

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**Purificação e Caracterização de uma proteína de semente de
soja (*Glycine max* L. Merr): Avaliação *in vitro* de atividades
antiagregante plaquetária e anticoagulante**

MARIANA CRISTINA CABRAL SILVA

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Orientadora

Profa. Dra. RUSSOLINA BENEDETA ZINGALI
Co-orientadora

Profa. Dra. MARIA LUIZA VILELA OLIVA
Co-orientadora

RECIFE, 2008

Purificação e Caracterização de uma proteína de semente de soja (*Glycine max* L. Merr): Avaliação *in vitro* de atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante

MARIANA CRISTINA CABRAL SILVA

Profa. Dra. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Orientadora

Profa. Dra. RUSSOLINA BENEDETA ZINGALI
Co-orientadora

Profa. Dra. MARIA LUIZA VILELA OLIVA
Co-orientadora

RECIFE, 2008

Silva, Mariana Cristina Cabral

Purificação e caracterização de uma proteína de semente de soja (*Glycine max* L. Merr): avaliação *in vitro* de atividade antiagregante plaquetária e anticoagulante. / Mariana Cristina Cabral Silva. – Recife: A Autora, 2008.

94 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – UFPE. CCB

1. Bioquímica 2. Proteína 3. Anticoagulação 4. Antiagregação I.Título

**577.1
572**

**CDU (2ª. Ed.)
CDD (22ª. Ed.)**

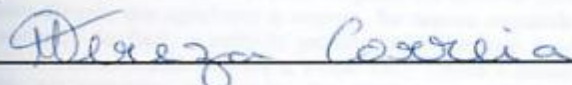
**UFPE
CCB – 2008 – 41**

MARIANA CRISTINA CABRAL SILVA

Purificação e Caracterização de uma proteína de semente de soja (*Glycine max* L. Merr): Avaliação *in vitro* de atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovada por:



Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Profa. Dra. Russolina Benedeta Zingali

Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel

Fevereiro/2008

Ata da defesa de dissertação da Mestranda **Mariana Cristina Cabral Silva**, realizada em 28 de fevereiro de 2008, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

Às 14:20 horas, do dia vinte e oito de fevereiro de 2008, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins – Depto. de Bioquímica, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, o ato de defesa de dissertação da mestranda **Mariana Cristina Cabral Silva**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica e Fisiologia/CCB/UFPE. Iniciando os trabalhos a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, ela própria, de suas co-orientadoras Professoras Doutoras Russolina Benedeta Zingali e Maria Luiza Vilela Oliva, bem como da Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores: Maria Tereza dos Santos Correia, na qualidade de Presidente, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, ambas do Depto. de Bioquímica/UFPE, Russolina Benedeta Zingali, do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ e Maria Inês Sucupira Maciel do Depto. de Ciências Domésticas, Alimentos Nutrição e Saúde/UFRPE. Após as apresentações, a Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Purificação e Caracterização de uma Proteína de Semente de Soja (*Glycine max* L. Merr): Avaliação *in vitro* de Atividades Antiagregante Plaquetária e Anticoagulante"**, e informou que de acordo com o Regimento Interno do Curso, a candidata dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pela aluna para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu à explanação e comentários acerca do tema em 45 (quarenta e cinco) minutos. Após a apresentação da mestranda, a Sra. Presidente convidou a Banca Examinadora para ocupar seus lugares e passou a palavra a primeira examinadora, Profa. Dra. Maria Inês Sucupira Maciel que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Russolina Benedeta Zingali, que agradeceu o convite, fez alguns comentários e sugestões, e iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Logo após, a Sra. Presidente passou a palavra para a Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, que agradeceu ao convite, fez alguns comentários e sugestões, iniciando sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita. Em seguida, a Sra. Presidente, na qualidade de orientadora, usou da palavra para tecer alguns comentários a respeito do trabalho da aluna, agradecer à Banca Examinadora e parabenizar a candidata. Finalmente, a sessão foi suspensa para proceder ao julgamento pela Banca Examinadora, a qual se reuniu na Secretaria do Curso. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2008.

[Assinaturas]
Maria Inês Sucupira Maciel.
BB Zingali
Tereza Correia

*Existe somente uma idade para a gente ser feliz,
somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível
sonhar e fazer planos
e ter energia bastante para realizá-los
a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.
Uma só idade para a gente se encantar com a vida
e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade
sem medo nem culpa de sentir prazer.
Fase dourada em que a gente pode criar e recriar a vida
à nossa própria imagem e semelhança
e vestir-se com todas as cores
e experimentar todos os sabores
e entregar-se a todos os amores sem preconceito nem pudor.
Tempo de entusiasmo e coragem
em que todo desafio é mais um convite à luta
que a gente enfrenta com toda disposição
de tentar algo NOVO, de NOVO e de NOVO, e quantas vezes for preciso.
Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se PRESENTE
e tem a duração do instante que passa.*

Mário Quintana

Dedico este trabalho às duas pessoas mais especiais e importantes na minha vida: meus pais, Ezenilton Silva e Maria de Fátima Silva, que sempre me dão forças e me apóiam na conquista de meus sonhos.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Diversidade das Proteínas	1
1.2 Purificação e Caracterização: Montando um Quebra-Cabeça	2
1.2.1 Etapas Prévias para a Purificação	2
1.2.2 A Versatilidade da Cromatografia para a Purificação de Proteínas	3
1.2.3 Caracterização Estrutural: Descobrimos a Proteína	4
1.2.3.1 Eletroforese	4
1.2.3.2 Sequenciamento do N-terminal	5
1.2.3.3 Dicroísmo Circular: Determinação de Estruturas Secundárias	6
1.2.3.4 Espectroscopia de Fluorescência	10
1.3 Imobilização: Por que Imobilizar Proteínas?	12
1.3.1 Sepharose CL Ativada com Brometo de Cianogênio: Excelente Suporte para imobilização de Proteínas	14
1.4 Lectinas: Proteínas de Reconhecimento a Carboidratos	16
1.4.1 Lectina de <i>Cratylia mollis</i> e suas Múltiplas Formas	18
1.5 Biomoléculas presentes em <i>Glycine max</i>	19
1.6 Hemostasia: Um Processo Dinâmico	20
1.6.1 Plaquetas	21
1.6.1.1 Ativação Plaquetária	22
1.6.1.2 Agonistas Plaquetários	23
1.6.2 Coagulação	23
1.6.3 Testes Laboratoriais Específicos para Avaliação da Função Plaquetária	25
1.6.3.1 Agregação Plaquetária	25
1.6.3.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa)	27
1.6.3.3 Tempo de Protrombina (TP)	27
1.6.4 Drogas Anticoagulantes	28
1.6.4.1 Heparina Não-Fracionada	28
1.6.4.2 Heparina de Baixo Peso Molecular (HBPM)	29
1.6.4.3 Anticoagulantes Orais	29
1.6.5 Proteínas e Glicoproteínas na Agregação Plaquetária e Coagulação	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos	31

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
4 ARTIGO	46
4.1 Title Pages	47
4.2 Summary	49
4.3 Text	50
4.3.1 Introduction	50
4.3.2 Materials and Methods	52
4.3.2.1 Materials	52
4.3.2.2 Isolation of Cramoll 1,4 Lectin	52
4.3.2.3 Lectin Immobilization	52
4.3.2.4 Purification of a soybean seed protein	53
4.3.2.5 Reversed-phase HPLC	53
4.3.2.6 Determination of peroxidase activity	53
4.3.2.7 SDS-PAGE	54
4.3.2.8 N-terminal Sequence	54
4.3.2.9 Spectroscopic Measurements	55
4.3.2.10 Platelet Aggregation	55
4.3.2.11 Determination of coagulation times (activated partial thromboplastin time – aPTT and prothrombin time - PT)	56
4.3.3 Results and Discussion	57
4.3.3.1 Isolation of ApcSP and Biochemical Characterization	57
4.3.3.2 Spectroscopic Properties	58
4.3.3.3 Biological Characterization	59
4.4 References	62
4.5 Legends to figures	66
4.6 Figures	68
5 CONCLUSÕES	76
6 ANEXOS	77
6.1 Normas para redação de artigos para a revista “The Journal of Biochemistry”	77
6.2 Resumos em Congressos	93

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e em especial a Deus, por toda força, esperança, fé, perseverança e paciência concedidas.

Aos meus queridos pais, Ezenilton Silva e Maria de Fátima Silva, por tudo que vocês fizeram por mim. Amo muito vocês!

Ao meu irmão Tiago Silva, pela paciência, amizade e companheirismo.

A minha orientadora Tereza Correia, pela confiança em mim depositada, orientação e amizade nestes cinco anos e meio. Obrigado Tereza por todas as oportunidades que você me concedeu!

A Profa. Dra. Patrícia Paiva, pela amizade e co-orientação.

A Profa. Dra. Luana Coelho, por todas as contribuições e ensinamentos científicos.

As Profa.s Dra.s Vera Menezes e Russolina Zingali pela oportunidade de estágio no Laboratório de Proteômica da UFRJ.

A Profa. Dra. Maria Luiza Oliva (Maysa), pela oportunidade de estagiar em seu laboratório (Unifesp) e pelos ensinamentos científicos.

Ao pessoal do Laboratório de Glicoproteínas (UFPE), onde tudo começou, meus eternos e sinceros agradecimentos, em especial a Roberto, Neila, Regina, Flávia, Adriana, Renata, Nathália, Mariana, Cynthia, Vanessa, Felipe, Luciana, Andréa Karla, Giselly, Lidiane, Romero, Fernando, Aleide, Walter e Andréa Santos.

Ao pessoal do LABENZ (UFPE), em especial a Caio e a Diego.

A amigas que sempre pude contar e estiveram ao meu lado, Tatiana Bertulino, Michele Silva, Rosane Vasconcelos e Amanda Lucena. Muito obrigado por sempre me ajudar e me apoiar nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica (Unifesp), muito Obrigado!!! A oportunidade do estagio não só criou laços profissionais como de amizade também. Em especial a Joana, Sônia, Ana Paula, Miti, Paula, Cláudia, Marlon, Sheila, Magda, Bruno, Fábio, Henrique, Mariana, Seu Manoel, Cássia, Tatiana e Cleide.

As Profa.s Dra.s Rosimeire de Lucca e Sônia Chudzinski e a Técnica Lucimeire Santana, muito obrigado por toda ajuda!

Ao pessoal do Laboratório de Proteômica (UFRJ) por todo apoio dado. Agradeço especialmente a Ana Cristina, Ana, Silas, Marjory e Patrícia.

A turma do mestrado 2006, em especial Jackeline, Rodrigo, Roberto e Ana Luiza.

A amigos que ao longo deste tempo me apoiaram, me ajudaram e que sempre serão especiais, Ana Ruth, Denise, Arthur, Regivaldo, René, Fernando, Daniela, Mauro, Shirley, Érika, David Néri e Aurélien.

Aos amigos matemáticos, em especial Marcelo, Joilson, Renata e Allyson.

A duas pessoas que me receberam de braços abertos em sua moradia por três meses em São Paulo, Seu Nilson e Nazaré. Muito Obrigado!

A Maria Reis, Neide, Míron, Djalma e Seu João por varias ajudas prestadas. Vocês são muito especiais.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Zaqueu Ramos, uma pessoa especial na minha vida, obrigado pela sua paciência, companheirismo e o seu carinho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para o andamento e finalização deste trabalho.

OBRIGADO!

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Esquema das etapas da Degradação de Edman	6
Figura 2 – Tipos de Conformação de Estrutura Secundária das Proteínas	7
Figura 3 – Espectros de Dicroísmo Circular das diferentes estruturas secundárias	9
Figura 4 – Espectros de Absorção e Emissão de Fluorescência	11
Figura 5 – Formação e Estrutura da Sepharose CL ativada com Brometo de Cianogênio	15
Figura 6 – Esquema da Imobilização de Lectinas em Sepharose CL ativada com Brometo de Cianogênio	17
Figura 7 – Sementes de <i>Glycine max</i>	19
Figura 8 – Mecanismos de Adesão e Agregação Plaquetária	21
Figura 9 – Morfologia de Plaquetas	22
Figura 10 – Cascata dos Fatores da Coagulação Sanguínea	24
Figura 11 – Modelo Tradicional de Agregação Plaquetária	26
Artigo	
Fig.1A. Purification of the ApcSP protein.	68
Fig.1B. Reversed-phase HPLC of ApcSP.	69
Fig.1C. SDS-PAGE of purified ApcSP protein.	70
Fig.2. Qualitative Peroxidase assay with Diaminobenzidine (DAB).	71
Fig.3. CD spectra of ApcSP in 1.0 M NaCl / 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0.	72
Fig.4. Fluorescence spectra of ApcSP at 25°C excited at 280 nm (solid line) and 295 nm (dashed line) in a concentration of 0.15 mg/ml at pH 7.0.	73
Fig.5. Evaluation the platelet aggregation in the presence of the ApcSP.	74
Fig.6. The influence of ApcSP in the blood coagulation.	75

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Grupos funcionais das proteínas participantes da Ligação Covalente com o Suporte de Imobilização	13
Tabela 2 – Propriedades da Sepharose	16
Tabela 3 – Lectinas Imobilizadas	18

RESUMO

Uma nova proteína de semente de soja (*Glycine max*), denominada ApcSP (antiplatelet and anticoagulant soybean protein) foi isolada, purificada e caracterizada bioquimicamente. A partir de extratos brutos destas sementes, foi realizado um fracionamento com sulfato de amônio, obtendo-se a fração F0-60%, com posterior submissão à cromatografia de afinidade em coluna de Cramoll 1,4-Sepharose. As proteínas adsorvidas eluídas com NaCl 1,0 M em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 foram submetidas à cromatografia de fase reversa HPLC. SDS-PAGE na presença de β -mercaptoetanol revelou uma banda polipeptídica de 51 kDa. Coloração com o reagente de Schiff revelou a natureza glicoprotéica de ApcSP. A sequência do N-terminal obtido pela degradação de Edman foi EGQFGPMIQS (10 resíduos), que apresenta 20% de homologia com a proteína albumina 2S tipo 3. O espectro de dicróismo circular foi característico de uma proteína predominantemente α -hélice, e este foi utilizado para estimar as contribuições das frações de estruturas secundárias presentes em ApcSP. Desconvolução usando o programa CDPro indicou a presença de 35% de alfa hélice, 17% de folhas-beta, 22 % de volta-beta e 26% de desordenada. O espectro de Fluorescência de ApcSP revelou uma emissão máxima em torno de 339 nm. A proteína da soja foi excitada em 280 nm e 295 nm, e os espectros de emissão foram monitorados na faixa de 290-450 nm e de 305-450 nm. Atividade peroxidásica foi detectada utilizando guaiacol e diaminobenzidina como substratos. Biologicamente, houve uma inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno (100% de amplitude e 98% de slope), trombina (79% de amplitude e 77% de slope) e ADP (62% de amplitude e 58% de slope) na concentração de 2 μ M de ApcSP em relação ao controle. Foi também avaliado o efeito da proteína de soja purificada nos tempos de coagulação, afetando as vias extrínseca e intrínseca da coagulação. O tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) foi bloqueado na concentração de 3 e 4 μ M, apresentando um R (Relação do tempo de coagulação com o tempo controle de coagulação) $> 7,5$. Estes resultados evidenciam que ApcSP com as atividades antiagregação plaquetária e anticoagulante pode ser de grande importância para a terapia anti-trombótica e anticoagulante.

Palavras-chave: Antiagregação; anticoagulação; Cramoll 1,4-Sepharose; *Glycine max*; glicoproteína.

ABSTRACT

A new soybean seed protein (*Glycine max*), called ApcSP (antiplatelet and anticoagulant soybean protein) was isolated, purified and biochemically characterized. From crude extracts of these seeds, an ammonium sulphate fractionation was performed, obtaining the fraction F0-60%, with subsequent submission to the affinity chromatography on Cramoll 1,4-Sepharose column. The adsorbed proteins eluted with 1.0 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 were submitted to the reversed-phase HPLC. SDS-PAGE at β -mercaptoethanol presence revealed a polypeptide band of 51 kDa. Staining by Schiff's reagent revealed the glycoprotein nature of ApcSP. The N-terminal sequence obtained by Edman's degradation was EGQFGPMIQS (10 residue), which shows 20% of homology with the soybean 2S albumin-wild type albumin 3. The circular dichroism (CD) spectrum was characteristic of proteins with high α -helical content, and this was used to estimate the contributions of secondary structure fractions present in ApcSP. Deconvolution using the program CDPro indicated the presence of 35% α -helix, 17% β -strand, 22% turn and 26% unordered structure. The fluorescence spectrum of ApcSP showed an emission maximum around 339 nm. The soy protein was excited in 280 nm and 295 nm, and the emission spectra were recorded in the range 290-450 nm and 305-450 nm. Peroxidase activity was detected using guaiacol and diaminobenzidine as substrates. Biologically, there was an inhibition of the collagen (100% amplitude and 98% slope), thrombin (79% amplitude and 77% slope) and ADP (62% amplitude and 58% slope) -induced platelet aggregation in the concentration of 2 μ M of ApcSP in relation to control. It was also evaluated the effect of the purified soy protein in the coagulation times, affecting the extrinsic and intrinsic pathways of the coagulation. The activated partial thromboplastin time (aPTT) was blocked in the concentrations of 3 and 4 μ M, showing a R (Relation coagulation time with coagulation control time) > 7.5. These results evidenced that ApcSP with platelet antiaggregation and anticoagulant activities can be of great importance for anti-thrombotic and anticoagulant therapy.

Key Words: Antiaggregant; anticoagulant; Cramoll 1,4-Sepharose; *Glycine max*; glycoprotein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Diversidade das Proteínas

Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes que ocorrem em todas as células. Podem ser encontradas em uma única célula, com enorme variedade de tamanho e função, e em diferentes compartimentos celulares (Lehninger, 2006). As proteínas exibem diversas funções biológicas, e devido a isto, durante vários anos, uma diversidade de proteínas vêm sendo purificadas e caracterizadas por diferentes métodos bioquímicos, que ao longo do tempo permitem um aprofundamento melhor dos níveis estruturais das proteínas.

Células de mamíferos possuem uma variedade de glicoconjugados, que podem participar de comunicações intercelulares. Uma dessas interações ocorre entre proteína e carboidrato. Lectinas, primeiramente descobertas em plantas, são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos. Devido a esta alta afinidade das lectinas a carboidratos, tornaram-se ferramentas moleculares importantes na identificação, purificação e caracterização de glicoproteínas específicas em células humanas (Shanmugham *et al.*, 2006). A descoberta das lectinas contribuiu para um grande impulso na moderna Glicobiologia, pois através destas, o mecanismo de ação em muitos sistemas biológicos foi compreendido. Várias lectinas de origens diferentes foram seqüenciadas, caracterizadas e suas funções biológicas compreendidas: lectina com atividade antifúngica (Boleti *et al.*, 2007); lectina com atividade inibitória do vírus citomegalovírus humano (Favacho *et al.*, 2007); atividade bactericida de amplo espectro e anti-inflamatória (Santi-Gadelha *et al.*, 2006); efeito antidepressivo (Barauna *et al.*, 2006); inibidor de várias linhagens de câncer (Kaur *et al.*, 2006) e inibição da transcriptase reversa 1 do HIV (Wang & Ng, 2006).

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa das enzimas, catalisadoras das reações dos sistemas biológicos. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico, todas as enzimas são proteínas (Lehninger, 2006). Diversas funções biológicas e tecnológicas têm sido atribuídas a estas proteínas: superóxido dismutase de alho com efeito antioxidante em linhagens celulares tumorais (Hadji *et al.*, 2007); remoção de componentes fenólicos de águas poluídas pelas peroxidases (Gómez *et*

al., 2006) e proteases utilizadas no amaciamento de carnes e extração de óleo de peixe (Shahidi & Kamil, 2001).

Assim, o estudo e a compreensão da base molecular das proteínas é de fundamental importância, não só visando o mecanismo de ação nos sistemas biológicos, como também suas aplicações industriais e tecnológicas.

1.2 Purificação e Caracterização: Montando um Quebra-Cabeça

1.2.1 Etapas Prévias para a Purificação

Os procedimentos de purificação de proteínas utilizam os princípios de separação com base nas propriedades físico-química das mesmas como carga, tamanho, propriedades de ligação e solubilidade. As células ou tecidos, que porventura possam contê-las, são rompidos por um processo de maceração ou homogeneização, denominado extração, obtendo-se os chamados extratos brutos. As extrações são realizadas em soluções tampão isotônicas ou em pH fisiológico; em temperatura ambiente ou variada (com a finalidade de evitar a desnaturação da proteína durante etapas posteriores de purificação). Existem, ainda, diversos métodos de purificação parcial utilizados para eliminar moléculas que não sejam de interesse (Baynes & Dominiczak, 2000).

A solubilidade da maioria das proteínas depende da concentração de sais dissolvidos, podendo ser potencializada pela adição de sal em uma baixa concentração, *salting-in*, ou pode ser reduzida por altas concentrações de sal, efeito denominado *salting out*. O fracionamento salino obtido pela adição de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, um dos sais de maior solubilidade, pode induzir a precipitação de algumas proteínas em uma alta concentração de sal (*salting out*), sendo um dos métodos utilizados para purificação parcial das proteínas (Lehninger, 2006).

A diálise é realizada pela adição da solução proteína-sal a uma membrana semipermeável, comumente uma membrana de celulose com poros, onde as moléculas de dimensões menores passam pelos poros e emergem no dialisado, fora da membrana, enquanto as maiores ficam retidas dentro do saco de diálise. Esta técnica é utilizada com o objetivo de separar as proteínas de moléculas pequenas, como sal, que podem interferir na interação das proteínas com suportes cromatográficos (Baynes & Dominiczak, 2000).

1.2.2 A Versatilidade da Cromatografia para a Purificação de Proteínas

A última etapa (ou últimas etapas) utilizada para purificação protéica, após os métodos de purificação parcial é a Cromatografia. Este método é baseado em duas fases, uma fase estacionária, que é um material sólido poroso com suas devidas propriedades químicas, mantido em uma coluna, e uma fase móvel, solução tamponada ou solvente orgânico que passa pela fase estacionária. A solução protéica percorre a matriz sólida, sendo a velocidade de migração dependente das propriedades químicas e físicas do suporte.

Na purificação de proteínas podem ser realizados diversos métodos cromatográficos (Labrou, 2003), como: Cromatografia de Filtração em Gel, onde as moléculas são separadas através do tamanho; Cromatografia de Troca Iônica, onde as proteínas serão separadas em função de sua carga; Cromatografia de Afinidade, técnica em que a proteína de interesse ficará seletiva e especificamente ligada ao ligante enquanto as demais proteínas passarão através do suporte na coluna. A proteína ligada pode ser eluída da coluna por uma alta concentração de sal, por desnaturação branda ou por uma forma solúvel do ligante ou seus análogos (Lehninger, 2006). A exploração dos princípios de afinidade para separação de moléculas foi desenvolvida por Starkenstein em 1910, que foi capaz de ligar α -amilase a um suporte, mas foi somente em 1968 que foi introduzida como conhecida atualmente por Cuatrecasas *et al.* (Labrou, 2003).

Atualmente, um refinamento dos métodos cromatográficos é HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Este método utiliza bombas de alta-pressão que aceleram a velocidade de migração das moléculas protéicas pela coluna, como também de suportes cromatográficos de melhor qualidade, que suportam a força do fluxo pressurizado. HPLC reduz o tempo de trânsito na coluna, assim limitando o espalhamento por difusão das bandas de proteínas, e portanto melhorando a resolução (Lehninger, 2006).

