



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA
NÍVEL MESTRADO

**Avaliação da Atividade Hipoglicemiante da Lectina de
Folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) em camundongo
NOD (*Non Obese Diabetic*)**

CHRISJACELE SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

RECIFE

2012

CHRISJACELE SANTOS FERREIRA DE ARAUJO

**Avaliação da Atividade Hipoglicemiante da Lectina de
Folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) em camundongo
NOD (*Non Obese Diabetic*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como pré-requisito para a obtenção do título em Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia de Menezes Lima

Banca examinadora:

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Presidente/UFPE)

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE)

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (UFPE)

Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho (Externo)

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Araujo, Chrisjacele Santos Ferreira de
Avaliação da atividade hipoglicemiante da lectina de folhas de
***Bauhinia monandra* (BmoLL) em camundongo NOD (*Non Obese Diabetic*)**
Chrisjacele Santos Ferreira de Araújo– Recife: O Autor, 2012.

63 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Coorientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de

Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e
Fisiologia, 2012.

Inclui referências

1. Lectinas 2. *Bauhinia* 3. Diabetes I. Coelho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso (orientadora) II. Lima, Vera Lúcia de Menezes (coorientadora) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-073



**Avaliação da Atividade Hipoglicemiante da Lectina de
Folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) em camundongo
NOD (*Non Obese Diabetic*)**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho (Presidente/UFPE)

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE)

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (UFPE)

Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho (membro externo)

Data: 15/02/2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus antes de tudo, por todos os risos que me deram forças e pelas horas difíceis que me ensinaram muito, agradeço ainda por todos que conheci e por todas as amizades que fiz, como também pela família na qual Ele me colocou sem meus pais, sem meu irmão e todos os que amo, nunca estaria onde estou! Por tudo obrigada Senhor!

Agradeço a Prof.^a Luana Cassandra e Prof.^a Vera Menezes que confiaram e me deram essa oportunidade, aprendi com elas não apenas o que a mim cabia como mestrandas, mas também o que é ter força, fé, ética, para mim elas não são apenas professoras, mas exemplos de pessoas.

Agradeço ao Prof.^o Anibal Vercesi que me aceitou em seu Laboratório para conclusão dos meus experimentos, para mim foi uma grande oportunidade e o apoio da Prof.^a Helena Coutinho durante todo o tempo em que estive em Campinas-SP.

Aos meus amigos que me ajudaram durante todo em especial a todos do Laboratório de Glicoproteínas, Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídios e Lipoproteínas como também o Laboratório de Bioenergética, Unicamp. Pelos esclarecimentos nas horas de dúvidas, pela força e companhia nos fins de semana e feriados, pelos risos e enfim por todo aprendizado!

De maneira especial agradeço a pessoas que foram determinantes no trabalho do dia-a-dia, Carina Malaguti, Maria Barbosa Reis, Albérico Real e João Antônio Virginio.

Por esta oportunidade por tudo e por todos, Obrigada Deus!

“Senhor fazei de mim um instrumento de tua Paz...”.
(São Francisco de Assis).

RESUMO

Diabetes mellitus (DM) caracteriza um grupo de doenças metabólicas resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina que levam à hiperglicemia. As plantas do Gênero *Bauhinia*, pertencentes à Família das Fabaceae, conhecidas como “pata-de-vaca” são utilizadas pela medicina popular para o tratamento de diabetes em várias regiões do mundo, tais como África, Ásia bem como América Central e do Sul; estudos prévios já demonstraram atividade hipoglicemiante de extrato folhas de *Bauhinia monandra*. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, que reconhecem e se ligam a carboidratos de forma específica e reversível. Uma lectina presente em folhas da *B. monandra* (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*), galactose específica, foi purificada através de cromatografia de afinidade em gel de guar. Apenas uma banda foi revelada por eletroforese em gel de poliacrilamida, PAGE, para proteínas nativas. Os efeitos da ação hipoglicemiante do tratamento de BmoLL purificada em camundongos NOD (*NON OBESE DIABETIC*), foi avaliado a na utilização de três grupos de animais, cada grupo com (n=4), intraperitonealmente, por 21 dias. O grupo tratado com BmoLL recebeu 60mg/kg/dia, o grupo controle para diabetes não tratado recebeu veículo, água. Grupo controle para valores normoglicêmicos foram camundongos que não desenvolveram diabetes. No grupo tratado os picos hiperglicêmicos foram vistos antes do tratamento, em uma média de glicose ($307,50 \pm 83,30$ mg/dL), equivalente ao grupo diabéticos não tratados $364,5 \pm 106,24$ mg/dl. No final do tratamento, 21dias, o grupo tratado ($137,50 \pm 68,26$ mg/dL) atingiu valores equivalentes ao grupo normoglicêmico ($110,50 \pm 16,66$ mg/dL). O controle nos níveis glicêmicos no grupo tratado mostrou apenas diferença estatística significativa ($p= 0,002$) em comparação com o grupo que recebeu apenas veículo. Já o grupo de camundongos não diabéticos, ou seja, normoglicêmicos quando comparado com o grupo tratado não apresentou diferença estatística significativa ($p= 0,12$) os testes foram realizados pelo teste “t” de “Student”. Observando as consequências secundárias a hiperglicemia apresentadas pelo grupo controle para diabetes não tratado, não foram apresentadas pelo grupo tratado com BmoLL nem pelo grupo controle de níveis normoglicêmicos; conclui-se que a ação do tratamento com BmoLL ao ser capaz de controlar os níveis glicêmicos a valores normais de forma continua minimizou também as complicações secundárias a hiperglicemia, durante todo o período de 21 dias. Necessários estudos posteriores para entendimento dos mecanismos pelos quais a BmoLL tem seu efeito hipoglicemiante.

