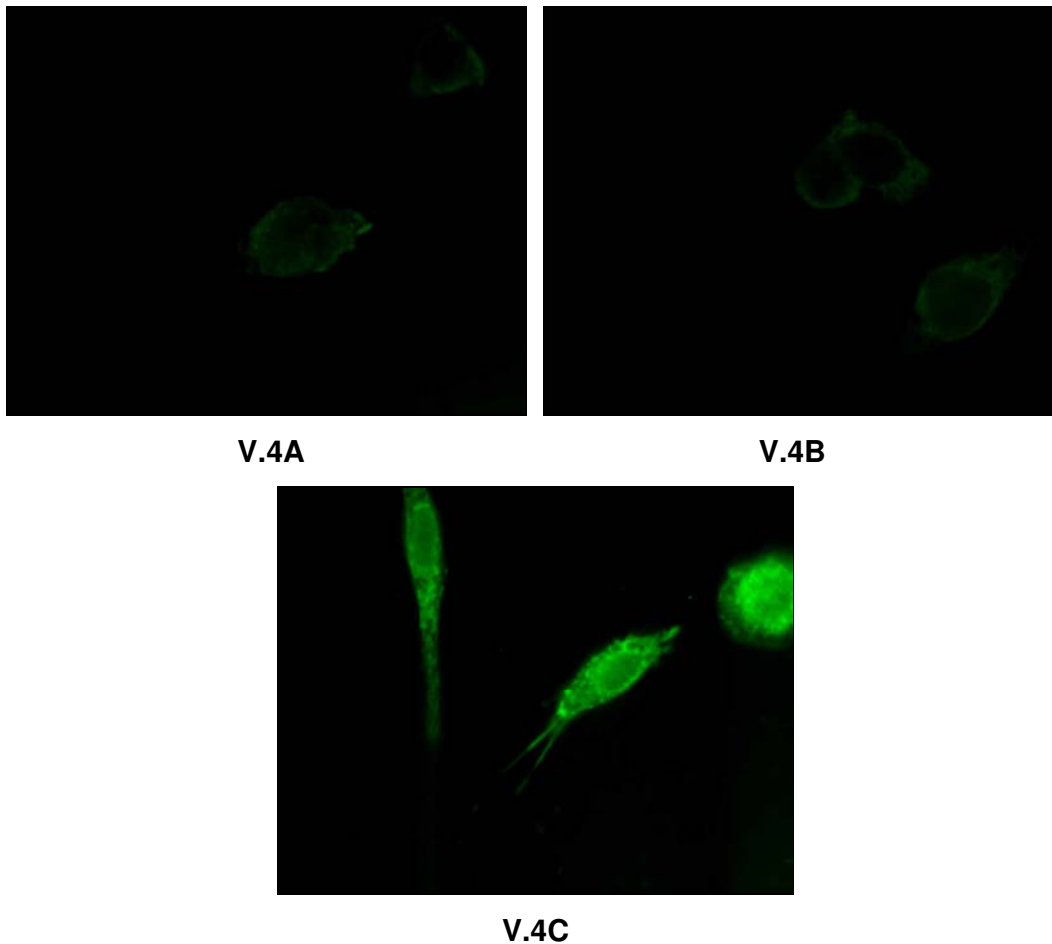
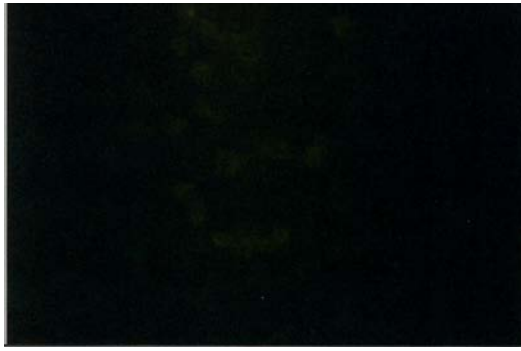
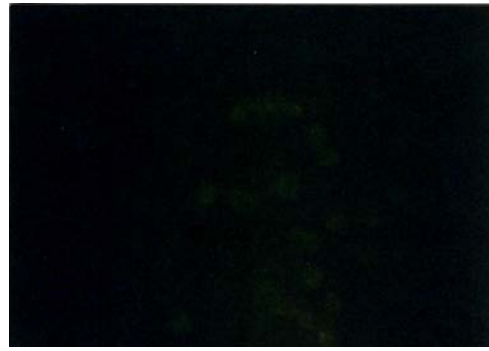


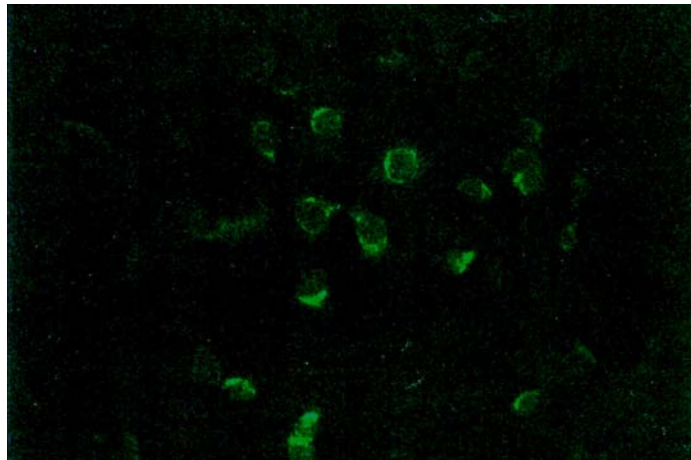
FIGURA V.4. Marcação de células da linhagem T-47D com ADL biotinizada e revelada com Estreptoavidina-FITC (aumento de 1000 x). V.4A. Controle 1: células tratadas com Estreptoavidina-FITC sem ADL; V.4B. Controle 2: células tratadas com ADL inibida por GlcNAc a 0, 2 M e, posteriormente, com Estreptoavidina-FITC; V.4C. Células tratadas com ADL biotinizada e revelada com Estreptoavidina-FITC.



**V.5A**



**V.5B**



**V.5C**

FIGURA V.5. Marcação de células da linhagem T-24 com ADL biotinizada e revelada com Estreptoavidina-FITC (aumento de 400 x). V.5A. Controle 1: células tratadas com Estreptoavidina-FITC sem ADL; V.5B. Controle 2: células tratadas com ADL inibida por GlcNAc a 0,2 M e, posteriormente, com Estreptoavidina-FITC; V.5C. Células tratadas com ADL biotinizada e revelada com Estreptoavidina-FITC.

#### V.4. DISCUSSÃO

Algumas lectinas que se encontram disponibilizadas comercialmente como WGA, PHA e a ConA são empregadas como ferramenta no estudo da estrutura de superfície celular, bem como em diagnósticos e prognósticos de determinados tipos de cânceres (Mody *et al.*, 1995). Para tanto, empregam-se métodos histoquímicos, sendo estas lectinas utilizadas como marcadores. O processo baseia-se na especificidade das lectinas em se ligar a um determinado tipo de glicoconjugado presente na superfície da célula normal ou transformada.

Este fato é de extrema relevância em patologia, pois como Faria (1999) adverte, o diagnóstico de um câncer é cito ou histológico, apesar de o mesmo poder ser sugerido clínica ou radiologicamente.

É conhecido que as células neoplásicas, em geral, apresentam mudanças estruturais na localização de determinados glicoconjugados de superfície das células determinando parte do fenótipo tumoral. Conforme Damis *et al.* (1999), durante a transformação maligna há uma supraexpressão de N-glicanos altamente ramificados e com cadeias poli-N-acetilactosamina em regiões restritas da superfície celular. Em algumas transformações malignas, como por exemplo, em gliomas de rato tipo C6 e em linfomas, ocorre o aumento das cadeias ramificadas de N-glicanos e poli N-acetilactosamina (Gal $\beta$ -1,4-GlcNAc $\beta$ -1,3-N-asparagina). Também ocorre o aumento do antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) nos glicanos de superfície em 90 % dos carcinomas humanos (Irazoqui *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2002).

As mudanças estruturais de glicoconjugados em células transformadas acabam favorecendo uma maior intensidade de marcação com lectinas e um aumento no processo de aglutinação das células com estas proteínas (Cotran

*et al.*, 1994; Sharon e Lis, 1972). Este fato deve-se, fundamentalmente, a supraexpressão de um tipo de glicoconjugado em regiões restritas da superfície celular. Assim é que algumas lectinas são rotineiramente utilizadas em histologia e em histopatologia.

Rhodes e Milton (1998) descreveram que a PNA, lectina de *Arachis hypogaea* L., é utilizada para detectar carcinomas de pulmão, mama e cólon. Conforme Thies *et al.* (2001) a HPA, lectina de *Helix pomatia*, é útil em prognóstico de neoplasias epiteliais. Colton *et al.* (1992) marcaram cultura de células do glia do córtex cerebral de rato com WGA, ConA e RCA conjugadas com biotina. Carcinoma invasivo de células escamosas do cólon uterino foi marcado por Sames *et al.* (2001) usando JFL, e Valentiner *et al.* (2002) marcaram carcinoma do epitélio do cólon uterino com RCA, GSA, LTA e UEA-1.

A ADL demonstrou ser um marcador viável para células das linhagens de câncer de cólon uterino, mama e bexiga, marcando HT-29, T-47D e T-24, respectivamente (figuras V.3 a V.5), com aspectos cito-patológicos diferenciados. A visualização de agregados fluorescentes no citoplasma das células T-47D e T-24 pode ser devido à internalização, por endocitose, de agregados de receptores da superfície celular. A marcação (reação positiva) das células destas três linhagens, com a ADL biotinizada, permite distinguí-las claramente das células transformadas de outros tecidos não marcados (reação negativa) pela lectina, ou seja, as células das outras nove linhagens utilizadas neste trabalho (tabela V.1). Deve-se ressaltar que dentre as linhagens de células não marcadas encontra-se a MCF7, de carcinoma mamário humano, do mesmo órgão que as células da linhagem T-47D, de adenocarcinoma mamário ductal humano, indicando que a ADL é capaz de distinguir tipos distintos de células de um mesmo órgão.

Estes resultados abrem perspectivas para a efetiva contribuição da ADL como uma lectina útil em estudos de transformações fisio-patológicas destas células, e das estruturas dos glicanos das células tumorais epiteliais, pois a glicosilação diferenciada de proteínas ocorre em grande intensidade nas

células malignas.

A lectina EML, obtida de *Euphorbia milii* Des Moull. Var. "Breonii", específica para Gal e GalNAc, conforme Irazoqui *et al.* (2005), também marcou células de linhagem HT-29, T-47D, mas diferentemente da ADL, a lectina EML marcou OVCAR-3 não marcada pela ADL. O fato da EML ligar-se às células HT-29 e T-47D indica que estruturas distintas do antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) reconhecida pela EML, foram as reconhecidas pela ADL. Postula-se que poderia haver o envolvimento de estrutura, contendo acetilactosamina ou composto similar, reconhecida também pela ADL. Não foi objetivo deste trabalho o estudo das estruturas dos glicoconjugados aos quais a ADL ligou-se.

A disponibilidade de novas lectinas vem ao encontro da necessidade de obter-se um número maior de sondas, sobretudo, na utilização em estudos de neoplasias (Villanueva, 20002; Herling *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Kannan *et al.*, 1993). É pertinente ressaltar que lectinas com especificidade similar a um determinado carboidrato são muito úteis nestes estudos, dado o fato de que estas proteínas podem ligar-se diferentemente a uma mesma estrutura polissacarídica, revelando peculiaridades da estrutura fina das mesmas e permitindo correlações significativas entre certos tipos de glicosilações alteradas.



## **CAPÍTULO VI**

### **SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DAS ISOFORMAS DA ADL COM ÊNFASE NA ADL-III**

---

## VI.1. INTRODUÇÃO

Inúmeras lectinas vegetais, como em WGA, PHA, ConA e RCN, apresentam cadeias polipeptídicas que são capazes de se dissociarem e se reassociarem, produzindo diferentes porcentagens de isoformas, como moléculas altamente relacionadas. A determinação da ocorrência de isoformas obedece critérios muito variados, mas encontra-se fundamentada em diferenças de características físico-química, química ou em alguma propriedade biológica que as isoformas de uma determinada lectina podem apresentar. Com certa freqüência, os autores baseiam seus estudos em diferenças que tais moléculas apresentam em função da especificidade para carboidratos, especificidade por eritrócitos de diferentes origens, em alguma propriedade biológica ou na seqüência de aminoácidos e grau de glicosilação. Nas sementes de *Abrus precatorius* L., por exemplo, ocorrem quatro isoformas, com 63 a 67 kDa, sendo que a abrina A possui atividade anticarcinogênica (Wu *et al.*, 2001; Tahirov *et al.*, 1995). Outro exemplo é o complexo de isoformas de *Trichosanthes anguina* L., que apresenta formas glicosiladas e não glicosiladas da mesma lectina (Anuradha e Bhide, 1999).

As isoformas podem ser enquadradas como sendo isolectinas ou formas moleculares múltiplas. Estes termos reportam-se à origem das isoformas. As isolectinas originam-se do polimorfismo genético e, assim, este termo é empregado com propriedade quando a heterogeneidade da origem genética estiver definida. O termo formas moleculares múltiplas é mais adequado para ser empregado nos casos em que diferentes formas de uma lectina são geradas no processo co ou pós-tradução. Calvete *et al.* (1999) esclarecem que podem ocorrer formas moleculares múltiplas em função de variantes do meio como, por exemplo, oscilações de pH, o que resultaria em uma pequena diferença na seqüência de aminoácidos e/ou na estrutura tridimensional da proteína, fato que ocasionaria as formas moleculares múltiplas. Por outro lado, as isoformas podem surgir como artefato de técnicas empregadas no próprio

processo de isolamento ou até mesmo durante migrações eletroforéticas, sendo adequado o termo formas moleculares múltiplas. Lis e Sharon (1981) assinalam que, nestes casos, pode ocorrer, por exemplo, a hidrólise do grupo amida nas cadeias laterais da proteína. A reaplicação das amostras protéicas em gel de poliacrilamida, após uma primeira migração eletroforética é utilizada para a elucidação desta questão. Com este procedimento verifica-se o comportamento das bandas protéicas obtidas por migração eletroforética, sendo que a presença de formas moleculares múltiplas é indicada quando não há repetibilidade na obtenção das mesmas.

A separação das isoformas pode ser obtida pela utilização de métodos como cromatografia de interação hidrofóbica ou pelo ponto isoelétrico (Hochleitner *et al.*, 2003). Nos últimos anos vem se utilizando, tanto para a purificação de lectinas como para a separação de isoformas, sistema HPLC com colunas preparativas em matriz de afinidade, gel filtração e troca iônica. Também é utilizado sistema de HPLC com coluna de fase reversa (coluna C<sub>18</sub>). Neste tipo de cromatografia, em alguns casos, a lectina deve ser protegida por soluções glicídicas adequadas, prevenindo interações da proteína com a matriz da coluna (Nagano *et al.* 2002; Rego *et al.*, 2002). Na separação das isoformas o uso de HPLC é útil por ser capaz de discriminar, em uma única vez, várias estruturas isoméricas, com sensível resolução e reprodutibilidade (Amano *et al.*, 2001). Utilizam-se também, e com certa freqüência, técnicas de eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida para a separação das isoformas.

Este capítulo apresenta como objetivo a separação e a determinação de características físico-químicas, químicas e de propriedades biológicas das isoformas da ADL, com ênfase na ADL-III, por ser a isoforma mais abundante.

## **VI.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **VI.2.1. Material vegetal**

O material vegetal constou de rizomas de *Arundo donax* L. var *variegata* Vilmorin, coletados na cidade de Porto Alegre/RS e identificado pelo taxonomista Sérgio Bordignon, conforme exsicata ICN 144955 depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS. O material coletado era imediatamente reduzido a pó em moinho de facas e armazenado a -18 °C.

### **VI.2.2. Reagentes químicos**

Todos os reagentes utilizados foram do tipo “pró-análise”, e a procedência de alguns produtos químicos, foi a seguinte:

Acrilamida, N,N'-metilenobisacrilamida, Comassie Brilliant Blue R-250, Sephadex G-100 e G-200 foram obtidos da Pharmacia Fine Chemical Ab. Uppsala, Suécia. Bio Gel P-100 obtida da Bio-Rad, USA.

$\beta$ -mercaptoetanol provenientes da Merck, Alemanha. Albumina bovina cristalina fração V (BSA), carboidratos e proteínas padrões eletroforéticos, PHA-L, Ficoll-Hipaque, RPMI 1640, N-acetil-D-glicosamina-Agarose foram provenientes da Sigma, Chemical Company, USA.

Dodecil Sulfato de sódio e N,N,N',N'-Tetrametilenodiamina, fornecidos pela Inlab, Intermat, Indústria e Comércio LTDA, Brasil.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e purificada no sistema MILLI Q Plus, Millipore, Bedford, USA.

### **VI.2.3. Isolamento e purificação da ADL**

O isolamento e a purificação da ADL foram obtidos conforme metodologia do capítulo II deste trabalho.

### **VI.2.4. Separação das isoformas de ADL por eletroforese preparativa (PAGE)**

A separação das isoformas da ADL foi obtida por eletroforese nativa preparativa (PAGE) em placa de 20 x 20 cm com gel de poliacrilamida a 10 %, em solução tampão Tris-HCl 0,375 M, pH 8,5 tomando por base o método de Laemmli (1970) sem a presença de SDS e de redutores. A lectina, purificada por coluna de estroma-poliacrilamida (1mg), foi dissolvida em 100 µl de solução tampão Tris-HCl, 0,07 M, pH 8,5, contendo glicerol a 10 % e de azul de bromofenol a 0,04 % e aplicada em toda a extensão de um único poço no gel com 15 cm de largura.

A eletroforese foi realizada a 100 volts, 20 mA, durante 5 h, à temperatura ambiente de  $20 \pm 1$  °C, e o tampão de cuba foi constituído de solução tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 8,5, contendo glicina 0,192 M.