A Cromatografia Líquida de Fase Reversa (do inglês Reversed-phase HPLC) consiste de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a cromatografia convencional apresenta as polaridades invertidas (Oliver, 1998). O suporte geralmente é formado por partículas de sílica, cujo tamanho compreende entre 3 e 50 microns. O tamanho dos poros das partículas é mensurado em

angstroms e geralmente está compreendido entre 100 e 1000 angstroms. O tamanho dos poros ideal, para proteínas, é de 300 angstroms, e, para moléculas pequenas é de 100 angstroms. A fase estacionária compreende cadeias alquil hidrofóbicas ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) que interagem com o material. Existem três tipos mais comuns de cadeias de comprimentos diferentes utilizadas neste processo: C4, C8 e C18. As moléculas protéicas maiores possuirão mais sítios hidrofóbicos para interagir com a coluna e assim uma cadeia menor de comprimento se torna mais apropriada. Peptídios são moléculas menores e necessitam de cadeias hidrofóbicas de comprimento maior para serem capturados. Sendo assim, a C4 é geralmente empregada para proteínas, enquanto que a C8 e a C18 são para peptídios ou moléculas menores. Os solventes da fase móvel reversa são constituídos por um solvente aquoso (solvente A) e por um solvente orgânico: acetonitrila, metanol ou propanol (solvente B). O solvente A, que equilibra a coluna, é uma solução de ácido 0,1% em água e o solvente B (com o objetivo de eluição) é uma solução de um solvente orgânico (acetonitrila ou metanol) com o ácido 0,1%. O ácido (ácido fórmico, ácido trifluoracético ou ácido acético) é utilizado para melhorar o formato dos picos cromatográficos e para fornecer uma fonte de prótons (Oliver, 1998).

1.2.3 Caracterização Estrutural: Descobrindo a Proteína

1.2.3.1 Eletroforese

Em adição à Cromatografia, os métodos eletroforéticos são utilizados na caracterização de proteínas, para avaliar a pureza, massa molecular de subunidades e o caráter ácido ou básico da proteína. A separação das proteínas é baseada na migração destas em um gel, quando um campo elétrico é aplicado, sendo a velocidade de migração dependente da intensidade do campo, da carga líquida da proteína e do coeficiente de atrito. A eletroforese de proteínas é geralmente realizada em géis feitos de polímeros entrecruzados de poliacrilamida, que funcionam como uma peneira molecular, reduzindo a velocidade de migração das moléculas em proporção ao peso molecular de cada uma delas, por serem quimicamente inertes e devido ao tamanho de seus poros poderem ser controlados (Stryer, 1992).

1.2.3.2 Sequenciamento do N-terminal

Para sequenciar um polipeptídeo, usualmente emprega-se um método químico desenvolvido por Pehr Edman, a Degradação de Edman, num aparelho denominado seqüenciador. Este procedimento marca e remove apenas o resíduo aminoterminal de um peptídeo, deixando as demais ligações peptídicas intactas. O peptídeo reage com o fenilisotiocianato ($C_6H_5N=C=S$) sob condições alcalinas moderadas, convertendo o aminoácido do terminal amino até um aduto feniltiocarbamoil (PTC). A próxima ligação peptídica ao aduto PTC é posteriormente clivada em uma etapa realizada na presença do anidrido do ácido trifluoroacético, que remove o aminoácido do terminal amino como um derivado anilintiazolinona. Este aminoácido derivado é extraído com solventes orgânicos, convertidos a derivados feniltio-hidantoína mais estáveis por tratamento com ácido aquoso e depois identificado. Após a remoção e identificação do resíduo do terminal amino, o novo resíduo do terminal amino exposto pode ser marcado, removido e identificado pela mesma série de reações (Figura 1). O sequenciamento geralmente declina a precisão a medida que aumenta o tamanho do polipeptídeo, devendo ser quebrado por métodos químicos ou enzimáticos em tamanhos menores para um sequenciamento mais eficiente. Ligações dissulfeto, estando presentes, precisam também serem rompidas. Cada fragmento gerado é purificado e seqüenciado. Por fim, a ordem em que os fragmentos aparecem na proteína é determinada e as ligações dissulfeto, se existirem, são localizadas (Solomons, 1996; Lehninger, 2006).

Uma vez obtida a sequência da proteína em estudo, recorre-se aos chamados Banco de dados de seqüências, por exemplo, o **Sistema BLAST** (Basic Local Alignment and Search Tool – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) com a finalidade comparativa a seqüências já determinadas.

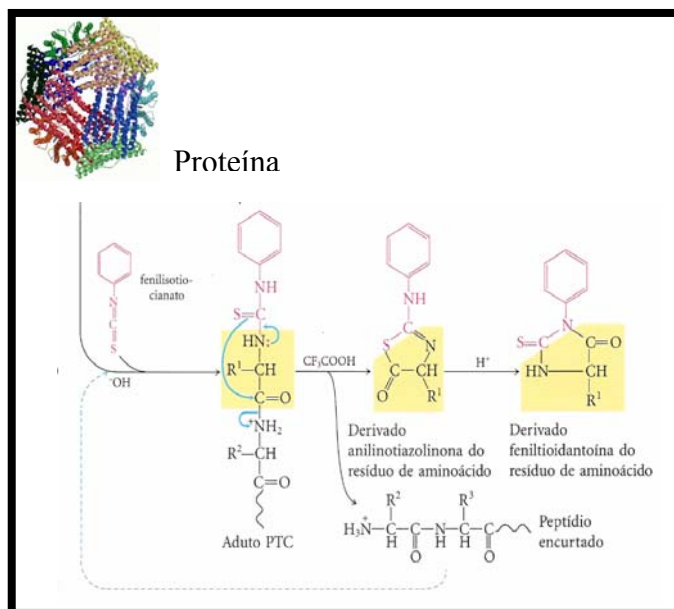


Figura 1 – Esquema das etapas da Degradação de Edman

Fonte: Lehninger, 2006. A proteína do esquema se trata da Ferritina (Macedo *et al.*, 2003).

1.2.3.3 Dicroísmo Circular: Determinação de Estruturas Secundárias

Existem quatro níveis de organização estrutural das proteínas. Cada proteína possui uma sequência definida de resíduos de aminoácidos, que constitui seu primeiro nível de organização, assim chamado de Estrutura Primária. O próximo nível, a Estrutura Secundária, refere-se ao arranjo regular do esqueleto da cadeia polipeptídica em α -hélices, folhas β e dobras β . O arranjo tridimensional geral de todos os átomos em uma proteína é referido como Estrutura Terciária. Algumas proteínas possuem duas ou mais cadeias polipeptídicas separadas, ou subunidades idênticas ou diferentes. O arranjo dessas subunidades em complexos tridimensionais constitui a Estrutura Quaternária (Venyaminov & Yang, 1996).

As estruturas secundárias foram primeiramente relatadas por Pauling e seus colaboradores em 1951. Nas α -hélices, o esqueleto polipeptídico está fortemente enovelado em hélice ao redor de um eixo imaginário, e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos projetam-se para o exterior do esqueleto helicoidal. Nas folhas β , o esqueleto da cadeia polipeptídica é estendido em ziguezague, sendo as cadeias adjacentes paralelas ou antiparalelas. A dobra β é uma dobra de 180° envolvendo quatro resíduos de aminoácidos

que conectam corridas sucessivas de α -hélices ou folhas β . Estas dobras freqüentemente ocorrem perto da superfície protéica.

As proteínas podem ser agrupadas em cinco classes de conformação estrutural secundária: - Toda α : Proteínas que possuem somente α -hélices como estrutura secundária; - Toda β : Proteínas formadas apenas por folhas β ; - $\alpha + \beta$: Proteínas que possuem α -hélices e folhas β freqüentemente em domínios separados; - α / β : Proteínas que apresentam segmentos intermisturados (α -hélices e folhas β) que freqüentemente se alternam ao longo da cadeia polipeptídica e – Desordenada: Incluem oligopeptídeos, polipeptídeos pequenos com pontes dissulfeto ou grupamentos prostéticos e proteínas desnaturadas (Figura 2).

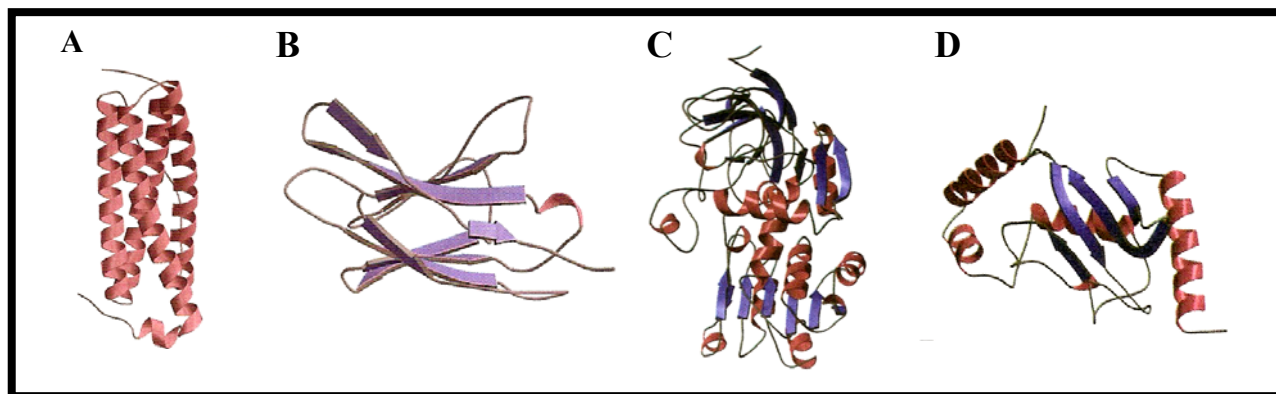


Figura 2 – Tipos de Conformação de Estrutura Secundária das Proteínas

(A) Toda α – Bacterioferritina; (B) Toda β – CD8; (C) α / β – Álcool Desidrogenase; (D) $\alpha + \beta$ – Enzima de Conjugação à ubiquitina (UBC). Fonte: Lehninger, 2006.

Dicroísmo Circular (CD – Circular Dichroism) é um método físico muito sensível à determinação estrutural e monitoramento de mudanças estruturais (acarretadas por solventes, pH, temperatura, força iônica e ligações específicas e não específicas) de biomoléculas devido à sua capacidade em discriminar as estruturas secundárias. Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para quantificar os componentes da estrutura secundária de uma proteína, para tanto utilizando um espectro de CD (Hennessey & Johnson, 1981; Toumadje *et al.*, 1992; Sreerama & Woody, 1993; Woody, 1995; Sreerama & Woody, 2000).

O CD é observado quando um cromóforo (molécula opticamente ativa) apresenta diferenças na absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, devendo ser assimétrico. Nas proteínas, os cromóforos são principalmente as ligações peptídicas, as

cadeias laterais dos aminoácidos e grupos prostéticos, que apresentam absorção de luz na região ultravioleta. A espectroscopia de CD é operada somente sob atmosfera de gás nitrogênio (Matsuo *et al.*, 2004). O espectro de CD na região ultravioleta (180 a 260 nm) possibilita a identificação dos diferentes tipos de estruturas secundárias (Woody, 1994).

O espectro de CD de proteínas Toda α (Figura 3A) demonstra uma banda positiva com máximo entre 191-193 nm e duas bandas negativas com mínimos em 208-210 nm e 222 nm, que são característicos da estrutura de α -hélices. As proteínas Toda β (Figura 3B) usualmente possuem uma banda negativa com mínimo entre 210 e 225 nm e uma banda positiva com máximo entre 190 e 200 nm, podendo variar consideravelmente entre diferentes proteínas que apresentam apenas folhas β . Para proteínas α/β (Figura 3C) e $\alpha + \beta$ (Figura 3D) freqüentemente apresentam duas bandas negativas com o mínimo em 208-210 nm e 222 nm e uma banda positiva com máximo em 190-195 nm, similar às proteínas Toda α . A classe das proteínas Desordenadas (Figura 3E) usualmente demonstram um espectro de CD com uma banda negativa com mínimo próximo a 200 nm, e alguns picos de banda entre 220 e 230 nm que podem ter sinais tanto positivos ou negativos (Venjaminov & Yang, 1996).

A estimativa da estrutura secundária é realizada utilizando programas, tais como o CDPro (Sreerama & Woody, 2000) e os dados expressos em elipticidade molar por resíduo de aminoácido $[\theta]$:

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{mdeg}}}{10 \cdot C \cdot I \cdot N}$$

Onde:

θ = Medida de CD em Miligraus;

C = Concentração da Proteína em Molaridade;

I = Caminho Óptico da cubeta em cm;

N = Número de resíduos de aminoácidos da proteína.

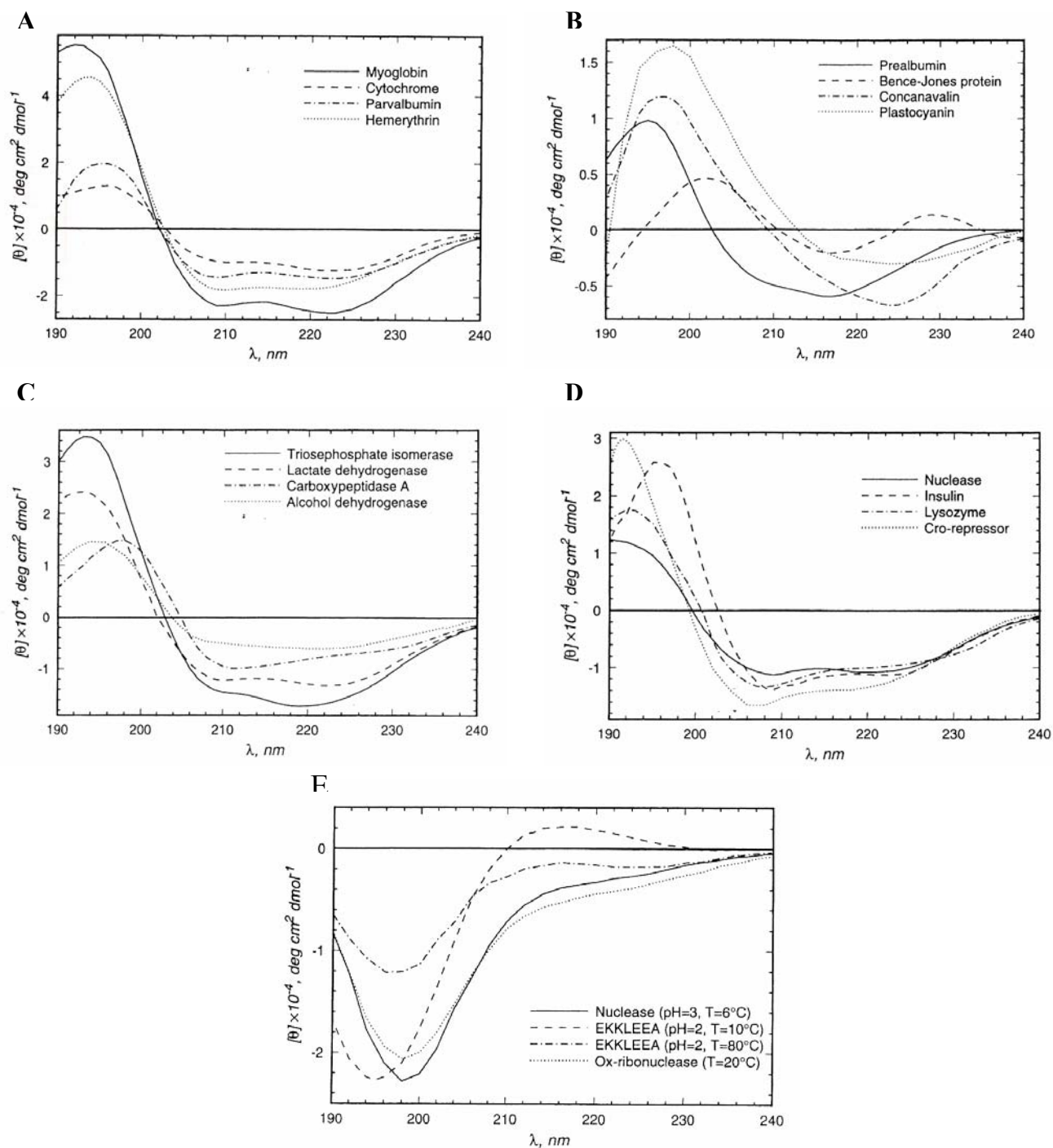


Figura 3 – Espectros de Dicroísmo Circular das diferentes estruturas secundárias
 (A) Proteínas Toda α ; (B) Toda β ; (C) α/β ; (D) $\alpha + \beta$; (E) Proteínas Desordenadas.

Fonte: Venyaminov & Yang, 1996.

1.2.3.4 Espectroscopia de Fluorescência

Algumas moléculas são capazes de emitir luz em estados excitados, fenômeno este denominado Luminescência, que está dividido em duas categorias: Fluorescência e Fosforescência. O fenômeno da Fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado fundamental para o estado excitado, e ao retornar ao estado fundamental, é acompanhado pela liberação de um fóton. Na Fosforescência, os átomos são excitados pela radiação visível, no que o difere da fluorescência onde os átomos são excitados com fótons ultravioleta. Neste fenômeno os átomos ficam excitados por longo tempo antes de emitirem fótons (Lakowicz, 1999).

A emissão de fluorescência tipicamente ocorre de moléculas aromáticas, tais como o fluoróforo quinina, presente em água tônica. Proteínas são moléculas que apresentam este fenômeno de emissão, ao contrário dos lipídios e carboidratos. Nas proteínas, a emissão de fluorescência ocorre pela presença dos resíduos de aminoácidos aromáticos: Triptofano (Trp), Tirosina (Tyr) e Fenilalanina (Phe), sendo o triptofano o fluoróforo intrínseco dominante. A emissão de fluorescência do triptofano é altamente sensível ao ambiente em que se encontra. Mudanças no espectro de emissão do triptofano podem ser devido a mudanças conformacionais, associação de subunidades, ligações a substratos ou desnaturação, ou seja, a técnica de Fluorescência é capaz de detectar mudanças estruturais ou conformacionais nas proteínas, monitorando assim modificações na estrutura terciária destas moléculas (Lakowicz, 1983).

O espectro de absorção e emissão destes aminoácidos está demonstrado na Figura 4. A emissão de fluorescência nas proteínas é dominada pelo triptofano, que absorve em maior comprimento de onda, assim, a energia absorvida pelos resíduos de tirosina e fenilalanina é frequentemente transferida para os resíduos de triptofano presentes na mesma proteína. A fenilalanina apresenta o menor comprimento de onda de absorção e emissão de energia. Sua emissão ocorre em um máximo de comprimento de onda de 282 nm. A emissão da tirosina em solução aquosa ocorre em 303 nm e independe da polaridade do solvente. A emissão máxima do triptofano em água ocorre próximo do comprimento de onda de 350 nm e é altamente dependente da polaridade do solvente e/ou ambiente em que se encontra.

Para emissão da fluorescência pelas proteínas, a excitação geralmente ocorre em um máximo de absorção próximo ao comprimento de onda de 280 nm ou em comprimentos maiores. Assim, fenilalanina na maioria dos experimentos não chega a ser excitada. A quantidade deste resíduo de aminoácido é muito pequena nas proteínas, tornando-se raro a emissão por estes resíduos. A absorção pelas proteínas em 280 nm é devido aos resíduos de aminoácidos triptofano e tirosina. Em comprimentos de onda maiores a 295 nm, o espectro de absorção é devido principalmente ao triptofano. A emissão de fluorescência pelo triptofano pode ser seletivamente excitado em 295-305 nm. Assim, o uso do comprimento de onda de 295 nm para a excitação é para evitar a excitação dos resíduos de tirosina (Lakowicz,1999).

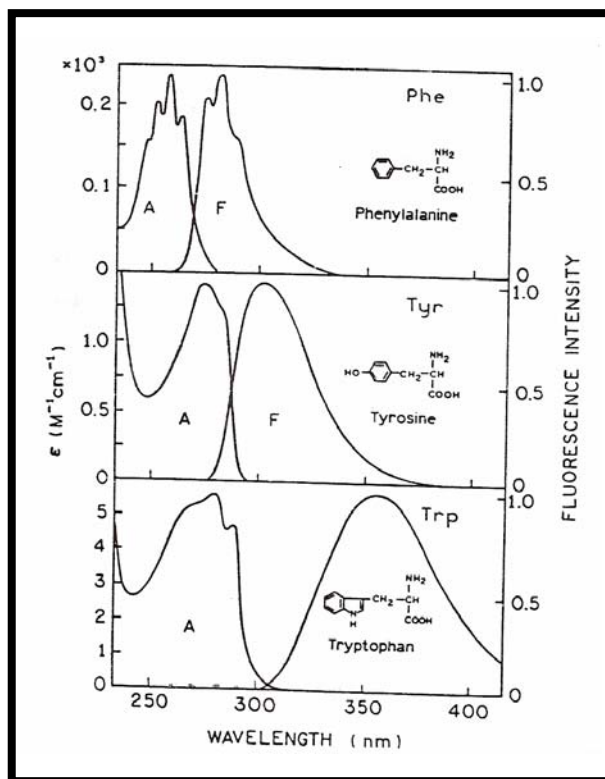


Figura 4 – Espectros de Absorção e Emissão de Fluorescência

Fonte: Lakowicz,1999.

1.3 Imobilização: Por que Imobilizar Proteínas?

Trevan em 1980 definiu a imobilização de enzimas como sendo um processo de separação física entre o catalisador e o seu meio de reação, de maneira que as moléculas do substrato e do produto possam difundir-se facilmente entre as duas fases. O método de Imobilização envolve o aprisionamento químico ou físico em um suporte solúvel ou insolúvel em água, de moléculas, tais como proteínas; carboidratos; ácidos nucleicos ou fármacos.

O comportamento das proteínas imobilizadas, nos últimos anos, tem atraído bastante interesse (Cheng *et al.*, 2006) em virtude da necessidade de purificação e separação de moléculas (Miranda *et al.*, 2002; Guo & Ruckenstein, 2003; Fraguas *et al.*, 2004; Schulze *et al.*, 2007) e suas aplicações biotecnológicas (Cheng *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2006).

Na interação entre proteínas e superfícies, certos fatores são essenciais: a conformação da proteína a ser imobilizada; possuir no mínimo um grupo funcional através do qual seja acoplado ao suporte ($-NH_2$; $-COOH$; $-CHO$; $-SH$ ou $-OH$), e que este não seja essencial para a sua função biológica; sua concentração na solução; pH do meio; método de imobilização e características químicas do suporte a ser utilizado.

Dentre as metodologias empregadas para a imobilização de biomoléculas, destacam-se: **Adsorção Física** – Processo em que a proteína adere à superfície do suporte, por meio de interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio (Rosevear *et al.*, 1987). É uma metodologia simples, mas que apresenta uma grande desvantagem de não adsorção das proteínas, devido a variação de pH, força iônica ou de temperatura (Kemeny & Challacombe, 1988). Os plásticos são os suportes mais utilizados neste processo. **Enclausuramento** – Inclusão da proteína a ser imobilizada no interior de polímeros, impedindo a difusão do elemento fixado, porém permitindo a livre difusão de outras moléculas. Os géis de poliacrilamida, ágar e agarose são as matrizes mais utilizadas no Enclausuramento (Coughlan *et al.*, 1988). **Ligação Covalente** – A proteína através de ligação covalente se liga a um suporte sólido. Esta ligação envolve diretamente os resíduos de aminoácidos e os grupos reativos da superfície do suporte. Na tabela 1 encontram-se os

principais grupos funcionais de resíduos de aminoácidos que podem participar da reação (Torchilin, 1991).

Tabela 1 – Grupos funcionais das proteínas participantes da Ligação Covalente com o Suporte de Imobilização

Grupo Funcional	Aminoácidos
Amida	Asparagina e Glutamina
Amina	Lisina
Carboxílico	Ácido Aspártico e Glutâmico
Fenol	Tirosina
Guanidina	Arginina
Hidroxila	Serina
Imidazol	Histidina
Indol	Triptofano
Mercaptometil	Metionina
Sulfidrila	Cisteína

De acordo com Kennedy e White (1985), é necessário o uso de métodos de ativação do suporte utilizado para imobilização, devido este não apresentar na sua maioria grupos reativos que se liguem diretamente à proteína. Esta ativação pode ser através de alquilação, reações de amidação, utilização de reagentes de condensação ou com brometo de cianogênio.

Ao final do processo de Imobilização por Ligação Covalente ocorre a obtenção de um imobilizado com alta estabilidade operacional, devido à força da ligação covalente entre a proteína e o suporte, capazes de formar ligações cruzadas com as moléculas protéicas e assim permitindo baixa lixiviação da proteína imobilizada (Kennedy & White, 1985).

Dentre os suportes que podem ser utilizados na imobilização de proteínas estão:

- Polietilenotereftalato - Dracon (Amaral *et al.*, 2006);
- Sepharose (Schulze *et al.*, 2007).

O suporte utilizado neste trabalho foi a Sepharose, devido seu alto rendimento de imobilização com a lectina Cramoll 1,4, formando assim o suporte desejado para a purificação de biomoléculas, denominado Cramoll 1,4-Sepharose.