Palavras-Chave: *Bauhinia monandra*, Lectina BmoLL, camundongos NOD, *Diabetes Mellitus*, atividade hipoglicemiante.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) features a group of metabolic disorders resulting from defects in the secretion and/or insulin action leading to hyperglycemia. The plants of the genus *Bauhinia*, belonging to the family *Fabaceae*, known as "paw-of-cow" are used in folk medicine for the treatment of diabetes in many parts of the world such as Africa, Asia and Central and South America; previous studies have demonstrated hypoglycemic activity of leaf extract of *Bauhinia monandra*. Lectins are proteins or glycoproteins of non- immune origin which recognize and bind carbohydrates specifically and reversibly form. A lectin present in the leaves of *B. monandra* (BmoLL , *B. monandra* Leaf Lectin), specifically galactose was purified by affinity chromatography on guar gel. Only one band was revealed by polyacrylamide gel PAGE for native proteins. The effects of treatment with hypoglycemic action BmoLL purified NOD (non obese DIABETIC) was evaluated using the three groups of animals, each group (n=4) intraperitoneally for 21 days. The treated group received 60mg/kg/day BmoLL, the control group received untreated diabetes vehicle, water. Values for the control group were normoglycemic mice did not develop diabetes. In the group treated hyperglycemic peaks were seen before treatment, at an average glucose ($307.50 \pm 83.30\text{mg/dL}$), equivalent to the untreated diabetic group $364.5 \pm 106.24\text{mg /dl}$. At the end of treatment, 21 days, the treated group ($137.50 \pm 68.26\text{mg/dL}$) achieved equivalent to the normoglycemic group ($110.50 \pm 16.66\text{mg/dL}$) values. The control on blood glucose levels in the treated group showed only statistically significant difference ($p=0.002$) compared with the group that received only vehicle. The group of non-diabetic mice, ie, normoglycemic compared with the treated group showed no statistically significant difference ($p=0.12$) tests were performed by the "*t*" of "*Student*" test. Observing the secondary consequences hyperglycemia presented by the control group to untreated diabetes, were not presented by the group treated with BmoLL nor the normoglycemic control group levels, it is concluded that the action of treatment with BmoLL to be able to control blood glucose levels to normal values continuously also minimized the complications secondary to hyperglycemia during the whole period of 21 days. Required further studies to understand the mechanisms by which BmoLL has its hypoglycemic effect .

Keywords: *Bauhinia monandra*, *Diabetes Mellitus*, hypoglycemic activity, Lectin BmoLL, NOD mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela lectina de ligação a carboidratos de superfície e (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres. (inserções) Aspectos de ensaio em placas de microtitulação.	16
Figura 2. Aspectos de <i>Bauhinia monandra</i> .	22
Figura 3. Ilhota de Langerhans no pâncreas.	24
Figura 4. Produção e ação da insulina no organismo humano.	25
Figura 5. Camundongos NOD (<i>Non Obese Diabetic</i>).	29

ARTIGO

Figure 1. Blood glucose levels from NOD mice treatment with pure BmoLL. Time 0 (zero), before treatment; time 7, 14, and 21 days of treatment (three groups, n = 4); untreated diabetes group received vehicle (water); BmoLL treated diabetic group (60 mg/kg/day) and nondiabetic normoglycemic value group. BmoLL treated group showed a statistically significant difference ($p = 0.002$) as compared with control group not treated for diabetes treated group and compared with control group to normoglycemic levels showed no statistically significant difference ($p = 0.12$). 61

Figure 2. NOD mice weighing during treatment with pure BmoLL, divided into time 0 (zero) start of treatment, with 7, 14 and 21 days of treatment groups: control group received vehicle (water); group (BmoLL) treated (60mg/kg/day), non-diabetic group for normoglycemic values. BmoLL treated group showed a statistically significant difference ($p = 0.02$) as compared with control group not treated for diabetes, but the treated group compared with the control group to normoglycemic levels showed no statistically significant difference being ($p = 0, 12$). 62

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Americana Diabetes Association
BmoLL	Lectina de folhas da <i>B. monandra</i> (<i>B. monandra Leaf Lectin</i>)
BmoRoL	Lectina de raízes secundarias de <i>Bauhinia monandra</i>
CMoL	Lectina de sementes de <i>Moringa oleífera</i>
CramoLL 1,4	Lectina de sementes de <i>Cratylia mollis</i>
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
NOD	Camundongos (<i>Non Obese Diabetic</i>)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
Epígrafe.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
1 INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 Lectinas.....	12
2.1.1 Generalidades.....	12
2.1.2 Lectina de Plantas.....	18
2.2 Gênero <i>Bauhinia</i>	20
2.2.1 <i>Bauhinia monandra</i>	22
2.3 Diabetes Mellitus	23
2.3.1 Camundongos NOD	29
2.4 Possível composto hipoglicemiante da espécie <i>Bauhinia monandra</i>.....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4 REFERÊNCIAS	33
5 ARTIGO CIENTÍFICO	47
6 CONCLUSÃO.....	63

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido usadas como fontes de medicamentos, por populações em todo o mundo, é perceptível o interesse no estudo por plantas medicinais, como exemplo as plantas do Gênero *Bauhinia*, Família *Fabacea*. No Brasil são conhecidas como “pata-de-vaca” e as suas folhas são usadas popularmente em forma de chás (infusão) para o tratamento de diabetes, como anti-inflamatório e analgésico.