Para a visualização das bandas correspondentes às isoformas separadas pela eletroforese, uma faixa de 1 cm de cada lado do gel foi removida e corada com solução de Comassie Blue R-250 a 0,2 % em ácido acético: metanol: água purificada (10: 50: 40), servindo como controle para a localização das bandas de cada isoforma.

A porção do gel, correspondente a cada isoforma, foi recortada, removida e triturada separadamente em água purificada, num volume 3 vezes o seu. Em seguida o material foi centrifugado durante 10 min, a 15000 g, 0 °C. O sedimento da centrifugação foi reextraído por mais 2 vezes com o mesmo volume de água purificada e os sobrenadantes respectivos foram reunidos,

dialisados contra água purificada, concentrados à vácuo (speed-vac) e armazenados a -18°C até o momento de uso.

O rendimento do processo foi analisado a partir do perfil densitométrico das bandas coradas e por dosagem protéica, pelo método de Lowry (1951), de cada uma das isoformas recuperadas. O grau de pureza das isoformas de ADL foi verificado com a proteína nativa, em gel de poliacrilamida PAGE a 11 %, pH 8,5, e por eletroforese SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras ou não.

#### **VI.2.5. Determinação de características físico-químicas e químicas das isoformas da ADL**

Os experimentos referentes à obtenção do espectro de absorção, efeito de cátions divalentes, efeito de agentes desnaturantes e redutores, efeito de enzimas proteolíticas foram realizados para todas as isoformas da ADL conforme metodologia do capítulo II. A massa molecular das isoformas foi determinada por espectrometria de massa e por SDS-PAGE.

A determinação do efeito da temperatura e do pH para a ADL-III foi realizada conforme metodologia do capítulo II. Para a ADL-III também foi possível fazer a determinação centesimal de aminoácidos constituintes e o seqüenciamento da porção N-terminal de suas subunidades.

##### **➤ Determinação da massa molecular por espectrometria de massa**

A massa molecular de cada isoforma e suas respectivas cadeias polipeptídicas foi determinada por espectrometria de massa. Para tanto, cada isoforma (10 µg) foi previamente alquilada, com 100 µl de cloridrato de guanidina 6 M em bicarbonato de amônio 0,1 M, e reduzidas, com 50 µl de DTT 1 M em bicarbonato de amônio 0,1 M, por 50 min a 50 °C, seguido por

mais 15 min, a 50 °C, com 100 µl de iodocetamida 1 M em bicarbonato de amônio 0,1 M.

As amostras assim tratadas foram dialisadas contra água purificada e liofilizada. Um total de 2 µg de cada isoforma foi dissolvida em água nanopura, misturadas em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (1: 3), depositada em uma placa do tipo Anchorchip com 600 mm e deixada secar à temperatura ambiente.

Os componentes moleculares tiveram as massas moleculares respectivas determinadas, em espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF UltraFlex II (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando calibração externa sob modo de operação linear (positivo).

#### ➤ **Seqüenciamento da porção N-terminal**

O N-terminal de cada cadeia polipeptídica da ADL-III foi determinado pelo método de degradação de Edman e Begg (1967).

A ADL-III foi submetida à eletroforese, conforme Laemmli (1970), em gel de poliacrilamida a 13 %, pH 8,6, sob condições redutoras, sendo a separação eletroforética realizada a 15 mA em sistema de miniplacas Hoefer SE 250. Após a migração eletroforética, foi realizada a eletrotransferência das cadeias polipeptídicas separadas para a membrana de PVDF, usando uma corrente de 400 mA, por 1 h, a 10 °C. O tampão de transferência constou de uma solução aquosa de 3-ciclohexil-amino-1-ácido propanosulfônico (CAPS) e metanol a 10 %, pH 11. Ao final da transferência, a membrana foi corada com Comassie Blue R-250, durante 2 min. Por fim as bandas protéicas obtidas na membrana de PVDF foram recortadas e transferidas para o seqüenciador modelo 477 A da Biosystem, que utiliza, para a identificação dos PTH-aminoácidos, um sistema de HPLC modelo 120 A, também da Biosystem. O equipamento possui um

microprocessador que permite a obtenção de seqüências automáticas com alta sensibilidade, entre 10-500 picomoles de proteína.

Os aminoácidos fenilidantoína (PTH) foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com um padrão de PTH-aminoácidos.

Este experimento foi realizado pelo Dr. José Rosa, do Laboratório de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, sob chefia do Dr. Green.

#### **VI.2.6. Determinação de propriedades biológicas das isoformas da ADL**

A especificidade hemaglutinante e para carboidratos e glicoproteínas foi determinada para todas as isoformas da ADL, conforme metodologia do capítulo II. A atividade mitogênica foi possível determinar para a ADL-III, conforme metodologia do capítulo III.



## **VI.3. RESULTADOS**

### **VI.3.1. Separação das isoformas da ADL**

O protocolo de separação das isoformas da ADL constou de uma eletroforese (PAGE) preparativa, em gel de poliacrilamina a 10 %, pH 8,5, seguida de eluição com PBS das isoformas a partir do gel macerado. Pela eletroforese seis bandas protéicas distintas foram separadas e visualizadas a olho nu após a coloração do gel de poliacrilamida com azul de Comassie (fig. VI.1). As seis bandas apresentaram intensidades de cor diferente, evidenciando distintas concentrações protéicas como foi verificado por densitometria do eletroferograma conforme figura VI.2. e dosagem de proteínas. As isoformas III e IV apresentaram, respectivamente, as maiores concentrações protéicas. Uma sétima banda, não visível a olho nu, foi detectada pela densitometria do eletroferograma, correspondendo a um percentual de 3,16 % do total das isoformas. Devido à baixa concentração, a isoforma VII não foi analisada posteriormente. Do total de 1 mg de ADL, aplicado no gel de poliacrilamida, houve a recuperação de 884,88 µg de proteína nas seis bandas protéicas eluídas (tabela VI.1).

A verificação da pureza das isoformas separadas por este protocolo foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas nativas (PAGE) e por SDS-PAGE na presença ou não de redutores (figuras VI.3 a VI.5). A figura VI.3 mostra que as isoformas foram separadas eficientemente e portanto, passíveis de serem analisadas.

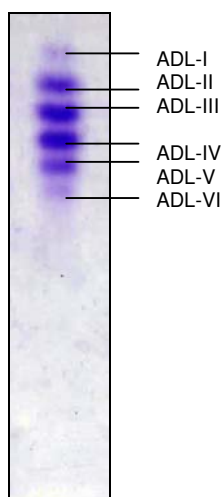


Fig. VI.1

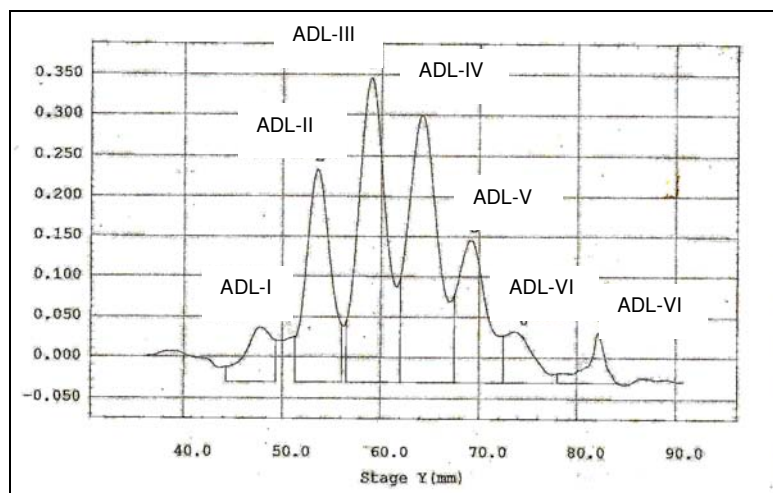


Fig. VI.2

FIGURA VI.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10 %, pH 8,5, evidenciando seis bandas coradas com azul de Comassie correspondentes às isoformas de ADL.

FIGURA VI.2. Perfil densitométrico obtido a partir da eletroforese, em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10 %, pH 8,5, com a amostra da ADL.

TABELA VI.1. Porcentagem relativa das isoformas da ADL, separadas por PAGE a 10 %, pH 8,5, obtida por densitometria e a quantidade recuperada a partir de 1 mg de ADL.

Isoformas Da ADL	Porcentagem relativa (%)	Quantidade de proteína recuperada a partir de 1 mg de ADL submetida a PAGE, pH 8,5. (µg)
I	5,13 ± 1,11	44,21
II	17,45 ± 1,08	164,49
III	28,85 ± 1,38	263,24
IV	27,04 ± 1,17	244,73
V	13,62 ± 1,54	126,65
VI	4,75 ± 1,04	41,56
VII	3,16 ± 1,02	---
<b>Rendimento</b>	100	884,88

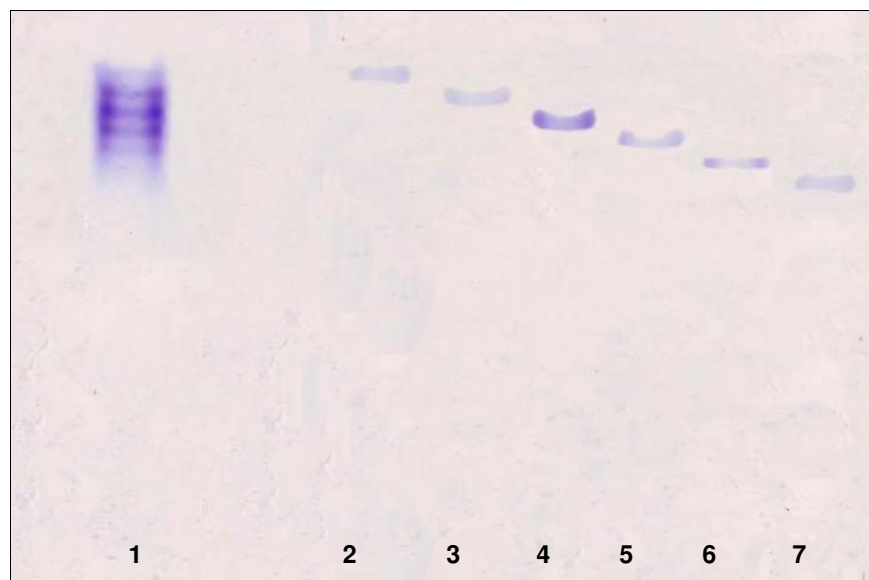


FIGURA VI.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 11 %, pH 8,3, das isoformas da ADL. Legenda: 1. ADL (4  $\mu$ g); 2. ADL-1 (4  $\mu$ g); 3. ADL-2 (4  $\mu$ g); 4. ADL-3 (4  $\mu$ g); 5. ADL-4 (4  $\mu$ g); 6. ADL-5 (4  $\mu$ g); 7. ADL-6 (4  $\mu$ g). sistema mini-gel.

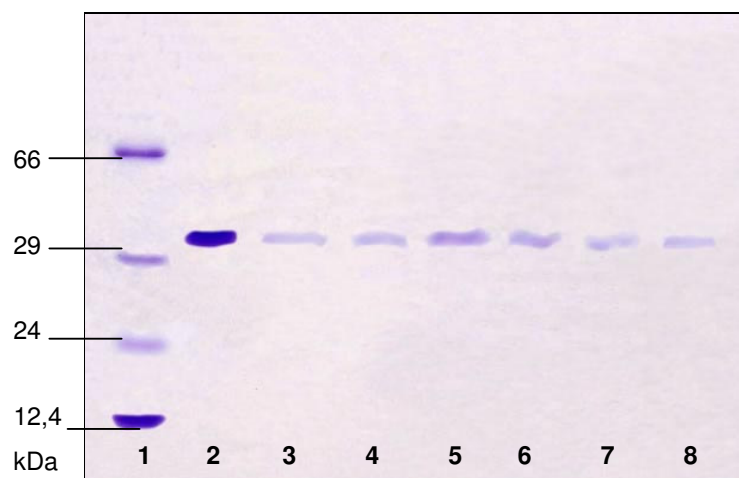


FIGURA VI.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3, da ADL e das isoformas da ADL não reduzidas e não desnaturadas com calor. Legenda: 1. Padrões protéicos: albumina bovina (66 kDa); anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e citocromo C (12,4 kDa); 2. ADL (6  $\mu$ g); 3. ADL-1 (4  $\mu$ g); 4. ADL-2 (4  $\mu$ g); 5. ADL-3 (4  $\mu$ g); 6. ADL-4 (4  $\mu$ g); 7. ADL-5 (4  $\mu$ g); 8. ADL-6 (4  $\mu$ g). sistema mini-gel.

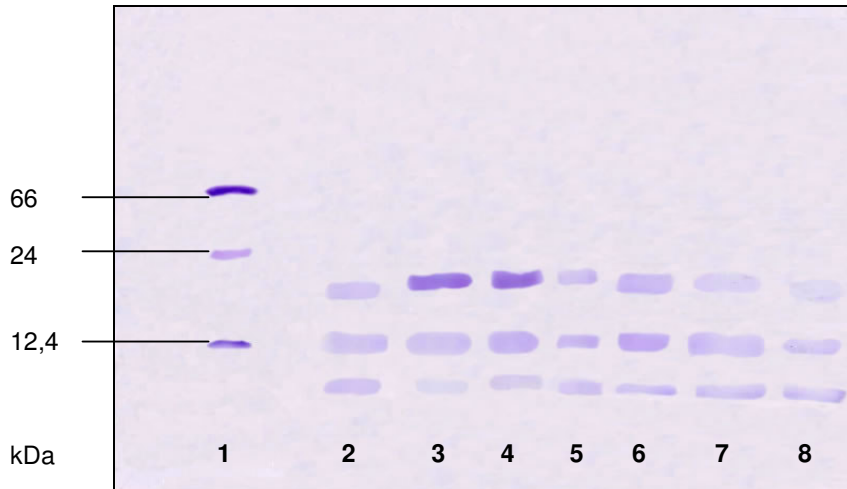


FIGURA VI.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 13 %, pH 8,3, da ADL e suas isoformas reduzidas com  $\beta$ -mercaptoetanol. Legenda: Legenda: 1. Padrões: albumina bovina (66 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e citocromo C (12,4 kDa); 2. ADL (4  $\mu$ g); 3. ADL-1 (4  $\mu$ g); 4. ADL-2 (4  $\mu$ g); 5. ADL-3 (4  $\mu$ g); 6. ADL-4 (4  $\mu$ g); 7. ADL-5 (4  $\mu$ g); 8. ADL-6 (4  $\mu$ g).

### VI.3.2. DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS DAS ISOFORMAS

#### VI.3.2.1. Massa molecular

A determinação da massa molecular das três cadeias polipeptídicas de cada isoforma da ADL, obtida por espectrometria de massa, está registrada na tabela VI.2 e figuras VI.6 a VI.11. Os resultados mostraram pequenas variações na massa molecular das respectivas cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), das distintas isoformas. A massa molecular das isoformas, calculadas a partir da soma das massas moleculares das cadeias polipeptídicas constituintes, foram muito próximas. A isoforma I registrou a menor massa molecular com 40,123 kDa, e a isoforma IV, a maior massa molecular de valor com 40,990 kDa, conforme tabela VI.2.

A figura VI.4 mostra que, por SDS-PAGE realizada em condições de não desnaturação por calor e não redutora, a massa molecular das seis isoformas da ADL são similares ou muito próximas a da ADL purificada por coluna de afinidade ou seja de 442,4, estimada no capítulo II. Também, as massas moleculares das três bandas protéicas, respectivas das seis isoformas da ADL, em condições desnaturantes e redutoras (figura VI.5) são similares ou muito próximas as da ADL purificada por coluna de afinidade e estimadas no capítulo II, em 19,0, 14,2 e 8,7, respectivamente (cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Pelo somatório das massas moleculares das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  a massa molecular da ADL foi calculada como sendo 41,9.

TABELA VI.2. Massa molecular total e das cadeias polipeptídicas da ADL determinada por espectrometria de massa.

Isoformas De ADL	Massa Molecular cadeia $\alpha$ (kDa)	Massa molecular Cadeia $\beta$ (kDa)	Massa molecular Cadeia $\gamma$ (kDa)	Massa molecular Total (kDa)
ADL-I	18,707	12,982	8,434	40,123
ADL-II	18,920	13,134	8,584	40,638
ADL-III	19,056	13,187	8,644	40,887
ADL-IV	19,045	13,270	8,675	40,990
ADL-V	18,973	13,197	8,700	40,870
ADL-VI	18,794	13,044	8,429	40,267

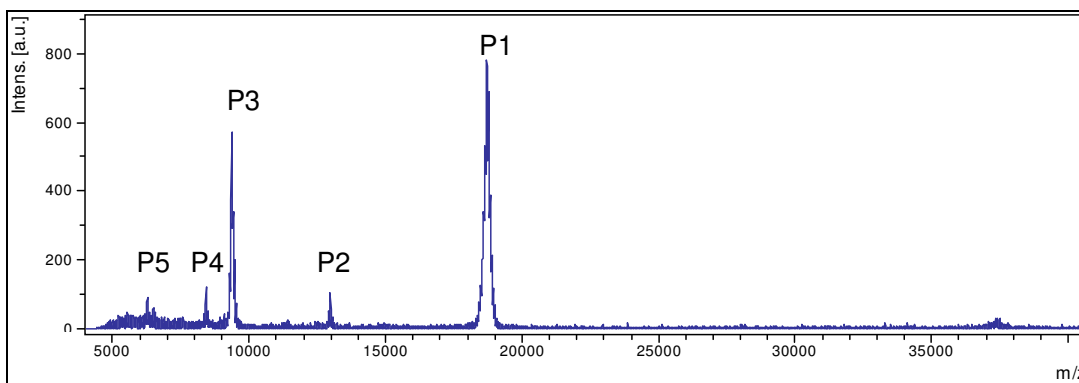


FIGURA VI.6. Espectro de massa molecular da ADL-I obtido por TOF-MALDI. Legenda: P1: 18707 Da; P2: 12982 Da; P3: 9358 Da; P4: 8434 Da; P5: 6490 Da.