1.3.1 Sepharose CL Ativada com Brometo de Cianogênio: Excelente Suporte para Imobilização de Proteínas

Sepharose é um gel em forma de grãos preparado a partir do polissacarídeo agarose. Este polissacarídeo é isolado de algas vermelhas, constituído de unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose, com cadeias laterais de 6-metil-D-galactose (Garrett e Grisham, 1995). Esta agarose é obtida por um processo de purificação que remove polissacarídeos carregados, formando um gel que possui somente um número muito pequeno de grupos carregados residuais. Para formação do gel, a agarose é aquecida até que as cadeias polissacarídicas individuais formem duplas hélices que subsequentemente se agregam para formar o gel estável (Figura 5A). A partir da formação da Sepharose, é possível a preparação das ligações cruzadas, formando a Sepharose CL (do inglês Cross Linked), através da reação da Sepharose com 2,3-dibromopropanol sob condições alcalinas extremas. O produto final é um gel de agarose com ligações cruzadas possuindo a mesma porosidade do gel inicial, mas com grande aumento de estabilidade termal e química (Figura 5B). Após as ligações cruzadas, o gel perde os grupos sulfato por hidrólise alcalina sob condições redutoras para a diminuição de grupos ionizáveis (Figura 5C).

A Sepharose CL ativada com brometo de cianogênio é produzida pela reação da Sepharose CL com o brometo de cianogênio. Neste suporte ocorre a imobilização de todos os tipos de proteínas e ligantes que contenham grupos amino primários. O brometo de cianogênio reage com os grupos hidroxil da Sepharose CL para formar imidocarbonatos cíclicos e acíclicos. Este suporte tem sido amplamente utilizado para a imobilização de proteínas devido condições suaves empregadas para obter um suporte com múltiplos pontos de ligação (Figura 5D).

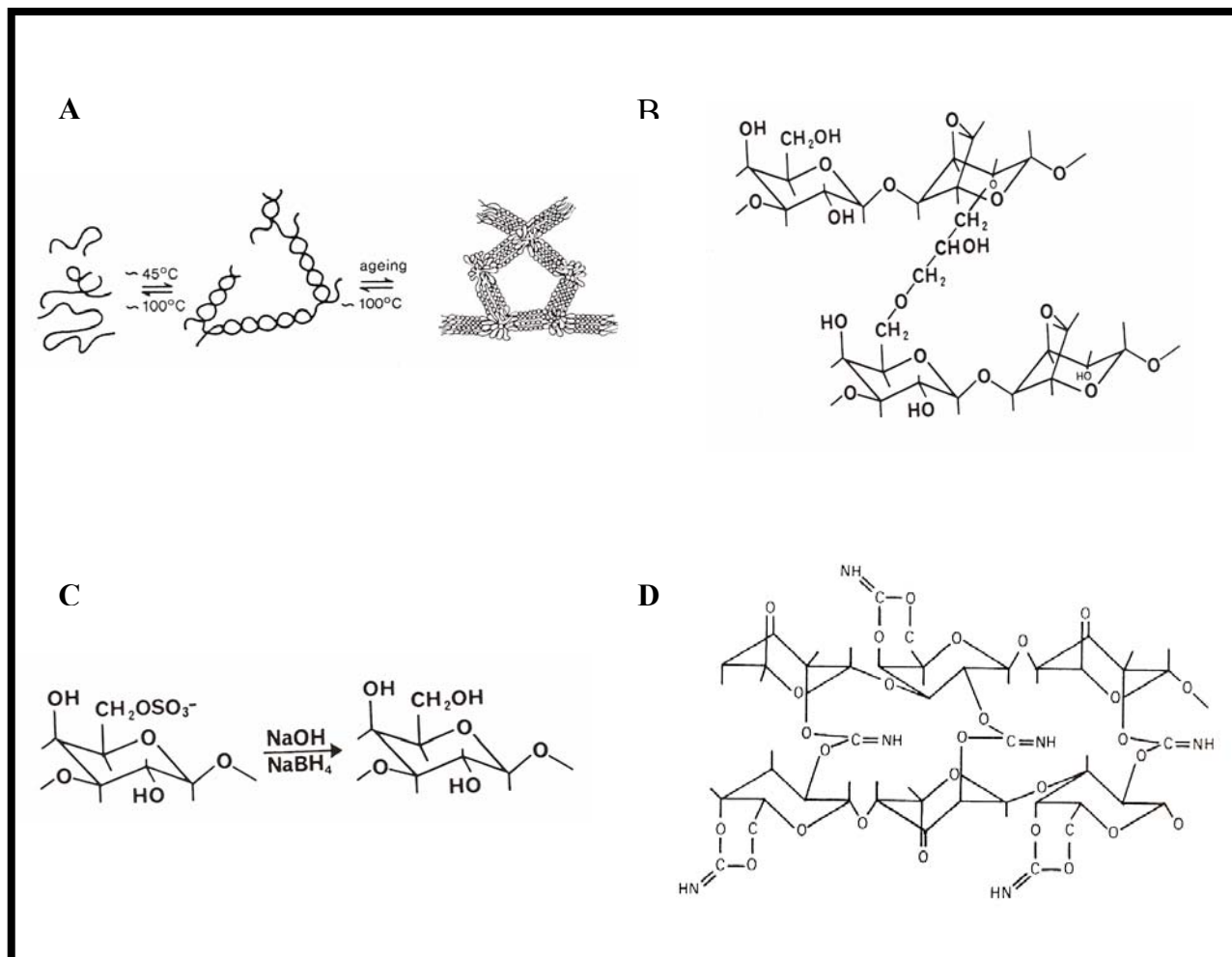


Figura 5 – Formação e Estrutura da Sepharose CL ativada com Brometo de Cianogênio

(A) Formação da Sepharose através do aquecimento da Agarose; (B) Estrutura das ligações cruzadas em Sepharose CL; (C) Perda dos grupos sulfato por hidrólise alcalina sob condições redutoras; (D) Sepharose após ativação com o brometo de cianogênio.

Existem três tipos de Sepharose com diferentes concentrações de agarose e tamanho dos poros (Tabela 2).

Tabela 2 – Propriedades da Sepharose

Tipo	Concentração de agarose (%)	Diâmetro dos poros (μM)	Peso Molecular das proteínas	Peso Molecular dos Polissacarídeos
Sepharose 2B	2	60 - 200	7×10^4 - 40×10^6	10^5 - 20×10^6
Sepharose 4B	4	45 - 165	6×10^4 - 20×10^6	3×10^4 - 5×10^6
Sepharose 6B	6	45 - 165	10^4 - 4×10^6	10^4 - 1×10^6

1.4 Lectinas: Proteínas de Reconhecimento a Carboidratos

Lectinas são glicoproteínas ou proteínas capazes de reconhecer e de se ligar reversivelmente a carboidratos sem alterar a estrutura covalente dos ligantes reconhecidos (Sharon, 2007). Possuem a habilidade de induzir o fenômeno de aglutinação celular e estão presentes em múltiplas formas moleculares, sendo obtidas com rendimentos de purificação consideráveis através de cromatografias convencionais, de afinidade ou de alta resolução. A promoção de aglutinação eritrocitária de extratos de plantas foi primeiramente identificado por Stillmark em 1888, pela observação de fatores tóxicos em *Ricinus communis* (Barondes, 1998).

Devido a certas lectinas distinguirem entre células normais e malignas (Dhuna *et al.*, 2005; Kaur *et al.*, 2006), como também reconhecer diferentes tipos de grupos sanguíneos humanos (Sharon 1993), estas proteínas têm sido extensivamente estudadas e usadas como ferramentas moleculares para o estudo da arquitetura de carboidratos e dinâmica na superfície celular durante a divisão celular, diferenciação e em processos malignos (Silva *et al.*, 2007).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microorganismos (Kirkeby *et al.*, 2006), animais (Dvoránková *et al.*, 2008) e plantas (Gong *et al.*, 2007).

Goldstein *et al.* (1980) define lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, interagindo com carboidratos, aglutinando células vegetais e ou de

animais, e precipitando polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. A origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboídratos que aglutinam células.

A interação entre lectinas e o seu carboidrato específico, ou grupos de carboidratos em oligossacarídeos ou glicoproteínas é realizada através de ligações fracas, tais como: pontes de hidrogênio, interação de Van der Waals e interações hidrofóbicas (Sharon & Lis, 2002), devido aos seus sítios de ligação que tendem a se localizar na superfície da molécula protéica.

A presença de lectinas, em diversas amostras, é detectada através de Atividade Hemaglutinante (AH), onde há formação de uma rede ou malha pela interação entre as proteínas e os carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos (Naeem *et al.*, 2007).

Várias lectinas vêm sendo imobilizadas em suportes inertes para a purificação de proteínas, glicoconjugados e outras moléculas. A cromatografia de afinidade utilizando lectinas imobilizadas como suportes, é usada para o isolamento de glicoproteínas como método de purificação, além de servir para analisar mudanças estruturais que ocorrem em carboidratos de glicoproteínas e de glicopeptídeos. A imobilização de lectinas ocorre através da reação de seus grupos amino aos resíduos imidocarbonato da Sepharose (Figura 6).

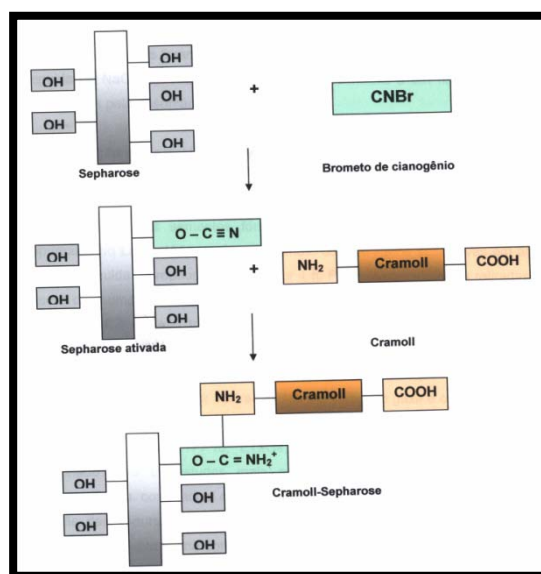


Figura 6 – Esquema da Imobilização de Lectinas em Sepharose CL ativada com Brometo de Cianogênio

Cramoll (Lectina de interesse): Lectina *Cratylia mollis*.

Fonte: Silva, 2006. Monografia.

Na tabela 3 estão demonstrados exemplos de aplicações biotecnológicas de lectinas imobilizadas.

Tabela 3 – Lectinas Imobilizadas

Lectina	Utilização	Referência
Cramoll-Sepharose	Isolamento de glicoproteínas plasmáticas humanas.	Lima <i>et al.</i> , 1997
	Isolamento de um inibidor de tripsina de <i>Echinodorus paniculatus</i> .	Paiva <i>et al.</i> , 2003
Con A-Sepharose	Purificação de ceramidase ácida humana recombinante.	Schulze <i>et al.</i> , 2007
	Purificação de uma fosfatase alcalina micelial sem atividade DNAase por <i>Aspergillus caespitosus</i> .	Guimarães <i>et al.</i> , 2007
WGA-Sepharose	Isolamento de glicoproteínas de <i>Epicoccum purpurascens</i> .	Kukreja <i>et al.</i> , 2007
	Purificação e Caracterização do transportador creatina expressa em altos níveis em células HEK293.	West <i>et al.</i> , 2005
	Purificação de uma proteína de 60 Kda de NPCs (Complexos de poro nuclear).	Wesierska-Gadek <i>et al.</i> , 2007

Cramoll: Lectina *Cratylia mollis*; Con A: Lectina Concanavalina A; WGA (Wheat-germ agglutinin): Lectina *Triticum vulgaris*.

1.4.1 Lectina de *Cratylia mollis* e suas múltiplas formas

Cratylia mollis Mart. (feijão camaratu ou camaratuba) é uma forrageira da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco; a planta pertence ao grupo *Phaseoleae*, subgrupo *Dioclineae*, que contém o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionada com a *Cratylia* (Correia & Coelho, 1995). Lectinas de sementes de *Cratylia mollis*, Cramoll, de reconhecimento glicose/manose (Cramoll 1, Cramoll 2 e Cramoll 4) e galactose específica (Cramoll 3), têm sido amplamente purificadas e caracterizadas em formas moleculares distintas (Paiva & Coelho, 1992; Correia & Coelho, 1995). Estas isoformas ou isolectinas vêm sendo aplicadas na caracterização de células transformadas (Beltrão *et al.*, 1998);

potencial eletroquímico da lectina livre e imobilizada (Souza *et al.*, 2003); atividade mitogênica em linfócitos humanos (Maciel *et al.*, 2004) e atividade antitumoral (Andrade *et al.*, 2004).

1.5 Biomoléculas presentes em *Glycine max*

Glycine max pertence a família Fabaceae (leguminosa), conhecida popularmente no Brasil como soja (do japonês shoyu). Os alimentos a base de soja têm sido consumidos a mais de 5000 anos nos países asiáticos (Xiao *et al.*, 2008), sendo esta leguminosa originária da China (Figura 7).

Evidências epidemiológicas sugerem que o consumo da soja está relacionado com a baixa de incidência de certas doenças, tais como: Distúrbios Coronarianos, Aterosclerose, Diabetes tipo 2, Osteoporose, Câncer de próstata e de mama (Xiao *et al.*, 2008), além da redução dos níveis de colesterol total e de LDL (Anderson *et al.*, 1995; Ascencio *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2004).

Em média, a soja possui 40% de proteínas, 20% de lipídios, 5% de minerais e 34% de carboidratos (açúcares como glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose), porém não possui amido (Hollung *et al.*, 2005).



Figura 7 – Sementes de *Glycine max*

Fonte: <http://www.clicmercado.com.br/noticias/noticias.asp?IDnoticia=15245>

1.6 Hemostasia: Um Processo Dinâmico

O mecanismo hemostático é o processo fisiológico e dinâmico que, ao nível do sistema vascular, permite em caso de lesão, que os tecidos sejam reparados e as suas funções reestabelecidas; evitar perdas sanguíneas, bem como a perda da fluidez do sangue (Guyton & Hall, 2006; Preissner, 2007; Aires, 2008). Este processo é regulado por diferentes mecanismos e inclui etapas como:

1. Vasoconstricção: Qualquer lesão vascular provoca uma vasoconstricção reflexa, diminuindo o fluxo sanguíneo local, favorecendo a interação dos fatores plasmáticos da coagulação (Castilho & Martínez-Vila, 1995; Guyton & Hall, 2006; Aires, 2008).
2. Adesão e Agregação Plaquetária: As plaquetas são os primeiros elementos atraídos ao local da lesão, devido a liberação de fatores da parede vascular ou do colágeno subendotelial, que facilita a aderência das plaquetas (Pelagalli *et al.*, 2003). Esta aderência à parede do vaso lesionado é mediada pelo fator von Willebrand, através da glicoproteína Ib e do complexo glicoproteína IIb-IIIa (Parise, 1999). As plaquetas ativadas, que apresentam carga elétrica negativa, são atraídas para o subendotélio vascular exposto, contendo colágeno com carga elétrica positiva. Estas plaquetas ativadas por sua vez começam a liberar fatores como a serotonina, fator vasoconstrictor que mantém a contração vascular inicialmente reflexa. O ADP (adenosina difosfato) plaquetário também é liberado, atraindo novas plaquetas para o local da lesão, formando um tampão plaquetário pela agregação destas plaquetas. O tampão plaquetário é mantido através da liberação de fatores vasculares (von Willebrand) e plaquetários (tromboxane A₂) enquanto é ativado o mecanismo de coagulação (Aires, 2008).

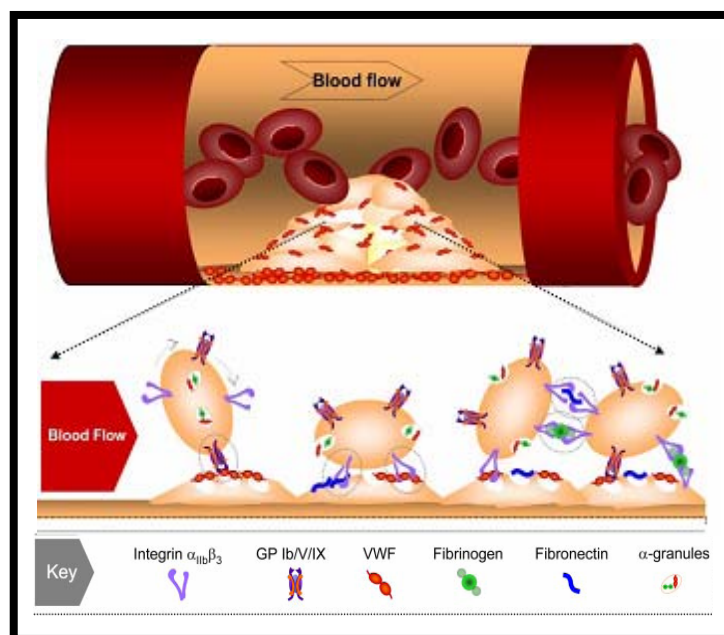


Figura 8 – Mecanismos de Adesão e Agregação Plaquetária

VWF: Fator de von Willebrand. Fonte: Jackson, 2007.

3. Coagulação: As proteínas plasmáticas da circulação, em decorrência do desequilíbrio atingido pela vasoconstrição e ativação plaquetária, iniciam sua ativação a partir das cininas (pré-caliceína). Como consequência, inicia-se um mecanismo sequencial, que ativa as demais proteínas ligadas à coagulação, formando uma rede de fibrina, que contém os glóbulos vermelhos em suas malhas, denominado coágulo sanguíneo (Kahner *et al.*, 2008).
4. Reparação da Parede Vascular: Uma vez formado o coágulo, inicia-se a ativação do mecanismo fibrinolítico que procura desfazer o coágulo formado, ao mesmo tempo que fatores do tecido vascular procuram refazer a parede vascular lesada (Guyton & Hall, 2006; Aires, 2008).

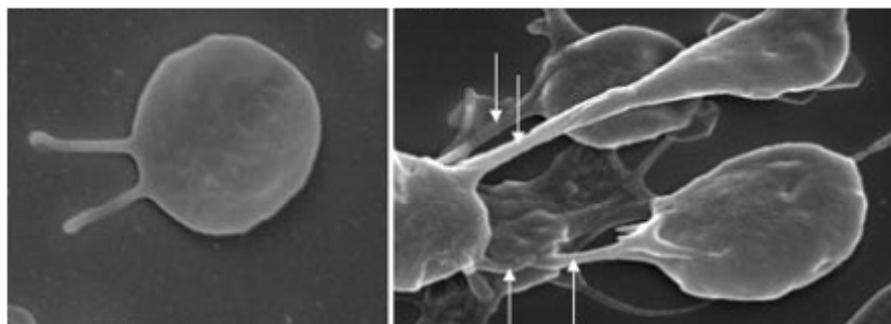
1.6.1 Plaquetas

As plaquetas ou trombócitos, são elementos ou parte do citoplasma de células denominadas megacariócitos, provenientes da célula primitiva (stem cell) da medula óssea (Italiano & Hartwig, 2007; Shah & Ma, 2007). Na circulação, as plaquetas possuem a

forma discóide (Figura 9) e são desprovidas de núcleo (Aires, 2008). O local principal de produção de plaquetas na idade adulta é na medula óssea (Guyton & Hall, 2006).

Possuem membrana celular lipoprotéica que contém glicoproteínas como receptores atuantes na ativação plaquetária. Uma vez decorrida a lesão vascular, ocorre a exposição da camada subendotelial, que estimula a aderência das plaquetas por ligação a receptores como a glicoproteína Ib-IX-V (Petrich *et al.*, 2007).

A



B

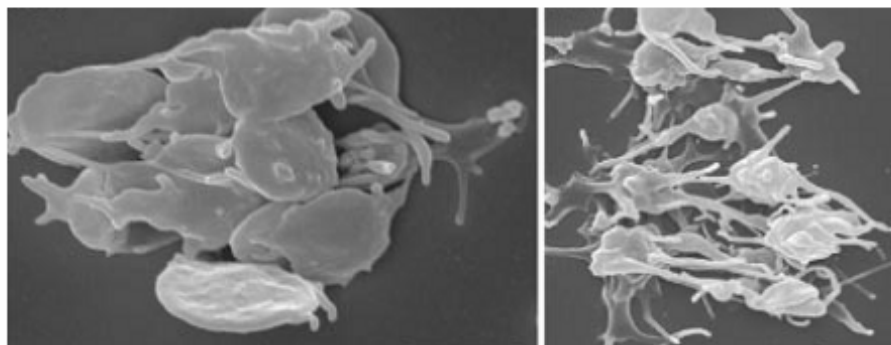


Figura 9 – Morfologia de Plaquetas

(A) Aderência da plaqueta mediada pelo Fator von Willebrand. (B) Agregação Plaquetária. Fonte: Jackson, 2007.

1.6.1.1 Ativação Plaquetária

A ativação plaquetária inicia-se através da ligação de um agonista aos receptores presentes na membrana plasmática plaquetária (Shattil & Newman, 2004). Dentre os agonistas fisiológicos participantes na ativação plaquetária destacam-se macromoléculas da matriz subendotelial como o colágeno; fator de von Willebrand; hormônios circulantes; trombina ou substâncias geradas por plaquetas ativadas como tromboxane A_2 , ADP e serotonina (Jackson, 2007). O colágeno, o fator de von Willebrand, adrenalina e a trombina

são agonistas que se ligam a receptores ativando enzimas que degradam fosfolipídeos (fosfolipase C e A_2) e suprimem a formação de AMP cíclico (AMP_c) (Castilho & Martínez-Vila, 1995).

1.6.1.2 Agonistas Plaquetários

- Adenosina Difosfato (ADP): A ligação de ADP nas plaquetas resulta em mudanças na forma destas; agregação plaquetária e inibição da estimulação do adenilato ciclase. De acordo com Murugappa & Kunapuli (2006) existem três receptores plaquetários para ADP, denominados $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ e $P2X_1$. O $P2Y_1$ é responsável pela mediação da agregação que esta acoplada a proteína G, mudança na forma das plaquetas e geração de tromboxano A_2 e o $P2Y_{12}$ apresenta funções muito similares ao receptor $P2Y_1$. O $P2X_1$ é responsável pelo influxo de cálcio e mudança na forma das plaquetas.

- Colágeno: Proteína insolúvel que induz ativação, adesão, liberação de grânulos e agregação plaquetária (Heemskerk *et al.*, 2005). Como receptores de colágeno, encontram-se a integrina $\alpha_2\beta_1$ (GPIIb/IIIa) e GPVI (Jung & Moroi, 2000). A ativação de plaquetas por colágeno resulta em um aumento da concentração de cálcio citosólico e mudanças em fosfoinositídeos (Heemskerk *et al.*, 1997; Siljander *et al.*, 2001).

- Trombina: Mais potente agonista plaquetário (Lopez *et al.*, 2007), ocasionando ativação da fosfatidilinositol 3-quinase; aumento intracelular da concentração de cálcio; fosforilação da miosina com conseqüente interação actina-miosina desencadeando a contração da plaqueta (Castilho & Martínez-Vila, 1995).

1.6.2 Coagulação

Quando ocorre lesão da parede vascular, ao mesmo tempo que se inicia o mecanismo hemostático pelas plaquetas, formando o tampão plaquetário, ocorre ativação do processo de coagulação, que pode decorrer por duas vias: Via Intrínseca e a Via Extrínseca (Mackman *et al.*, 2007). Pela Via Intrínseca, o fator contato ou fator XII é adsorvido sobre uma superfície carregada negativamente, enquanto que a adsorção do fator XI e da pré-caliceína se faz indiretamente através do cininogênio de alto peso molecular. A pré-caliceína interage com o fator XII provocando sua ativação. O fator XII ativado ativa o

fator XI que, por sua vez, ativa os fatores da coagulação seguinte (Gailani & Renné, 2007). Na Via Extrínseca ocorre a participação de fatores teciduais, dependente apenas de cofatores e proteínas encontradas no plasma. O fator tissular entra em contato com o sangue formando um complexo com o fator VII, ativando-o (Mackman *et al.*, 2007). Este fator ativado por sua vez ativa o fator X, seguindo assim a Via Comum das Vias Intrínseca e Extrínseca da Coagulação (Figura 10).