Existe a necessidade de pesquisa científica na busca de comprovação ou desmistificação de tais plantas, pois o uso por parte população sem avaliação pode trazer riscos, por extratos de plantas terem em sua composição diversas substâncias que podem apresentar toxicidade, como também é preciso comprovar e identificar os compostos que apresentam as propriedades desejadas, sendo necessárias purificações de tais compostos.

Foi purificada uma lectina presente em folhas da espécie *Bauhinia monandra* (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*), dentre diversos compostos purificados de plantas estão as lectinas que são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos de forma não-catalítica, por reconhecimento específico e reversível sendo de origem não imune. Tais carboidratos presentes nas lectinas podem desempenhar papéis importantes no armazenamento ou na transmissão de informação dentro da célula ou entre as células, assim são excelentes em investigações como agentes terapêuticos.

Diante das atividades encontradas em outras lectinas e do uso da medicina popular das plantas do gênero *Bauhinia*, na espécie *B. monandra* há possibilidade dos relatos feitos pela população das atividades biológicas encontradas nessa espécie terem como princípio ativo a lectina BmoLL. Desta forma o objetivo do presente estudo será investigar, propriedade hipoglicemiante da lectina BmoLL (*B. monandra Leaf Lectin*) em camundongos diabéticos (NOD, *non-obese diabetic*).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.2 Lectinas

2.1.1 Generalidades

Lectinas são todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento a carboidratos, assim lectinas e carboidratos, se ligam de forma específica e de maneira reversível, não exercendo sobre tais carboidratos atividades de anticorpo ou enzima (BARONDES, 1988; AMBROSI et al., 2005; LAM et al., 2010).

As interações entre lectinas e carboidratos ocorrem através de especificidade com ligações reversíveis de determinada lectina com glicoproteínas ou grupo de carboidratos (oligossacarídeos) ou um carboidrato específico (PEUMANS e VAN DAMME, 1995, PEUMANS et al., 2001, WU et al., 2006,). Quando lectinas interagem com carboidratos em uma solução, pode haver a partir das ligações entre as moléculas lectina e carboidrato, aglutinações, em geral a presença de aglutinação em um determinado meio é visto como característica da presença de lectinas.

A característica de aglutinação de eritrócitos por lectinas teve seu primeiro relato em 1888 por Stilmark que atribui aglutinações de eritrócitos a presença de uma proteína a partir de uma preparação proteica parcialmente pura, no extrato da planta conhecida por mamona, *Ricinus communis* (KENNEDY et al., 1995), sendo observado em 1889 por H. Helin uma hemaglutinina tóxica em sementes de Jequiriti, *Abrus precatorius*, (SHARON e LIS, 1988).

Além das lectinas outras moléculas como anticorpos anticarboidratos também aglutinam células, assim devido especificidade as lectinas eram consideradas semelhantes aos anticorpos, mas diferem quando se refere à similaridade estrutural, onde entre as lectinas há diversidade enquanto os anticorpos são estruturalmente similares (VAN DAMME et al., 1998).

Outros relatos de lectinas já nos anos 40, Boyd e Reguera observaram aglutininas em sementes com especificidade para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (SHARON e LIS, 1988), Novamente a característica de aglutinar eritrócitos tendo algumas lectinas com afinidade específica até mesmo para grupos sanguíneos.

O termo Lectinas foi usado pela primeira vez no ano de 1954 por Boyd e Shapleigh, pois Lectinas vem do Latim: *Lectus*, que significa selecionado, foi usado devido à capacidade de ligação reversível a carboidratos e aglutinação seletiva a eritrócitos de grupos sanguíneos específicos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995), foi determinante a escolha do termo lectinas na descoberta e definição dessas proteínas a seletividade a carboidratos, assim como a diversidade estrutural.

O estudo dessas proteínas com atividade hemaglutinante foi aprofundado em 1960, pois começaram a ser pesquisadas aplicabilidades (GABOR et al., 2001). Em 1965, Agrawal e Goldstein isolaram a lectina Con-A, Concanavalina-A, extraída de *Canavalia ensiformis* uma leguminosa, a partir de uma cromatografia de afinidade em uma matriz de dextrana (Sephadex), tendo a lectina afinidade a glicose e seus derivados. Em 1981 Lectinas encontradas tanto em animais quanto em plantas estavam sendo purificadas (DEBRAY, 1981).

Atualmente lectinas são consideradas de natureza ubíqua, pois estão presentes em todos os organismos como plantas (YAN et al., 2010) vírus, bactérias e fungos (TRIGUEIROS et al., 2003;) além de peixes (SILVA et al, 2012; KANIA et al., 2010), serpentes (NUNES et al., 2011) entre outros animais (ZHAO et al., 2009; WANG et al., 2009; KILPATRICK, 2002; BATTISON e SUMMERFIELD, 2009), como também lectinas foram ainda isoladas de células-tronco embrionárias (ALVAREZ-MANILLA et al., 2010).