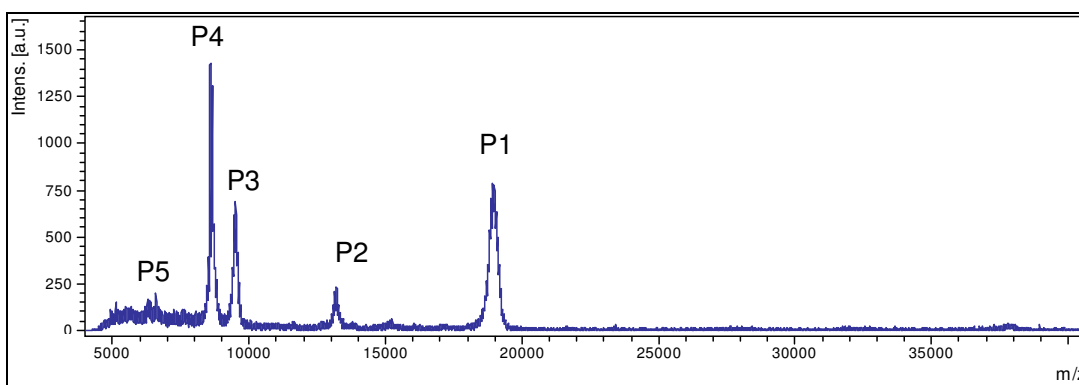


FIGURA VI.7. Espectro de massa molecular da ADL-II obtido por TOF-MALDI. Legenda: P1: 18920 Da; P2: 13134 Da; P3: 9495 Da; P4: 8584 Da; P5: 6566 Da.

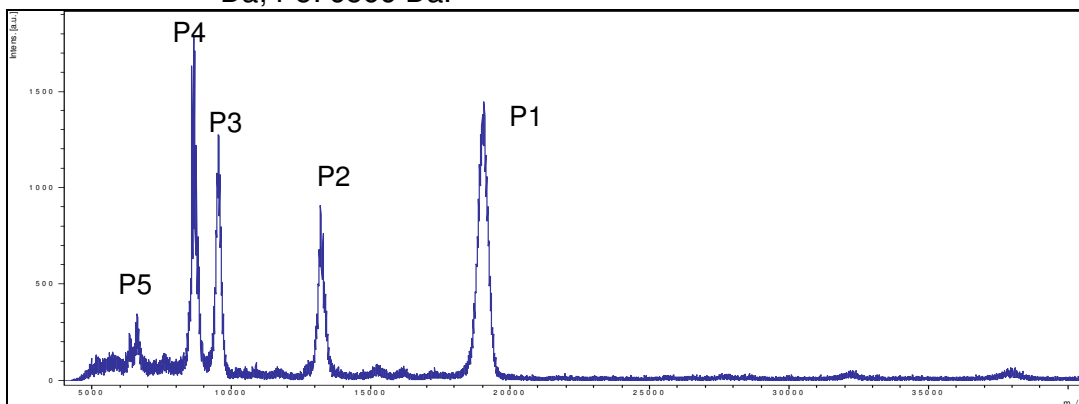


FIGURA VI.8. Espectro da massa molecular da ADL-III obtido por TOF-MALDI. Legenda: P1: 19056 Da; P2: 13187 Da; P3: 9531 Da; P4: 8644 Da; P5: 6598 Da.

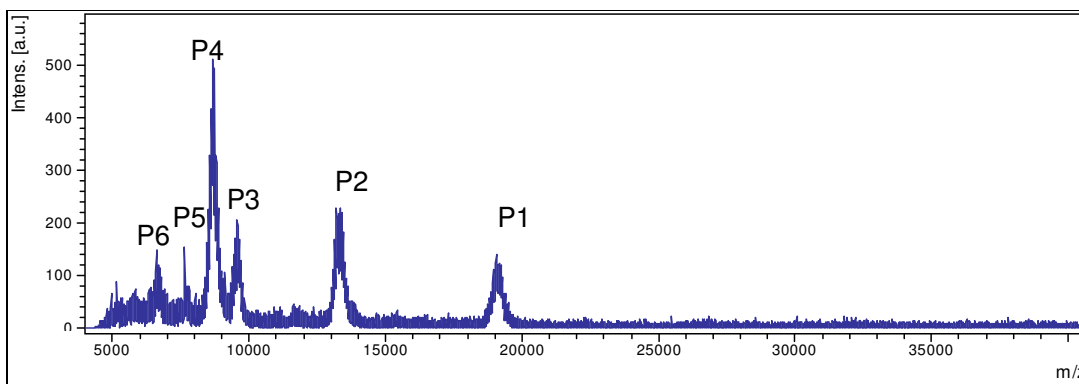


FIGURA VI.9. Espectro da massa molecular da ADL-IV obtido por TOF-MALDI. Legenda: P1: 19045 Da; P2: 13270 Da; P3: 9538 Da; P4: 8675 Da; P5: 6633 Da.

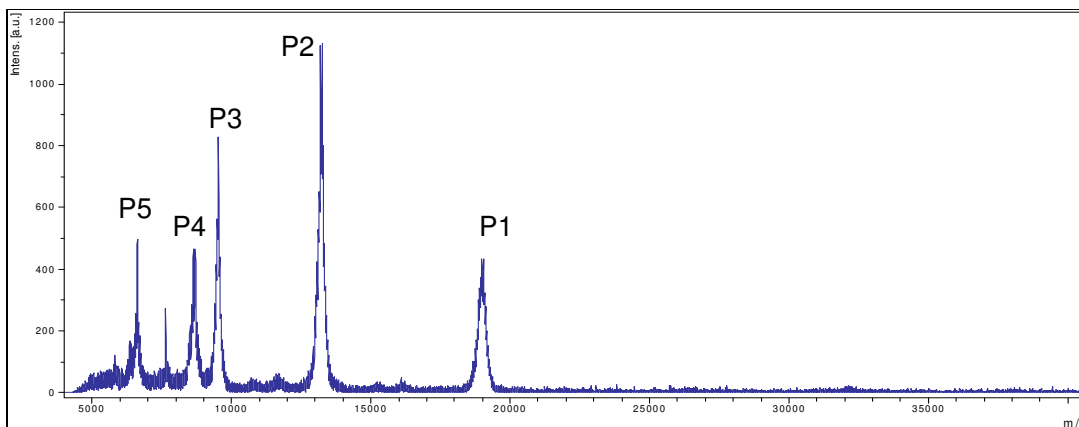


FIGURA VI.10. Espectro da massa molecular da ADL-V obtido por TOF-MALDI. Legenda: P1: 18973 Da; P2: 13254 Da; P3: 9526 Da; P4: 8700 Da; P5: 6626 Da.

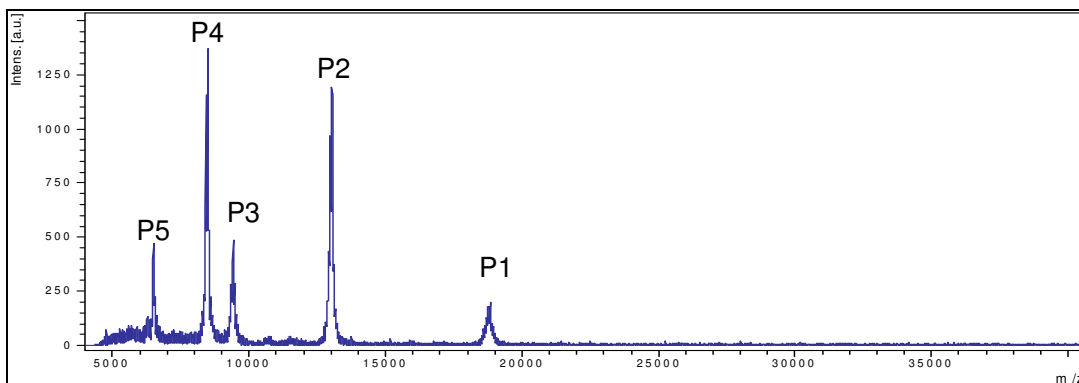


FIGURA VI.11. Espectro de massa molecular da ADL-VI obtido por TOF-MALDI. Legenda: P1: 18794 Da; P2: 13044 Da; P3: 9420 Da; P4: 8429 Da; P5: 6523 Da.

### VI.3.2.2. Espectro de absorção

As isoformas da ADL apresentaram espectro de absorção no UV similares, com o pico de absorvância máxima próximo a 280 nm. Somente a isoforma V apresentou absorvância máxima (276 nm), como a ADL. A menor absorvância máxima foi apresentada pela isoforma I (274 nm) e a absorvância máxima foi obtida com a isoforma IV (278 nm), conforme tabela VI.3.

TABELA VI.3. Pico máximo de absorvância das isoformas da ADL obtida por leitura em espectrofotômetro entre 200 – 400 nm.

Amostras protéicas	Pico máximo de absorvância (nm)
ADL-I	274
ADL-II	275
ADL-III	277
ADL-IV	278
ADL-V	276
ADL-VI	275

### VI.3.2.3. Coeficiente de extinção

O coeficiente de extinção das isoformas da ADL foi obtido por leitura em espectrofotômetro a 280 nm, e com o valor obtido foi calculado o coeficiente de extinção molar (tabela VI.4).

TABELA VI.4. Coeficiente de extinção e de extinção molar das isoformas da ADL.

Amostras protéicas	Coeficiente de extinção	Coeficiente de extinção molar
	$\epsilon_{cm}^{1\%}$	( $cm^2/Mol$ )
ADL-I	7,370	$0,2959 \times 10^5$
ADL-II	26,550	$1,0792 \times 10^5$
ADL-III	8,930	$0,3659 \times 10^5$
ADL-IV	11,253	$0,4630 \times 10^5$
ADL-V	21,565	$0,8838 \times 10^5$
ADL-VI	25,450	$1,0262 \times 10^5$



#### VI.3.2.4. Aminoácidos constituintes da ADL-III

A composição centesimal de aminoácidos da ADL-III (tabela VI.5) mostram um percentual elevado de glicina (27,636 %), seguido de ácido glutâmico/glutamina (11,86 %), lisina (7,88 %) e ácido aspártico/asparagina (7,85 %). Destaca-se também a presença de cisteína (5,6), na constituição desta lectina. Isoleucina, histidina e metionina participam com menos de 1 % da constituição da mesma.

TABELA VI.5. Composição centesimal de aminoácidos da ADL-III.

Aminoácidos	mg % ADL-III
Asp/Asn	7,85
Glu/Gln	11,86
Ser	6,17
Gly	27,66
His	0,00
Arg	3,59
Thr	2,19
Ala	5,29
Pro	6,02
Tyr	5,88
Val	1,62
Met	0,00
Cys	5,60
Ile	0,00
Leu	5,25
Phe	3,14
Lys	7,88
Trp	Não determinado

### VI.3.2.5. Seqüenciamento da porção N-terminal da ADL-III

Os resultados do seqüenciamento da porção N-terminal da ADL-III estão apresentados na tabela VI.6 e evidenciam a presença de triptofano na cadeia  $\alpha$  e  $\beta$  desta isoforma.

TABELA VI.6. Seqüenciamento da porção N-terminal da ADL-III.

Aminoácidos	Cadeia $\alpha$	Cadeia $\beta$	Cadeia $\gamma$
1	Tyr	Glu	Ala
2	Gln	Leu	Glu
3	Thr	Pro	Met
4	Pro	Gly	Gln
5	Lys	Gly	Pro
6	Asn	Ser	Gln
7	Gly	Leu	Gln
8	Gly	Asn	Ser
9	Tyr	Trp	Gly
10	Ala	Tyr	Ile
11	Ala	Leu	Arg
12	Trp	Leu	Gln
13	Pro	Trp	Gly
14	Pro	Lys	Phe
15	Asn	Lys	Pro

### VI.3.2.6. ESTABILIDADE DAS ISOFORMAS DA ADL FRENTE A DIFERENTES FATORES

#### VI.3.2.6.1. Efeito da temperatura na ADL-III

O efeito da variação da temperatura sobre a atividade lectínica da ADL e da ADL-III foi similar e está registrado na tabela VI.7. Tanto a ADL descrita no capítulo II como a ADL-III mostraram-se estáveis em uma ampla faixa de temperatura. Quanto à atividade lectínica, somente após 60 min em banho de água a 70 °C, ocorreu um decréscimo na atividade hemaglutinante tanto da ADL como da ADL-III, e apenas à temperatura de 95 °C, durante 10 min, não foi mais registrada atividade hemaglutinante.

TABELA VI.7. Efeito da variação de temperatura na atividade hemaglutinante da ADL-III.

Temperatura ( ° C)	Atividade hemaglutinante (UH/ml)				
	10 min	30 min	60 min	90 min	120 min
0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
10	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
20	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
30	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
40	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
50	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
60	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
70	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
80	640 ± 0,0	320 ± 0,0	160 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
90	160 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0
95	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0	0 ± 0,0

### VI.3.2.6.2. Efeito do pH na ADL-III

A atividade hemaglutinante da ADL-III mostrou-se estável em uma ampla faixa de pH, conforme pode ser verificado na tabela VI.8. Em pH 3,0 a 9,0, a atividade hemaglutinante manteve-se constante por até duas h. Houve uma redução considerável da atividade hemaglutinante da ADL-III em pHs superiores a 9. Em pHs 10 a 12, a ADL-III manteve atividade hemaglutinante por até 1 h. A atividade hemaglutinante manteve-se constante após 6 h de exposição da lectina a pHs 5 a 8. Em nenhum intervalo de tempo ou em pHs avaliados a ADL-III perdeu totalmente sua atividade hemaglutinante.

TABELA VI.8. Efeito da variação do pH na atividade hemaglutinante da ADL-III.

PH	Atividade hemaglutinante (UH/ml)		
	1 h	2 h	6 h
2	640 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
3	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0
4	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0
5	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
6	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
7	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
8	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
9	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	640 ± 0,0
10	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
11	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0
12	2560 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0

### VI.3.2.7. Efeito de agentes desnaturantes e redutores

Ficou demonstrado que as isoformas da ADL apresentaram comportamento similar frente aos diferentes agentes desnaturantes (uréia 8,0 M e SDS a 1 %), com perda total da atividade lectínica. Em presença de uréia 4,0 M verificou-se abrupta diminuição na atividade hemaglutinante para as isoformas da ADL. Houve diminuição da atividade hemaglutinante das amostras lectínicas, em presença de agentes redutores ( $\beta$ -mercaptoetanol 5 - 20 mM e DTT 5-20 mM), com uma diminuição de 62,5 % na atividade hemaglutinante das amostras lectínicas, o que pode ser verificado na tabela VI.9.

TABELA VI.9. Efeito de diferentes agentes desnaturantes e redutores na atividade lectínica das isoformas da ADL.

Amostras protéicas	Atividade hemaglutinante (UH/ml)					
	ADL-I	ADL-II	ADL-III	ADL-IV	ADL-V	ADL-VI
Controle	2560 $\pm$ 0,0	2560 $\pm$ 0,0	2560 $\pm$ 0,0	2560 $\pm$ 0,0	2560 $\pm$ 0,0	2560 $\pm$ 0,0
SDS 1 %	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Uréia 4 M	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
Uréia 8 M	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
DTT 5 mM	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
DTT 10 mM	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
DTT 20 mM	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
$\beta$ -mercaptoetanol 5 mM	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
$\beta$ -mercaptoetanol 10 mM	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0
$\beta$ -mercaptoetanol 20 mM	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0	160 $\pm$ 0,0

#### VI.3.2.6.4. Efeito de enzimas proteolíticas

A estabilidade das isoformas da ADL frente à ação proteolítica da tripsina, pepsina ou quimiotripsina está registrado na tabela VI.10. Os resultados mostraram que, nas condições experimentais testadas, as amostras lectínicas não perderam atividade hemaglutinante na presença destas enzimas.

TABELA VI.10. Efeito de enzimas proteolíticas sobre a atividade lectínica das isoformas da ADL.

Amostra protéica	Atividade hemaglutinante (UH/ml)			
	controle	Pepsina	Quimotripsina	Tripsina
ADL-I	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
ADL-II	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
ADL-III	2560 ± 0,0	2560,0 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
ADL-IV	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
ADL-V	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
ADL-VI	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0

### VI.3.3. DETERMINAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

#### VI.3.3.1. Efeito do EDTA e de cátions divalentes sobre a atividade hemaglutinante

Foi utilizado EDTA como agente quelante para verificar se as isoformas da ADL necessitam ou não de cátions divalentes no desempenho de suas bioatividades, o que sinalizaria, mesmo que de forma inespecífica, a necessidade destes íons para a estabilidade das mesmas. Também foram utilizados íons  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$  para verificar se os mesmos interferem na atividade das amostras lectínicas testadas. Os resultados mostraram que o EDTA não exerceu efeito sobre a atividade hemaglutinante das amostras testadas e que a adição de íons  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ , em presença ou não de EDTA, não aumentou a atividade dos mesmos, conforme a tabela VI.11.

TABELA VI.11. Efeito de diferentes cátions divalentes na atividade lectínica das isoformas da ADL.

Amostra protéica	Atividade hemaglutinante (UH/ml)					
	ADL-I	ADL-II	ADL-III	ADL-IV	ADL-V	ADL-VI
Controle	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA 50 mM	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA 250 mM	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560,0 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
$\text{Ca}^{++}$ 40 mM	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
$\text{Mg}^{++}$ 40 mM	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
$\text{Mn}^{++}$ 40 mM	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Ca}^{++}$ 50 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Ca}^{++}$ 250 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Mg}^{++}$ 50 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560,0 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Mg}^{++}$ 250 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Mg}^{++}$ 50 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Mg}^{++}$ 250 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Mn}^{++}$ 50 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560,0 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0
EDTA+ $\text{Mn}^{++}$ 250 + 40 (mM)	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0	2560 ± 0,0

### VI.3.3.2. Especificidade eritrocitária

A especificidade eritrocitária, determinada pela atividade hemaglutinante das isoformas da ADL frente a suspensões de eritrócitos humanos (sistema ABO) e de diferentes animais, está registrada na tabela VI.12. As amostras lectínicas das diferentes isoformas aglutinaram, com intensidades distintas entre si. Todas as isoformas aglutinaram com maior intensidade eritrócitos de coelho quando comparadas a aglutinação de eritrócitos de humanos pertencentes aos grupos sanguíneos A/B/AB e de rato. A ADL V, VI e VII não aglutinaram eritrócitos de rato.