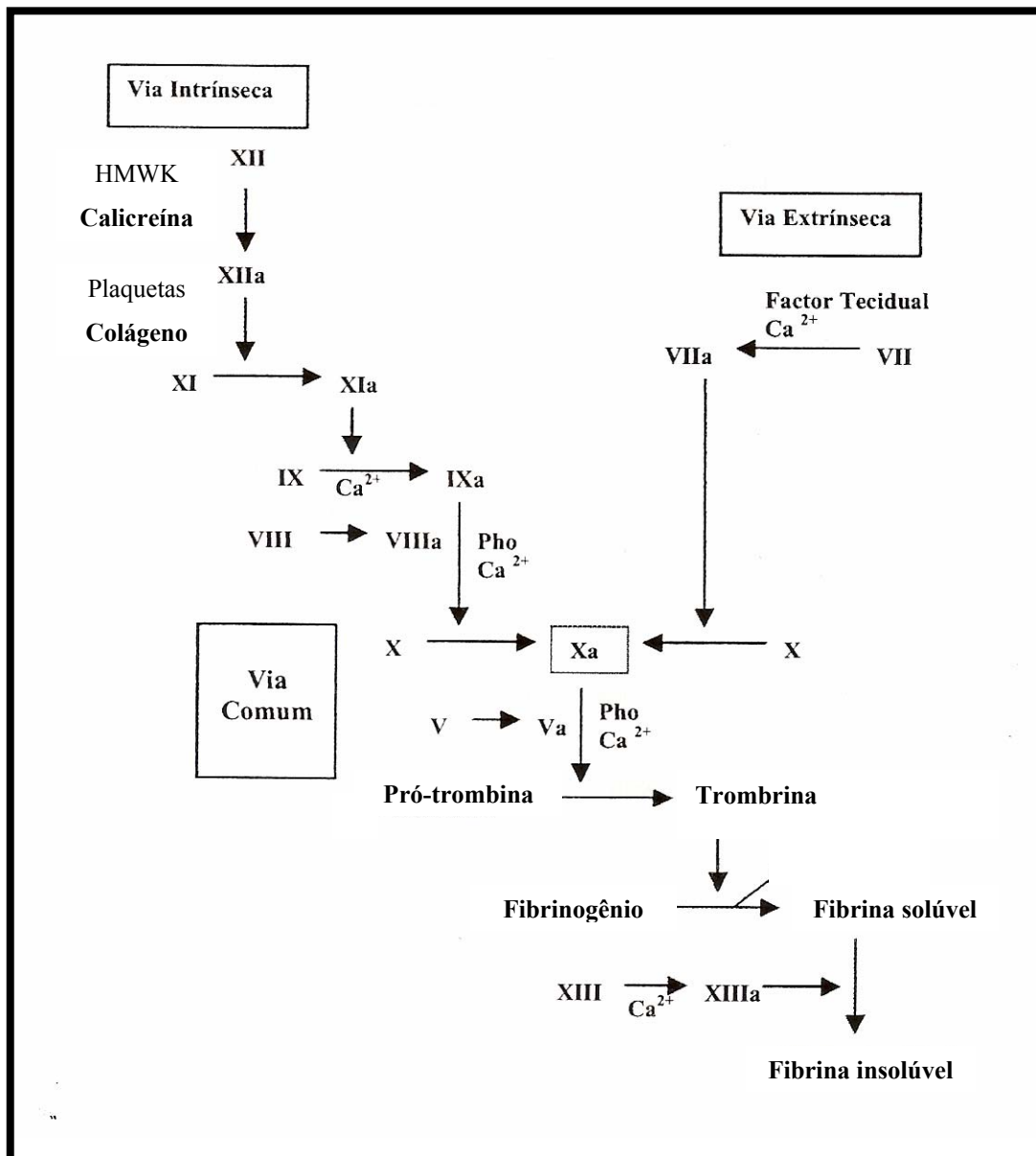


Figura 10 – Cascata dos Fatores da Coagulação Sanguínea
 HMWK: Cinínogênio de alto peso molecular; Pho: Fosfolipídios.

1.6.3 Testes Laboratoriais Específicos para Avaliação da Função Plaquetária

Avaliação da agregação plaquetária e da coagulação é de caráter fundamental, visto que a inapropriada ativação plaquetária e subsequente formação de trombos podem acarretar quadros clínicos drásticos, levando a uma Aterosclerose Arterial ou Tromboses (Handin, 1996; Ruggeri, 2002; Badimun & Vilahur, 2007). Os testes laboratoriais utilizados estudam a agregação, a secreção e a atividade coagulante das plaquetas e são realizados *in vitro*.

1.6.3.1 Agregação Plaquetária

Procedimento realizado em equipamentos denominados agregômetros, onde em um plasma rico em plaquetas contendo citrato, denominado PRP, será adicionado um agonista (ADP, colágeno, trombina, ristocetina, etc...). O agregômetro mede uma combinação de absorção e dispersão de luz (Figura 11). Adicionando um agonista, diminui a transmissão de luz devido à mudança das formas das plaquetas (de discóides para esféricas). Logo a seguir, com a agregação plaquetária, ocorre um aumento gradual na transmissão da luz (Shah & Ma, 2007). A agregação plaquetária é influenciada pelo pH do meio; temperatura; o tipo de coagulante utilizado, a concentração de plaquetas e o uso de medicamentos pelos pacientes doadores do sangue.

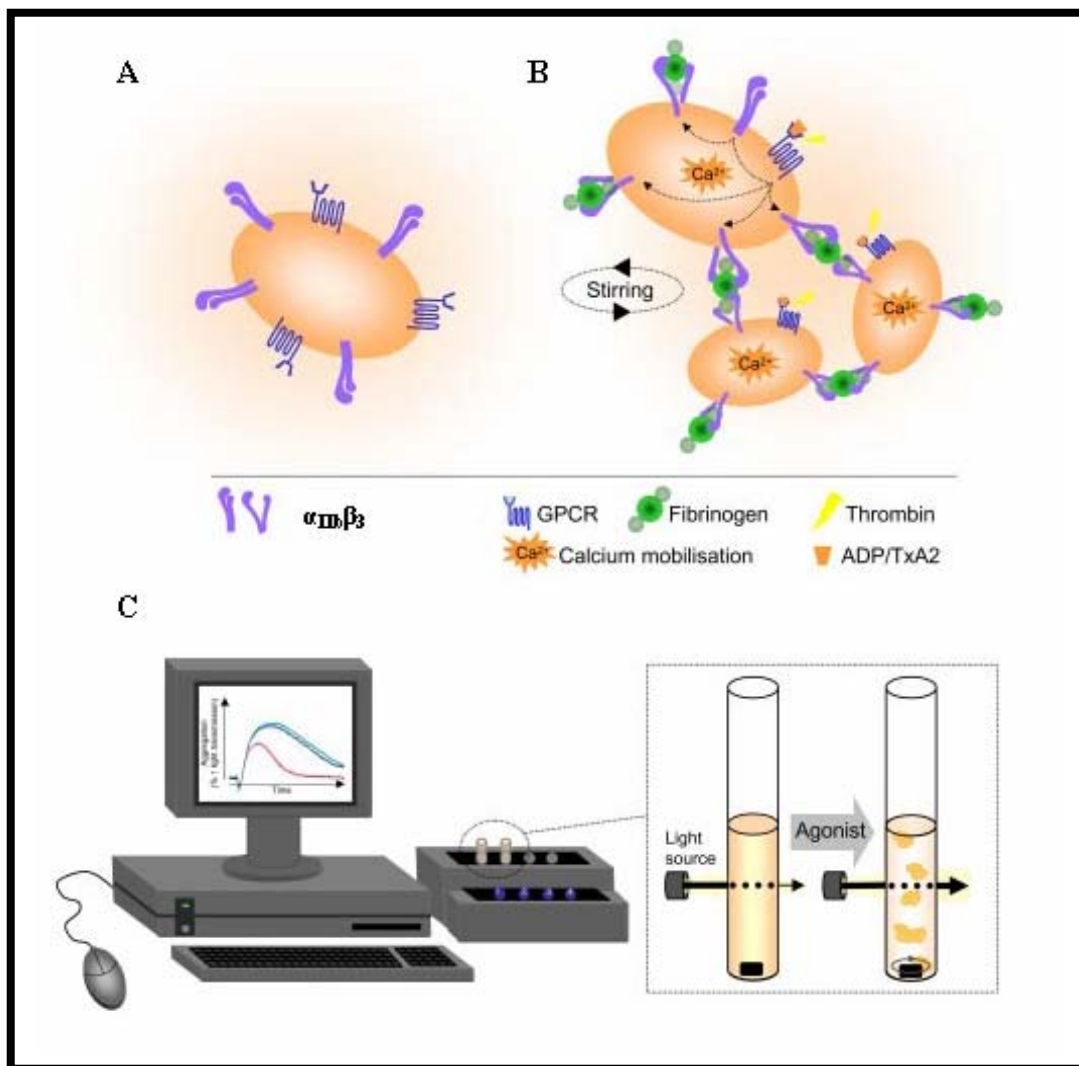


Figura 11 – Modelo Tradicional de Agregação Plaquetária

(A) Plaqueta com uma de suas integrinas presentes na superfície plaquetária. (B) Representação do mecanismo de agregação plaquetária. Três elementos têm sido identificados como essenciais na agregação plaquetária: Um estímulo de ativação (geralmente um agonista solúvel); uma proteína plasmática (predominantemente o fibrinogênio) e um receptor de superfície plaquetária (integrina GP IIb-IIIa). (C) O agregômetro envolve incubação a 37°C com posterior agitação de uma suspensão de plaquetas na presença de um ativador plaquetário (agonista) e pela monitorização das mudanças na transmissão de luz. ADP: Adenosina difosfato; TxA₂: Tromboxano A₂. Fonte: Jackson, 2007.

1.6.3.2 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa):

O TTPa é utilizado para avaliar a Via Intrínseca da cascata da coagulação sanguínea, que envolve os fatores XII, XI, IX, VIII, a pré-caliceína e o cininogênio de alto peso molecular; na detecção de anticorpos lúpicos e para monitorização laboratorial da heparina. Este teste também avalia a Via Comum (fatores X, V, II e I) da cascata da coagulação (Zago *et al.*, 2004). No Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada utilizam-se substitutos de fosfolípidos plaquetários como a cefalina ou a inositina que são tromboplastinas parciais, incapazes de ativar a Via Extrínseca. No plasma devidamente coletado em tubos plásticos siliconizados contendo solução de citrato de sódio 3,8%, é colocado um destes fosfolípidos, um ativador por contato e cálcio (Emeis *et al.*, 2007). O registro do TTPa será o tempo em que o plasma leva a coagular. O valor normal de referência está entre 26 e 33 segundos para formação do coágulo (Goodman & Gilman, 2007). O tempo de tromboplastina parcial ativada pode estar prolongado em casos de deficiência dos fatores I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII, pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular ou na presença de inibidores destes fatores (Zago *et al.*, 2004). Em casos clínicos de doenças hepáticas, coagulação intravascular disseminada e várias transfusões sanguíneas, além da terapêutica com a administração de anticoagulantes orais em altas doses (heparina) pode também acarretar no prolongamento do TTPa (Zago *et al.*, 2004).

1.6.3.3 Tempo de Protrombina (TP):

O Tempo de Protrombina (TP) avalia a Via Extrínseca da cascata da coagulação, como também a Via Comum. Reflete alterações do fibrinogênio, em três dos fatores dependentes da vitamina K (fatores II, VII e X) e do fator V (Zago *et al.*, 2004). Este teste consiste na adição a um plasma devidamente coletado em tubos plásticos siliconizados contendo solução de citrato de sódio 3,8% de uma tromboplastina equivalente à tromboplastina tecidual e cálcio (Emeis *et al.*, 2007), ocasionando o início do mecanismo da coagulação, com a formação do coágulo em um período específico. A Organização Mundial de Saúde (OMS) para minimizar a enorme discrepância entre os diferentes tipos de testes que avaliam o TP, sugeriu que as tromboplastinas fossem padronizadas segundo uma preparação de referência internacional, criando o International Sensitivity Index (ISI).

Assim, os resultados do TP podem ser expressos como International Normalized Ratio (INR), que representa a razão entre o TP do paciente e o TP de referência em segundos. A variação normal do INR encontra-se na faixa entre 0,9 e 1,2. Um prolongamento do INR pode ser devido a deficiência dos fatores I, II, V, VII e X, como também deficiência de vitamina K. Em casos clínicos de doenças hepáticas, coagulação intravascular disseminada e várias transfusões sanguíneas, além da terapêutica com a administração de anticoagulantes orais em altas doses (heparina) pode também acarretar no prolongamento do TP como ocorre no TTPA. O uso do anticoagulante heparina provoca um prolongamento do INR que pode variar entre 2 e 3 na doença tromboembólica venosa; entre 3 e 3,5 na trombose recorrente ou em caso de Lúpus e entre 2,5 e 3,5 em pacientes com prótese valvular (Zago *et al.*, 2004).

1.6.4 Drogas Anticoagulantes

1.6.4.1 Heparina Não-Fracionada

Heparina trata-se de uma família de mucopolissacarídeos, com variação do tamanho das cadeias, cuja atividade anticoagulante deve-se a ligação com dois anticoagulantes naturais: a antitrombina III, que possui atividade de inibição da trombina e dos fatores da coagulação X, IX e XI; e o co-fator II da heparina, que inibe apenas a trombina (Tamada *et al.*, 2002; Castilho & Martínez-Vila, 1995; Goodman & Gilman, 2007). Na presença de um quadro clínico de Trombose é necessário uma quantidade maior de heparina para prevenir a extensão de um trombo, pois o próprio organismo possui meios de se defender contra a atividade anticoagulante da heparina. O fator X ativado ligado as plaquetas e a trombina ligada ao endotélio não sofrem ação inibitória da antitrombina III (Castilho & Martínez-Vila, 1995). As plaquetas também interferem com a função da heparina, pois secretam o fator plaquetário IV, que possui ação inibitória da heparina. A administração da heparina é realizada por via parenteral, uma vez que esta não é absorvida pelo trato gastrointestinal (Goodman & Gilman, 2007). Uma das principais consequências decorrida da administração da heparina é a hemorragia, podendo ocorrer principalmente no trato gastrointestinal, urinário e na pele (Goodman & Gilman, 2007).

1.6.4.2 Heparina de Baixo Peso Molecular (HBPM)

A Heparina de Baixo Peso Molecular (HBPM) é formada pelos fragmentos de heparina não fracionada, obtidas através de métodos de fracionamento (gel-filtração; ultrafiltração, precipitação com álcool) ou através de métodos de despolimerização química ou enzimática (ácido nitroso, esterificação e despolimerização alcalina), apresentando baixo peso molecular (5×10^3 a 15×10^3) em relação à heparina não fracionada (3×10^3 a 40×10^3) (Castilho & Martínez-Vila, 1995). O mecanismo de ação da HBPM é semelhante ao da heparina não fracionada, porém inibe apenas o fator X ativado da coagulação, pois para a inibição da trombina é necessário a presença de uma cadeia adicional presente apenas na heparina não fracionada (Goodman & Gilman, 2007). O fator X é inativado pela HBPM mesmo ligado a membrana plaquetária. A HBPM possui uma menor afinidade ao fator plaquetário IV e ao endotélio, o que lhe confere uma biodisponibilidade maior do que a heparina não fracionada. A sua meia-vida é maior; provoca menor permeabilidade vascular e possui pouco efeito sobre as plaquetas do que a heparina não fracionada. Acarreta menor sangramento, atualmente sendo a droga de escolha para se utilizar na maioria das mulheres grávidas (Goodman & Gilman, 2007).

1.6.4.3 Anticoagulantes Orais

Os Anticoagulantes Orais são ativos apenas *in vivo*, lipossolúveis, derivados da 4-hidroxicumarina ou do 1,3-indandiona. Como exemplo, o Warfarin sódico, Acenomurol, Fenprocoumon e outros cumarínicos impedem a ativação da vitamina K pela epóxido-redutase. Estas drogas não atravessam a barreira hematoencefálica, mas atravessam a placenta, com grande risco de ocasionar teratogenia. Além disso, provocam fenômenos hemorrágicos, renais, hepáticos e necroses. A ação dos anticoagulantes orais decorre da inibição da síntese dos fatores da coagulação vitamina K-dependente (fatores II, VII, IX e X) e de proteínas anticoagulantes naturais: Proteína C e Proteína S (Castilho & Martínez-Vila, 1995; Goodman & Gilman, 2007).

1.6.5 Proteínas e Glicoproteínas na Agregação Plaquetária e Coagulação

As plaquetas possuem participação importante no processo hemostático, incluindo o reconhecimento da lesão em um vaso sanguíneo, recrutamento adicional de plaquetas por sinalização intercelular e aderência umas as outras, e interação com a cascata de coagulação para formar o tampão plaquetário (McNicol & Israels, 2003). Uma inapropriada ativação plaquetária pode acarretar a formação de trombos e hipercoagulabilidade, levando ao quadro clínico de Trombose (Handin, 1996; Ruggeri, 2002). Atualmente, agentes Antiplaquetários são utilizados preferencialmente para o tratamento de distúrbios cardiovasculares. A aspirina, usada por mais de 100 anos, continua sendo a droga mais utilizada no tratamento da Aterosclerose. Entretanto, novas moléculas antiplaquetárias, tais como clopidogrel e anticorpos contra a glicoproteína $\alpha_{IIb}\beta_3$ vêm sendo utilizadas no tratamento (de Benedetti, 2005). Potentes antagonistas da agregação plaquetária vêm sendo isolados. Proteínas de venenos de cobras, que geralmente possuem um peso molecular acima de 50 kDa sob condições não redutoras, possuem estas propriedades (Wang *et al.*, 2001). O mecanismo de ação dos agentes antiplaquetários geralmente engloba a supressão da síntese de Tromboxano A_2 (aspirina); ação antagônica da integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que é requerida para agregação plaquetária e formação do tampão plaquetário; e dos receptores de ADP e de trombina (McNicol & Israels, 2003). Além dos agentes antiplaquetários, a terapia anticoagulante envolve o uso de drogas como a heparina de baixo peso molecular, a heparina não fracionada ou anticoagulantes cumarínicos que afetam as vias extrínseca e intrínseca da cascata da coagulação, prolongando os tempos de coagulação. Vários inibidores dos fatores da cascata de coagulação têm sido reportados como os inibidores tipo Kunitz do fator X ativado (Oliva *et al.*, 1999; Pedersen *et al.*, 2005).

Em virtude da existência de doenças que acarretam quadros clínicos graves, a descoberta de agentes que de alguma maneira afetam o mecanismo de ação dos elementos participantes ou até mesmo do próprio mecanismo patológico é de extrema importância. A descoberta de proteínas com atividades inibitórias da agregação plaquetária e da coagulação podem se tornar potenciais ferramentas para tratamento de distúrbios circulatórios, como a Aterosclerose e a Trombose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Purificação e caracterização bioquímica de uma proteína de semente de *Glycine max* (soja), bem como sua avaliação *in vitro* de atividades antiagregante plaquetária e anticoagulante.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolamento da lectina Cramoll 1,4 de semente de *Cratylia mollis* (feijão camaratu), com posterior imobilização no suporte Sepharose CL-4B ativada com brometo de cianogênio;
- Purificação de uma proteína de semente de *Glycine max* (soja) através de processo cromatográfico por afinidade no suporte Cramoll1,4-Sepharose, e de alta resolução através de cromatografia de fase reversa HPLC;
- Caracterização da proteína da soja por SDS-PAGE;
- Sequenciamento do N-terminal da proteína da soja purificada (10 resíduos) através da Degradação de Edman;
- Determinação do conteúdo de estruturas secundárias da proteína da soja através do Dicroísmo Circular (Circular Dichroism – CD);
- Determinação do comprimento de onda de emissão máxima da proteína na Espectroscopia de Fluorescência;
- Avaliação de atividade peroxidásica da proteína da soja frente aos substratos Diaminobenzidina e Guaiacol;
- Avaliação da atividade da proteína *in vitro* na agregação plaquetária, utilizando como agonistas o ADP (adenosina difosfato), colágeno e trombina;
- Avaliação da atividade da proteína *in vitro* na coagulação sanguínea, através da determinação do tempo de protrombina (TP) e do tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TTPa).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M.M. Fisiologia. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 3ª ed., Rio de Janeiro, 2008.
- AMARAL, I.P.G., CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G., CARVALHO Jr., L.B., BEZERRA, R.S. Fish trypsin immobilized on ferromagnetic Dacron. **Process Biochemistry**, v.41, p.1213-1216, 2006.
- ANDERSON, J.W., JOHNSTONE, B.M., COOK, N. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. **New England Journal of Medicine**, v.333, p.276-282, 1995.
- ANDRADE, C.A., CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B., NASCIMENTO, S.C., SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.435-445, 2004.
- ASCENCIO, C., TORRES, N., ISOARD-ACOSTA, F., GOMEZ-PEREZ, F.J., HERNANDEZ-PANDO, R., TOVAR, A.R. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.522-529, 2004.
- BADIMON, L., VILAHUR, G. Platelets, arterial thrombosis and cerebral ischemia. **Cerebrovascular Diseases**, v.24, p.30-39, 2007.
- BARAUNA, S.C., KASTER, M.P., HECKERT, B.T., do NASCIMENTO, K.S., ROSSI, F.M., TEIXEIRA, E.H., CAVADA, B.S., RODRIGUES, A.L., LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v.85, p.160-169, 2006.
- BARONDES, S.H. Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, v.13, p.480-482, 1998.

BAYNES, J., DOMINICZAK, M. Bioquímica Médica. **Manole**, São Paulo, 2000.

BELTRÃO, E.I.C., CORREIA, M.T.S., FIGUEREDO-SILVA, J., COELHO, L.C.B.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to mammary human tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.74, p.125-134, 1998.

BOLETI, A.P., FREIRE, M.G., COELHO, M.B., SILVA, W., BALDASSO, P.A., GOMES, V.M., MARANGONI, S., NOVELHO, J.C., MACEDO, M.L. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.2653-2658, 2007.

CASTILHO, J., MARTÍNEZ-VILA, E. Trombosis, Fármacos antitrombóticos y Enfermedad cerebrovascular. **Barcelona**, 1995.

CHENG, J., YU, S.M., ZUO, P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. **Water Research**, v.40, p.283-290, 2006.

CORREIA, M.T.S., COELHO, L.C.B.B. Purification of a Glucose/Mannose Specific Lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.55, p.261-273, 1995.

COUGHLAN, M.P., KIERSTAN, M.P., BORDER, P.M., TURNER, A.P.F. Analytical applications of immobilized proteins and cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.8, p.1-50, 1988.

de BENEDETTI. Anti-platelet treatment in cardiology. **Revue Médicale Suisse**, v.1, p.619-622, 2005.

DHUNA, V., BAINS, J.S., KAMBOJ, S.S., SINGH, J., SHANMUGAVEL, SAXENA, A.K. Purification and Characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having *in vitro* anticancer activity against human cancer cell lines. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, p.526-532, 2005.

DVORÁNKOVÁ, B., LACINA, L., SMETANA, K.Jr., LENSCH, M., MANNING, J.C., ANDRÉ, S., GABIUS, H.J. Human galectin-2: nuclear presence *in vitro* and its modulation by quiescence/stress factors. **Histology and Histopathology**, v.23, p.167-178, 2008.

EMEIS, J.J., JIROUSKOVA, M., MUCHITSCH, E.M., SHET, A.S., SMYTH, S.S., JOHNSON, G.J. A guide to murine coagulation factor structure, function, assays and genetic alterations. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.5, p.670-679, 2007.

FAVACHO, A.R., CINTRA, E.A., COELHO, L.C., LINHARES, M.I. *In vitro* activity evaluation of *Parkia pendula* seed lectin against human cytomegalovirus and herpes virus 6. **Biologicals**, v.35, p.189-194, 2007.

FRAGUAS, L.F., BATISTA-VIERA, F., CARLSSON, J. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of peroxidase from horseradish roots. **Journal of Chromatography B**, v.803, p.237-241, 2004.

GAILANI, D., RENNÉ, T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.5, p.1106-1112, 2007.

GARRET, R.H., GRISHAM, C.M. **Biochemistry**, Saunders College Publishing, p.310-350, 1995.

GILMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. The pharmacological basis of therapeutics. Goodman and Gilman's. **Editora Mcgraw Hill Education**, 11^a ed., New York, 2007.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v.285, p.66, 1980.

GÓMEZ, J.L., BÓDALO, A., GÓMEZ, E., BASTIDA, J., HIDALGO, A.M., GÓMEZ, M. Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1016-1022, 2006.