As lectinas são formadas por cadeias polipeptídicas que são ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados, tendo interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio podendo ter também pontes dissulfeto, conferindo maior estabilidade, lectinas podem ser ligadas covalentemente a sua estrutura a um complexo glicídico geralmente de 4-10% da massa total da molécula, sendo que porção glicídica liga-se apenas à asparagina, serina ou treonina. Na asparagina pode ocorrer a ligação GlcNAc tanto em vegetais como em animais (HELENIUS e AEBI, 2004; KENNEDY et al., 1995).

As lectinas se dividem em inúmeras classificações dentre elas as lectinas de plantas tiveram sua classificação por Peumans e Van Damme (1998) com base na estrutura: Merolectinas: possuem um único domínio ligante a carboidrato, não precipitando glicoconjugados nem aglutinando células, portanto proteínas de pequeno tamanho. Hololectinas: com no mínimo dois domínios idênticos ou homólogos se ligam a açúcares similares ou ao mesmo carboidrato, podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados, são di ou multivalentes. Quimerolectinas: moléculas com um ou mais domínios ligantes a carboidratos, associados com outro domínio distinto, tendo outra atividade biológica podendo ser enzimática ou não, independente do domínio ligante a carboidratos. Superlectinas: possuem no mínimo dois domínios ligantes a carboidratos, estruturalmente diferentes, assim têm capacidade de reconhecer açúcares distintos.

Diante de sua diversidade estrutural consequentemente cada lectinas pode apresentar características próprias, em uma variedade de especificidade lectinas diferentes tem especificidades diferentes, então podem interagir com glicoproteínas ou grupo de carboidratos (oligossacarídeos) ou um carboidrato específico podendo ser através de sítios de ligação geralmente localizados na superfície da molécula proteica, sabendo que a seletividade é obtida por pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals, interações hidrofóbicas entre a lectina e o carboidrato (KENNEDY et al., 1995;

SHARON, 1993; COMINETTI et al., 2002; SHARON e LIS, 2002), podendo ainda a partir de um sítio adicional de natureza hidrofóbica acionar interações entre proteínas (BARONDES et al., 1988; SHARON e LIS, 1990).

Durante a busca por aplicabilidades biológicas das lectinas é preciso um processo de purificação, quando se observa que a maioria das lectinas é solúvel em água, solução salina e/ou tampão, sendo necessárias técnicas para eliminar outras moléculas (contaminantes), o que envolve mecanismos como temperatura, solução extratora entre outros (KAWAGISHI et al., 2001; OSHIKAWA et al., 2000; MOURE et al., 2001). Além da eliminação de outras moléculas é preciso manter a lectina estável fora de seu meio biológico, uma técnica usada para verificação da presença e da estabilidade das lectinas em uma determinada solução é atividade hemaglutinante.

A possibilidade de verificação da atividade hemaglutinante das lectinas em determinada solução seja um extrato ou uma proteína pura em solução tampão, por exemplo, se dá devido à especificidade de lectinas por eritrócitos, estes podem ser tratados enzimaticamente por tripsina dentre outros; como também quimicamente por glutaraldeído ou formaldeído, tratamento que podem ou não aumentar a sensibilidade das células a lectina, como também com eritrócitos não tratados (CORREIA e COELHO, 1995; COELHO e SILVA, 2000; MO et al., 2000).

Atividade Hemaglutinante pode ser vista no esquema da (**Figura 1**) onde no campo (A) as lectinas formam uma malha junto aos eritrócitos devido sua especificidade com os carboidratos presentes na superfície destes, observando no campo (B) na presença de carboidratos livres as lectinas se ligam a esses carboidratos e não mais aos eritrócitos, nos dois campos são mostradas imagens das microplacas representadas nos esquemas.

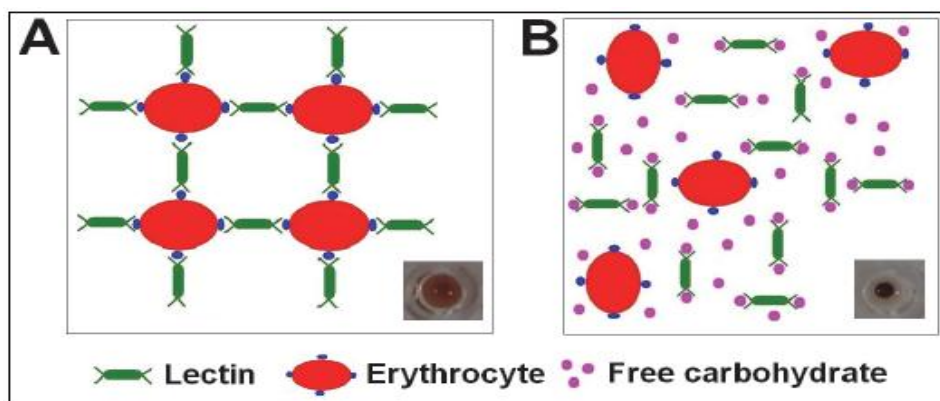


Figura 1. (A) Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela lectina de ligação a carboidratos de superfície e (B) inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos livres. (inserções). Aspectos de ensaio em placas de microtitulação (PAIVA et al., 2011).