TABELA VI.12. Atividade hemaglutinante das isoformas da ADL sobre diferentes eritrócitos.

Eritrócitos	Atividade hemaglutinante (UH/ml)						
	ADL-I	ADL-II	ADL-III	ADL-IV	ADL-V	ADL-VI	ADL-VII
<b>Boi</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Cabra</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Cachorro</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Camundongo</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Cavalo</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Coelho</b>	1280±0,0	5124±0,0	2560±0,0	2560±0,0	2560±0,0	2560±0,0	2560±0,0
<b>Galinha</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Ovelha</b>	---	---	---	---	---	---	---
<b>Rato</b>	160 ± 0,0	160 ± 0,0	80 ± 0,0	80 ± 0,0	---	---	---
<b>Humano A</b>	80 ± 0,0	320 ± 0,0	160 ± 0,0	80 ± 0,0	160 ± 0,0	160 ± 0,0	160 ± 0,0
<b>Humano B</b>	80 ± 0,0	320 ± 0,0	160 ± 0,0	80 ± 0,0	160 ± 0,0	160 ± 0,0	160 ± 0,0
<b>Humano AB</b>	160 ± 0,0	640 ± 0,0	640 ± 0,0	160 ± 0,0	320 ± 0,0	320 ± 0,0	320 ± 0,0
<b>Humano O</b>	---	---	---	---	---	---	---



### VI.3.3.3. Especificidade a carboidratos e glicoproteínas

A especificidade das isoformas da ADL para carboidratos e glicoproteínas foi determinada pela avaliação da atividade hemaglutinante dos mesmos em presença de açúcares e glicoproteínas, face a eritrócitos nativos de coelho a 2 %. Os resultados obtidos encontram-se na tabela VI.13.

Os resultados mostram que as isoformas da ADL são todas inibidas por GlcNAc, bem como pelos seus derivados oligossacarídicos, com distintas intensidades. Com o aumento do número de resíduos de GlcNAc no oligossacarídeo a inibição da atividade hemaglutinante também aumenta, indicada pela diminuição da concentração do inibidor necessário para produzir o efeito. Apenas a ADL-IV foi inibida por alta concentração de fetuína e asialofetuína. À exceção da ADL-I, todas as isoformas foram inibidas por ManNAC. Conforme a tabela VI.13, a concentração mínima necessária dos inibidores para causar o efeito variou para as distintas isoformas.

A ovalbumina não inibiu a hemaglutinação de todas as isoformas, assim como os carboidratos D-glicose, D-manose, D-galactose, L-fucose, L-ramnose, ácido glicurônico, 2-desoxi-D-glicose, D-glicosamina, D-galactosamina, D-arabinose, L-arabinose, D-xilose, D-lixose, D-desoxiribose, Me- $\beta$ -galactosideo, Me- $\alpha$ -galactosideo, BZL- $\alpha$ -GalNAc, P-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosideo, PhL- $\alpha$ -GalNAc, sacarose,  $\beta$ -D-lactose, D-maltose,  $\alpha$ -(D)-melibiose, D-trealose L-sorbose, lactose, rafinose, D-celobiose, dextrano, glicose-1-fosfato e glicose-6-fosfato.

TABELA VI.13. Efeito de carboidratos e glicoproteínas sobre a atividade hemaglutinante das isoformas da ADL frente a eritrócitos nativos de coelho a 2 %.

Carboidratos e glicoproteínas	Concentração para 50% de inibição (mM)					
	ADL-I	ADL-II	ADL-III	ADL-IV	ADL-V	ADL-VI
N-acetil-D-manosamina	-----	25,000	25,000	100,000	100,000	100,000
N-acetil-D-glicosamina	6,250	12,500	3,120	12,500	12,500	6,250
N, N`diacetilquitobiose	0,500	0,500	0,125	0,125	0,250	0,500
N, N',N``diacetilquitotriose	0,200	0,200	0,050	0,100	0,100	0,200
N,N',N'',N``tetraacetilquitotetraose	0,025	0,025	0,006	0,0125	0,0125	0,025
Quitina*	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Fetuína*	-----	-----	-----	1,000	-----	1,000
Asialofetuína*	-----	-----	-----	1,000	-----	-----

Legenda: \* concentração em mg %.

#### VI.3.3.4. Atividade mitogênica da ADL-III

A ADL-III apresentou atividade mitogênica significativa para células mononucleares do sangue periférico humano de maneira dose não dependente. Nas diferentes concentrações utilizadas da ADL-III, os resultados apresentaram valores próximos, tendo havido maior estimulação na concentração de 10 µg/ml, conforme figura VI.12. Nesta concentração, a resposta foi próxima à obtida com fitohemaglutinina mitogênica de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), usada neste ensaio como controle positivo. Na presença de GlcNAc, açúcar inibidor da AD-III, mostrou um comportamento anômalo (figura VI.12).

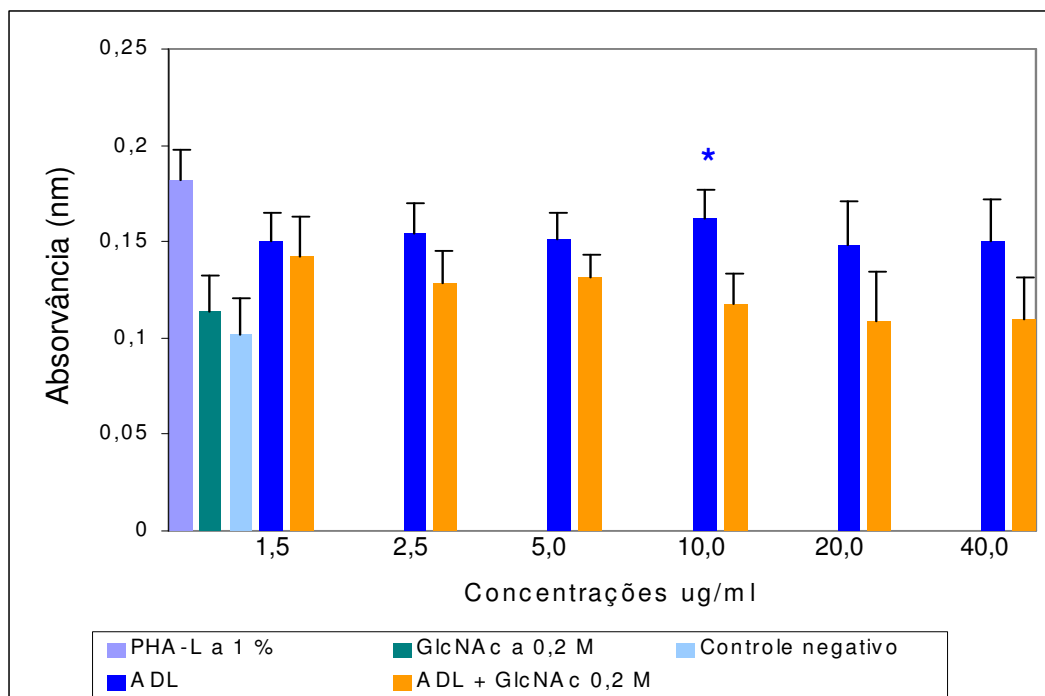


FIGURA VI.12. Atividade mitogênica da ADL-III sobre células mononucleares do sangue periférico humano *in vitro*. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $P < 0,05$  comparado com o controle negativo (ANOVA seguido de teste de Dunett).

#### VI.4. DISCUSSÃO

Várias espécies vegetais apresentam lectinas com número variado de isoformas. *Cratylia mollis* Mart., possui quatro isoformas isoladas e purificadas (Correia, *et al.*, 1995). *Sambucus nigra* L. apresenta três isoformas (Juan, 2004). *Artocarpus lakoocha* Roxb. possui duas isoformas (Wongkham *et al.*, 1995) e a abrina apresenta quatro isoformas (Wu *et al.*, 2001). Neste trabalho, o único processo eficiente empregado na separação das sete isoformas da ADL foi a eletroforese preparativa (PAGE), em gel de poliacrilamida a 10 % e pH de 8,5. Este processo é bastante trabalhoso, contudo foi eficiente, tendo-se conseguido uma recuperação elevada equivalente a 88 % do material aplicado (tabela VI.1).

Kaur *et al.* (2005) relataram a presença de três isolectinas, na lectina de *Arundo donax* por eles isolada, nos géis de PAGE, pH 8,5. Neste trabalho, verificou-se um maior número de isoformas (sete), como já foi discutido no capítulo II desta tese. Este número maior de isoformas pode ser atribuído ao fato de Kaur *et al.* (2005) terem usado como matéria-prima para seus estudos uma fração protéica obtida por precipitação com sulfato de amônio 20-40 % de saturação, que apresentava máxima atividade lectínica, desprezando as demais frações. No presente trabalho, utilizou-se o extrato bruto protéico para a purificação. Também deve ser frisado que apesar de ter-se trabalhado com a mesma espécie vegetal, a variação obtida com o número de isoformas pode ter ocorrido devido à variedade botânica da planta que se usou nos trabalhos. Apesar de Kaur *et al.* (2005) não apontarem a variedade de *Arundo donax* que utilizaram em seus trabalhos, esta questão não pode ser descartada. Neste sentido, é sabido que, por exemplo, as variedades distintas de *Phaseolus vulgaris* L. apresentam diferenças na constituição e propriedade, inclusive de toxicidade, de suas lectinas (Roitt, 2003; Saul *et al.*, 2000; Weder *et al.*, 1997; Carvalho, 1990).

A massa molecular das cadeias polipeptídicas das isoformas da ADL, determinadas por espectrometria de massa, apresentaram diferenças sutís entre si. As distintas massas moleculares das três cadeias polipeptídicas, atingiram valores médios de 18,5 kDa, 13 kDa e 8,5 kDa, respectivas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), e a massa molecular total, calculada a partir destes dados, atingiu valor médio de 40,6 kDa (tabela VI.2). A similaridade nos valores da massa molecular entre as isoformas de uma mesma lectina é muito comum e pode ser constatada nas lectinas isoladas de *Abrus precatorius* L. (Wu *et al.*, 2001), *Artocarpus lakoocha* Roxb. (Wongkham *et al.*, 1995), *Trichosanthes anguina* L. (Anuradha *et al.*, 1999) e também de *Lens culinaris* L. (Hochleitner *et al.*, 2003).

O pico máximo de absorvância das isoformas da ADL está entre 274 e 278 nm (tabela VI.3), e apresenta pequenas diferenças entre si, sendo indicativo de variações na composição dos aminoácidos constituintes, em especial dos aromáticos, com interferência de altas concentrações de cisteína (Edelhoch, 1967). Também foi verificado que a ADL-II, ADL-V e ADL-VI apresentam maior absorção no comprimento de onda em 280 nm do que as outras três isoformas. Este fato pode ser devido a um possível maior número de triptofano nestas isoformas e por isto apresentaram maior absorvância, pois na faixa de 280 tem-se a absorção dos cromóforos da cadeia lateral do aminoácido aromático triptofano. Pela migração diferenciada obtida em PAGE, pH 8,5 (figura VI.3), também se pode deduzir a existência de diferenças na composição dos aminoácidos com cadeias laterais dissociáveis.

Pela análise de aminoácidos constituintes da ADL-III (tabela VI.5) tem-se teores elevados de Gly, Glu/Gln, Asp/Asn, sendo destacada a presença de Cys (mas em concentrações menores do que a ADL). A WGA, lectina de *Triticum vulgare* L. (Poaceae), é também rica em Cys, Gly, Asp e Glu (LeVine *et al.*, 1972). A lectina extraída a partir de *Zea mays* L. (Poaceae), conforme Martínez-Cruz *et al.* (2001), também apresenta altas concentrações de glicina, ácido aspártico e glutâmico, além de serina e glicina, mas possui poucos resíduos de cisteínas que contribuem apenas com um total de 0,7 % na constituição desta lectina.

A estabilidade das isoformas frente a diferentes fatores apresentou alta similaridade com os resultados obtidos com a ADL, como pode ser verificado nas tabelas II.8 a II.12 (capítulo II), e tabelas VI.7 a VI.11 (capítulo VI). Qualquer que seja a possível diferença da estrutura primária das isoformas da ADL, a estabilidade de suas moléculas continuou inalterada frente aos fatores de temperatura, pH, efeito de endoenzimas proteolíticas do trato gastrointestinal analisadas. Também a perda de atividade hemaglutinante das isoformas, face à ação de agentes desnaturantes como uréia e SDS e a de redutores, como DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol, foi similar.

Em relação à aglutinação observada para os eritrócitos testados, as isoformas da ADL apresentaram diferenças que residem, basicamente, em dados quantitativos e qualitativos, com algumas variações entre si, sendo que os eritrócitos de rato não foram aglutinados pelas isoformas V a VII (tabela VI.12). As isoformas da lectina purificada de *Arundo donax* foram mais efetivas em aglutinar eritrócitos nativos de coelho, mas também aglutinaram, porém em menor intensidade, eritrócitos de rato e de humanos, exceto os pertencentes ao grupo sanguíneo O.

A aglutinação de eritrócitos, ou outros tipos celulares, por lectinas, é uma resposta à interação dos açúcares de superfície e domínios de reconhecimento de carboidratos na lectina (Singh *et al*, 1999). Estas interações são usualmente não covalentes, envolvendo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals. Os testes de hemaglutinação com diferentes eritrócitos são clássicos e amplamente utilizados pela praticidade que oferecem em evidenciar a presença de lectinas em extratos ou soluções diversas, podendo ser possível quantificar estas proteínas através do método de dupla diluição serial.

Mesmo as lectinas inibidas por um mesmo monossacarídeo podem demonstrar especificidade de reconhecimento diferenciada, tanto quantitativa quanto qualitativamente, para diferentes eritrócitos, dado o grau que as

mesmas apresentam em se ligar às distintas glicoestruturas de superfície das células. Este fato é resultado, em última análise, da conformação que os domínios de reconhecimento de carboidratos destas proteínas apresentam e que acabam em propiciar a complexação com tais estruturas glicídicas.

A especificidade ao carboidrato (tabela VI.13) também revelou diferenças, geralmente sutís, entre as isoformas da ADL, o que pode suceder em se tratando de isoformas. Em *Cratylia mollis* Mart., as isoformas 1, 2 e 4 são galactose/manose específicas enquanto que a isoforma 3 é galactose específica (Correia, *et al.*, 1995). Estas diferenças refletem variações na estrutura das isoformas com possíveis conseqüências nas propriedades biológicas das mesmas. A PHA-L, uma isoforma de PHA, lectina obtida a partir de *Phaseolus vulgaris* L., é pouco hemaglutinante e induz a mitose em linfócitos T, enquanto que a isoforma PHA-E é fortemente hemaglutinante e, praticamente, não mitogênica (Roitt, 2003; Saul *et al.*, 2000; Carvalho, 1990).

A ADL III, assim como a ADL, purificada por cromatografia de afinidade, também apresentou atividade mitogênica para células mononucleares de sangue periférico humano (figura III.4 e figura VI. 12). Outras lectinas, como a ConA e a arceína, também ativam a blastogênese de linfócitos e promovem a ligação entre estes linfócitos e as células-alvo, facilitando a atividade citolítica dos linfócitos (Silva, 2000). Pode-se verificar que a GlcNAc 0,2 M, inibiu a atividade da ADL-III, em baixas concentrações, indicando que a atividade mitogênica da ADL-III é devida a interação específica lectina-carboidrato presente na membrana plasmática das células mononucleares.

## DISCUSSÃO GERAL

Objetivando a detecção de lectinas vegetais, os estudos que antecederam esta tese tiveram início com um levantamento que enumerou diferentes plantas utilizadas como medicinais e comercializadas *in natura* na cidade de Porto Alegre/Brasil. Dentre outras plantas, constatou-se atividade lectínica, por aglutinação de eritrócitos nativos de coelho, em extratos de insumos classificados e comercializados sob responsabilidade técnica, como sendo de rizomas de *Costus spicatus* (Jacq.) Sw. Contudo, foi possível verificar, ainda no ano de 2003, que os insumos em questão, eram de fato, de *Arundo donax* L., e que os extratos de *Costus spicatus* não aglutinavam os eritrócitos de coelho. Assim é que surgiu a necessidade da determinação de características macroscópicas e microscópicas que fossem úteis na averiguação da autenticidade dos rizomas de *Arundo donax* e o estudo de sua lectina cuja atividade aglutinante era inibida por GlcNAc, em vista de, na ocasião não haver dados na literatura a respeito.

Em casos como estes, em ocorrer a troca de material vegetal, estudos para a determinação de características botânicas estabelecem parâmetros morfo-anatômicos que definem a autenticidade e separam uma espécie vegetal de outra, possibilitando a comprovação da veracidade do material vegetal e seus adulterantes (Zanetti *et al.*, 2004). A falta de cristais e de estruturas secretoras, bem como a riqueza de fibras constituindo a hipoderme, o periciclo e junto aos feixes vasculares, em calotas ou formando bainhas de proteção para os mesmos e conferindo grande rigidez aos rizomas, são características que auxiliam no reconhecimento botânico dos rizomas de *Arundo donax*. Além disto, a análise fitoquímica, mostrando a presença de proteína nas células parenquimáticas e nas fibras esclerenquimáticas (figura I.11), de mucilagens em grupo de células parenquimáticas localizadas profundamente na medula (figura I.12), de amido disperso em células do parênquima (figura I.13), de cumarinas em células profundas na medula (figura I.14), flavonóides nas fibras esclerenquimáticas junto ao sistema vascular (figura I.15), saponinas em fibras



esclerenquimáticas (figura I.16), e alcalóides no parênquima próximo ao periciclo e elementos de vaso do xilema (figura I.17) e a não observação de taninos, cardioativos, antracenosídeos, isotiocianatos, de óleos voláteis e de cristais de oxalato de cálcio contribui para definirem características dos rizomas em estudo.