GONG, F., MA, Y., MA, A., YU, Q., ZHANG, J., NIE, H., CHEN, X., SHEN, B., LI, N., ZHANG, D. A lectin from Chinese mistletoe increases gammadelta T cell-mediated cytotoxicity through induction of caspase-dependent apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.39, p.445-452, 2007.

GUIMARÃES, L.H., JÚNIOR, A.B., JORGE, J.A., TERENCE, H.F., POLIZELI, M.L. Purification and biochemical characterization of a mycelial alkaline phosphatase without DNAase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Folia Microbiologica (Praha)**, v.52, p.231-236, 2007.

GUO, W., RUCKENSTEIN, E. Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. **Journal of Membrane Science**, v.211, p.101-111, 2003.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Medica. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 11^a ed., Rio de Janeiro, 2006.

HADJI, I., MARZOWKI, M.N., FERRARO, D., FASANO, E., MAJDOUB, H., PANI, G., LIMAM, F. Purification and characterization of a Cu, Zn-SOD from Garlic (*Allium sativum*

L.). Antioxidant effect on tumoral cell lines. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.143, p.129-141, 2007.

HANDIN, R.I. Platelets and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v.334, p.1126-1127, 1996.

HEEMSKERK, J.W.M., KUIJPERS, M.J.E., MUNNIX, I.C.A., SILJANDER, P.K.M. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.15, p.86-92, 2005.

HEEMSKERK, J.W.M., VUIST, W.M.J., FEIJGE, M.A.H. Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine and procoagulant activity of adherent platelets. **Blood**, v.90, p.2615-2625, 1997.

HENNESSEY, J.P.Jr., JOHNSON, W.C.Jr. Information content in the circular dichroism of proteins. **Biochemistry**, v.20, p.1085-1094, 1981.

HOLLUNG, K., OVERLAND, M., HRUSTIC, M., SEKULIC, P., MILADINOVIC, J., MARTENS, H., NARUM, B., SAHLSTROM, S., SORENSEN, M., STOREBAKKEN, T., SKREDE, A. Evaluation of nonstarch polysaccharides and oligosaccharide content of different soybean varieties (*Glycine max*) by near-infrared spectroscopy and proteomics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.9112-9121, 2005.

ITALIANO, J.E., HARTWIG, J.H. Megakaryocyte development and platelet formation. **Platelets**, 2^a ed., p.23-44, 2007.

JACKSON, S.P. The growing complexity of platelet aggregation. **Blood**, v.109, p.5087-5095, 2007.

JUNG, S.M., MOROI, M. Activation of the platelet collagen receptor integrin $\alpha 2\beta 1$. Its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. **Trends in cardiovascular Medicine**, v.10, p.285-292, 2000.

KAHNER, B.N., DORSAM, R.T., KUNAPULI, S.P. Role of P2Y receptor subtypes in platelet-derived microparticle generation. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.433-439, 2008.

KAUR, M., SINGH, K., RUP, P.J., KAMBOJ, S.S., SAXENA, A.K., SHARMA, M., BHAGAT, M., SOOD, S.K., SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, p.432-440, 2006.

KEMENY, D.M., CHALLACOMBE, S.J. Microtitre plates and other solid phase supports. In ELISA and other Solid Phase Immunoassays. **John Wiley and Sons Ltd.**, New York, p.31-35, 1988.

KENNEDY, J.F., WHITE, C.A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Alan Wiseman, 2^a ed., New York, p.147-201, 1985.

KIRKEBY, S., HANSEN, A.K., d'APICE, A., MOE, D. The galactophilic lectin (PA-IL, gene LecA) from *Pseudomonas aeruginosa*. Its binding requirements and the localization of lectin receptors in various mouse tissues. **Microbial Pathogenesis**, v.40, p.191-197, 2006.

KUKREJA, N., ARORA, N., SINGH, B.P., DAS, H.R., SRIDHARA, S. Role of glycoproteins isolated from *Epicoccum purpurascens* in host-pathogen interaction. **Pathobiology**, v.74, p.186-192, 2007.

LABROU, N.E. Design and selection of ligands for affinity chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.790, p.67-78, 2003.

LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, **Kluwer/Plenum**, 2^a ed., New York, 1999.

LAKOWICZ, J.R., MALIWAL, B.P., CHEREK, H., BALTER, A. Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides. **Biochemistry**, v.22, p.1741-1752, 1983.

LEHNINGER, A.L. Princípios de Bioquímica. **SARVIER**, 4^a ed., São Paulo, 2006.

LIMA, V.L.M., CORREIA, M.T.S., CECINEL, Y.M.N., SAMPAIO, C.A.M., OWEN, J.S., COELHO, L.C.B.B. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v.33, p.27-32, 1997.

LIN, Y., MEIJER, G.W., VERMEER, M.A., TRAUTWEIN, E.A. Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.143-148, 2004.

LOPEZ, J.J., SALIDO, G.M., GÓMEZ-ARTETA, E., ROSADO, J.A., PARIENTE, J.A. Thrombin induces apoptotic events through the generation of reactive oxygen species in human platelets. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.5, p.1283-1291, 2007.

MACEDO, S., ROMÃO, C.V., MITCHELL, E., MATIAS, P.M., LIU, M.Y., XAVIER, A.V., LEGALL, J., TEIXEIRA, M., LINDLEY, P., CARRONDO, M.A. The nature of the di-iron site in the bacterioferritin from *Desulfovibrio desulfuricans*. **Nature Structural Biology**, v.10, p.285-290, 2003.

MACIEL, E.V.M., ARAÚJO-FILHO, V.S., NAKAZAWA, M., GOMES, Y.M., COELHO, L.C.B.B., CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v.32, p.57-60, 2004.

MACKMAN, N., TILLEY, R.E., KEY, N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.27, p.1687-1693, 2007.

McNICOL, A. & ISRAELS, S. Platelets and Anti-platelet Therapy. **Journal of pharmacological sciences**, v.93, p.381-396, 2003.

MATSUO, K., YONEHARA, R., GEKKO, K. Secondary-structure analysis of protein by vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy. **Journal of Biochemistry**, v.135, p.405-411, 2004.

MIRANDA, M.V., MAGRI, M.L., NAVARRO DEL CAÑIZO, A.A., CASCONI, O. Study of variables involved in horseradish and soybean peroxidase purification by affinity chromatography on Concanavalin A-Agarose. **Process Biochemistry**, v.38, p.537-543, 2002.

MORIYAMA, T., KISHIMOTO, K., NAGAI, K., URADE, R., OGAWA, T., UTSUMI, S., MARUYAMA, N., MAEBUCHI, M. Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.68, p.352-359, 2004.

MURUGAPPA, S., KUNAPULI, S.P. The role of ADP receptors in platelet function. **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.1977-1986, 2006.

NAEEM, A., AHMAD, E., ASHRAF, M.T., KHAN, R.H. Purification and characterization of mannose/glucose-specific lectin from seeds of *Trigonella foenumgraecum*. **Biochemistry**, v.72, p.44-48, 2007.

OLIVA, M.L., ANDRADE, S.A., BATISTA, I.F., SAMPAIO, M.U., JULIANO, M., FRITZ, H., AUERSWALD, E.A., SAMPAIO, C.A. Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia ungulata* seeds. **Immunopharmacology**, v.45, p.145-149, 1999.

OLIVER, R.W.A. HPLC of Macromolecules. **Oxford University Press**, 2^a ed., New York, 1998.

PAIVA, P.M.G., COELHO, L.C.B.B. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.36, p.113-118, 1992.

PAIVA, P.M.G., SOUZA, A.F., OLIVA, M.L.V., KENNEDY, J.F., CAVALCANTI, M.S.M, COELHO, L.C.B.B., SAMPAIO, C.A.M. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. **Bioresource Technology**, v.88, p.75-79, 2003.

PARISE, L.V. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signaling in platelet adhesion and aggregation. **Current Opinion in Cell Biology**, v.11, p.597-601, 1999.

PEDERSEN, B., HOLSCHEER, T., SATO, Y., PAWLINSKI, R., MACKMAN, N. A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice. **Blood**, v.105, p.2777-2782, 2005.

PELAGALLI, A., BELISARIO, M.A., TAFURI, S., LOMBARDI, P., D'ANGELO, D., AVALLONE, L., STAIANO, N. Adhesive properties of platelets from different animal species. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p.127-131, 2003.

PETRICH, B.G., MARCHESE, P., RUGGERI, Z.M., SPIESS, S., WEICHERT, R.A.M., YE, F., TIEDT, R., SKODA, R.C., MONKLEY, S.J., ERITCHLEY, D.R., GINSBERG, M.H. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, p.3103-3111, 2007.

PREISSNER, K.T. Extrazelluläre RNS- Ein neuer Mitspieler bei der Blutgerinnung und Gefäßpermeabilität. **Hämostaseologie**, v.27, p.373-377, 2007.

ROSEVEAR, A., KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. Immobilised enzymes and cells. **Adan Hilger Published**, England, 1987.

RUGGERI, Z.M. Platelets in atherothrombosis. **Nature Medicine**, v.8, p.1227-1234, 2002.

SANTI-GADELHA, T., GADELHA, C.A.A., ARAGÃO, K.S., de OLIVEIRA, C.C., MOTA, M.R.L., GOMES, R.C., PIRES, A.F., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., de ALENCAR, N.M., CRIDDLE, D.N., ASSREUY, A.M., CAVADA, B.S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.350, p.1050-1055, 2006.

SCHULZE, H., SCHEPERS, U., SANDHOFF, K. Overexpression and mass spectrometry analysis of mature human acid ceramidase. **Biological Chemistry**, v.388, p.1333-1343, 2007.

SHAH, U., MA, A.D. Tests of platelet function. **Current Opin in Hematology**, v.14, p.432-437, 2007.

SHAHIDI, F. & KAMIL, J. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.12, p.435-464, 2001.

SHANMUGHAM, L.N., CASTELLANI, M.L., SALINI, V., FALASCA, K., VECCHIET, J., CONTI, P., PETRARCA, C. Relevance of plant lectins in human cell biology and immunology. **Rivista di Biologia**, v.99, p.227-249, 2006.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, v.18, p.221-226, 1993.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p.2753-2764, 2007.

SHARON, N., LIS, H. How Proteins bind carbohydrates: Lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6586-6591, 2002.

SHATTIL, S.J., NEWMAN, P.J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. **Blood**, v.104, p.1606-1615, 2004.

SILJANDER, P., FARNDAL, K.W., FEIJGE, M.A.H. Platelet adhesion enhances the glycoprotein VI-dependent procoagulant response. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v.21, p.618-627, 2001.

SILVA, M.C.C. Purificação e Caracterização de peroxidases de semente de soja e de raiz de rabanete através de cromatografia de afinidade utilizando lectinas de *Cratylia mollis* imobilizadas em Sepharose CL-4B. **Monografia** (Graduação - Biomedicina), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

SILVA, J.A., DAMICO, D.C.S., BALDASSO, P.A., MATTIOLI, M.A., WINCK, F.V., FRACETO, L.F., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. Isolation and Biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* Candida (BvcL) Seeds. **The Protein Journal**, v.26, p.193-201, 2007.

SOBEK, J., BARTSCHERER, K., JACOB, A., HOHEISEL, J.D., ANGENENDT, P. Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v.9, p.365-380, 2006.

SOLOMONS, T.W.G. Organic chemistry. **John Wiley and Sons, Inc.**, 6^a ed., New York, 1996.

SOUZA, S.R., DUTRA, R.F., CORREIA, M.T.S., PESSOA, M.M., LIMA-FILHO, J.L., COELHO, L.C.B.B. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Bioresource technology**, v.88, p.255-258, 2003.

SREERAMA, N., WOODY, R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. **Analytical Biochemistry**, v.209, p.32-44, 1993.

SREERAMA, N., WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v.287, p.252-260, 2000.

STRYER, L. Bioquímica. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, Rio de Janeiro, 1992.

TAMADA, Y., MURATA, M., HAYASHI, T., GOTO, K. Anticoagulant mechanism of sulfonated polyisoprenes. **Biomaterials**, v.23, p.1375-1382, 2002.

TAO, S.C., CHEN, C.S., ZHU, H. Applications of protein microarray technology. **Combinatorial Chemistry & High throughput screening**, v.10, p.706-718, 2007.

TORCHILIN, V.P. Immobilized enzymes in medicine. **Berlin: Springer. Verlag.**, p.134, 1991.

TOUMADJE, A., ALCORN, S.W., JOHNSON, W.C.Jr. Extending CD spectra of proteins to 168 nm improves the analysis for secondary structures. **Analytical Biochemistry**, v.200, p.321-331, 1992.

TREVAN, M.O. Immobilized enzymes: an introduction and applications in biotechnology. **John Wiley and Sons**, New York, 1980.

VENYAMINOV, S.Y., YANG, J.T. Determination of proteins secondary structures. In: Fasman, G.D. ed. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules. **Plenum Press**, New York, p.70-107, 1996.

WANG, H., NG, T.B. A lectin with some unique characteristics from the samta tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p.181-185, 2006.

WANG, R., KONG, C., KOLATKAR, P., CHUNG, M.C.M. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper). **FEBS letters**, v.508, p.447-453, 2001.

WESIERSKA-GADEK, J., KLIMA, A., KANFTLER, C., KOMINA, O., HANOVER, J., INVERNIZZI, P., PENNER, E. Characterization of autoantibodies against components of the nuclear pore complexes: high frequency of anti-p62 nucleoporin antibodies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1109, p.519-530, 2007.

WEST, M., PARK, D., DODD, J.R., KISTLER, J., CHRISTIE, D.L. Purification and characterization of the creatine transporter expressed at high levels in HEK 293 cells. **Protein Expression and Purification**, v.41, p.393-401, 2005.

WOODY, R.W. Circular dichroism. **Methods in enzymology**, v.246, p.34-71, 1995.

WOODY, R.W. Contributions of tryptophan side chains to the far-ultraviolet circular dichroism of proteins. **European Biophysics Journal**, v.23, p.253-262, 1994.

XIAO, C.W., MEI, J., WOOD, C.M. Effect of soy proteins and isoflavones on lipid metabolism and involved gene expression. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.2660-2673, 2008.

ZAGO, M.A., FALCAO, R.P., PASQUINI, R. Hematologia: Fundamentos e Prática. **Editora Atheneu**, São Paulo, 2004.

4 ARTIGO

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A SOYBEAN SEED PROTEIN (*Glycyne max*) WITH *in-vitro* PLATELET ANTIAGGREGATION AND ANTICOAGULANT ACTIVITIES

Este artigo será submetido à revista internacional “The Journal of Biochemistry”.



4.1 Title Pages

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A SOYBEAN SEED PROTEIN (*Glycine max*) WITH *in-vitro* PLATELET ANTIAGGREGATION AND ANTICOAGULANT ACTIVITIES

Mariana Cristina Cabral Silva ¹, Lucimeire Aparecida de Santana ³, Rosimeire Aparecida da Silva de Lucca ⁵, Amanda Lucena Rosendo de Lima ^{1,2}, Tatiana do Prado Anjos ³, Joana Gasperazzo Ferreira ³, Sonia Andrade Chudzinski ⁴, Patrícia Maria Guedes Paiva ¹, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho ¹, Maria Luiza Vilela Oliva ³, Russolina Benedeta Zingali ⁶ and Maria Tereza dos Santos Correia ^{1*}

¹ Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco; Recife, PE, Brazil 50670-420; ² Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco; Recife, PE, Brazil; ³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, SP, Brazil 04044-020; ⁴ Hospital Sírio Libanês, São Paulo, SP, Brazil; ⁵ Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, PR, Brazil 85903-000 and ⁶ Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Running title: ANTIAGGREGANT AND ANTICOAGULANT SOYBEAN PROTEIN

* Corresponding Author:

Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Glicoproteínas

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco

Rua Professor Moraes Rego, S/N

CEP 50670-901

Telephone number: + 55 81 21268574

Fax: + 55 81 21268576

E-mail address: mtscorreia@gmail.com

⁷Abbreviations: AAPP, anti-platelet protein isolated from the saliva of *Anopheles stephensi*; ADP, adenosine diphosphate; AL3, soybean 2S albumin: wild-type albumin 3; ApcSP, antiplatelet and anticoagulant soybean protein; aPTT, activated partial thromboplastin time; BLAST, basic local alignment and search tool; BSA, bovine serum albumin; BuXI, Kunitz-type inhibitor of the factor X activated from *Bauhinia ungulata*; CD, circular dichroism; Cramoll, *Cratylia mollis* lectin; DAB, diaminobenzidine tetrahydrochloride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HPLC, high performance liquid chromatography; LDL, low density lipoprotein; PAS, periodic acid-Schiff; PRP, platelet rich plasma; SBA, soybean agglutinin; SBP, soybean peroxidase; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TFA, trifluoroacetic acid; TP, prothrombin time; WP, washed platelets; $\lambda_{\max}$, emission maximum wavelength; λ_{exc} , excitation wavelength.

4.2 Summary

This paper describes the purification and characterization of a new soybean seed protein from *Glycine max* (ApcSP – Antiplatelet and anticoagulant soybean protein) and its *in vitro* platelet antiaggregation and anticoagulant activities. ApcSP was purified by ammonium sulphate fractionation (F0-60), affinity chromatography in Cramoll 1,4-Sepharose and reversed-phase HPLC. SDS-PAGE of ApcSP under reducing condition revealed a single glycosylated band of 51 kDa (Shiff's reagent). Peroxidase activity was detected using guaiacol and diaminobenzidine as substrates. The N-terminal 10-residue sequence of ApcSP was EGQFGPMIQS, indicated that the protein is clearly distinct from the previously reported soybean seed protein, such as soybean peroxidase, soybean seed lectin and soybean 2S albumin. Deconvolution of CD spectrum indicated 35% α -helix, 17% β -strand, 22% turn and 26% unordered structure. ApcSP fluorescence spectrum showed a maximum emission around 339 nm. There was inhibition of collagen (100% amplitude and 98% slope), thrombin (79% amplitude and 77% slope) and ADP (62% amplitude and 58% slope) -induced platelet aggregation in the concentration of 2 μ M of ApcSP in relation to control. The soy protein prolonged the coagulation times (aPTT, more affected, and PT). Results indicated that ApcSP could be of great importance for anti-thrombotic and anticoagulant therapy.

Key Words: antiaggregant, anticoagulant, Cramoll 1,4-Sepharose, *Glycine max*, glycoprotein.

4.3 Text

4.3.1 Introduction

The chemical interactions between proteins and molecules make possible the use of proteins for affinity separation techniques based on biospecific molecular interactions (1). The use of affinity chromatography with immobilized lectins has been powerful tools for the isolation of biological macromolecules (2) with biotechnological applications (3).

Lectins are proteins or glycoproteins able to recognize and binding reversibly to carbohydrates without altering the covalent structure of any of the recognized ligands (4). *Cratylia mollis* (camaratu bean – Fabaceae family) is a leguminous, native forage from the semiarid region of Northeast of Brazil. Isolectins and isoforms of *Cratylia mollis* lectin (Cramoll) exhibit specificity to different carbohydrates, Cramoll 1, Cramoll 2 and Cramoll 4 are specific for glucose/mannose; and Cramoll 3 is galactose specific (5,6). A preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4 (Cramoll 1,4) was isolated and immobilized using Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B. The support Cramoll 1,4-Sepharose was used for isolation plasma glycoprotein lecithin-cholesterol acyltransferase (7).

Soybean foods (*Glycine max* - Fabaceae family) are widely consumed in the World, mainly in Asian countries (8). The epidemiological evidence suggest that soy consumption is linked to a lower incidence of chronic diseases including atherosclerosis, certain types of cancers such as prostate cancer and breast cancer, coronary heart disease, osteoporosis, type 2 diabetes (8), and lowering total and LDL cholesterol levels (9,10).

In the hemostatic process, the platelets play an important function, including recognizing the site injury, release agonists which recruit more platelets, adhering to each other, and interaction with the coagulation cascade to form a platelet plug (11). An inappropriate platelet activation can cause thrombus formation, which is responsible for the occlusion vessels and ischemic injury to brain and heart (12).

Thrombosis refers to the formation of an abnormal mass in the light of a blood vessel, involving vascular, cellular and humoral factors. Clinical complications of thrombosis include abnormalities of vascular wall, changes in blood flow and hypercoagulability. Anti-platelet drugs (anti-thrombotic agents) are currently used to treatment thrombo-embolic disorders (13). These drugs include cyclooxygenase inhibitors, thienopyridine derivates and $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin blockers, which affect platelet function. The anticoagulant therapy involves the use of drugs such as low molecular weight heparin, non-fractioned heparin or coumarin anticoagulants that affect the extrinsic and intrinsic pathways of the coagulation cascade, extending the blood coagulation times. Recently it has been reported (14) a Kunitz-type proteinase inhibitor which directly binds and inhibits factor X activated (an inhibitor of tissue factor pathway).

In this report, we describe the purification of a soybean seed protein using Cramoll 1,4-Sepharose as affinity chromatography matrix and its characterization as a platelet antiaggregation and anticoagulant molecule. The characterization protocols included electrophoresis, evaluation of peroxidase activity, N-terminal amino acid sequence, circular dichroism, fluorescence spectroscopy, effect of the isolated protein on the activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) and influence on the platelet aggregation induced by agonists adenosine diphosphate (ADP), collagen and thrombin.

4.3.2 Materials and Methods

4.3.2.1 Materials - Electrophoretic reagents were obtained from Bio-Rad (Richmond, USA) and Amersham Pharmacia (New Jersey, USA). Standard molecular weight markers, sephadex G-75, horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7), diaminobenzidine and guaiacol were purchased from Sigma (Saint Louis, USA). Cyanogen bromide-activated Sepharose CL 4B was purchased from Amersham Pharmacia (New Jersey, USA). PT and aPTT reagents were obtained from Hospital Sírio Libanês, São Paulo, Brazil and stored at 4 °C. Soybean seeds were obtained from a local supermarket. Blood were collected from health human donor using 3.8% trisodium citrate (1:10). The other reagents used were of analytical grade.

4.3.2.2 Isolation of Cramoll 1,4 Lectin – Cramoll 1,4 lectin was purified from a 10% (w/v) *Cratylia mollis* seed extract following the previously established protocol (6). Proteins of extract were precipitated using 40-60% ammonium sulphate saturation and the obtained was applied on Sephadex G-75 column (70.0 x 1.9 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. After the wash step, the elution was performed with 0.3 M D-glucose in 0.15 M NaCl. The isolated Cramoll 1,4 was dialyzed in 0.15M NaCl and distilled water for 6 h at 4°C.

4.3.2.3 Lectin Immobilization – Cyanogen bromide-activated Sepharose 4B (1 g) was washed with 1mM HCl, followed by 0.1 M NaHCO₃/0.5 M NaCl, pH 8.3 and 1 mM HCl. The support was incubated (2 h, 24°C) with Cramoll 1,4 (30 mg of proteins). Then, filtration and incubation (2 h, 24°C) in 1M ethanolamine, pH 8.0 was performed. Finally, the Cramoll 1,4-Sepharose was washed with 0.1 M sodium acetate/0.5 M NaCl, pH 4.0, followed by 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl, pH 8.0, 0.1 M sodium acetate/0.5 M NaCl, pH 4.0 and 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl, pH 8.0. The amount of immobilized protein was calculated by the difference between the offered protein amount and that found in the filtrates and measured according to Lowry *et al.* (15) using bovine serum albumin as standard. The support Cramoll 1,4-Sepharose was kept in 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl buffer pH 8.0 at 4°C until use.

4.3.2.4 Purification of a soybean seed protein – The protein, called ApcSP (Antiplatelet and anticoagulant soybean protein), was purified from a 10% (w/v) soybean seed extract (extracting for 16 h at 4°C) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. The crude extract was centrifuged at 5,000 rpm at 4°C for 15 min and the proteins of supernatant (extract) were precipitated using 60% ammonium sulphate saturation (F0-60), according to Green and Hughens (16). The F0-60 was dialysed against 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (4°C for 16 h) and was applied on Cramoll 1,4-Sepharose. The support was equilibrated in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 at 24°C. The flow rate was maintained at 10 ml/h, and adsorbed proteins were biospecifically eluted with 0.3 M glucose/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, following by 1.0 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. Chromatographic fractions were collecting and monitored at A_{280} . The protein (ApcSP) was dialysed against the same buffer of extraction. Protein concentration was measured according to Lowry *et al.* (15) using bovine serum albumin as standard. Enzymatic activity (Peroxidase) was measuring as described by Kim *et al.* (17).