Diante da busca por caracterizar e purificar uma lectina á através da analise de inibição da atividade hemaglutinante, utilizando diferentes tipos de carboidratos, que é verificada a especificidade de uma lectina (GABOR et al., 2001; OTTA et al., 2002). A caracterização de uma lectina se faz durante a purificação junto às informações obtidas como tamanho molecular, solubilidade, carga e afinidade específica de ligação a carboidratos que determinam uma purificação e caracterizam uma lectina (CORREIA e COELHO, 1995). Para conhecimento das propriedades básicas e funções biológicas das lectinas são de extrema importância sua purificação e caracterização (CARTWRIGHT et al., 2004).

A caracterização de uma lectina trás uma real importância para manutenção dessa proteína fora de seu meio biológico, além de trazer informações que ajudam a entender alguma ação biológica que a lectina apresente, porém lectinas distintas podem apresentar características semelhantes e mesmo assim aplicabilidades bem diferentes.

Em um protocolo de purificação de lectinas são feitos extratos e destes é preciso determinar atividade hemaglutinante e concentração proteica, em seguida são ainda

submetidos à purificação parcial por precipitação seletiva de proteínas com sais, onde sulfato de amônio é o sal mais comumente utilizado devido à sua solubilidade, o sal remove a camada de solvatação das proteínas fazendo com que as mesmas se precipitem; posteriormente são dialisados, através da utilização de uma membrana (celulose) semipermeável (PAIVA e COELHO, 1992; COELHO e SILVA, 2000; YEASMIN et al., 2001; DELATORRE et al., 2006).

Durante o processo de purificação estão presentes no extrato bruto alguns agentes como taninos, lipídeos ou cátions divalentes em altas concentrações e podem aglutinar eritrócitos (RÜDIGER, 1998); podendo fazer necessário o ensaio de precipitações por polissacarídeos ou glicoproteínas (YAMAGUCHI et al., 1998; KAWAGISHI et al., 2001; GOLDSTEIN et al., 2007; JAYATI et al., 2005). O ensaio de precipitação com carboidratos além de determinar a real presença de lectinas no meio também revela a especificidade da lectina.

Em geral protocolos de purificação de lectinas depois de um fracionamento salino para purificação parcial e realizada dialise, são usadas técnicas de cromatografias, em sua maioria são cromatografias de afinidades (GERLACH et al., 2002) assim como de filtração em gel (REGO et al., 2002; SINGH et al., 2011), de troca iônica (NG e YU, 2001; SINGH et al., 2011).

Durante avaliação do grau de pureza e caracterização estrutural de uma lectina são usados métodos eletroforéticos em gel (STRYER, 2004), sendo possível definir a massa molecular de subunidades a partir da desnaturação proteica na presença de detergente sulfato sódico de dodecila (SDS), com a possibilidade da desnaturação (COELHO e SILVA, 2000; PAIVA et al., 2006), como também através de coloração específica, determinar sua possível natureza glicoproteica (FENG et al., 2006).

As lectinas devido sua diversidade possuem inúmeras ações biológicas e vêm sendo investidas em uma variedade de aplicações biológicas dentre elas capacidade de mucoadesão, citoadesão e citoinvasão; estas vêm sendo investigadas quanto à sua aplicação em sistemas de liberação de drogas (GABOR et al., 2004).

Entre outras aplicações lectinas têm demonstrado um papel importante na área de microbiologia, pois demonstram ação contra o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, além de atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (DOM et al., 2008), pois são capazes de detectar sutis diferenças na estrutura de carboidratos complexos presentes na superfície bacteriana (LUO et al., 2007).

Estudos recentes na Cancerologia Experimental demonstraram que lectinas podem detectar diferenças no comportamento metastático das células tumorais diante das alterações na glicosilação que ocorrem durante a transformação maligna (DAMODARAN et al., 2008; ARAB et al., 2010).

Assim sendo lectinas podem ser usadas em uma variedade de aplicações biológicas ainda como identificação de microorganismos e grupos sanguíneos, estimulação mitogênica de células imunes, monitoramento sobre a superfície de células normais e neoplásicas além de aglutinar células (GOLDSTEIN et al, 1980.; SHARON, 2008).

2.1.2 Lectinas de plantas

Lectinas podem ser encontradas em todos os tecidos de planta como, por exemplo, (RATANAPO et al., 2001), folhas (COELHO e SILVA, 2000), cascas, bulbos, tubérculos (RÜDIGER et al., 2001), sementes (SHARMA et al., 2010), raízes (SOUZA et al., 2011), frutos, rizomas (PEUMANS et al., 2000) e cerne das plantas (SÁ et al., 2009).

As lectinas encontradas em plantas têm suas funções biológicas, ou seja, na planta, constantemente debatidas por terem uma diversidade estrutural muito ampla, pois diferem em vários aspectos como composição de aminoácidos, estrutura e números de subunidades, estrutura terciária e massa molecular; sabe-se que tais aspectos das lectinas são determinantes quanto a sua especificidade por carboidratos; assim como também são debatidas sua ação ou aplicabilidade biológica, fora do seu meio natural. (SILVA, 2008).