Também a análise química qualitativa dos extratos dos rizomas (tabela I.2) evidenciando a presença de mucilagem e óleos fixos nos extratos etéreos, de triterpenos/esteróis em extratos etéreos, etanólicos e aquosos, de flavonóides em extratos etanólicos e de saponinas em extratos aquosos, aliado aos resultados negativos para a presença de óleos voláteis, taninos gálicos e catéquicos, antocianinas, antracenosídeos, cardioativos, isotiocianatos e de saponinas hemolíticas nos extratos, além de confirmarem os resultados dos ensaios histoquímicos, auxiliam na caracterização dos rizomas. Finalmente, a presença de atividade hemaglutinante para eritrócitos nativos de coelho nos extratos aquosos dos rizomas de *Arundo donax* L. e a ausência desta mesma atividade nos extratos dos rizomas de *Costus spicatus* permitem, através de um simples teste de hemaglutinação, passível de ser realizado em lâmina de vidro, a diferenciação entre os insumos das duas espécies vegetais. Não foi encontrado na literatura revisada, até a data presente, nenhum trabalho histoquímico ou de análise química qualitativa nos rizomas acima mencionados.

Para o isolamento e a purificação da ADL em escala preparativa foi efetivada a cromatografia em coluna de afinidade, utilizando matriz estroma de coelho-poliacrilamida, na qual foi passado o extrato protéico obtido a partir dos rizomas pulverizados de *Arundo donax*. Por este processo, obteve-se uma purificação da lectina de 12,15 vezes e uma recuperação de aproximadamente 80 % da atividade hemaglutinante (tabela II.3). Kaur *et al.* (2005) descreveram o isolamento de uma lectina GlcNAc específica, a partir dos rizomas desta mesma planta, obtendo uma purificação de 3,02 vezes a partir de uma fração obtida por precipitação salina das proteínas do extrato dos rizomas, com rendimento final de 0,19 % de proteínas e 60 % da atividade hemaglutinante inicial. Estes mesmos autores estimaram por gel permeação molecular, em

coluna de Sephadex G-100, como sendo igual a 32, o que está de acordo com os resultados experimentais obtidos neste trabalho, utilizando, o mesmo método experimental. No entanto, por SDS-PAGE, em condições não redutoras e segundo método de Laemmli (1970), com gel de poliacrilamida 13 %, mas sem desnaturação da amostra protéica pelo calor antes de sua aplicação no gel, a massa molecular da única banda protéica corada obtida foi estimada pela equação da reta como sendo 33 (figura II.10). Quando a SDS-PAGE foi realizada com a amostra protéica, desnaturada pelo calor e em condições redutoras, obteve-se três bandas protéicas. As três bandas protéicas separadas durante a eletroforese, são indicativos de uma estrutura possivelmente heterotrimérica da lectina e, também, que esta estrutura é mantida por pontes dissulfeto.

Em geral, as lectinas de poáceas, isoladas de embriões ou de folhas, possuem estrutura homo ou heterodimérica, com subunidades cujas massas moleculares variam de fragmento de 8 kDa a 19 kDa, respectivamente (Leiner et al., 1986). Quando DTT foi utilizado como redutor, em baixas concentrações, obteve-se neste trabalho, por SDS-PAGE, apenas duas bandas protéicas. Tão logo a concentração de DTT no tampão de amostra foi igualado a do  $\beta$ -mercaptoetanol a ADL desdobrou-se em três bandas. Kauer *et al.* (2005) atribuíram a ADL uma estrutura homodimérica não mantida por pontes dissulfeto, a partir de resultados experimentais obtidos por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 8 %, no qual o material protéico com massa molecular inferior a 18 kDa costuma sobrepor-se, migrando na frente próximo ao marcador de frente de migração.

Neste trabalho foram separadas sete isoformas da ADL purificada. Por nenhum dos processos cromatográficos testados anteriormente, nem mesmo pelo sistema HPLC, conseguiu-se a separação das isoformas entre si, ou ao menos a separação de uma das isoformas das restantes. O único processo eficiente e que permitiu a separação das isoformas da ADL foi por eletroforese preparativa (PAGE), em gel de poliacrilamida a 10 % e pH de 8,5. Este processo é bastante trabalhoso, o que dificulta seu emprego em um sistema de

produção industrial. Contudo, com a separação das isoformas em estado puro por eletroforese preparativa e o sequenciamento da porção N-terminal das subunidades da molécula ADL-III, abre-se a possibilidade do sequenciamento de aminoácidos e a produção heteróloga da mesma e do mesmo modo das demais isoformas.

Em vegetais não é incomum a presença de isoformas. A lectina de *Phaseolus vulgaris* L. possui 5 isoformas (Leavitt, *et al.* 1977), *Lens culinaris* Medik., apresenta uma lectina com duas isoformas e *Triticum vulgare* L., a WGA, possui três isoformas (Hocheitner *et al.*, 2003), enquanto que *Acacia constricta* Benth., possui quatro isoformas (Guzmán-Partida *et al.*, 2004). Uma das explicações apontadas para esta característica das lectinas de plantas apresentarem isoformas em número variado encontra-se no fato das células vegetais formarem um sistema poligenômico, o que pode facilitar a ocorrência de isoformas nestes organismos (Gottlieb, *et al.*, 1996).

Constatou-se, neste trabalho, que a massa molecular das isoformas da ADL, determinada por espectrometria de massa, atingiu o valor médio de 40,6 kDa, sendo que as três cadeias polipeptídicas das isoformas também apresentaram distintas massas moleculares, que atingiram média de 18,7 kDa, 13 kDa e 8,5 kDa (figura II.10 e II.11). Ao ser usado DTT como redutor, em concentrações inferiores a 100 mM, no tampão de amostra SDS-PAGE, apenas duas bandas protéicas foram visualizadas após coloração com azul de Comassie R-250, mas em concentrações maiores a terceira banda era visualizada, como quando com o emprego de  $\beta$ -mercaptoetanol. Os resultados da espectrometria de massa também indicam que as isoformas da ADL são estruturadas por três cadeias polipeptídicas associadas entre si por pontes S-S. No entanto, não se pode afirmar, até o presente momento se esta lectina que se desdobra inicialmente em duas bandas protéicas em SDS-PAGE e que configura uma estrutura heterodimérica, ou se a terceira banda protéica seria obtida por separação de uma das duas cadeias polipeptídicas sob ação de concentrações adequadas de redutor. A lectina de *Aloe arborescens* foi descrita como tendo estrutura trimérica ou tetramérica em um de seus

fragmentos (Koike, *et al.*, 1995). Dentre as lectinas de poáceas a de *Oryza sativa* L. é rica em cisteína e possui massa molecular de 38 kDa e é constituída por duas cadeias polipeptídicas com massa molecular relativa de 18 e 19 kDa, mas que podem ser clivadas em polipeptídeos menores de 8 e 10 kDa (Takahashi *et al.*, 1973).

A lectina purificada de *Arundo donax* e todas as suas sete isoformas foram efetivas em aglutinar eritrócitos nativos de coelho, como a lectina de *Saraca indica* (Ray e Chatterjee, 1995) que também aglutina eritrócitos de coelho. Aglutinaram também eritrócitos de rato e de humanos, pertencentes aos grupos sanguíneos, A, B e AB, com menor intensidade, mas não os do grupo O. Isto leva a conjecturar que a ADL poderia ser usada na tipificação de eritrócitos humanos pertencentes ao grupo sanguíneo O por exclusão. Por razões práticas neste trabalho foi utilizado, nos ensaios subseqüentes, eritrócitos de coelho, no estado nativo ou glutarizados.

A capacidade de aglutinar células isoladas, não caracteriza uma lectina, pois taninos, certos lipídios e até mesmo cátions divalentes (altas concentrações) são capazes de produzir esta reação (Costa, 1982). Para garantir que a aglutinação está sendo mediada por alguma lectina exige-se que ocorra a inibição desta atividade por carboidratos.

Os carboidratos interagem com as lectinas através de pontes de hidrogênio devido o grande número de hidroxilas disponíveis nas moléculas dos açúcares, que acabam por agir como doadores e receptores de hidrogênio, e também por meio de interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals no(s) domínio(s) de reconhecimento de carboidratos (Loris *et al.*, 1998). Nos testes de inibição da atividade hemaglutinante a ADL demonstrou afinidade com a GlcNAc. Esta lectina e suas isoformas mostraram ter maior afinidade para os derivados oligossacarídeos da GlcNAc, indicando que o domínio de reconhecimento de carboidrato possui pontos múltiplos de interação com estruturas polissacarídicas possuidoras de ligação  $\beta$ -1-4-GlcNAc. O fato da ManNAc, epímero da GlcNAc, ser muito fraco inibidor da atividade

hemaglutinante, indica que a posição axial do grupo N-acetil do C2 na estrutura piranosídica é importante no reconhecimento pela lectina. Por outro lado, a N-acetil-D-galactosamina, que possui o grupamento N-acetil no C2, na mesma posição que a GlcNAc, não é reconhecida pela ADL e suas isoformas, indicando que a posição do grupamento N-acetil é importante, mas não único, para o reconhecimento pela lectina. Este fato ainda indica que a posição da hidroxila, livre ou ligada no C4 da GlcNAc, também é outro ponto importante de reconhecimento.

Uma propriedade geral de muitas proteínas que estão diretamente envolvidas em mecanismos de defesa de plantas é a estabilidade a amplas faixas de pH, temperatura e a digestão por enzimas proteolíticas. Muitas proteínas que conferem algum grau de patogenicidade a insetos, bactérias ou fungos permanecem estáveis a tratamentos que poderiam inativar proteínas celulares normais (Barbieri *et al.*, 1993). A ADL e a sua isoforma ADL-III, conforme os ensaios realizados, demonstrou ser altamente resistente a uma larga faixa de temperatura até 70 °C, por 60 min, perdendo totalmente a atividade por aquecimento durante 10 min a 95 °C. Além disto elas são estáveis em faixa de pH 3 a 12. Esta lectina e suas isoformas são resistentes a ação de enzimas proteolíticas, como a WGA (Gabor, *et al.* 1997).

A ADL apresentou efetiva atividade nos modelos experimentais utilizados para verificar a atividade inseticida (tabela III.5 e III.6), nematocida (III.7), fitotóxica (figura III.1) e citotóxica (figura III.2) constatado neste trabalho. Também pode-se constatar neste trabalho que a ADL apresenta atividade tóxica e que a toxicidade aguda via intraperitoneal em doses letais é de 800 mg/kg (tabela III.4). A ADL também demonstrou atividade quimiotóxica *in vitro*, para neutrófilos humanos à semelhança da lectina de *Euphorbia milii* Des Moul. Var. "Breonii" (Dias-Baruffi *et al.*, 2000) e tanto a ADL ( 20 µg/ml) como a ADL-III (10 µg/ml) possuem atividade mitogênica. A atividade mitogênica apresentada pela ADL corresponde a 88,6 % da atividade mitogênica da PHA-L usada como padrão positivo e a da ADL-III corresponde a 89,01 % da atividade da PHA-L. Kaur *et al.*, (2005), relataram atividade mitogênica da

lectina de *Arundo donax* na concentração de 10 µg/ml.

A lectina purificada e suas isoformas não dependem de íons divalentes para desempenhar suas atividades biológicas e não são glicosiladas. Estas características são discordantes da maioria das lectinas vegetais que, conforme Sol *et al.* (2006) e Van Damme *et al.* (1998), são metaloproteínas e apresentam estrutura molecular glicosilada. Contudo, estas características da ADL, conforme Van Damme *et al.* (1998) e Willy (1986) são concordantes com as de lectinas já isoladas e purificadas a partir de outras poáceas, como a WGA, bem como a de outras famílias vegetais, como a lectina de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Silva, 2000).

A presença de cisteína em proteínas vegetais é bastante comum, sendo que este resíduo em grande quantidade pode ser observado em diversas lectinas vegetais, especialmente em poáceas, como a WGA, além de algumas euforbiáceas, como a HEV (Van Damme *et al.*, 1998). A análise da composição centesimal de aminoácidos da ADL e ADL-III indicaram a presença de alto percentual de Gly, de Glu/Gln, Asp/Asn e Cys, o que é comum em lectinas de poácea.

Os resultados sugerem que a ADL é uma lectina constituinte de parede celular. Buckeridge (2001) relata que determinadas proteínas de parede celular de vegetais são ricas em glicina. A ADL, rica em glicina, foi, de fato, detectada neste trabalho, na parede celular, por ensaio de imunolocalização usando-se anticorpos anti-lectina de coelho, em secções dos tecidos dos rizomas. Por este método, a ADL pode ser detectada na parede celular de fibras que compõem os rizomas e, por vezes, em paredes de células do parênquima cortical deste órgão vegetal.

Uma aplicação das lectinas está em utilizá-las como sondas na marcação de células tumorais, prestando-se à identificação das células e o estudo dos mecanismos envolvendo a transformação maligna. A complexação de lectinas com determinados glicoconjugados de superfície celular em neoplasias é muito acentuado, pois estas estruturas não se encontram

distribuídas homogeneamente. Geralmente os glicoconjugados de superfície passam a formar ilhas isoladas em pontos definidos, além do fato de serem quase sempre diferentes daquela das células normais (Hakomori, 1985). A ADL marcou células das linhagens HT-29, T-24 e T-47D. Estes resultados apontam a possibilidade desta lectina vir a ser utilizada, sobretudo, em trabalhos que objetivam estudos referentes aos padrões de modificações que estas células sofrem durante processos neoplásicos.

Dentre as propriedades biológicas da ADL demonstradas nesta tese, a de fitotoxicidade, a atividade nematicida e a atividade inseticida, bem como a localização nas células dos rizomas, sugerem que a ADL estaria envolvida nos mecanismos de defesa dos rizomas, onde a mesma encontra-se endogenamente.

## CONCLUSÕES

- Dentre as características morfo-anatômicas que contribuem para a autenticidade dos rizomas de *Arundo donax* destacam-se: a epiderme uniestratificada e com cutícula persistente, o parênquima cortical com grãos de amido, as bainhas de fibras imediatamente abaixo da epiderme e ainda delimitando a medula, os feixes vasculares (abertos e fechados) mostrando uma estrutura rica em fibras e tomando disposição atactostélica. Por outro lado, a falta de tricomas, de cristais de oxalato de cálcio e de estruturas secretoras são marcantes.
- A presença de cumarinas, alcalóides, flavonóides e saponinas não hemolíticas nos extratos, obtidos a partir dos rizomas de *Arundo donax*, corroboram com os resultados da análise histoquímica do órgão.
- Os rizomas de *Arundo donax* L., contêm uma lectina (ADL), purificada neste trabalho eficazmente até a homogeneidade, por protocolo de extração protéica com solução salina seguida de cromatografia de afinidade em coluna de estroma de coelho – poliacrilamida.
- ADL é uma proteína que não apresenta sazonalidade na atividade lectínica e ocorre apenas nos rizomas de *Arundo donax*, na parede celular de fibras e na parede de poucas células do parênquima cortical.
- A lectina purificada (ADL) é constituída de sete isoformas, separadas com sucesso por PAGE (preparativa) em gel de poliacrilamida a 10 %, pH 8,5. Das sete isoformas, seis foram analisadas e apresentaram afinidade por GlcNAc e seus derivados oligoméricos.



- As isoformas da ADL ocorrem em concentrações distintas, sendo que a ADL-II, ADL-III e a ADL-IV são as mais abundantes.
- A ADL e suas isoformas aglutinam eritrócitos de coelho, de rato e de humanos, pertencentes aos grupos sanguíneos A, B e AB, mostrando diferenças quali e quantitativas entre si. Eritrócitos de porco foram testados para ADL, havendo aglutinação. A atividade hemaglutinante é independente de cátions divalentes.
- A ADL e suas isoformas possuem massa molecular relativa média de 40 kDa, e cada uma das isoformas são estruturadas por três subunidades distintas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), ligadas por pontes S-S, separáveis por SDS-PAGE em condições redutoras. As massas moleculares relativas das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , determinada por espectrometria de massa são de 8,5, 13,0 e 18,5 kDa respectivamente.
- A ADL não possui resíduos de carboidratos neutros detectáveis na molécula portanto, não seria uma glicoproteína.
- A análise de aminoácidos da ADL, bem como da isoforma ADL-III revelou que as mesmas possuem alto teor de Glu/Gln, Asp/Asn, Gly e também Cys. Este fato possibilita a formação de ligações covalentes na estrutura terciária e quaternária das respectivas moléculas.
- Tir é o aminoácido N-terminal da cadeia  $\alpha$ , Glu da cadeia  $\beta$  e Ala da cadeia  $\gamma$  da ADL-III.
- A ADL purificada e a ADL-III são estáveis frente a variações de pH na faixa de 3 a 9 durante 2 h, e são termoestáveis não apresentando diminuição na atividade hemaglutinante a 70 °C durante 1 h. porém a atividade é perdida quando é exposta a agentes desnaturantes e redutores, mas não pela ação de enzimas endoproteolíticas do trato gastrointestinal *in vitro*.
- A toxidez da ADL é manifestada após a administração em camundongos, via intraperitoneal a partir da dose de 300 mg/kg, ocorrendo 100 % de óbito com 800 mg/kg.