4.3.2.5 Reversed-phase HPLC – Reversed-phase HPLC on a μ -Bondapak C 4 column (Shimadzu LC-10AD-Kyoto, Japan) was used to confirm the homogeneity of ApcSP eluted with 1.0 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. Samples (1 ml) were filtered, centrifugated and injected in the system. The column was equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in Milli-Q water, and then the bound protein was eluted with a linear gradient (5%-100%) of 90% acetonitrile in 0.1% TFA in Milli-Q water for 65 min at the flow rate of 0.7 ml/min. The elution profile was monitored at 215 nm and 280 nm.

4.3.2.6 Determination of peroxidase activity – Peroxidase activity in the extract, ammonium sulphate fractions and ApcSP was determined using guaiacol (quantitative assay) and diaminobenzidine (qualitative assay) as reducing substrates. The rate of decomposition of hydrogen peroxide by peroxidase at 24°C was determined spectrophotometrically by measuring the rate of formation of the final product 3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenol at 470 nm ($\epsilon = 26600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

in the presence of guaiacol as hydrogen donor (18). The reaction mixture contained 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 3 mM hydrogen peroxide, 15 mM guaiacol and the samples. The change in absorbance at 470 nm was monitored for 2 min using a FEMTO 700 S spectrophotometer (São Paulo, Brazil). One unit of peroxidase activity (U) represents the amount of enzyme catalyzing the oxidation of 1 μ M of guaiacol in 1 min (18). In the qualitative assay, the reaction mixture consisted of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, diaminobenzidine (DAB) and hydrogen peroxide. The reaction was started by the addition of 100 μ l of the samples in 100 μ l of the reaction mixture at 24°C, with a brown staining indicating positive reaction.

4.3.2.7 SDS-PAGE – Electrophoresis under denaturing and reducing conditions was done according to Laemmli (19), using a 6% (w/v) stacking gel and a 10% (w/v) separating gel. The gels were stained overnight with 0.125 % (w/w) Coomassie Brilliant Blue R-250 prepared in 10% (v/v) acetic acid and 50 % (v/v) methanol and destained in 10% (v/v) acetic acid. The standard molecular weight markers were phosphorylase *b* (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (30 kDa). The gels were also stained for glycoprotein by the Periodic acid-Schiff (PAS) technique (20).

4.3.2.8 N-terminal Sequence – ApcSP (1.64 mg) was reduced in 200 μ l of buffer 0.25 M Tris-HCl pH 8.5 containing 6 M guanidine-HCl and 1mM EDTA. Then, was added in the mixture 5 mg of dithiothreitol and incubated in the dark at 37°C for 2 h under atmosphere of nitrogen (21). The alkylation of protein was performed as described by Friedman (22), adding in the reaction 13.4 mg of iodoacetamide in 100 μ l of 0.5 M NaOH freshly prepared, posterior incubation in the dark at 37°C for 2 h under atmosphere of nitrogen. After, the sample was desalted by reverse-phase HPLC and the peak obtained was digested by pyroglutamase (24°C for 16 h), purified by reverse-phase HPLC and eluted to sequencing. The N-terminal sequence of protein was determined in an automatic gas liquid protein sequencer (PPSQ-23 – Shimadzu), using the Edman's degradation (23). The homology sequences were searched using the BLAST protein sequence database.

4.3.2.9 Spectroscopic Measurements (Circular Dichroism-CD and Fluorescence) – The Circular Dichroism (CD) data were recorded on a JASCO J-810 spectropolarimeter (Jasco Corporation, Japan) in the 198-250 nm region using a circular quartz cuvette of 1 mm path length, at 25°C, under constant nitrogen purging. Measurements were recorded as an average of 8 scans for protein solutions of 0.15 mg/ml, in 1.0 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0. All CD spectra measured were baseline corrected by the buffer. Secondary structure percentages were calculated from deconvolution of the CD spectra using the program CDPro (24). The CD data were expressed in terms of mean residue ellipticity $[\theta]$ ($\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$), assuming a mean residue number of 110. Fluorescence measurements were performed at 25°C on a Hitachi F2500 spectrofluorimeter using a quartz cuvette of 1 cm path length. The samples for fluorescence experiments were the same used in the CD experiments. Tryptophan was selectively excited at 295 nm (25), whereas for both the tryptophan and tyrosine fluorescence the excitation wavelength was 280 nm. The emission spectra were recorded in the range 290-450 nm and 305-450 nm as an average of four scans. All spectra measured were baseline corrected by the buffer.

4.3.2.10 Platelet Aggregation – Venous blood from healthy volunteers was collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at 1,000 rpm for 12 min at room temperature. Washed platelets (WP) were obtained by centrifugation of PRP added of 2% EDTA (EDTA/PRP 1:20) at 2,500 rpm for 15 min followed by two washes with washing buffer (140 mM NaCl, 10 mM NaHCO_3 , 2.5 mM KCl, 0.9 mM Na_2HPO_3 , 2.1 mM MgCl_2 , 22 mM $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$, 0.055 mM Glucose, 0.053 mM BSA, pH 6.5). The pellet was suspended in 2ml Tyrode buffer (10 mM Hepes, 134 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 12 mM NaHCO_3 , 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0.055 mM glucose, pH 7.4). The platelets were counted in Sereno-Baker 9020+AX System and adjusted for a final concentration of $3 \times 10^6/\text{ml}$ with Tyrode buffer. The aggregation was measured by the Born and Cross turbidimetric method (26) and monitored at 37°C for 6 min in a Chrono-log aggregometer using 500 μl of platelet

suspension and agonists thrombin (1.0 National Institutes of Health-NIH), ADP (5.0 μ M) or collagen (2 μ g/ml) with continuous stirring. The concentration of ApcSP dialysed and concentrated used was 1 μ M and 2 μ M. The impedance of each sample was monitored until a stable baseline was established (<5 mV drift per min). Increase in impedance across a pair of electrodes over time was transmitted through an interface to a personal computer for analysis (AGGRO/LINK, Chrono-log). Control was made at the beginning and end of each experiment.

4.3.2.11 Determination of coagulation times (activated partial thromboplastin time – aPTT and prothrombin time - PT) - PT and aPTT were determined in a semi-automated coagulometer BFT II (Dade Behring, São Paulo, Brazil). The total plasma was obtained by centrifugation of several human blood at 3,500 rpm, for 15 min (25°C). In the PT, the control was made with 50 μ l of saline and 50 μ l of plasma, incubation for 60 s, with subsequent addition of 100 μ l of reagent (contains dehydrated brain of rabbit with calcium ions). ApcSP in different concentrations (2 μ M, 3 μ M and 4 μ M) in 50 μ l were incubated (60 s) in 50 μ l of plasma, with subsequent addition of 100 μ l of reagent. In the aPTT, the control was made with 50 μ l of saline, 50 μ l of plasma and 50 μ l of aPTT reagent (contains 0.1 mM of elagic acid with a suspension of phospholipids extracted from dehydrated rabbit brain), incubation for 120 s. Then, subsequent addition of 50 μ l of 0.025 M calcium chloride. ApcSP (same concentration used to PT) was incubated for 120 s in 50 μ l of plasma and 50 μ l of aPTT reagent. Then, was added in the mixture 50 μ l of 0.025 M calcium chloride. The tests were made in duplicate and the results express by the average of the determinations of each sample.

4.3.3 Results and Discussion

4.3.3.1 Isolation of ApcSP and Biochemical Characterization – A protein from *Glycine max*, called ApcSP, was purified using protein extraction in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, ammonium sulphate fractionation (F0-60) and two-step chromatography involving affinity chromatography on Cramoll 1,4-Sepharose and reversed-phase HPLC. The protocol used for obtention of affinity matrix resulted in 100% of Cramoll 1,4 immobilization. The profile of the chromatography on Cramoll 1,4-Sepharose showed the presence of non-adsorbed and adsorbed proteins eluted with 0.3 M glucose/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 and 1.0 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (Fig. 1A). Cramoll 1,4-Sepharose had been used as a support for isolation plasma glycoprotein lecithin-cholesterol acyltransferase (7) and isolation of trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* (27). Figure 1B shows the final step of ApcSP purification that was done by reversed-phase HPLC on a μ -Bondapack C4 column. ApcSP was resolved by SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions as single polypeptide band with molecular mass of approximately 51 kDa (Fig.1C). The presence of carbohydrates in its structure was evidenced by the Schiff's reagent. Non-adsorbed proteins as well as protein (62.4 mg) eluted with 1.0 M NaCl/0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (ApcSP) showed peroxidase activity. The qualitative assay for enzyme activity revealed the presence of peroxidase by appearing of brown color using diaminobenzidine as substrate (Fig. 2). The peroxidase activity of ApcSP (total activity of 16.2 units from 40 g of crude extract) was also detected using guaiacol as substrate. The colorimetric assay of peroxidase activity using guaiacol is a common analytical method for quantifying enzymatic activity based on the change in absorbance at 470 nm (28). Plant peroxidases (E.C. 1.11.1.7) are oxidoreductive enzymes, haem-containing glycoproteins, possess a variety of substrate specificity and can oxidize a large number of aromatic compounds in the presence of hydrogen peroxide (29). Soybean peroxidase (SBP) present at high concentrations in the soybean seed coat, is

glycosylated and has been purified (30). According to Srivastava and van Huystee (31), molecular weights of peroxidases from various sources ranged from 30 kDa to 60 kDa. Soybean peroxidase was first purified by Sessa and Anderson (32), which obtained four bands in SDS-PAGE, 22 kDa, 37 kDa, 50 kDa and 61 kDa, being the major band estimated to have a molecular weight of 37 kDa. These results suggest that ApcSP can be a protein like-peroxidase, or an isoperoxidase. The N-terminal sequence of protein (EGQFGPMIQS) was determined in an automatic gas liquid protein sequencer (PPSQ-23-Shimadzu), using the Edman's degradation (23). Reduced and alkylated ApcSP was inaccessible to Edman sequencing, because the N-terminal residue was blocked by pyroglutamate and only after treatment with pyroglutamase, the N-terminal sequence was obtained.

4.3.3.2 Spectroscopic Properties – The CD spectrum in the far UV revealed two negative CD bands around 208-210 nm and 222-228 nm and one positive band near 190-195 nm (Fig. 3), characteristic of proteins with high α -helical content. The spectrum was used to estimate the contributions of secondary structure fractions present in ApcSP. Deconvolution using the program CDPro indicated 35% α -helix, 17% β -strand, 22% turn and 26% unordered structure, showing that the α helix elements were predominant and indicating the presence of β secondary structure. In order, were investigated the correlation between the shape of the CD spectrum and the tertiary structure class of the protein using Cluster program. This program correlate spectra with five tertiary structure classes: all α proteins with only α -helix secondary structure, all β proteins having mainly β -sheet secondary structure, $\alpha + \beta$ proteins that contain α and β secondary structure segments that are not mixed but remain separated along the sequence, α/β proteins having mixed or alternating segments of α and β secondary structure and unordered (denatured) proteins. For $\alpha + \beta$ and α/β proteins, the intensities of CD spectra related to α -helix usually predominate those of β -sheet. For $\alpha + \beta$ proteins the 208 to 220nm band usually has a larger intensity than 222 nm band, whereas for the α/β proteins is observed the reverse (33). Cluster analysis showed that the protein belongs $\alpha + \beta$ tertiary structure

class, corroborated by results of secondary structure estimative. In proteins, only the three aromatic amino acids (Phe, Trp and Tyr) are fluorescent, but the tryptophan is the dominant intrinsic fluorophore. The tryptophan absorbs at the longest wavelength, also, the energy absorbed by tyrosine and phenylalanine is often transferred to the tryptophan residues in the same protein (25). The emission maximum (λ_{max}) of free tryptophan in water occurs near 350 nm and is highly dependent of environment (25), and thus, can be monitored for information about protein structure and conformation (34). Tryptophan fluorescence λ_{max} reflects the overall polarity of the Trp environment. More polar environment typically translates into a higher λ_{max} . A protein may possess just one or few tryptophan residues, which already displays spectral data (25). The soy protein was excited in 280 nm, which absorption is due to tyrosine and tryptophan residues, and 295 nm, which absorption is due primarily to tryptophan, avoiding excitation of tyrosine (34). The emission fluorescence spectra (λ_{exc} at 280 and 295 nm) of ApcSP are shown in Figure 4. The emission maximum for both excitation wavelengths were invariant and appear around 339 nm, showing that the emission fluorescence was dominated by the emission of the tryptophan residues of soy protein. This emission maximum is characteristic of partially solvent accessible Trp residues.

4.3.3.3 Biological Characterization - In this work, were used the agonists collagen, thrombin and ADP to evaluate the platelet aggregation activity in the presence of ApcSP. There was an inhibition of the collagen (100% amplitude and 98% slope), thrombin (79% amplitude and 77% slope) and ADP (62% amplitude and 58% slope) -induced platelet aggregation in the concentration of 2 μM of ApcSP in relation to control (Fig. 5 A, B and C). Collagen is considered as primary haemostatic agonist and thrombin as well as ADP, are considered secondary agonists (11). Collagen induces platelet aggregation by interaction with the $\alpha_2\beta_1$ and GPVI receptors on the surface platelets (35), the thrombin is related with PAR1, PAR4 and GPIb receptors (36) and the ADP with P2Y₁, P2Y₁₂ and P2X₁ receptors (37). The inhibition of platelet aggregation or anti-platelet therapy can be due to

$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin blockers, integrin required for platelet aggregation and formation of a platelet plug, ADP, collagen and thrombin (the most potent known platelet agonist) receptors antagonists. An anti-platelet protein, isolated from the saliva of *Anopheles stephensi* (AAPP) exhibited inhibitory activity of the collagen-induced platelet aggregation, because direct binding of protein to collagen, blocked platelet adhesion via GPVI and integrin $\alpha_2\beta_1$ (38). The inhibitory activity of the collagen, thrombin and ADP-induced platelet aggregation by ApcSP can be due the antagonists action to receptors or blocking the action of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, which is common to the three vias. It was also evaluated the effect of ApcSP in the coagulation times. When injury occurs of the vascular wall, while initiating the hemostatic mechanism by platelets, forming the platelet plug, occurs activation of the coagulation cascade by two pathways: extrinsic and intrinsic pathways. An inappropriate hemostatic process can cause thrombus formation. For the treatment, anti-platelets drugs and anticoagulants can be used. Inhibitors of coagulation factors has been studied and characterized. It was reported an inhibitor of tissue factor pathway, a Kunitz-type proteinase inhibitor which directly binds and inhibits factor X activated (14) and a Kunitz-type inhibitor of the factor X activated from *Bauhinia ungulata* –BuXI (39). The influence of ApcSP in the coagulation (Fig. 6) was determined by activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT). The statistical significance of the different concentrations of the sample was evaluated using Student's unpaired *t*-test. A *p*-value <0.05 was considered to indicate significance. The anticoagulant activity of soy protein was efficient in the concentrations used, since the determined R (relation coagulation time with coagulation control time) was > 2.0. The soy protein prolonged the activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT), but the aPTT was more affected. These results suggest that ApcSP can be affecting coagulation factors, especially those who are of the common pathway of the coagulation cascade. In summary, a new soybean protein, named ApcSP, was purified by affinity chromatography in Cramoll 1,4-Sepharose and reversed-phase HPLC, with *in vitro* platelet antiaggregation and anticoagulant activities. Our results evidenced a protein that can

be of great importance for anti-thrombotic and anticoagulant therapy because of its ability to prolong the coagulation times and block the platelet aggregation.

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE). The authors are deeply grateful for the technical assistance of Mrs. Maria Barbosa Reis da Silva, Mr. João Virgínio and Mrs. Lucimeire Aparecida de Santana.

4.4 References

1. Helmholz, H., Cartellieri, S., He, L., Thiesen, P., and Niemeyer, B. (2003) Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. *J Chromatogr A* **1006**, 127-135.
2. Guo, W., and Ruckenstein, E. (2003) Separation and purification of horseradish peroxidase by membrane affinity chromatography. *J Memb Sci* **211**, 101-111.
3. Gómez, J.L., Bódalo, A., Gómez, E., Bastida, J., Hidalgo, A.M., and Gómez, M. (2006) Immobilization of peroxidases on glass beads: An improved alternative for phenol removal. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 1016-1022.
4. Sharon, N. (2007) Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* **282**, 2753-2764.
5. Paiva, P.M.G., and Coelho, L.C.B.B. (1992) Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **36**, 113-118.
6. Correia, M.T.S., and Coelho, L.C.B.B. (1995) Purification of a Glucose/Mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* **55**, 261-273.
7. Lima, V.L.M., Correia, M.T.S., Cechinel, Y.M.N., Sampaio, C.A.M., Owen, J.S., and Coelho, L.C.B.B. (1997) Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydr Polym* **33**, 27-32.
8. Xiao, C.W., Mei, J., and Wood, C.M. (2008) Effect of soy proteins and isoflavones on lipid metabolism and involved gene expression. *Front. Biosci.* **13**, 2660-2673.
9. Lin, Y., Meijer, G.W., Vermeer, M.A., and Trautwein, E.A. (2004) Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. *J. Nutr.* **134**, 143-148.
10. Moriyama, T., Kishimoto, K., Nagai, k., Urade, R., Ogawa, T., Utsumi, S., Maruyama, N., and Maebuchi, M. (2004) Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal

and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 352-359.

11. McNicol, A., and Israels, S.J. (2003) Platelets and Anti-platelet Therapy. *J. Pharmacol. Sci.* **93**, 381-396.

12. Ruggeri, Z.M. (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat. Med.* **8**, 1227-1234.

13. Bhatt. D.L., and Topol E.J. (2003) Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat. Rev.* **2**, 16-28.

14. Pedersen B., Holscher, T., Sato, Y., Pawlinski, R., and Mackman, N. (2005) A balance between tissue factor and tissue factor pathway inhibitor is required for embryonic development and hemostasis in adult mice. *Blood* **105**, 2777-2782.

15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

16. Green, A.A. and Hughens, W.L. (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous salts and organic solvents in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. and Kaplan, N., eds.) Vol.1, pp.67-90, Academic Press, New York.

17. Kim, Y.H. and Yoo, Y.J. (1996) Peroxidase production from carrot hairy root culture. *Enz. Microb. Technol.* **18**, 531-535.

18. Araujo, B.S., Oliveira, J.O., Machado, S.S., and Pletsch, M. (2004) Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Plant Sci.* **167**, 1151-1157.

19. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

20. Zacharius, R.M., Zell, T.E., Morrison, J.H., and Woodlock, J.J. (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **30**, 148-152.

21. Matsudaira, P.T. (1989) *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing* pp. 20-22, Academic Press, San Diego, California.
22. Friedman, M., Krull, L.H., and Cavins, J.F. (1970) The chromatographic determination of cysteine and cysteine residues in proteins as s-beta-(4-pyridylethyl) cysteine. *J.Biol.Chem.* **245**, 3868-3871.
23. Edman, P. (1950) Preparation of phenyl thiotydanotoins from some natural aminoacids. *Acta Chem. Scand.* **4**, 277-282.
24. Sreerama, N. and Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252-260.
25. Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* pp. 446-447, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
26. Born, G.V. and Cross, M.J. (1963) The aggregation of blood platelets. *J Physiol.* **168**, 178-195.
27. Paiva, P.M.G., Souza, A.F., Oliva, M.L.V., Kennedy, J.F., Cavalcanti, M.S.M., Coelho, L.C.B.B., and Sampaio, C.A.M. (2003) Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresour. Technol.* **88**, 75-79.
28. Doerge, D.R., Divi, R.L., and Churchwell, M.I. (1997) Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal. Biochem.* **250**, 10-17.
29. Rani, D.N. and Abraham, T.E. (2006) Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time temperature indicator for food materials. *J Food Process Eng* **77**, 594-600.
30. Welinder, K.G. and Larsen, Y.B. (2004) Covalent structure of soybean seed coat peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 121-126.

31. Srivastava, Om. P. and van Huystee, R.B. (1977) Spectral and molecular properties of peanut peroxidase isozymes. *Phytochemistry* **16**, 1657-1659.
32. Sessa, D.J. and Anderson, R.L. (1981) Soybean Peroxidases: Purification and some properties. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 960-965.
33. Venyaminov, S.Y. and Yang, J.T. (1996) Determination of proteins secondary structures in *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (Fasman, G.D., eds.) pp. 70-107, Plenum Press, New York.
34. Tayefi-Nasrabadi, H., Keyhani, E., and Keyhani, J. (2006) Conformational changes and activity alterations induced by nickel ion in horseradish peroxidase. *Biochimie* **88**, 1183-1197.
35. Jung, S.M. and Moroi, M. (2000) Activation of the platelet collagen receptor integrin $\alpha 2\beta 1$. Its mechanism and participation in the physiological functions of platelets. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 285-292.
36. McNicol, A. and Gerrard, J.M. (1993) Post-receptor events associated with thrombin-induced platelet activation. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **4**, 975-991.
37. Murugappa, S. and Kunapuli, S.P. (2006) The role of ADP receptors in platelet function. *Front. Biosci.* **11**, 1977-1986.
38. Yoshida, S., Sudo, T., Niimi, M., Tao, L., Sun, B., Kambayashi, J., Watanabe, H., Luo, E., and Matsuoka, H. (2008) Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by anopheline anti-platelet protein, a saliva protein from a malaria vector mosquito. *Blood* **111**, 2007-2014.
39. Oliva, M.L., Andrade, S.A., Batista, I.F., Sampaio, M.U., Juliano, M., Fritz, H., Auerswald, E.A., and Sampaio, C.A. (1999) Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. *Immunopharmacology* **45**, 145-149.

4.5 Legends to figures

Fig.1A. **Purification of the ApcSP protein.** Affinity chromatography on immobilized Cramoll 1,4-Sephacrose. Column was equilibrated with 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 and 0-60% fraction, after dialysis against the same buffer, was applied to the column. Fractions were eluted at a flow rate of 10 ml/h. Retained proteins were eluted with 0.3 M glucose and 1.0 M NaCl (ApcSP) in the same buffer. Fractions (2 ml) each were collected; absorbance at 280 nm and peroxidase activity were measured.

Fig.1B. **Reversed-phase HPLC of ApcSP.** Analysis of homogeneity of ApcSP in a reversed-phase HPLC using μ -Bondapack C4 column. The column was equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in Milli-Q water. The protein fraction was eluted with a linear gradient (5%-100%) of 90% acetonitrile in 0.1% TFA in Milli-Q water for 65 min at the flow rate of 0.7 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm.

Fig.1C. **SDS-PAGE of purified ApcSP protein.** Protein was subjected to SDS-PAGE using 10% gel, under reducing conditions.

Fig.2. **Qualitative Peroxidase assay with Diaminobenzidine (DAB).** (A) 100 μ l commercial peroxidase (Sigma-HRP); (B) 100 μ l soybean F0-60% and (C) 100 μ l protein peak eluted with 1.0 M NaCl / 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 (ApcSP).

Fig.3. **CD spectra of ApcSP in 1.0 M NaCl / 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0.** Measurements were recorded as an average of 8 scans for protein solutions of 0.15 mg/ml, at 25°C. The CD spectrum deconvolution indicated 35% α -helix; 17% β -strand; 22% turn and 26% unordered structure.

Fig.4. **Fluorescence spectra of ApcSP at 25°C excited at 280 nm (solid line) and 295 nm (dashed line) in a concentration of 0.15 mg/ml at pH 7.0.** Emission maximum was around 339 nm for both excitation wavelength.

Fig.5. **Evaluation the platelet aggregation in the presence of the ApcSP.** ApcSP in the concentration of 1 μ M and 2 μ M was used to evaluation ADP (A), collagen (B) and thrombin (C)-induced platelet aggregation.

Fig.6. **The influence of ApcSP in the blood coagulation.** It was determinated by activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT). The statistical significance was evaluated using Student's unpaired *t*-test. A *p*-value <0.05 was considered to indicate significance. (# and *) significance between the concentration of 2 μ M and 3 μ M and between 2 μ M and 4 μ M. R: Relation coagulation time with coagulation control time.