Desta forma lectinas conferem diferentes propriedades bioquímicas, devido a inúmeras variedades de estruturas moleculares, assim no organismo da planta não se espera uma função para todas as lectinas de plantas, como também uma lectina pode ter mais de uma função (SANZ-APARICIO et al., 1997; RÜDIGER et al., 2000). Da mesma forma acontece fora de seu meio biológico, onde uma lectina pode apresentar diversas ações, assim como uma determinada ação biológica pode não se apresentar em mais de uma lectina.

Diversos estudos apontam que lectinas de plantas podem ter propriedades atuantes na organização celular, na mitose induzida, fagocitose, mecanismos de defesa (PEUMANS e VAN DAMME, 1995), armazenamento e transporte de carboidratos na manutenção e extensão da parede celular (SANTOS-MAGALHÃES et al, 2004), regulação e sinalização celular (JIANG et al., 2006), na ativação de enzimas (KESTWAL et al., 2007) além de armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, como também inibição de crescimento de fungos (SHARON e LIS, 2003).

Dentre funções biológicas de lectinas de plantas algumas atuam em mecanismos de defesa inibindo crescimento de algumas bactérias fitopatogênicas como lectinas Isolada do cerne de Aroeira (*Myracrodruon urundeuva*)], assim como na adesão de agentes infecciosos às células hospedeiras (HIRSCH, 1999).

Devido ampla diversidade estrutural e consequentemente inúmeras aplicações biotecnológicas de lectinas vegetais algumas podem ser citadas, como por exemplo, detecção de doenças relacionadas à síntese de glicanas, estudo da estrutura de carboidratos em vírus, bactéria e na superfície de célula de animais (SHARON e LIS, 2004).

Outras lectinas vegetais como a lectina (CramoLL 1,4) purificada de sementes de *Cratylia mollis* apresentou atividade cicatrizante em camundongos normais e imunodeprimidos (MELO et al., 2007; MELO et al., 2011) como também, a lectina ArtinM de *Artocarpus integrifolia* apresentou capacidade de conferir resistência contra infecções por ativação de neutrófilos (TOLEDO et al., 2009).

2.2 Gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia* foi criado em 1753, por Carolus Linnaeus, em homenagem ao botânico franco-suíço Gaspar Bauhin e compreende cerca de 300 espécies (LEWIS, 1987).

As plantas deste gênero estão entre as plantas medicinais encontradas em várias regiões do mundo tais como África, Ásia bem como América Central e Sul, as plantas do Gênero *Bauhinia*, pertencentes à Família das Fabaceae, conhecidas como “pata-de-vaca” ou “unha-de-vaca” são utilizadas em forma de chás ou outras preparações para o tratamento de diabetes e outras enfermidades, como infecções e processos dolorosos (YEH et al., 2003; KHALIL et al., 2008, SILVA e CECHINEL-FILHO, 2002).

Diversos estudos sobre plantas deste gêneros sugerem inúmeras atividades biológicas como para extratos orgânicos de *Bauhinia variegata* que apresentaram atividade antibacteriana (PAREKH et al., 2006), em outro estudo extratos de *Bauhinia*

microstachya demonstraram atividade antioxidante *in vitro* (BIANCO e SANTOS, 2010).

Foi observado também que extratos alcoólico e aquoso de *B. variegata* podem diminuir os níveis plasmáticos de colesterol, triglicérido, LDL e VLDL e aumentam os níveis de HDL, além de demonstrar atividade antioxidante (RAJANI e ASHOK, 2009). Em outros estudos extrato de *Bauhinia forticata* apresentou atividade hipoglicemiante, reduzindo também níveis de triglicerídeos e colesterol, em ratos diabéticos (LINO et al., 2004; CUNHA et al., 2010), assim tais plantas medicinais podem ser úteis no tratamento de diabetes e outros problemas relacionados com o metabolismo de lipídeos.

Estudos prévios já demonstraram que diante da atividade hipoglicemiante de *Bauhinia thoningii* houve uma diminuição em riscos de doenças coronarianas causadas por complicações durante o *Diabetes*, em ratos com diabetes induzido por Aloxana (OJEZELE e ABATAN, 2011).

Foi descrito que a espécie *Bauhinia divaricata* teve atribuída sua atividade hipoglicemiante à sua capacidade de inibir a α -amilase por inibição da absorção de glicose pelo intestino (ANKLI et al., 2002), em outro estudo também foi revelada atividade hipoglicemiante, como o extrato aquoso da *Bauhinia megalandra* (GONZALES-MUJICA et al., 2003).

Em humanos, pacientes que já faziam uso de algum medicamento para *Diabetes Mellitus* tipo 2, foi visto uma significativa diminuição dos níveis glicêmicos para o grupo tratado com infusão de *B. forticata* em relação ao grupo controle (MORAES et al., 2010).

Segundo Pepato e colaboradores (2010) em ratos com diabetes induzido foi verificado também um nível significativo de toxicidade consequência do tratamento do extrato de *B. forticata*.

Em outros estudos com as plantas do gênero *Bauhinia*, foi verificada atividade hemaglutinante na fração globulina das sementes de *B. malabarica* (VIDJAYA-KUMARI et al., 1993), *Bauhinia purpurea*, *Bauhinia racemosa* e *Bauhinia vahlii* (RAJARAM e JANARDHANA, 1991), e ainda foi identificada lectina de ligação a N-acetil-D-galactosamina, a partir de sementes de *Bauhinia purpurea* (SARKER et al., 1993).