- A ADL apresenta atividade citotóxica *in vitro* para células transformadas da linhagem HT-29, atividade inseticida reduzindo o número e o peso de larvas de *Dysdercus peruvianus*, além de atividade nematicida para *Meloidogyne incognita* o que seria condizente com sua toxicidade.
- A ADL e a ADL-III são mitogênicas. Elas induzem a blastogênese de células mononucleares de sangue periférico humano e, além disto, a ADL também induz a migração de neutrófilos *in vitro*.
- Todas as isoformas da ADL mostraram ser antigênicas, reconhecidas por anticorpos policlonais anti-ADL presentes no coelho imunizado com a lectina.
- ADL mostrou ser um marcador viável para as células transformadas, ligando-se às células de câncer de cólon, mama e bexiga, das linhagens HT-29, T-47D e T-24, respectivamente. Este fato possibilitaria o uso da ADL em estudos de glicosilação de glicoconjugados da membrana plasmática, envolvidas com a transformação maligna.
- A toxicidade intraperitoneal da ADL, embora esta lectina seja resistente *in vitro* à digestão por enzimas endoproteolíticas, do trato gastrointestinal, impede que a mesma possa ser utilizada como veículo para a administração de medicamentos.

## REFERÊNCIAS

- AGAPOV, I. I.; TONEVITSKY, A. G.; MALUCHENKO, N. V.; MOISENOVICH, M. M.; BULAH, Y. S.; MIKHAIL P.; KIRPICHNIKOV, M. P. (1999). Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Letters*. V. 464, p. 63-66.
- ALLEN, A. K.; NEUBERGER, A. (1973). The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. *Biochemical Journal*. V. 135, p. 307-324.
- ALONSO, A. A.; MORAES-DALLAQUA, M. (2004). Morfoanatomia do sistema caulinar de *Canna edulis* Kerr-Gawler (Cannaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. V. 27, nº 2, p. 229-239.
- ALONSO-PLAZA, J. M.; CANALES, M. A.; JIMÉNEZ, M.; ROLDÁN, J. L.; GARCÍA-HERRERO, A.; ITURRINO, L.; ASENSIO J. L.; CAÑADA, F. J.; ROMERO, A.; SIEBERT H.; ANDRÉ, S.; SOLÍS, D.; GABIUS, H.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. (2001) NMR investigations of protein-carbohydrate interactions: insights into the topology of the bound conformation of a lactose isomer and  $\beta$ -galactosylxyloses to mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1568, p. 225-236.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. (1984). *Flora brasileira*. Três livros e fascículos Ltda, São Paulo. V. 1, 152 p.
- AMANO, J.; KOBAYASHI, K.; OSHIMA, M. (2001). Comparative study of glycosyltransferase activities in caco-2 cells before and after enterocytic differentiation using lectins-affinity-performance liquid chromatography. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V. 395, nº 2, p. 191-198.
- AMAT, A. G., (1991). Caracteres histofoliare diferenciales de *Ilex paraguariensis* St. Hil. ("yerba mate") y su adulterante *Mandigifera indica* L. (mango). *Acta Farmacéutica Bonaerense*. V. 10, nº 1, p. 9-13.
- ANURADHA, P.; BHIDE, S. V. (1999). A isolectin complex from *Trichosanthes anguina* seeds. *Phytochemistry*. V. 52, p. 751-758.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. e CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (2003). *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora UFV. Cap. 4. p. 109-127.
- AQUILA, M. E. A. 2000. Efeito alelopático de *Ilex paraguariensis* A. St-Hil. A germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. *Iheringia. Série Botânica*. V. 53, p. 51-66.
- ARBÓS, P.; ARANGO, M. A.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. (2002). Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVN/MA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. V. 242, p. 129-136.
- ASTOUL, C. H.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. (2000). Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp 120 from human immunodeficiency virus

type I probed by *in vitro* interaction with mannose-binding lectins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 274, nº 2, p. 455-460.

ATHERTON, D. (1989). Successful PTC amino acid analysis at the picomol level. *In: Techniques in Protein Chemistry* (Hugly, T. E., ed.), San Diego, Academic Press, Inc., capítulo 27, p. 273-283.

BABA, K.; OGAWA, M.; NAGANO, A.; KURODA, H.; SUMIYA, K. (1991). Development changes in the bark lectins of *Sophora japonica*. *Planta*. V. 181, p. 462-470.

BACCHI C. E.; ALMEIDA P. C. C.; FRANCO, M. (1999). Manual de padronização de laudos histopatológicos (Sociedade Brasileira de Patologia). 2ª edição, Reichmann & Affonso (ED.), Rio de Janeiro, 266 p.

BANDYOPADHYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. (2001). Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Science*. V. 161, p. 1025-1033.

BARBIERI, L.; BATELLI, G. B.; STIRPE, F. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochemical et Biophysical Acta*. V. 1154, p. 237-282.

BARKER, N. P. *et al.* (2000). A phylogeny of the grass family (Poaceae), as inferred from eight character sets. *In: JACOBS, S. W. L. e EVERETT (eds.) Grass systematics and evolution*. Melbourne: CSIRO, p. 3-7.

BARRE, A.; HERVÉ, C.; LESCURE, B.; ROUGÉ, P. (2002). Lectin receptor kinases in plants. *Plant Science*. V. 21, nº 4, p. 379-399.

BEAVIS, R. C. (1992). Matrix-assisted Ultraviolet-laser desorption – evolution and principles. *Organic Mass Spectrometry*. V. 27, nº 6, p.653-659.

BERLITZ, H. D.; WEDER, J. K. P. (1990). Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. *Food Reviews International*. V. 6, p. 151-211.

BELL, A. D.; TOM LINSON, P. B. (1980). Adaptativ archicteture in rhizomatous plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*. V. 80, p. 125-160.

BÉTAIL, G.; COULET, M.; GENAUD, L.; GUILLOT, J.; SCANDARIATO, M. (1975). Les stromas érythrocytaires inclus en gel de polyacrylamide. Applications à la chromatographie d'affinité. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiars*. V. 169, nº 3, p. 561-566.

BIDLINGMEYER B. A.; COHEN, S. A.; TARVIN, T. L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications*. V. 336, nº 1, p. 93-104.

BOUCKAERT, J.; HAMELRYCK, T.; WYNS, L.; LORIS, R. (1999). Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. *Carbohydrate and Glycoconjugates*. V. 9, nº 5, p. 572-577.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. (1954). Especific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. V. 119, p. 419.

BOUWMAN, L. H.; ROEP, B. O.; ROOS, A. (2006). Mannose-binding lectin: Clinical

implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Human Immunology*. V. 67, nº 4-5, p. 247-256.

BOYDEN, S. (1962). The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*. V. 15, p. 453-466.

BRITO A. R. M. S. Legislação de fitoterápicos. In: DI STASI, L. C. (1996). *Plantas medicinais: Arte e ciência*. São Paulo, UNESP, cap. 13. p. 187-197.

BRITO, A. S. (1994). *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: Ed. da UNICAMP. 122p.

BROOKS, A. S.; LEATHEM, A. J. C.; SCHUMACHER, U. L. (1997). Na introduction of the field. In: BROOKS, A. S.; LEATHEM, A. J. C.; SCHUMACHER, U. L. (Eds.). *Lectin histochemistry: a concise practical handboock*. Bios Scientific Publishers Ltda, Oxford, U.K., p. 1-17.

BUCKERIDGE, M. S.; LIMA, D. U.; SANTOS, H. P. (2001). Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. V. 12, nº 1, p. 137-162.

BURMAN, A. G. (1985). Nature and composition of the grass flora of Brazil. *Willdenowia*. V. 15, p. 211-233.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDÁ, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANJEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; ROCHA, I. M. A.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B. S. (1999). Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochemica et Biophysica Acta*. V. 1430, p. 367-375.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*. V. 40, nº 11, p. 1515-1539.

CARVALHO, H. F. (1990). Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. *Ciência e Cultura*. Nº 42, p. 884-893.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANJEIRO, T. B., NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A. M., CRISOSTOMO, C. V., CALVETE, J. J. (1998). Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry*. V. 49, p. 675-680.

CAVADA, B. S.; MOREIRA-SILVA, L. I. M.; GRANGEIRO, C. F.; SANTOS, C. F.; PINTO, V. P. T., BARRAL-NETTO, M., ROQUE-BARREIRA, M. C.; GOMES, J. C.; MARTINS, J. M.; OLIVEIRA, A.; MOREIRA, R. A. (1996). Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. *Lectin: Biological, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. V. 11., p. 74-80.

CHAUDHURI, R. K.; GHOSAL, S. (1970). Triterpenes and sterols of the leaves of *Arundo donax*. *Phytochemistry*. V. 8, p. 1895-1896.

CHAURAND, P.; CORNETT, D. S.; CAPRIOLI, R. (2006). Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry. *Current Opinion in Biotechnology*. V. 17, p. 431-436.

- CHAURAND, P.; SCHWARTZ, S. A.; CAPRIOLI, R. M. (2002). Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Current Opinion in Chemical Biology*. V. 6, p. 676-681.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. (1986). *Genera graminum. Grasses of the world*. London: Her Majesty's Stationery Office. 389p.
- COELHO, M. B.; SOUZA, I. A.; FREIRE, M. G. M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, S.; MACEDO, M. L. R. (2006). Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. *Toxicon*. V. 48, nº 5, p. 529-535.
- COSTA, A. F. (1982). *Farmacognosia*. 2ª ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. V. III. 1032 p.
- CORREIA, M. T. S. e COELHO, L. C. B. B. (1995). Purification of a glucose/manose specific lectin isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camarutu beans). *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 36, p. 261-273.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. (1994). Neoplasia. In: *Pathologic basis of disease*. 6ª ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company. 1425 p.
- CRONQUIST, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. 2ª ed., New York: The New York Botanical Garden. 517p.
- CUNMMINGS, R. D. (1997). Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. Glyco-science, status and perspectives. Ed. Gabius, S. Capítulo 10. Champman e Hall GmbH, Weinheim, Germany, p. 191-199.
- DABELSTEEN, E.; CLAUSEN, H.; MANDEL, U. (1992). Carbohydrate changes in squamous cell carcinomas. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavia (Suppl. 27.)*. V. 100, p. 130-138.
- DANIN, A. (2004) *Arundo* (Gramineae) in the Mediterranean reconsidered. *Willdenowia*, V. 34, p. 361-369.
- DATTA, P. K.; FIGUEROA, M. O. R.; LAJOLO, F. M. (1991). Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). *Plant Physiology*. Nº 97, p. 856-862.
- DELAPORTE, R. H.; SÁNCHEZ, G. M.; CUÉLLAR, A. C.; MELLO, J. C. P. (2001). Control calidad y atividade antiinflamatoria de las drogas vegetales *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze y *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. V. 20, nº 1, p. 39-46.
- DIAS-BARUFFI; SAKAMOTO, S. R.; ROSSETTO, S.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. (2000). Neutrophil migration and aggregation induced by euphorbin, a lectin from the latex of *Euphorbia milii*, var. *milii*. *Inflammation Research*. V. 40, p. 732-736.
- DICKISON, W. C. (2000). *Integrative Plant Anatomy*. Harcourt Academic Press, San Diego, 533p.
- DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K.; ROBERTS, P. A. (1956). Colorimetric

- methods of the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. V. 28, p. 350-356.
- DURINTI, M.; GIUS, C. (1997). Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field crops Research*. V. 53, p. 31-45.
- EDMAN, P.; BEGG, G. (1967). A protein sequenator. *European Journal Biochemistry*. v. 1, p. 80-91.
- EDELHOCH, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry*. V. 6, p. 1948-1954.
- ELAKOVICH, S. D. (1999). Bioassays applied to allelopathic herbaceous vascular hydrophytes. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; FOY, C. L. (Ed.) *Principles and Practices in Plant Ecology*. Boca Raton: CRC Press. p. 45-56.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. (1997). Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*. V. 22, nº 22. p. 462-467.
- ESPINOSA, J. F.; ASENSIO, J. L.; GARCIA, J. L.; LAYNEZ, J.; BRUIX, M.; WRIGHT, C.; SIEBERT, H-C.; GABIUS, H-J.; CAÑADA, F. J.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. (2000). NMR investigations of proteins-carbohydrate interactions binding studies and refined three-dimensional solution structure of the complex between the B domain of wheat germ agglutinin and N,N',N''-triacetylchitotriose. *European Journal Biochemistry*. V. 267, p. 3965-3978.
- ESQUENAZI, D.; SOUZA, W.; ALVIANO, C. S.; ROZENTAL, S. (2003). The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. V. 35, p. 113-123.
- ETZLER, M. E. (1985). Plant lectins: molecular and biological aspects. *Annual Review Plant Physiology*. N° 36, p. 200-234.
- FARIA, J. L. (1999). *Carcinomas In: Patologia especial com aplicações clínicas*. 2ª edição. Ed. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. 687p.
- FARIAS, M. R. (1999). *Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais*. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; *et al.*, Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. Cap. 12, p. 197-220.
- FERNÁNDEZ-ALONSO, J. L.; VEJA, N.; FILGUEIRA, J. J.; PÉREZ, G. (2003). Lectins prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. *Biochemical Systematics and Ecology*. V. 20, p. 1-17.
- FERNÁNDEZ, T.; ZOLEZZI, P. C.; AULICINO, P.; LOPES, E. C.; WAGNER, M.; RICCO, R.; HAJOS, S.; GURNI, A.; ALVAREZ, E. (2003). Immunobiological features of the galactoside lectin L-Lc isolated from the Argentine mistletoe *Ligaria cuneifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 85, p. 81-92.

- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 12 (edição especial), p. 175-204.
- FERREIRA, R. B.; FREITAS, R. L.; TEIXEIRA, A. R. (2003). Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated. *FEBS Letters*. V. 534, p. 106-110.
- FOLLMER, C.; WASSERMANN, G. E.; CARLINI, C. R. (2004). Separation of Jack (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science*. V. 167, p. 241-246.
- FONT QUER, P. (1993). *Dicionário de Botânica*. V.II. Barcelona: Ed. Labor S.A. p. 609-1242.
- FREIRE, M. G. M.; GOMES, V. M.; CORSINI, R. E.; MACHADO, O. L. T.; SIMONE, S. G.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. (2002). Isolation and partial characterization of a lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology Biochemistry*. V. 40, p. 61-68.
- FRIGERIO, L.; ROBERTS, L. M. (1998). The enemy within: ricin and plant cells. *Journal of Experimental Botany*. V. 49, n° 326, p. 1473-1480.
- GABIUS, H. J. (1994). Non carbohydrate binding partners, domains of animal lectins. *International Journal Biochemistry*. V. 26, p. 469-477.
- GABIUS, H. J.; SABINE A.; KALTNER, H.; SIEBERT, H C. (2002). The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1572, n° 2-3, p. 165-177.
- GABOR, F.; WIRTH, M.; JURKOVICH, B.; HABERL, I.; THEYER, G.; WALCHER, G.; HAMIITON. (1997). Lectin-mediated bioadhesion: Proteolytic stability and binding-characteristics of wheat germ agglutinin and *Solanum tuberosum* lectin on Caco-2, HT-29 and human colonocytes. *Journal of Controlled Release*. V. 49, p. 27-37.
- GALANINA, O.; FEOFANOV, A.; TUZIKOV, A. B.; RAPOPORT, E.; CROCKER, P. R.; GRICHINE, A.; EGRET-CHARLIER, M.; VIGNY, P.; PENDU, J.; BOVIN, N. V. (2001). Fluorescent carbohydrate probes for cell lectins. *Spectrochimica Acta Part A*. V. 57, p. 2285-2296.
- GATTUSO, M. A.; GATTUSO, S. J. (1999). *Manual de procedimientos para analisis de drogas en polvo*. Rosário: Editora da Universidade Nacional da Rosário - Argentina. 48p.
- GERLACH, D. (1977). *Bothanische mikrotechnik*. 2ª ed., Stuttgart: Georg-Thieme Verlag, 311p.
- GERRITS, P. O.; SMIDT, L. (1983). New, less toxic polimerization system for the embedding of soft tissue in glycolmethacrylate and subsequent preparing of serial section. *Journal Microbiological*. N° 132, p. 81-85.



- GHERI, G.; RUSSO, G.; CAPPUGI, P.; SBAMBATI, E.; BRYK, S. G. (1999). The oligosaccharidic component of glycoconjugates in lichen planus, granuloma annular, seborheic keratosis and palmoplantar keratoderma: lectin histochemical study. *Histology and Histopathology*. V. 14, nº 3, p. 697-704.
- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; SCACCINI, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status critical new and experimental data. *Free Radical Biology Medicine*. V. 29, p. 1106-1114.
- GIBBS, P. E.; FERGUSON, I. K. (1987). Correlations between pollen exine sculpturing and angiosperm self-incompatibility systems – a reply. *Plant Systematics and Evolution*. V. 157. p. 143-159.
- GILBOA-GARBER, N.; CITRONBAUM, R.; LEVENE, C.; SELA R. H. (1988). Blood group detection by the L-fucose binding lectin of the green marine alga *Ulva lactuca*. *Developmental and Comparative Immunology*. V. 12, p. 695-705.
- GLOSAL, S.; CHAUDHURI, R. K.; DUTTA, S. K. (1971). Alkaloids of the flowers of *Arundo donax*. *Phytochemistry*. V. 10, nº 11, p. 2852-2853.
- GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. (1988). *Introduction to Plant Biochemistry*. 2<sup>a</sup> ed.: Pergamon Press. 677p.
- GOTTLIEB, R. O.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. (1995). *Biodiversidade: um Enfoque Químico-Biológico*. UFRJ. Rio de Janeiro, 267p.
- GRAHAM Jr., R. C.; KARNOVSKY, M. J. (1966). The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. V. II nº 4, p. 291-302.
- GUZMÁN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, I. (2004). Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulggaris* lectins. *Biochimie*. V. 86, p. 335-342.
- HAKOMORI, S. (1985). Aberrant glycosylation in cancer cell membrane as accused on glycolipids overview and perspective. *Cancer Research*. V. 45, p. 2405-2414.
- HARAT, K.; MURAKI, M. (2000). Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose. *Journal of Molecular Biology*. V. 297, p. 663-671.
- HERLING, M.; KMOLLE, J.; BAHN, H., GABIUS, H. J., HINZE, H. (2000). Glychohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. *In Vivo*. V. 14, nº 4, p. 499-506.
- HIRSCH, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Current Opinon in Plant Biology*. V. 2; p. 320-326.
- HOCHLEITNER, E. O.; BAKRY, R.; HUCK, C. W.; FLORES, F.; STÖGGL, W. M.; STECHER, G.; BONN, G. K. (2003). Analysis of isolectins on non-porous particles and monolithic polystyrene-divinylbenzene based stationary phases and electrospray

ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*. V. 223-224, p. 519-526.