4.6 Figures

Figure 1A

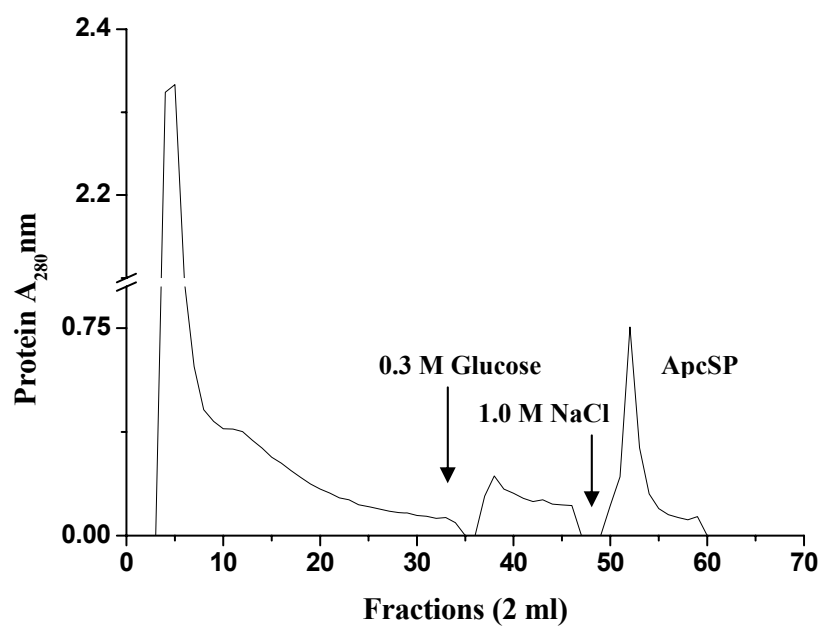


Figure 1B

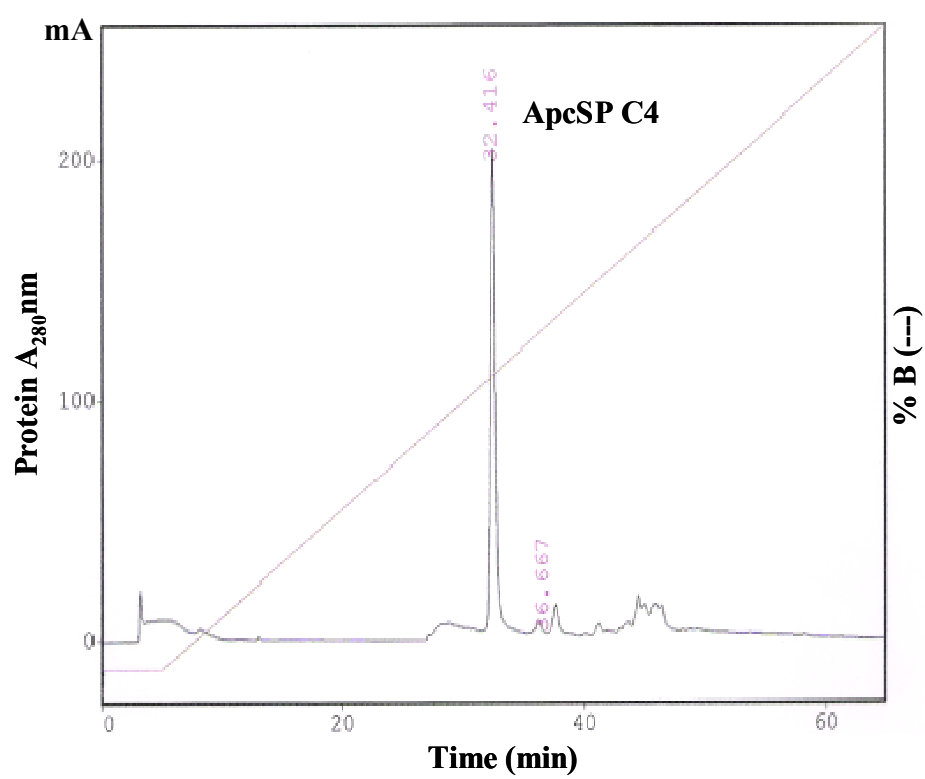


Figure 1C

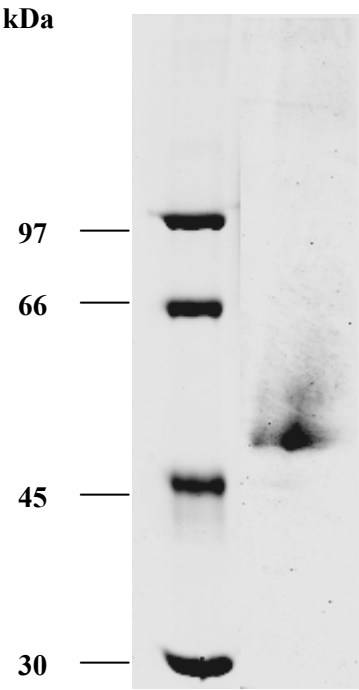


Figure 2

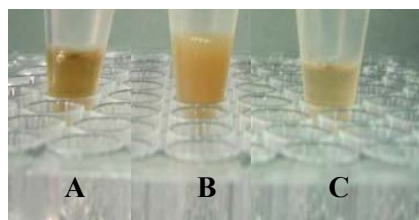


Figure 3

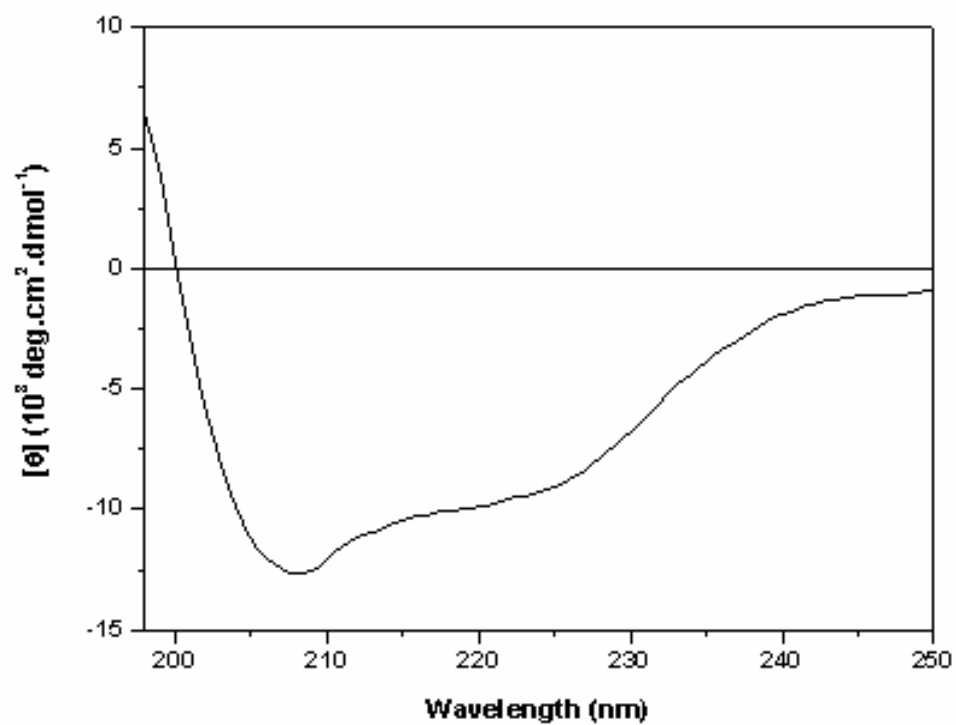


Figure 4

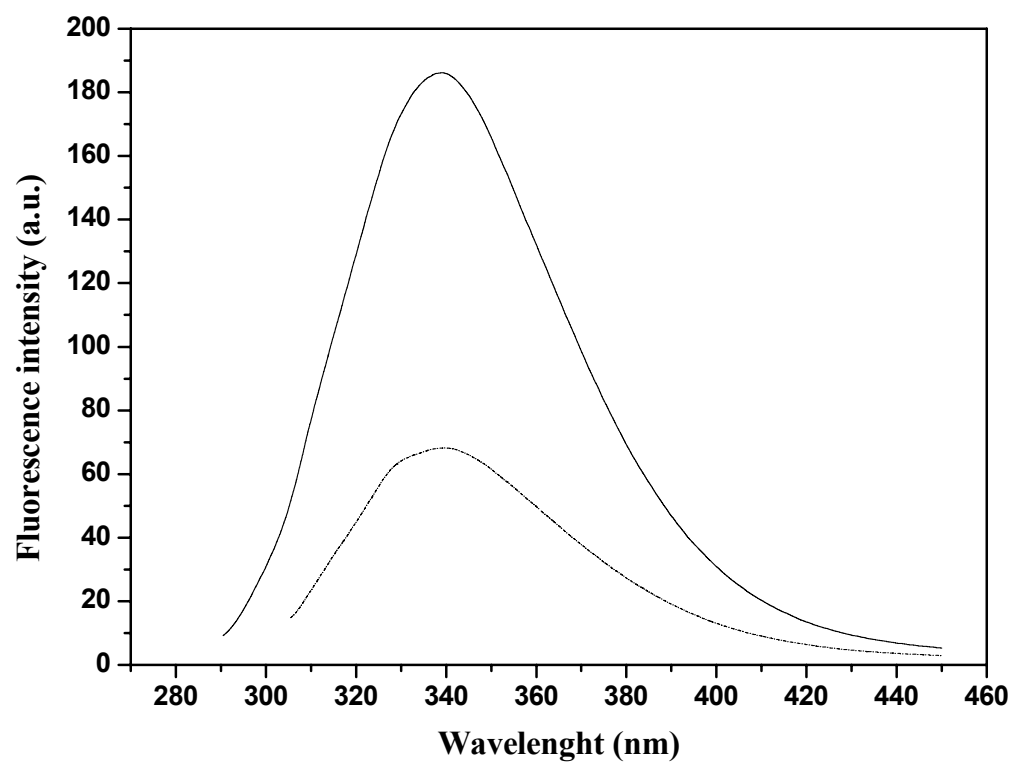


Figure 5

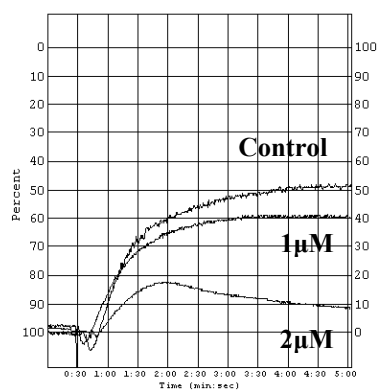
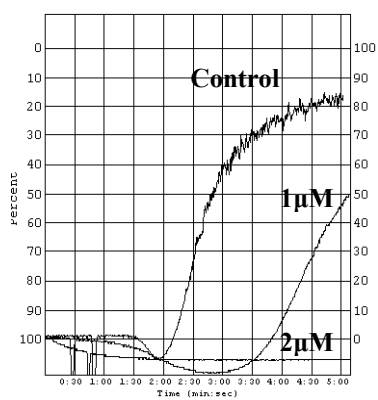
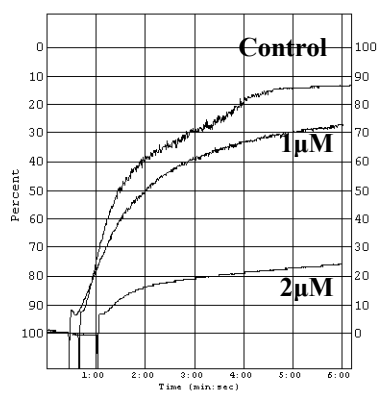
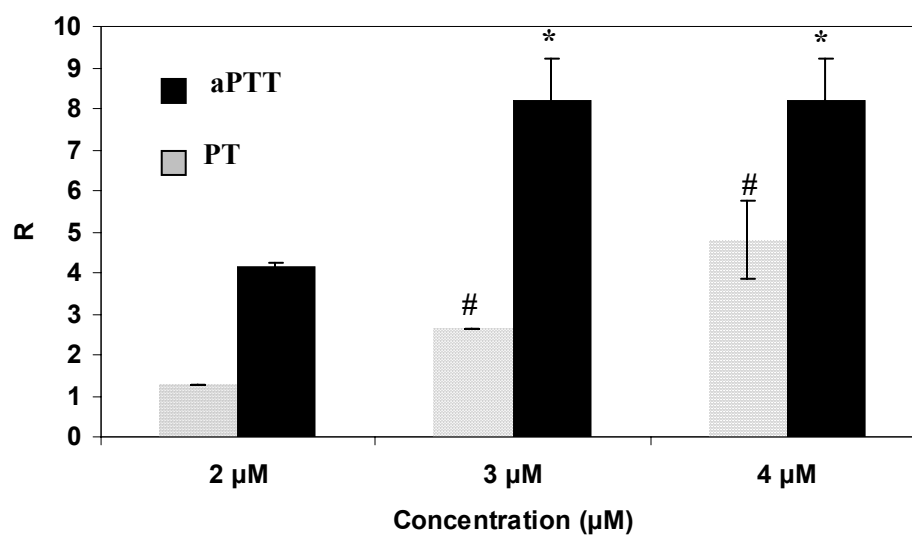
A**B****C**

Figure 6



5 CONCLUSÕES

ApcSP (antiplatelet and anticoagulant soybean protein) foi purificada pela combinação de fracionamento do extrato com sulfato de amônio (F0-60) e duas etapas cromatográficas envolvendo a cromatografia de afinidade no suporte Cramoll 1,4-Sepharose e cromatografia de fase reversa HPLC em uma coluna μ -Bondapack C 4. A homogeneidade de ApcSP foi avaliada por SDS-PAGE, sendo determinada uma banda polipeptídica de 51 kDa. A sequência do N-terminal de 10 resíduos apresentou apenas homologia de 20% com a albumina 2S tipo 3 de *Glycine max*.

A estrutura secundária da proteína, revelada pelo dicroísmo circular, foi característico de uma proteína predominantemente α -hélice, mas que se enquadra na classificação $\alpha + \beta$. O espectro de fluorescência da proteína revelou uma emissão máxima em torno de 339 nm, devido principalmente a resíduos de triptofano expostos.

ApcSP apresentou atividade peroxidásica frente aos substratos guaiacol e diaminobenzidina; inibiu na concentração de 2 μ M a agregação plaquetária induzida por colágeno, ADP e trombina e prolongou os tempos de coagulação (TP e TTPa), sendo o TTPa (relativo a Via Intrínseca da coagulação) mais afetado. Esses resultados evidenciam uma proteína de soja (ApcSP) que pode ser de grande importância para terapia anticoagulante e anti-trombótica.

6 ANEXOS

6.1 Normas para redação de artigos para a revista “The Journal of Biochemistry”

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The Journal of Biochemistry

Published by

The Japanese Biochemical Society (2008)

The Journal of Biochemistry publishes the results of original research in the fields of Biochemistry, Molecular Biology, Cell, and Biotechnology written in English in the form of Regular Papers or Rapid Communications. A Rapid Communication is not a preliminary note, but it is, though brief, a complete and final publication. The materials described in Rapid Communications should not be included in a later paper. The Journal also publishes short reviews (JB Review) and papers solicited by the Editorial Board. The submission of a manuscript implies that the work described has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if it is accepted for publication, the author(s) will transfer the copyright to the Japanese Biochemical Society. **Submission should be made through the online submission system at <http://mc.manuscriptcentral.com/jb>. We no longer handle submission by post. For further information on online submission, please see: Instructions for Online Submission.**

I. GENERAL INFORMATION

On submission of a paper, authors are requested to select one of the following four fields and its topic, under which the submitted paper should be reviewed, and to indicate their selection on the title page of the manuscript.

Fields to be selected:

Biochemistry

Molecular Biology

Cell

Biotechnology

Topics to be selected:

Biochemistry: Biochemistry General; Protein Structure; Protein Interaction and Recognition; Biomolecular Structures; Nucleic Acid and Peptide Biochemistry; Glycobiology and Carbohydrate Biochemistry; Lipid Biochemistry; Enzymology; Enzyme Inhibitors; Biochemistry of Proteolysis; Metabolism and Bioenergetics; Reactive Oxygen and Nitrogen Species; Biochemistry in Cell Membranes; Biochemistry in Diseases and Aging; Neurochemistry; Immunochemistry; Physiological Chemistry; Biochemical Pharmacology; Analytical Biochemistry

Molecular Biology: Molecular Biology General; Genes and Other Genetic Materials; Replication and Recombination; Gene Expression; Protein Synthesis; DNA-Protein Interaction; RNA Processing; Genetic Engineering; Genetic Diseases; Molecular Genetics;

Molecular Evolution; Bioinformatics

Cell: Cell General; Biomembranes, Organelles, and Protein Sorting; Muscles; Cytoskeleton, Cell Motility, and Cell Shape; Extracellular Matrices and Cell Adhesion Molecules; Cell Cycle; Receptors and Signal Transduction; Stress Proteins and Molecular Chaperones; Cell Death; Differentiation, Development, and Aging; Neurobiology; Tumor and Immunology

Biotechnology: Biotechnology General; Biomimetic Chemistry; Biomaterials; Bioactive Substances; Synthetic Peptides and Oligonucleotides; Gene and Protein Engineering; RNA Technology; Glycotechnology; Immunological Engineering; Cell and Tissue Engineering; Transgenic Technology; Gene Delivery Systems; Drug Delivery Systems; Biosensor and Bioelectronics; New Devices in Biotechnology; Environmental Technology

No definite limit of length is set for a Regular Paper, but all manuscripts should be as concise as possible. A concise well-written paper will usually reduce the time required for review and tends to be published more rapidly. A Rapid Communication should not exceed an equivalent of 3.5 printed pages including the spaces required for figures, tables, and references. In estimating this limit, note that one single typeset page is approximately 3.5 pages of a double-spaced type-written manuscript.

Manuscripts should be written in clear and concise, grammatical English. A contributor whose native language is not English is recommended to have the manuscript checked by a native speaker of English. The Journal will not assume the responsibility of polishing English.

A manuscript describing primary structures of biological macromolecules (proteins and nucleic acids) without sufficient data for their deductions within the limited page space is not acceptable as a Rapid Communication. **In the case of a Rapid Communication, the author should describe the urgency or necessity for the rapid publication in the cover letter.**

II. REVIEW PROCESS

Manuscript will be sent to at least two referees for evaluation. The JOURNAL always attempts to minimize the potential for conflict of interest in the review of manuscripts. Therefore, authors may request that a specific individual with a possible conflict of interest not be involved in reviewing the manuscript. Authors may suggest the names and addresses of a few potential reviewers. The Editors and Associate Editors will be guided but not necessarily bound by these suggestions. Contributors will receive an email from one of the Editors or Associate Editors stating whether their manuscript is acceptable. Revised manuscripts should be submitted through the online submission system. Correspondence concerning manuscripts should be sent directly to the relevant Editor. Revised papers will be considered as newly submitted papers if they are not resubmitted within 2 months for no justifiable reason. Handling of manuscripts is free of charge.

Manuscripts will be published online at <http://ib.oxfordjournals.org/> as “Advance Access” articles in 2 or 3 working days after acceptance. Authors should take care to follow instructions on Form and Style of Manuscript, as the pre-typeset manuscript will be published online. Authors who do not wish their papers to be published as “Advance Access” due to justifiable reason should contact the Editorial Office upon

submission.

However, manuscripts will be published in a formal issue only after agreement by the author(s) to pay the costs of publication including page charges (see "notes to contributors" in recent issues). Alteration in galley proofs, other than the correction of printer's errors, are not granted, except when the Editor admits inevitable addition of a brief note in proofs at the author's expense. Galley proofs corrected by authors should be returned to the printer by a designated date. Otherwise, the Editor reserves the right of proofreading. Illustrations, photographs, electron micrographs, color plates, and other special illustrations will be reproduced at the author's expense at cost prices. The list of these cost prices will be sent to the author after the final decision has been reached. Reprints can be purchased, in lots of 50 copies, at cost prices. The orders should be submitted with the returned proof. The members of the Editorial Board use the following guidelines to assist them in making editorial decisions. To inform prospective authors of our criteria, the guidelines are listed below, but please note that these are only guidelines. (1) Is the subject suitable for publication in the *Journal of Biochemistry*? (2) Is it an original contribution? (3) Is it a complete and final paper? (4) Is it clearly presented? (5) Are the summary and title informative? Do they reflect the contents of the paper? (6) Are the appropriate key words given? (7) Does the introduction contain statements sufficient to explain the aim of the work? (8) Are the methods sound? (9) Are the results relevant and sufficient? (10) Are the illustrations and tables necessary and acceptable? (11) Are the interpretations and conclusions justified by the data? (12) Are the references adequate; are all of them necessary? Does the list of references contain all the information?

In general, the *Journal of Biochemistry* will not publish papers that are: (1) Merely confirmatory or descriptive as to the presence of a well-known process in tissues or organisms not previously studied. (2) Not novel enough: purification of an enzyme or sequencing of a protein or nucleic acid which has already been reported for another species or organ, unless the manuscript includes novel findings or is of biological significance. (3) Too preliminary or incomplete: incomplete amino acid or nucleotide sequences, incomplete structures of natural compounds, incomplete NMR or other spectroscopic assignments, *etc.* (4) Deals only with the description of a new method or the preparation of a reagent such as a monoclonal antibody, unless it is novel or represents a substantial improvement. (5) Too specialized in areas outside the scope of the *Journal of Biochemistry*. (6) Just negative.

III. FORM AND STYLE OF MANUSCRIPT

Manuscripts should conform to the style and usage of the Journal as exemplified in current issues. They should be typed on A4 form (21 x 29.7 cm or 21.6 x 28 cm) with double-spacing throughout. Text should be double spaced, with font size between 10.5 to 11. Separate pages should be used for the following: (1) title page(s), (2) summary, (3) text, (4) footnote(s) to the text, (5) references, (6) table(s), (7) legend(s) to figure(s), (8) figures or other subsidiary matters, (9) supplementary data (if any). The manuscripts should be arranged in the order indicated above and all pages should be numbered in succession except the figure(s), the title page being page 1. Indicate the appropriate location in the text of the tables, figures, and other subsidiary materials by marginal notes. Latin words should be italicized (for example: *in vitro*, *i.e.*, *etc.*, *per se*). Footnote(s) to the

author's name(s), and affiliation(s) should appear on the title page. All footnotes should be numbered in succession with superscript, arabic numerals, starting from the title page footnote(s). Footnotes to tables should be identified with superscript lower case (a, b, *etc.*), and placed at the bottom of the table. Acknowledgement (if any) should appear after the main text, and before the References. It is advised that authors note any conflict of interest in this section.

IV. ORGANIZATION OF MANUSCRIPT

A desirable plan for the organization of a **Regular Paper** is as follows: **(a) SUMMARY, (b) INTRODUCTION** with no heading, **(c) EXPERIMENTAL PROCEDURES or MATERIALS AND METHODS, (d) RESULTS, (e) DISCUSSION, (f) REFERENCES.** In some cases, presentation will be clearer and more effective if the author combines some of these section. For a **Rapid Communication**, a brief summary is requested, but headings and subheadings should be omitted.

1. Title Page(s)

Provide a title page(s), containing the following items.

1. The form of the paper (Regular Paper or Rapid Communication). The field and its topic under which the paper is to be reviewed.
2. Title. The title should be informative and as short as is consistent with clarity. The title should not include chemical formulae or arbitrary abbreviations, but chemical symbols may be used to indicate the structures of isotopically labeled compounds. The numbering of parts in a series of papers is not permitted, but titles and subtitles may be used if necessary.
3. By-line. List full names of all authors. A footnote reference(s) to an author(s), indicating a change of address, should be given on the title-page.
4. From-line. List the institution(s) in which the work was carried out, and the Zip Code, if available.
5. Running title. Provide a short running title of less than 60 strokes. It should be as informative as possible.
6. The name, complete mailing address, telephone number, Fax number, and E mail address of the person to whom correspondence should be sent. To expedite the review, much of the journal's correspondence will be by E mail.

Abbreviations. Non-standard abbreviations (see Section X-6, 7, and 8) should be defined, even if they are known to those familiar with the field. List all non-standard abbreviations used in the paper in alphabetical order in a footnote on the title page.

2. Summary

(1) Every paper should have summary. The summary should be concisely written in less than 200 words. Summaries of Rapid Communications should be limited to 100 words. The summary should briefly present the problem, suggest the scope of the work and the plan of experiments, mention significant data and state major findings and conclusions. Avoid statements such as "The significance of these results is discussed" that do not help the reader. The summary should be intelligible to the nonspecialist as well as the specialist in your field, and hence should avoid specialized terms and abbreviations.