2.2.1 *Bauhinia monandra*

Entre as espécies estudadas a *Bauhinia monandra* apresentou em extrato aquoso de folhas, propriedade hipoglicemiante em ratos (MENEZES et al., 2007), como também atividades antioxidantes (ARGÔLO et al., 2004).

Podendo ser observado na (**Figura 2**) aspectos de *Bauhinia monandra*, sendo apresentado na imagem folhas e flores.



Figura 2. Aspectos de *Bauhinia monandra*.

Em trabalhos recentes uma lectina de raízes secundárias de *Bauhinia monandra* (BmoRoL) apresentou atividades antifúngica e termiticidal, contra espécies fitopatogênicas de *Fusarium* e foi mais ativo em *Fusarium solani* e termiticidal sobre os trabalhadores e soldados de *Nasutitermes corniger* (SOUZA et al., 2011).

Em estudos prévios foi purificada uma lectina em folhas da *B. monandra* presente (BmoLL, *B. monandra Leaf Lectin*), galactose específica, através de

cromatografia de afinidade em gel de guar. Apenas uma banda foi revelada através de eletroforese em gel de poliacrilamida, PAGE, para proteínas nativas. Mais de 2 mg de BmoLL foram obtidas de 5 g de pó de folhas (COELHO e SILVA, 2000).

Entre suas aplicações biológicas BmoLL reconhece de forma seletiva sorotipos de dengue, atribuí-se aos diferentes padrões de glicoproteínas produzidos pelo soro devido a resposta imune de pacientes infectados pelo vírus da dengue (ANDRADE et al., 2011).

Assim como o comportamento interfacial de BmoLL e sua capacidade de interagir com monocamadas lipídicas foram estudados por meio de medições da tensão superficial (ROSILIO et al., 2004), como também ação inseticida da BmoLL foi avaliada sendo ativa contra larvas de *Zabrotes subfasciatus* e *Anagasta kuehniella* (MACEDO et al., 2007).

Em outro estudo BmoLL apresentou possível efeito antioxidante não apresentando genotoxicidade nem citotoxicidade em células e bactérias, assim não apresentando efeito tóxico (SISENANDO et al., 2009).

2.3 *Diabetes Mellitus*

Em sua origem a palavra *Diabetes* vem de uma palavra grega que significa “poliúria, polidipsia, polifagia”, sendo *Mellitus* derivado do latim que significa “mel” ou “doce”, relatos dos sintomas foram elucidados no primeiro século d.C., por Areteu da Capadócia quando descreve uma afecção crônica caracterizada por sede intensa, urina volumosa e adocicada (GOLDFINE e YOUNGREN, 1998; REZENDE, 2004; AIRES et al, 2008).

Em sua fisiologia normal para armazenamento energético o corpo utiliza glicose, ácidos graxos e outros, tendo o fígado e o pâncreas endócrino no controle destes

suprimentos, também para fins metabólicos o sistema respiratório e circulatório abastecem o organismo no fornecimento de oxigênio (COSTANZO, 2007).

Como mostrado na (Figura 3) na constituição do pâncreas as ilhotas de Langerhans e os ácinos; a secreção de sucos digestivos no duodeno é feita através dos ácinos, enquanto as ilhotas de Langerhans secretam hormônios no organismo. As ilhotas são constituídas de células beta que secretam insulina, células alfa secretam glucagon além de células delta que secretam somatostatina; em suas funções a insulina facilita o transporte da glicose na corrente sanguínea para os tecidos corporais, reduzindo assim os níveis de glicose no sangue, enquanto o glucagon aumenta a liberação de glicose armazenada no fígado para a corrente sanguínea. A somatostatina é responsável pela inibição da insulina e do glucagon, além de diminuir a atividade gastrointestinal após a ingestão de alimentos, tendo assim em um balanço energético um aumento do uso dos tecidos para com os alimentos absorvidos (GUYTON e HALL, 2000; COSTANZO, 2007).

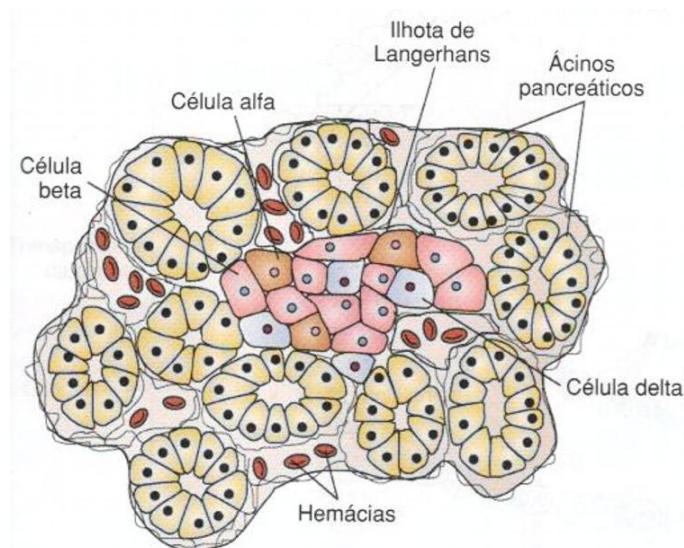


Figura 3. Ilhota de Langerhans no pâncreas (PORTH, 2007).