<http://www.anticancer.net/resan/basis.html> em 24.01.2007.

HUESING, J. E.; MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. (1991). Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. *Phytochemistry*. V. 30, p. 785-788.

HUGHES, M. A.; LEE, C. W.; HOLM, C. F.; GHOSH, S.; MILLS, A.; LOCKHART, L. A.; REED, L. S.; MANN, J. (2003). Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein. *Molecular & Biochemical Parasitology*. V. 127, nº 2, p. 113-120.

HUSSEY, R.S.; BARCKER, A. A. (1973). Comparison methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. Including a new technique. *Plant Disease Reported*. V. 57, p. 1025-1028.

ISSAD, T.; BOUTE, N.; PERNET, K. (2002). A homogenous assay to monitor the activity of the insulin receptor using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochemical Pharmacology*. V. 64, p. 813-817.

IRAZOQUI, F. J.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; LARDONE, R. D.; VILLARREAL, M. A.; SENDRA, V. G.; MONTICH, G. G.; TRINDADE, V. M.; CLAUSEN, H.; NORES, G. A. (2005). Fine carbohydrate recognition of *Euphorbia milii* lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 336, p. 14-21.

IRAZOQUI, F. J.; ZALAZAR, F. E.; CHIABRANDO, G. A.; ROMERO, O.; VIDES, M. A. (1992). Differential reactivity of *Agaricus bisporus* lectin with human IgA subclasses in gel precipitation. *Journal Immunology Methods*. V. 156, p. 199-204.

JACOBSON, R. L.; DOYLE, R. J. (1996). Doyle Lectin-parasite interactions. *Parasitology Today*. V. 12, nº 2, p. 55-61.

JORGE, L. F., MARKMAN, B. H. O. (1994). Caracterização histológica e química (Cromatografia em camada delgada) de *Plantago tomentosa* Lam. (tansagem). *Revista Brasileira de Farmácia*. V. 75, nº 1, p. 10-12.

JORGENSEN, C. S.; HEEGAARD, N. H. H.; HOLM, A.; HOJRUP, P.; HOUEN, G. (2000). Polypeptide binding properties of the chaperone calreticulin. *European Journal Biochemistry*. V. 267, p. 2945-2954.

JUAN, T. G. (2004). Nigrin B: uma proteína inactivadora de ribossomas no tóxica del saúco. Utilidad farmacéutica em la construcción de imunotoxinas y conjugados para la terapia del cáncer. *Revista da Academia Nacional de Farmácia*. V. 70, p. 73-94.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A., *et al.* (2002). *Plant Systematics: a Phylogenetic Approach*. Sunderland: Sinauer Associates. 576p.

KABIR, S. (1998). Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods*. Nº 212, p. 193-211.

KANNAN, S.; BALARAM, P.; CHANDRANG, J.; PILLOI, M. R.; MATHEW, B.; NAIR M. K. (1993). Expression of lectin-specific cellular glycoconjugates during aral

carcinogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. V. 119, n° 11, p. 689-694.

KANO, H.; KITAMURA, T. ; KOBAYASHI, Y. (1992). A sulfated proteoglycan from the red alga *Gracilaria verrucosa* is a hemagglutinin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. V. 102, p. 445-449.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PARDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. (2005). Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizome of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*. V. 66, p. 1933-1940.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*. V. 26, p. 219-230.

KILPATRICK, D. C. (1986). Carbohydrate and protein conformation. *Biochemical Journal*. V. 239, p. 808-806.

KILPATRICK, D. C.; PUSZTAI, G. G.; GRAHAM, C.; EWEN, W. B. (1985). Tomato lectin resists digestion in the mammalian alimentary canal and binds to intestinal villi without deleterious effects. *FEBS Letters*. V. 185, n° 2, p. 299-302.

KILPATRICK, D. C.; YEOMAN, M. M. (1978). Purification of the lectin from *Datura stramonium*. *Biochemical Journal*. V. 175, p. 1151-1153.

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. (1981). A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". *Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Nova lorque: Bog-Hansen e G. A. Spenger. V. 3, p. 3-6.

KOIKE, T.; TITANI, K.; SUZUKI, M.; BEPPU, H.; KUZUYA, K.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; FUJITA, K. (1995). The complete amino acid sequence of a mannose-binding lectin from "Kidachi aloe" (*Aloe arborescens* Miller var. *Natalensis* Berger). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 214, N° 1, p. 163-170.

KONOZY, E. H. E.; BERNARDES, E. S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L. J.; WARD, R. J. (2003). Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V. 410, p. 222-229.

KONOZY, E. H. E.; MULAY, R.; FACA, V.; WARD, R. J.; GREENE, L. J.; ROQUE-BARRIERA, M. C.; SABHARWAL, S.; BHIDE, S. V. (2002). Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. *Biochimie*. V. 84, p. 1035-1043.

KORTT A. A.; CALDWELL, J. B. (1990). Low molecular weight albumins from sunflower seed: identification of a methionine rich albumin. *Phytochemistry*. V. 9, p. 2805-2810.

KUBANEK, J.; ENTLICHER, G., KOCREREK, J. (1982). *Acta Biol. Med. Ger.* V. 41, p. 771-780. Appud: GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, D. R. (1986). *Isolation and Clinical Properties of Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. New York: Academic Press.

- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*. V. 227, p. 680-685.
- LAW, I. J.; KFIR, R. (1997). Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. V. 82, p. 261-265.
- LEATHEM, A. J.; BROOKS S. A. (1998). *Light Microscopy*. In: RHODES, J. M.; MILTON, J. *Lectin Methods and Protocols*. Ed Humana Press. p. 3-21.
- LEAVIT, R. D.; FELSTED, R. L.; BACHUR, N., R. (1976). Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 252, nº 9, p. 2961-2966.
- LeVINE, D.; KAPLAN, M. J.; GREENAWAY, P. J. (1972). The purification and characterization of wheat-germ agglutinin. *The Biochemical Journal*. V. 129, nº 4, p. 847-856.
- LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. (1986). *The Lectins: Properties, Function and Applications in Biology and Medicine*. New York: Academic Press. 600p.
- LIMPENS, E.; BISSELING, T. (2003) Signaling in symbiosis. *Plant Biology*. V. 6, p. 343-350.
- LINS, A. L. F. (1994). *Aspectos morfológicos e anatômicos de raízes do gênero Montrichardia cruger (Araceae)*. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Botânica. Porto Alegre. 92p.
- LIS, H.; SHARON, N. (1981). *Lectins in higher plants in the biochemistry of plants: a comprehensive treatise. Proteins and nucleic acids* (Marcos, a, 4 ed.). Ed. Academic Press, New York. V.6, p. 371-447.
- LIS, H.; SHARON, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Annual Review of Biochemistry*. Nº 5, p. 35-67.
- LIS, H.; SHARON, N. (1998). Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*. V. 98, nº 2, p. 637-674.
- LIU, W.; HU, Y.; WANG, M.; XIANG, Y.; HU, Z.; WANG, D. (2002). Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a novel mannose-binding lectin from *Gastrodia elata* with antifungal properties. *Biological Crystallography*. Nº 58, p. 1833-1835.
- LORENZI H.; SOUZA, H. M. (1999). *Plantas Ornamentais do Brasil: Arbustivas, Herbáceas e Trepadeiras*. 2ª ed. Nova Odessa: Plantarum. 1088p.
- LORIS, R. (2002). Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. Nº 1572, p. 198-208.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. V. 1383, nº 13, p. 9-36.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; EARR, A. L. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. V. 193, p. 265-275.
- LÚCIO, E. M. R. DE A. *Triagem Farmacológica e Triagem Fitoquímica*. In: SHARAPIN, N. (2000). *Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos*. Bogotá: Ed. Roberto Pinzón Sp. p. 197-206
- MACIEL, E. V. M.; ARAÚJO-FILHO, V. D.; KANAZAWA, M.; GOMES, Y. M.; COELHO, L. C. B. B.; CORREIA, M. T. S. (2004). Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*. V. 32, p. 57-60.
- MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; VAN DAMME; ELS, J. M.; CHRISPPEELS, M. J., LEUVEN, F. V.; PEUMANS, W. J. (1999). Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. *Phytochemistry*. V. 51, p. 721-728.
- MACHUKA, J. S. (2000). Characterization of seed proteins of velvet bean (*Macuna pruriens*) from Nigeria. *Food Chemistry*. N° 68, p. 421-427.
- MAKELA, O. (1957). Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. *Annales Medicinæ Experimentalis Biologiae*. V. 35, n° 3, p. 1-156.
- MANSFIELD, M. A.; PEUMANS, W. J.; RAIKHEL, N. V. (1998). Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosylated precursor. *Planta*. V. 173, p. 482-489.
- MARBAN-MENDONZA, N.; JEYPRAKASH, A.; JANSON H. B.; DAMON Jr, R. A.; ZURCKERMAN, B. M. (1987). Control of root-knot nematodes on tomato by lectins. *Journal of Nematology*. V. 19, p. 331-335. 1987.
- MARTINEZ-CRUZ, M.; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. (2001). Purification and characterization of a galactose specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle. *Biochimica et Biophysica Acta*. N° 1568, p. 37-44.
- MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. (1995). *Plantas medicinais*. Viçosa, Ed. da UFV, 220 p.
- MASASCHIN-SILVA, F.; AQÜILA, M. E. (2006). Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Acta Botânica Brasileira*, v. 20, n° 1, p. 61-69.
- MEDINA-BOLIVAR, F.; WRIGHT, R.; FUNK, V.; SENTZ, D.; BARROSO, L.; WILKINS, T. D.; PETRI, W.; CRAMER, C. L. (2003). A non-toxic lectin for antigen delivery of plant-based mucosal vaccines. *Vaccine*. V. 21, p. 997-1005.
- METCALFE, C. R. 1960. *Anatomy of the monocotyledons. Gramineae*. Tomo I. London: Oxford University Press, Amen Hause. P. 47-51.
- MEYER, K.; BASU, A.; RAY R. (2000). Funtional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virulogy*. V. 276, p. 214-228.
- MICUCCI, H. A.; CAMPS, E. (1987). Lectinas: Obtención, estructura química, propiedades, aplicaciones diagnósticas y farmacológicas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. V. 6, n° 1, p. 35-64.

- MILES, D. H.; TUNSUWAN, K.; CHITTAWONG, V.; KOKPOL, U.; CHOUDHARY, M. I.; CLARDY, J. (1993). Boll weevil antifeedants from *Arundo donax*. *Phytochemistry*. V. 34, n° 5, p. 1277-1279.
- MIRALLES, D. M.; MARÍM, C.; MAGNA, R.; FERNÁNDEZ-RAMOS, C.; ENTRALA, E.; CORDOVA, O.; VARGAS, F.; SÁNCHEZ-MORENO, M. (2002). *In vitro* culture and biochemical characterization of six trypanosome isolates from Peru and Brazil. *Experimental Parasitology*. V. 102, p. 23-29.
- MODY, R.; JOSHI, S.; CHARREY, W. (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal Pharmacological and Toxicological Methods*. V. 33, p. 1-10.
- MONKS, N. R.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MACHADO, K. R.; LIMA, M. F. S.; ROCHA, A. B.; SCHWARTZMANN, G. (2002). *In vitro* cytotoxicity of extracts from brasilian Asteraceae. *Pharmaceutical Biology*. V. 40, n° 7, p. 694-500.
- MONSIGNY, M.; ROCHE, A-C; KIEDA C.; MIDOUX, P.; OBRÉNOVITCH, A. (1988). Characterization and biological implications of membrane lectins in tumor. Lymphoid and myeloid cells. *Biochimie*, v. 70, p. 1633-1649.
- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; DE OLIVEIRA J. T. A.; AINOUZ, I. L. (1990). Plant lectins. Proceeding of the First Brazilian Congress on Proteins – COBRAP 90, 73-96.
- MOREIRA, E. A. (1979). Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb. e L. Stellfeldii R. Braga. Campanulaceae. *Tribuna Farmacêutica*. V. 47, n° 1, p. 13-39.
- MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; FERNANDES, A. G. F.; OLIVEIRA, J. T. A. (1993). Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. V. 5, n° 2, p. 127-132.
- MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO C. C.; MONTEIRO A. C. O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. (1998). Isolation and partial characterization of *Dioclea altissima* var. *Megacarpa* seed lectin. *Phytochemistry*. V. 2, p. 139-144.
- MOREIRA, R. A.; AINOUZ, I. L.; DE OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. (1991). Plant lectins, chemical and biological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 86, suplemento II, p. 211-218.
- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; DE OLIVEIRA J. T. A.; AINOUZ, I. L. (1990). Plant lectins. Proceeding of the First Brazilian Congress on Proteins – COBRAP 90, 73-96.
- MÜLLER, W. E. G.; CONRAD, J.; SCHRÖDER, C.; ZAHN, R. K.; KURELEC, B.; DREESBACH, K.; UHLENBRUCK, G. (1983). Characterization of trimeric, self-recognizing *Geodia cydonium* lectin I. *European Journal Biochemistry*. V. 133, p. 263-267.
- NAEEM, A.; KHAN, R. H.; WIKRAM, H.; AKIF, M. (2001). Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V. 396, n° 1, p. 99-105.

- NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH, C. J.; PRATES, M. V.; CALVET, J. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S. (2002). Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. *Current Pharmaceutical Design*. V. 9, nº 2, p. 159-166.
- NAGATA, Y.; BURGER, M. M. (1972). Wheat germ agglutinin. Isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry*. Nº 247, p. 2248-2254.
- NAJERA, M. T., SPEGAZZINI, E. D., ROSELLA, M. A., PFIRTER, G. B., MANDRILE, E. L. (1985). Análítica de *Panax ginseng* Meyer (Araliaceae) y espécies relacionadas. I micrografia. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. V. 4, nº 1, p. 19-26.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. (2000). LENINGER. *Principles of the Biochemistry*. Worth Publishers. 3ª ed., New york (USA), 1145p.
- NENOFF, P.; SUSS, K.; FLEMING, C.; HAUSTEIN, U. F. (2000). Differentiation of *Candida* strains by lectin mediated agglutination kinetics. *Mycoses*. V. 43, nº 3-4, p. 101-107.
- NETO, C. P.; NUNES, A. M.; COIMBRA, M. A.; DOMINGUES, F.; EUTUGUIN, D.; SILVESTRE, A.; CAVALEIRO, J. A. S. (1997). Variations in chemical composition and structure of macromolecular components in different morphological regions and maturity stages of *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*. V. 6, p. 51-58.
- NEUMANN, D.; LEHR, C. M.; LENHOF, H. P.; KOHLBACHER, O. (2004). Computational modeling of the sugar-lectin interaction. *Advances in Drug Delivery* Nº 56, p. 437-457.
- NG, T. B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. *Peptides*. V. 25, nº 7, p. 1215-1222.
- NICOLE, A.; MEADE, R. H. S.; SHARON, D. L.; DOYLE, R. J. (1980). Lectin-like activity from *Persea americana*. *Carbohydrate Research*. V. 15, p. 349-363.
- NICORA, E. G.; RÚGOLO DE AGRASAR, Z. E. (1987). Los generos de gramíneas de America Austral. Buenos Aires: Hemisferio sur. 611p.
- NOWAK, T. P.; HAYWOOD, P. L.; BARONDES, S. H. (1976). Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscle and a myogenic cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. V. 68, nº 3, p. 650-657.
- OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MURAKI, M. (2003). Cytoagglutination and cytotoxicity of wheat germ agglutinin isolectins against normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines-relationship between structure and biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta*. V. 1619, p. 144-150.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE G. (1989). *Fundamentos de farmacobotânica*. São Paulo. Ed. Atheneu. 216 p.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. (1991). *Farmacognosia*. Rio de Janeiro, Ed. Atheneu. 412p.

OLIVEIRA, J. T. A. (1996) Digestibility of plant lectins from Canavalia, Cratylia, Dioclea and genera in: *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. V. 11, p. 277-284.

OLIVEIRA, M. L.; BELTRAMINI, L. M.; DE SIMONE, S. G.; BRUMANO, M. H. N.; SILVA-LUCCA, R. A.; NAKAEMA, M. K. K.; PIRES, C. V.; OLIVEIRA, M. G. A. (2003). Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruit. *Brazilian Journal Plant Physiology*. V. 15, n°2, p. 119-122.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. (2001). Ricin. *Toxicon*. V. 39, p. 1713-1728.

OUCHTERLONY, O. (1948). *In vitro* method for testing the toxin-producing capacity of Diphtheria bacteria. *Acta Phathologica Microbiologica Scandinavica*. V. 25, p. 186-196.

PAJIC, I.; KLJAJIK, Z.; DOGOVIC, N.; ILADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, M. J. (2002). A novel lectin from the sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. V. 132, p. 213-221.

PALÁNOVÁ, L.; VOLF, P. (1997). Carbohydrate binding specificities and physico-chemical properties of lectins in various tissue of *Phlebotominae sandflies*. *Folia parasitológica*. V. 44, p. 71-76.

PALHARES, D.; SILVEIRA, C. E. S. (2005). Estudo anatômico de *Smilax goyazana* A. DC. (Smilacaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. V. 8, n° 1, p. 52-62.

PANYIM, S.; CHALHLEY, R. (1969). High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. V. 130, p. 337-346.

PARIJS, J ; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J., PNEUMANS, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*. V. 183, p. 258-262.

PARTRIDGE, J.; SHAMMAN, L.; GUMFIL, D. (1982). *Biochemistry Journal*. V. 203, p. 239-243. Appud: GOLDSTEIN, I., J.; PORETZ, D. R. (1986). *Isolation and Clinical Properties of Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. New York: Academic Press.

PASSALACQUA, N. G.; GUARRERA, P. M.; FINE, G. De. (2007). Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*. V. 78, p. 52-68.