(2) Key words. Provide five key words identifying the nature of the subject matter **alphabetically** in the last part of the summary.

3. Introduction

The text of a **Regular Paper** should begin with a short introduction with no heading. This should state the reasons for performing the work, with brief reference to previous work on the subject. Avoid giving an extensive review of the literature.

4. Methods, Results, and Discussion

The arrangement of the paper after the introduction is not fixed. The author may separate sections with italicized subheadings. The **Experimental Procedures** or **Materials and Methods** should give sufficient details to enable the reader to repeat your work exactly, if necessary. **The necessity for conciseness should not lead to omission of important experimental details.** Refer to previously published procedures employed by citation of both the original description and pertinent published modifications, and do not include extensive description unless they present substantially new modifications. Combination of the Results and Discussion in a single section sometimes gives a clearer and more compact presentation.

5. References

References cited in the text should be numbered in parentheses with italicized Arabic numerals in order of appearance. References to "unpublished experiments" and "personal communications" should appear parenthetically in the text following the name(s) of the source of information [(Yamada, T., personal communication), (Suzuki, M. and Yoshida, M., unpublished observations) *etc.*]. Be sure to verify the wording of any personal communication with the person who supplied the information and get his approval for the use of his name in connection with the quoted information. All references should be listed in numerical order typed double-spaced on a separate sheet under the heading REFERENCES. Please note the following examples.

(1) For a journal article:

7. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with the chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467

(2) For a chapter in an edited book:

12. Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning in *Methods in Enzymology* (Wu, R., Grossman, L., and Moldave, K., eds.) Vol.101, pp. 20-51, Academic Press, New York

(3) For a book by one or more authors:

15. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* pp. 1339-1341, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Text citations to references written by more than two authors should be styled for example as, Smith et al. In the reference list, however, the names of all authors (with initials) must be given. If an article has been accepted for publication by a journal but has not yet appeared in print, the reference should be styled as follows:

29. Tanahashi, H. and Ito, T. (1994) Molecular characterization of a novel factor recognizing the interleukin-6 responsive element. *J Biochem.* (in press)

The use of "in preparation" and "submitted for publication" is not allowed in the reference list. Citation of the references written in a language which is usually unreadable for general readers and those published in a journal (or book) to which general reader could not easily access should be avoided.

6. Figure Legends

Figure legends should be prepared for each figure. There should be sufficient experimental detail in the legend to make the figure intelligible without reference to the text (unless the same material has been given with a previous figure, or in the Experimental Procedures section).

7. Nucleotide Sequence

New nucleotide data must be submitted and deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the three collaborating databanks is sufficient to ensure data entry in all. The accession number should be included in the manuscript e.g., as a footnote on the title page: "Note: Nucleotide sequence data reported are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession number(s)". If requested, the database will withhold release of data until publication. The most convenient method for submitting sequence data is by World Wide Web:

DDBJ via SAKURA: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL via WEBIN: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/webin.html>

GenBankTM via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>

or stand-alone submission tool

Sequin: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>

For special types of submissions (e.g., genomes, bulk submissions, etc.) additional submission protocols are available from the above sites.

Database Contact Information

DDBJ: Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan

National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, JAPAN;

telephone: +81 559 81 6853; fax: +81 559 81 6849; e-mail: ddbj@ddbj.nig.ac.jp; web

URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL: EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD U.K.; telephone: +44 1223 494499; fax: +44 1223 494472; e-mail: datasubs@ebi.ac.uk; web URL:

<http://www.ebi.ac.uk>

GenBank: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bldg. 38A, Rm 8N-803, Bethesda, MD 20894, U.S.A.; telephone: +1 301 496 2475; fax: +1 301 480 9241; e-mail: info@ncbi.nlm.nih.gov; web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

V. PREPARATION OF TABLES

1. Tables should be drawn on separate pages and numbered consecutively in Roman numerals. For aid in designing tables in acceptable style, refer to current issues of the

Journal.

2. Each table should have an explanatory title and sufficient experimental detail, usually in a paragraph immediately following the title, to be intelligible without reference to the text (unless the procedure is given in the Experimental Procedures section, or under another table or figure).
3. Indicate units of measure clearly.
4. Footnotes to tables should be kept to a minimum and should be indicated by superscript lower cases, at the bottom of the table.

VI. PREPARATION OF ILLUSTRATIONS

1. Each figure (Scheme, Diagram) should be given on a separate file numbered with an Arabic numeral (Fig. 1, Fig. 2, *etc.*). Figures will be reduced to fit into the type area of the printed page (17.5 x 23.5 cm).
2. Indicate the magnification of photomicrographs in the legend or include a bar indicating the scale in the figure.
3. Flow diagrams and amino acid or nucleotide sequences should always be presented as direct photographic reproduction.
4. Color Figure

Color figures will be printed at the expense of the authors. Authors are required to pay 60,000 yen per page of color. If 2 color figures are printed on separate pages, the authors will be charged for 2 pages of color, whereas if 2 color figures are printed on the same page, the charge will be for 1 page. For detail, please contact the Editorial Office.

VII. SUPPLEMENTARY DATA

Supporting material that cannot be included, and which is not essential for inclusion in the full text of the manuscript, but would nevertheless benefit the reader can be published online. Authors are encouraged to take advantage of the opportunity to submit Supplementary data whenever appropriate; for example, when the amount of material is too great to warrant inclusion in the main body of the paper, or when the material is in a format that cannot be represented in print (i.e. video clips or animated graphics).

All material to be considered as Supplementary data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. Please indicate clearly the material intended as Supplementary data upon submission. Also ensure that the Supplementary data is referred to in the main manuscript at an appropriate point in the text.

Supplementary data should be submitted in a separate file(s), in its final form. Please note that Supplementary data will not be edited, so ensure that it is clearly and succinctly presented, and that the style of terms conforms to the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any internet browser.

Acceptable formats:

A maximum of 10 files is acceptable to make up the supplementary data unit for the article. The maximum size per file should not exceed 1.5 MB. An HTML index page is usually created to link in the Supplementary data file(s). Please provide short (2-4 word) titles for each individual file- these will be used to create links to the files from the index page.

VIII. CHEMICAL AND MATHEMATICAL FORMULAE

1. Refer in the text to simple chemical compounds by their formulae when these can be printed in simple horizontal lines of type. Do not use structural formulae in the running text.
2. Ionic charge should be shown as a superscript following the chemical symbol, *e.g.* Fe³⁺, SO₄²⁻.
3. Prepare large structural formulae and long mathematical equations in a form suitable for direct photographic reproduction and include them as a Diagram at the end of the paper.
4. **Isotopically Labeled Compounds**—The symbol for an isotope is shown in square brackets directly before the name (word), as in [¹⁴C]urea, [α -¹⁴C]leucine, DL-[methyl-¹⁴C]methionine. When more than one position in a substance is labeled with the same isotope and the positions are not indicated, the number of labeled atoms should be indicated as a right-hand subscript; as in [¹⁴C₂]glycolic acid. The symbol *U* indicates uniform, *e.g.* [*U*-¹⁴C]glucose (where the ¹⁴C is uniformly distributed among all six positions). The isotopic prefix precedes that part of the name to which it refers, as in sodium [¹⁴C]formate, thiamine [β -³²P]diphosphate. Terms such as ¹³¹I-labeled albumin should not be contracted to [¹³¹I]albumin. When isotopes of more than one element are introduced, their symbols should be arranged in alphabetical order: *e.g.* L-[3-¹⁴C, 2,3-²H, ¹⁵N]serine. The symbols ²H and ³H or D and T may be used for deuterium and tritium, respectively. For simple molecules, the labeling is indicated by writing the chemical formulae with the prefix superscripts attached to the correct atomic symbols in the formulae: *e.g.* ¹⁴CO₂, H₂¹⁸O ²H₂O. Square brackets should not be used for them, or when the isotopic symbol is attached to a word that is not a specific chemical name, abbreviation or symbol: *e.g.* ¹³¹I-labeled, ¹⁴C-sugar, ¹⁴C-steroids, ³²PO₄³⁻, but [³²P]-phosphate.
5. **Spectrophotometric Data**—Beer's law may be stated as

$$A = -\log T = \epsilon lc$$

Where *A* is the absorbance; *T*, the transmittance ($-I / I_0$); ϵ , the molar absorption coefficient; *c*, the concentration of the absorbing substances in moles per liter; and *l*, the length of the optical path in centimeters. Under these conditions ϵ has the dimensions liter•mol⁻¹•cm⁻¹ or more briefly M⁻¹•cm⁻¹ (not cm⁻¹•mol⁻¹). Do not use "O.D." and "E."

IX. ETHICS

In scientific investigations involving human subjects, experiments should be performed in accordance with the ethical standards formulated in the Helsinki Declaration of 1964 (revised in 1989, *cf.* <http://ohsr.od.nih.gov/>). Similarly, animal experiments should follow the ethical standards formulated in the Helsinki Declaration, and measures taken to protect animals from pain or discomfort should be mentioned.

X. TERMINOLOGY AND ABBREVIATIONS

1. Abbreviations with specific meanings may be used for convenience for complex chemical substances, particularly in equations, tables, or figures. Avoid using abbreviations in titles and summaries except the standard ones listed in Table II of Section X-8.
2. Use abbreviations and symbols sparingly in the text. In chemical equations, which

traditionally depend upon symbols, an abbreviation or symbol may be used for a term that appears in full in the neighboring text. Trivial names are usually sufficiently short not to require abbreviations.

3. An abbreviated name or symbol in a column heading in a table, figure, or photograph must either be taken from the "accepted" list given in Section X-8 or formulated in accordance with the principles of Section X-6.

4. For spelling of chemical names consult current issues of the Journal. For chemical terms follow essentially the usages and rules recommended by International Scientific Union, especially Nomenclature Committee of IUBMB (NC-IUBMB, IUBMB: International Union of Biochemistry and Molecular Biology) and IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN, IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry): see the recommendations in *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (1978), available from The Biochemical Society, 7 Warwick Court, London WC1R 5DP, U.K. and in *Biochemical Nomenclature and Related Documents. A Compendium*, 2nd edn (Liébecq, C., ed.), Portland Press Ltd, London (1992). (see *Eur. J. Biochem.* **213**, 1–3 (1993)).

Refer also to <http://www.chem.qmw.ac.uk/iupac/jcbn/>

5. Enzymes—Where one or more enzymes figure prominently in a manuscript, authors should use the recommended (trivial) name or systematic name given by Nomenclature Committee of IUBMB and IUPAC-IUBMB Commission on Biochemical Nomenclature: see

Enzyme Nomenclature, Recommendations (1992), Academic Press Inc.,

see also *Eur. J. Biochem.* **213**, 1–3 (1993).

—Supplement *Eur. J. Biochem.* **223**, 1–5 (1994).

—Supplement 2 *Eur. J. Biochem.* **232**, 1–6 (1995).

—Supplement 3 *Eur. J. Biochem.* **237**, 1–5 (1996).

—Supplement 4 *Eur. J. Biochem.* **250**, 1–6 (1997).

When an enzyme is the main subject of a paper, its source, trivial name, systematic name (or the reaction that it catalyzes) and code number (preceded by "EC") should be included.

6. Non-Standard Abbreviations—Use of abbreviations other than the standard ones listed in X-7 and X-8 should be kept to a minimum. Such abbreviations should be introduced only when absolutely necessary, as in tables, figures, and other illustrations where space is particularly limited. Abbreviations are usually not needed in the text of a paper where repeated use of long names can be avoided by judicious use of pronouns, or by paraphrasing with words such as "the substrate," "the inhibitor," "the methyl derivative" etc. **All non-standard abbreviations used in the text should be defined in alphabetical order in a single footnote on the title page.**

7. Abbreviations of Units of Measurement and Physical and Chemical Quantities—These abbreviations listed in Table I may be used without definition.

TABLE I

(1) Prefixes to the names of units

tera 10^{12} T	milli 10^{-3} m
giga 10^9 G	micro 10^{-6} μ
mega 10^6 M	nano 10^{-9} n
kilo 10^3 k	pico 10^{-12} p
deci 10^{-1} deci (not d)	femto 10^{-15} f
centi 10^{-2} c ¹⁾	atto 10^{-18} a

(2) Units of Concentration²⁾

molar (moles/liter)	M
millimolar (millimoles/liter)	mM (not 10^{-3} M)
micromolar (micromoles/liter)	μ M (or 10^{-6} M)
nanomolar (nanomoles/liter)	nM (or $\times 10^{-9}$ M)
picomolar (picomoles/liter)	pM (or $\times 10^{-12}$ M)

(3) Units of Length

meter	m
centimeter	cm
millimeter	mm
micrometer (not micron)	μ m (not μ)
nanometer	nm (not μ)
Ångstrom (0.1 nm)	Å

(4) Units of Area and Volume

square centimeter	cm^2
cubic centimeter	cm^3
liter	l (in tables only)
milliliter	ml
microliter	μ l (not λ)

(5) Units of Mass

gram g (kg, mg, μg [not γ], ng, pg)
dalton³¹ Da

(6) Units of Time

hour h year yr
minute min month mo
seconds s week wk
day d

(7) Units of Radioactivity

becquerel Bq (= 1 dps or 60 dpm)
counts per minute cpm
curie(s) Ci (= 3.7×10^{10} Bq)
disintegrations per minute dpm

(8) Other Units

mole	mol (mmol, μmol , nmol, pmol)
degree Celcius	$^{\circ}\text{C}$
degree absolute (kelvin)	K
joule	J
kilojoule	kJ
calorie	cal
kilocalorie	kcal
parts per billion	ppb
parts per million	ppm
cycles per second (hertz)	Hz (not cps)
equivalent	eq
ampere	A (mA)
ohm	Ω
volt	V
gauss	G
pascal	Pa
revolutions per minute	rpm
Svedberg unit of sedimentation coefficient (10^{-13} s)	S

(9) Physical and Chemical Quantities

absorbance	A
equilibrium constant	K
rate constant	k
maximum velocity	$V_{\max}$
Michaelis constant	K_m
equilibrium dissociation constant	K_d
isoelectric point	pI
molecular weight	M_r
retardation factor	R_f
acceleration of gravity	g
specific rotation	$[\alpha]_{\lambda}^t$
partial specific volume	v (bar)
diffusion constant	D
sedimentation coefficient	s
density	ρ
sedimentation coefficient in water at 20°C	$s_{0,20,w}$
extrapolated to zero concentration	
Gibbs energy change	ΔG
entropy change	ΔS
enthalpy change	ΔH
melting temperature	T_m

(10) Other Terms

logarithm	log
logarithm (natural)	ln
standard deviation of a series	SD
standard error of mean of series	SE

1) to be avoided where possible (except for cm).

2) Terms such as milligram percent (mg %) should not be used. Weight concentrations should be given as g/ml, g/100 ml, *etc.*

3) Molecular weight is dimensionless. Only molecular mass is expressed by daltons.

8. Accepted Abbreviations and Symbols—Authors may use, without definition, the abbreviations given in Table II and the symbols and abbreviations for amino acid or nucleotide residues in polymers or sequences. Define other abbreviations in a single footnote on the title page.

TABLE II

(1) General

Adenosine 3':5'-cyclic monophosphate	cAMP
Adenosine 5'-mono-, di, and triphosphates ¹⁾	AMP, ADP, and ATP
Adenosine triphosphatase	ATPase
Base pair(s)	bp
Bovine serum albumin	BSA
O-(Carboxymethyl)	CM-
Circular dichroism	CD
Coenzyme A and its acyl derivatives	CoA (or CoASH) and acyl-CoA
Complementary DNA	cDNA
Cyclic AMP	cAMP
Cyclic GMP	cGMP
Cytidine diphosphate choline, <i>etc.</i>	CDP-choline, <i>etc.</i>
Cytidine 5'-mono-, di-, and triphosphates	CMP, CDP, and CTP
Deoxyribonuclease	DNase
Deoxyribonucleic acid	DNA
O-(Diethylaminoethyl)	DEAE-
Dithiothreitol	DTT
Electron paramagnetic resonance	EPR
Electron spin resonance	ESR
Ethylenediaminetetraacetic acid	EDTA
[Ethylenebis(oxyethylenenitrilo)]-tetraacetic acid	EGTA
Flavin-adenine dinucleotide and its fully reduced form	FAD and FADH ₂
Flavin mononucleotide and its fully reduced form	FMN and FMNH ₂
Fourier transform	FT
Gas chromatography-mass spectrometry	GC-MS
Gas liquid chromatography	GLC
Glutathione and its oxidized form	GSH and GSSG
Guanosine 3':5'-cyclic monophosphate	cGMP
Guanosine 5'-mono-, di-, and triphosphates	GMP, GDP, and GTP
Guanosine triphosphatase	GTPase
Hemoglobin	Hb
Heterogenous nuclear RNA	hnRNA

High performance (pressure) liquid chromatography	HPLC
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid	HEPES
Immunoglobulin	(IgG, IgM, <i>etc.</i>)
Infrared	IR
Inorganic orthophosphate	P _i
Inorganic pyrophosphate	PP _i
Inosine 5'-mono-, di-, and triphosphates	IMP, IDP, and ITP
Kilobases	kb
Kilobase pairs	kbp
Lethal dose, 50%	LD ₅₀
Messenger RNA	mRNA
Nicotinamide adenine dinucleotide and its reduced form	NAD ⁺ and NADH ²⁾
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and its reduced form	NADPH ²⁾
Nuclear magnetic resonance	NMR
Nuclear RNA	nRNA
Optical rotatory dispersion	ORD
Phosphoric acid residue	P- or -P
Pseudouridine and pseudouridine mononucleotide	ψ and ψ MP
Polyacrylamide gel electrophoresis	PAGE
Poly(adenylic acid), polyadenylate ³⁾	Poly(A) ³⁾
Polymerase chain reaction	PCR
Restriction fragment length polymorphism	RFLP
Ribonuclease	RNase
Ribonucleic acid	RNA
Ribosomal RNA	rRNA
Ribosylthymine 5'-mono-, di-, and triphosphates	TMP, TDP, and TTP
Sodium dodecyl sulfate	SDS
Thin layer chromatography	TLC
Thymidine (2'-deoxyribosylthymine) 5'-mono-, di-, and triphosphates	dTMP, dTDP, and dTTP ⁴⁾
Transfer RNA	tRNA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris
Ultraviolet	UV
Uridine diphosphate glucose, <i>etc.</i>	UDP-glucose, <i>etc.</i>
Uridine 5'-mono-, di-, and triphosphates	UMP, UDP, and UTP

(2) Amino acids

Alanine	Ala (A)
Arginine	Arg (R)
Asparagine	Asn (N)
Aspartic acid	Asp (D)
Aspartic acid or asparagine	Asx (B)
Cysteine	Cys (C)
Glutamic acid	Glu (E)
Glutamine	Gln (Q)
Glutamic acid or glutamine	Glx (Z)
Glycine	Gly (G)
Histidine	His (H)
Isoleucine	Ile (I)
Leucine	Leu (L)
Lysine	Lys (K)
Methionine	Met (M)
Phenylalanine	Phe (F)
Proline	Pro (P)
Serine	Ser (S)
Threonine	Thr (T)
Tryptophan	Trp (W)
Tyrosine	Tyr (Y)
Valine	Val (V)

(3) Nucleic acids

Adenosine	A
Bromouridine	BrUrd or B
Cytidine	C
Dihydrouridine	D or hU
Guanosine	G
Inosine	I
6-Mercaptopurine ribonucleoside (6-thioinosine)	M or sI
'a nucleoside'	Nuc or N
Pseudouridine	ψ or Q ^a
'a purine nucleoside'	R
'a pyrimidine nucleoside'	Y

Thiouridine	S or sU
Thymidine (2'-deoxyribosylthymine)	dT
Uridine	U
Xanthosine	X
Phosphoric residue	-P or p

1) The various isomers of adenosine monophosphate may be written 2'-AMP, 3'-AMP, or 5'-AMP (in case of possible ambiguity). A similar procedure may be applied to other nucleoside or deoxyribonucleoside monophosphates.

2) NAD(P)⁺ and NAD(P)H indicate either NAD⁺ or NADP⁺ and either NADH or NADPH, respectively.

3) Similarly abbreviate oligo- and polynucleotides composed of repeating sequences or of unknown sequence of given purine or pyrimidine bases, *e.g.* oligothymidylate, oligo(dT); alternating copolymer of A and U, poly(A-U); random copolymer of A and U, poly(A,U).

4) The d prefix may be used to represent the corresponding deoxyribonucleoside phosphates, *e.g.* dADP.

9. Names of Animals, Plants, and Microorganisms—The scientific names are Latin binomials and should be given in full in the title and summary and on first mention in the text (*e.g.* *Escherichia coli*). Subsequently, the generic name may be contracted (usually to the first letter), *e.g.*, *E. coli*. The strain of laboratory animals and if possible the source should be stated.

10. The cytochromes should be designated by a small italicized letter, *e.g.* cytochrome *a*, *b*₂, *c*₁, *etc.*

XI. COPYRIGHT

The Journal is copyrighted by the Japanese Biochemical Society. Requests for any reproduction or translation of this journal should be made in duplicate to the Managing Editor of the Journal,

The Japanese Biochemical Society

Ishikawa Building-3f

25-16, Hongo 5-chome, Bunkyo-ku

Tokyo 113-0033, Japan

and should include a statement of intended use as well as explicit specifications of the material to be reproduced.

Authors are advised to consult "Notes to Contributors" appearing in every issue of the Journal in which any revisions of "Instructions to Authors" will be announced.

XII. CHARGES TO AUTHORS

A page charge (currently 1,000 yen and 8,600yen per printed page of a Regular Paper and a Rapid Communication, respectively, and subject to change) is levied to help publication cost. Under exceptional circumstances, when no source of grant or other support exists, the authors may apply, at the time of submission, for a grant-in-aid to the Editor-in-Chief.

6.2 Resumos em Congressos

Resumos apresentados na SBBq 2006

H-24 EVALUATION OF ISOFORMS FROM *Cratylia mollis* SEED LECTIN AS HISTOCHEMICAL MARKERS FOR HUMAN PROSTATIC TISSUES.

Lima, A.L.R., Silva, M.C.C., Cavalcanti, C.L.B., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.S.

H-23 EFFICIENCY OF IMMOBILIZED MOLECULAR FORMS FROM *Cratylia mollis* SEED LECTIN IN BINDING PEROXIDASE.

Silva, M.C.C., Araújo, F.F.B., Lima, A.L.R., Silva, A.K.S., Silva, M.D.C., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S.

Resumos apresentados na SBBq 2007

H-122 HISTOCHEMISTRY EVALUATION OF THE EFFECT OF *Cratylia mollis* LECTIN ON EXPERIMENTAL SCHISTOSOMIASIS.

Lima, A.L.R., Silva, M.C.C., Melo, C.M.L., Coelho, L.C.B.B., Carneiro-Leão, A.M.A., Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.S.

H-27 PURIFICATION OF PEROXIDASE FROM SOYBEAN THROUGH AFFINITY CHROMATOGRAPHY ON IMMOBILIZED *Cratylia mollis* LECTIN (CRAMOLL 1,4-SEPHAROSE).

Silva, M.C.C., Lima, A.L.R., Silva, M.D.C., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S.

H-3 ANTIFUNGAL EFFECT OF BMOLL (*Bauhinia monandra* LEAVES) AND CLAVELL (*Cladonia verticillaris* LICHEN) LECTINS ON *Fusarium* SPECIES.

Silva, M.D.C., Silva, M.C.C., Souza, J.D., Argolo, A.C.C.M., Melo, C.M.L., Gusmão, N.B., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B.

Resumos apresentados na FESBE 2007

HISTOQUÍMICA COM LECTINAS DE TECIDOS ESQUISTOSSOMÓTICOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E TRATADOS COM A LECTINA DE *Cratylia mollis*.
Lima, A.L.R., Silva, M.C.C., Melo, C.M.L., Coelho, L.C.B.B., Carneiro-Leão, A.M.A., Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.S.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEROXIDASE DE FEIJÃO DE SOJA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM CRAMOLL 1,4-SEPHAROSE.
Silva, M.C.C., Lima, A.L.R., Silva, M.D.C., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S.

EFEITO ANTIFÚNGICO DAS LECTINAS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra* (BMOLL) E DO LÍQUEN *Cladonia verticillaris* (CLAVELL) SOBRE ESPÉCIES DE *Fusarium*.
Silva, M.D.C., Silva, M.C.C., Melo, C.M.L., Gusmão, N.B., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B.