PEUMANS W. J.; HAUSE, B.; VAN DAMME, J. M. (2000). The galactose-binding and manose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Letters*, v. 477, p. 186-192.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. M. (1998). Plant lectins: versatile proteins with important perspectives. *biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. V. 15, 199-228.

PEUMANS W. J.; VAN DAMME, E. J. M. (1996). Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends Food Science Technnology*. V. 7, p. 132-138.



- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. M. (1995). Lectins as plants defense proteins. *Plant Physiology*. V. 109, p. 2347-352.
- PEUMANS, W. J.; CAMMUE, B. P. A. (1986). Gramineae lectins: a special class of plant lectins. *Lectins. Biology-Biochemistry Chemical Biochemistry*. V. 5, p. 31-37.
- PEUMANS, W. J.; NEIMBA-LUNAKI, M.; PETERS, B.; BRACKAERT, W. F. (1985). Isolation and partial characterization of a lectin from ground alder *Aegopodium podagraria* rhizomes. *Planta*. V. 164, p. 75-82.
- PEUMANS, W. J.; DOLEY, M.; BRACKAERT, W. F. (1984). An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Letters*. V. 177, p 99-103.
- PEUMANS, W. J.; STINISSEN, H. M.; CARLIER, A. R. (1982). *Biochemistry Journal*. V. 203, p. 239-243. Appud: GOLDSTEIN, I., J.; PORETZ, D. R. (1986). Isolation and Clinical Properties of Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. New York: Academic Press.
- PONTE, J. J.; CAVADA B. S.; SILVEIRA-FILHO. (1996). Teste com lectina no controle de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. V. 21, p. 489-491.
- POTAPOV, M. I. (1968). *New anti-B lectins (Phytohemagglutinins) including high-grade anti-B1*. *Izvestiya Akaddemii Nauk Kazahskoi SSR Seriya Fisiologii i Meditsiny*. V. 5, set-out., p. 712-720.
- PRABU, M. M.; SANKARANARAYANAN, R.; PURI, K. D.; SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M.; SUGUNA, K. (1998). Carbohydrate specificity and quaternary association in basis winged bean lectin: x-ray analysis of the lectin at 2,5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. V. 276, p. 787-796.
- PRATAP, J. V.; AROCKIA, J.; RANI, P. G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A. ; VIJAYAN, M. (2002). Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- $\alpha$ -D-mannose: Implications to the generation of carbohydrate specificity. *Journal of Molecular Biology*. V. 317, p. 237-247.
- PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. (1996). Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycoscience Glycotechnology*. V. 8, p. 149-165.
- PUSZTAI, A.; PALMER, R. (1997). Nutricional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*); the toxic principle. *Journal Science Food Agriculture*. V. 28, p. 620-623.
- RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN. W.; CHULAVATNATOL, M. (2001). Interation of a mulberry leaf lectin with a phytopatogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. *Plant Science*. V. 160, p. 739-744.
- RAY, S.; CHATTERJEE, B. P. (1995). Saracin: A lectin from *Saraca indica* seed integument recognizes complex carbohydrates. *Phytochemistry*. V. 3, p. 643-649.
- REGO, E. J. L.; CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. (2002). Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). *Phytochemistry*. V. 60, p. 441-446.

- REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. (1999). Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*. V. 18, nº 5, p. 577-608.
- REYNOSO-CAMACHO, R.; MEJÍA, E. G.; LOARCA-PIÑA, G. (2003). Purification and acute toxicology of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). *Food and Chemical Toxicology*. V. 41, p. 21-47.
- RHODES, J. M.; MILTON, J. D. (1998). *Lectin Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press. 616p.
- RICHARDS, A. G.; RICHARDS, P. A. (1997). The peritrophic membranes of insects. *Annual Review of Entomology*, v. 22, p. 787-791.
- RIOS, F. J. B.; CAVADA, B. S.; MEDEIROS, D. A.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, L. M.; OLIVEIRA, J. T. A. (1996). Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. V. 11, p. 277-284.
- RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LÉCONTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS W.; ABAD, P. JOUANIN, L. (2003). Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Science*. Nº 4, p. 1-7.
- ROGERS, D, J.; HORI, K. (1993). Marine algal: new developments. *Hydrobiologia*, v. 260/261, p. 589-593.
- ROITT, I. M. (2003). *Imunologia*. 6ª ed. São Paulo: Manole, 481p.
- ROSENGURTT, B.; MAFFEI, B. R. A. de; ARTUCIO, P. I. de. (1970). *Gramineas uruguaias*. Montevideo: Universidad de la Republica. 489p.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, H. (2001). Plant lectin: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugates Journal*. V. 18, p. 589-613.
- RÜDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLIS D.; JIMENEZ-BERBERO, J. (2000). Medicinal chemistry based on the sugar code: Fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Current Medicinal Chemistry*. V. 7, nº 4, p. 389-416.
- RÜDIGER, H. (1998). Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. *Acta Anatomica*. V. 161, p. 130-152.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, H. (1993). Lectinologie: Geschichte, konzepte und pharmazeutische bedeutung. *Deutsche Apotheker Zeitung*. V. 133, nº 26, p. 15-36.
- RUETZE, M.; SCHIMITT, U. (1986). Glycol-methacrylat (GMA) als einbettungssystem für histologische untersuchungen von koniferen-Nadeln. *European Journal For Pathology*. V 16, nº 5-6, p. 321-324.
- SAMES, K.; SCHUMACHER, U.; HALATA, Z.; VAN DAMME, E. J.; MOLL, I. (2001). Lectin and proteoglycan histochemistry of merkel cell carcinomas. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. V. 49, nº 1, p. 19-28.

- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; FARNHAM, W. F. (1996). Seasonal variation in production of lectins by *Ulva lactuca*. *Clinical Biochemistry*. V. 11, p. 101-106.
- SANTIAGO, A. P.; SAAVEDRA, E. P.; CAMPOS, E.; CORDOBA, F. (2000). Effect of plant lectins on *Ustilago maydis in vitro*. *Cellular and Molecular Life Sciences*. V. 57, p. 1986-1989.
- SANTOS, R. I. (1999). Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Ed. da UFRGS e UFSC. Cap. 16, p. 323-354.
- SASAKI, T.; K. YAMAZAKI, K.; YAMORI, T.; ENDO, T. (2002). Inhibition of proliferation and induction of differentiation of glioma cells with *Datura stramonium* agglutinin. *British Journal of Cancer*. V. 87, nº 8, p. 918-923.
- SASS JE (1951). *Botanical microtechnique*. 2ª ed. Iowa State University Press, Ames. 228 p.
- SAUL, F. A.; ROVIRA, P.; BOULOT, G.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; TRUFFA-BACHI, P.; BENTLEY, G. A. (2000). Crystal structure of *Urtica dioica* agglutinin, a superantigen presented by MHC molecules of class I and class II. *Structure*. V. 8, nº 6, p. 593-603.
- SCATENA, V. L.; SCREMIN-DIAS, E. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. e CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (2003). Parênquima, colênquima e esclerênquima. *Anatomia Vegetal*. Viçosa: Editora UFV. Cap. 4. p. 109-127.
- SCHULTZ, A. (1985). *Introdução à Botânica Sistemática*. V. 2, 5º ed., Porto Alegre: Ed. UFRGS. 414p.
- SEGREST, J. P.; JACKSON, R. L. (1972). Molecular weight determination of glycoprotein by polyacrylamid gel eletrophoresis in sodium dodecyl sulphate. *Methods in Enzimology XXVIII, Complex Carbohydrates*. New York: Academic Press, 54-63 p.
- SHANGARY, S.; SINGH, J.; KAMBOJ., S. S.; KAMBOJ, K. K.; SANDHU, R. S. (1995). Purification and properties of four monocotyledoneae lectins from the family Araceae. *Phytochemistry*. V. 40, nº 2, p. 449-455.
- SHARON, N.; LIS, H. (1972). Lectins: cell-agglutination and sugar-specific proteins. *Science*. V. 177, nº 4053, p. 949-959.
- SHARON, N. (1977). Lectins. *Scientific America*. Nº 236, p. 108-119.
- SHARON, N.; LIS, H. (1987). A century of lectin research (1888-1988). *Trends Biochemical Science*. V. 12, p. 488-491.
- SHARON, N.; LIS, H. (1989). *Lectins*, London: Chapman e Hall. 127p.
- SHARON, N.; LIS, H. (1990). Legumes lectins-a large family of homologous proteins. *Federation of European Biochemical Societies*. V. 4, p. 3198-3208.

- SHARON, N.; LIS, H. (1993). Carbohydrates in cell recognition. *Scientific America*. V. 268, p. 74-81.
- SHARON, N.; LIS, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. V. 14, n° 11, p. 53-62.
- SHATALOV, A. A.; PEREIRA, H. (2002). Carbohydrate behaviours of *Arundo donax* L. in ethanol-alkali medium of variable composition during organo solvent delignification. *Carbohydrate Polymers*. V. 49, p. 331-336.
- SHOWALTER, A. M. (1993). Structure and function of plant cell proteins. *The Plant Cell*. V. 5, p. 9-23.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; WARREN, V. J. T.; BOKESCH H.; KENNEY S.; BOYD, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the Nacional Cancer Institute*. V. 82, n° 13, p. 1107-1112.
- SIKDAR, S.; CHATTERJEE, B. P. (1990). Chemical modification studies on a blood group A-specific lectin, Crotonin (*Crotalaria striata*) and its effect on hemagglutinating activity. *Molecular Cell Biology*. V. 96, p. 107-116.
- SILVA, G. S.; SOUZA, I. M. R.; CUTRIM, F. A. (2002). Efeito da incorporação de sementes trituradas de feijão de porco ao solo sobre o parasitismo de *Meloidogyne incognita* em tomateiro. *Fitopatologia Brasileira*. V. 27, p. 412-413.
- SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; MARINHO, J. R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. (2000). Na alkali single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*. V. 23, p. 241-245.
- SILVA S. C. (2000). *Purificação, caracterização parcial e propriedades de uma lectina Montrichardia linifera* (Arruda) Schott – Dissertação de Mestrado, UFRGS. 93 p.
- SIMONS, G.; REEVES, J. D.; GROGAN, C. C.; VANDENBERGHE, L. H.; BARIBAUD, F.; WHITBECK, J. C.; BURKE, E.; BUCHMEIER, M. J.; SOILEUX, E. J.; RILEY, J. L.; DOMS, R. W.; BATES, P.; PÖHLMANN, S. (2003). DC-SIGN and DC-SIGNR bind Ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virulogy*. V. 305, P. 115-123.
- SINGH, R. S.; TIUVARY, A. K.; KENNEDY, J. F. (1999). Lectins: sources, activities, and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. V. 19, n° 2, p. 145-178.
- SLADOWSKI, D.; STEER, S. J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. (1993). An improved MTT assay. *Journal of Immunological Methods*. V. 157, p. 203-207.
- SOEDJANAATMADJA, U. M. S.; SUBROTO, T.; BEINTEMA, J. J. (1995). Processed products of hevein precursor in the latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Federation of European Biochemical Societies*. V. 363, p. 211-213.
- SOL, F. G.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A. H.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. (2006). Lectinas. *Investigación y Ciencia*. V. 361, p. 58-67.

SONG, H.; BINH, V.; DUY, D. N.; JÜLIGER, S.; BOCK, T. C.; LUTY, A. J. F.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. (2003). Mannose-binding lectin gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. *Mutation Research*. Nº 522, p. 119-125.

SCIENCE, (ilustração da capa da revista). V. 291, nº 5512.

SPECK, O.; SPATZ, H-C. (2003). Mechanical properties of the rhizome of *Arundo donax* L. *Plant Biology*. Nº 5, p. 661-669.

STIRPE, F.; LICASTRO, F.; MORINI, M.C.; PARENTE, A.; SAVINO, G.; ABBONDANZA, A.; BOLOGNESI, A.; FALASCA, A.; ROSSI, C. A. (1993). Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from the latex of *Euphorbia marginata*. *Biochemical et Biophysica Acta*. V. 1158, p. 33-39.

TAHIROV, T. H.; LU, T.; LIAW, Y.; CHEN Y.; LIN, J. (1995). Crystal structure of abrin-a at 2,14 Å. *Journal of Molecular Biology*. V. 250, p. 354-367.

TAKAHASHI, T.; YAMADA, N.; IWAMATO, K.; SHIMABHAYASHI, I.; ISUTSU, K. (1973). *Agricultural and Biological Chemistry*. V. 37, p. 29-36. Appud: GOLDSTEIN, I., J.; PORETZ, D. R. (1986). *Isolation and Clinical Properties of Lectins: Properties, Functions and Applications in biology and Medicine*. New York: Academic Press. 600 p.

THIES, A.; MOLL, I.; BERGER, J.; SCHUMACHER, U. (2001). Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. *British Journal of Cancer*. V. 84, nº 6, p. 819-823.

TOWBIN, H.; STACHELIN, T.; GORDON, J. (1979). Eletroforetic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science*. V. 176, p. 4350-4354.

TSUDA, M. (1979). *Journal Biochemistry*. V. 86, 1451-1461. Appud: GOLDSTEIN, I., J.; PORETZ, D. R. (1986). *Isolation and Clinical Properties of Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. New York: Academic Press.

VALENTINER, U.; PFÜLLER, U.; BAUM, C.; SCHUMACHER, U. (2002). The cytotoxic effect of mistletoe lectins, I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cell lines *in vitro*. *Toxicology*. Nº 171, p. 187-199.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. (1987). Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Letters*. V. 215, nº 140-144.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. (1998). Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Plant Sciences*. V. 17, nº 6, p. 575-692.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A. (2004). Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends Plant Science*. V. 10, p. 484-489.

VARKI, A.; CUMMINGS, R.; ESKO, J.; FREEZE, H.; HART, G.; MARTH, J. (1997). *Essentials of Glycobiology*. Nova Iorque: CSHL Press, 653p.

- VERNERSSON, T.; BONELLI, P.R.; CERELLA, E. G.; CUKIERMAN. (2002). *Arundo donax* cane as a precursor for activated carbons preparation by phosphoric acid activation. *Bioresource Technology*. V. 83, p. 95-104.
- VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. (1986). *Botânica Organográfica*. 3ª ed. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV. 114 p.
- VILLANUEVA, M. A. (2002). Elimination of artifacts on native western blots arising from endogenous lectin activity. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. V. 50, nº 2, p. 494-502.
- VOZÁRI-HAMPE, M. M.; VIEGAS, C.; SAUCEDO, C.; ROSSETO, S.; MANICA G. G.; HAMPE, O. G. (1992). A lectin from *Sechium edule* fruit exudate. *Phytochemistry*. V. 31, nº 5, p. 1477-1480.
- WALLACE, D. (1979). Interactions of alleles in sporophytically controlled self incompatibility. *Theoretical and Applied Genetics*. Nº 54, p. 193-201.
- WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E. C.; LIU, W. K. (2000). Effects of lectins with different carbohydrate – binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. V. 32, p. 365-372.
- WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. (1992). *The grass genera of the world*. Cambridge: C. A. B. International, p. 326-329.
- WEDER, J. K. P.; TELEK, L.; VOZÁRI-HAMPE, M.; SAINI, H. S. (1997). Antinutritional factors in anasazi and other pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*. V. 51, p. 85-98.
- WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. (1996). Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annual Review of Biochemistry*. v. 65, p. 441-473.
- WESTERMEIER, R. (1997). *Electrophoresis in practice a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. 2ª ed. Weinheim: UCH. p. 195- 213.
- WITTSUWANNAKUL, R.; DHIRAYOS, W.; SAKULBORIRUG, C. (1998). A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry*. V. 47, nº 2, p. 183-187.
- WONGKHAM, S.; WONGKHAM, C.; BOONSIRI, P.; SIMASATHIANSOPHON, S.; TRISONTHI, C.; ATISOOK, K. (1995). Isolectins from seeds of *Artocarpus lakoocha*. *Phytochemistry*. V. 40, nº 5, p. 1331-1334.
- WRIGHT, C. S. (1997). New folds of plant lectins. *Carbohydrate and Glycoconjugates*. V. 7, nº 1997, p. 631-636.
- WU, A. M.; WU, J. H.; HERP, A.; CHOW, L.; LIU, J. (2001). Carbohydrate specificity of a toxic lectin, abrin A, from the seeds of *Abrus precatorius* (jequirity bean). *Life Sciences*. V. 69, p. 2027-2038.
- XU, X. C.; BRIN, C. K. U.; SCHAUER, A., GABIUS, H. J. (2000) Differential binding activities of lectins and neoglycoproteins in human testicular tumors. *Urological Research*, v. 28, nº 1, p. 62-68.

[www.co.monterey.co.us/ag/nax\\_weeds.htm](http://www.co.monterey.co.us/ag/nax_weeds.htm), em 20/01/2007.

YONG, N. M.; WATSON, D. C.; WILLIAMS, R. E. (1985). Lectins and legume chemotaxonomy. Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Bauhinia purpurea*. *FEBS Letters*. V. 182, nº 2, p. 403-406.

YOU, I. G. (2001). Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedereich antigen-binding lectins. *Journal of Cellular Physiology*. V. 186, nº 2, p. 282-287.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. (2004). Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Poaceae). *Iheringia*. V. 59, nº 2, p. 173-178.

ZATTA, P. F.; CUMMINGS, R. (1992). Lectins and their uses as biotechnological tools. *Biochemical Education*. V. 20, nº 1, p. 2-9.

ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. (1973). Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotatic factor. *Journal of Experimental Medicine*. V. 137, p. 387-410.

ZOCCATELLI, G.; PELLEGRINA, C. D.; VINCENZI, S.; RIZZI, C.; CHIGNOLA, R.; PERUFFO, A. D. B. (2003). Egg-matrix for large-scale single-step affinity purification of plant lectins with different carbohydrate specificities. *Protein Expression and Purification*. V. 27, p. 182-185.

ZUCKERMAN, B. M. (1983). Hypothesis and possibilities of intervention in nematode chemoresponses. *Journal of Nematology*. V. 15, p. 173-182.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)