A secreção da insulina é aumentada em resposta ao aumento da glicose sanguínea para entrada da glicose no espaço intracelular nos tecidos, aproximadamente

dois terços da insulina é transportada após uma refeição, depois os níveis de secreção baixam sendo mantidos apenas em níveis normais, é demonstrado na (Figura 4) esse mecanismo (RANG et al., 2007).

Tecidos como cérebro e sistema nervoso usam quase exclusivamente a glicose para seu uso energético, diferente de tecidos corporais como fígado ou músculos esqueléticos onde seu uso é opcional, caso não tenha o uso da glicose ela passa a ser armazenada como glicogênio, quando esses tecidos saturam seus níveis de glicogênio ela é convertida em ácidos graxos e armazenada como triglicerídeos nas células adiposas (COSTANZO, 2007).

A decomposição do glicogênio se dá entre as refeições quando os níveis de glicose baixam ocorre a *glicogenólise*, caso precise o fígado pode sintetizar glicogênio a partir de outras moléculas energéticas, acontece então a gliconeogênese (NELSON e COX, 2011).

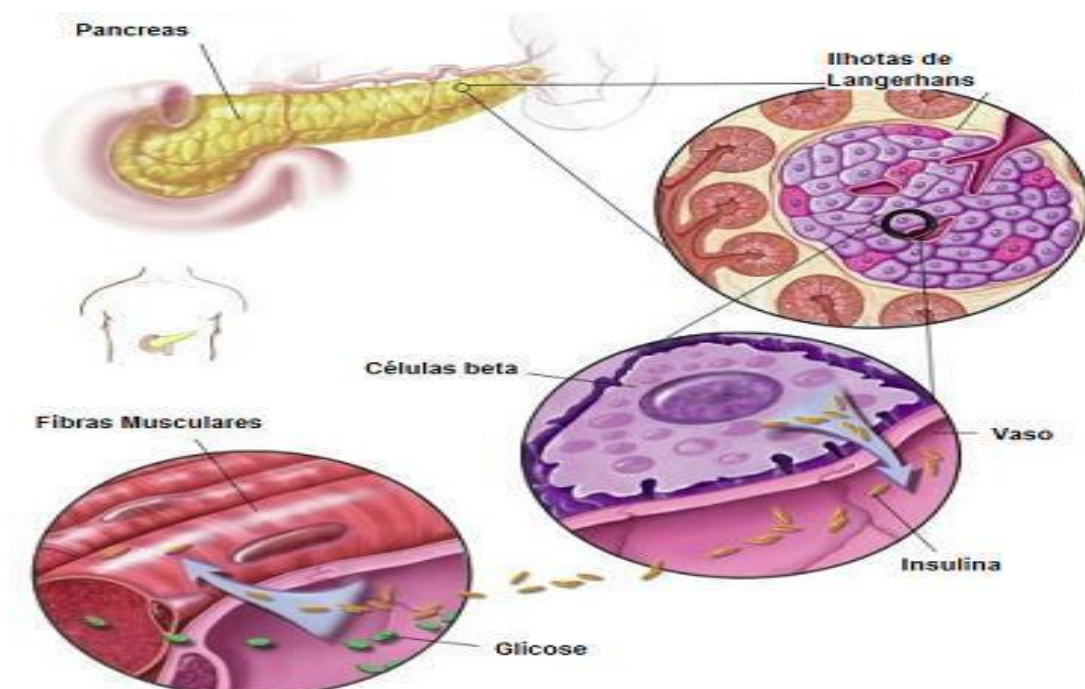


Figura 4. Produção e ação da insulina no organismo humano.

Fonte: <http://www.medicinapratica.com.br>

Diabetes Mellitus (DM) é caracterizado por ser um grupo de doenças metabólicas resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina que levam à hiperglicemia (FREGONESI et al, 2004).

O Diabetes é classificado em quatro grandes tipos de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2009); sendo Diabetes tipo 1 (DM1), antes conhecido por insulino-dependente; Diabetes tipo 2 (DM2), não insulino-dependente; Diabetes gestacional; Alterações do metabolismo ou da homeostase da glicose como endocrinopatias causadas por infecções, drogas, defeitos genéticos na função das células betas do pâncreas e etc.

O diabetes tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2) são classificados de acordo com a sua etiologia e não mais como “insulino dependente” ou “não-insulino dependente” (THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003) são as formas mais encontradas sendo a DM2 cerca de 90% dos casos (RIBEIRO et al; 2006); é visto que o DM1 é caracterizado por uma resposta imunológica, auto-imune, na destruição das células-beta produtoras de insulina, ocorre frequente em jovens, em uma faixa etária de 0 a 15 anos em alguns casos entre 40 a 50 anos (GOWER et al., 2009/2007; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2003).

O DM2 associado à obesidade age na resistência à ação da insulina levando à perda células beta pancreáticas, em muitos casos não se faz necessário o uso de insulina exógena (OLIVEIRA e MILECH, 2004).

Em DM1 diante da ausência de insulina ocorre mobilização de ácidos graxos com lipólise para aumento da gliconeogênese hepática ocorrendo assim liberação de cetonas (PORTH, 2007). Desta forma a hiperglicemia com aumento de cetoácidos no metabolismo levando a cetoacidose diabética trás consequências como perda de peso

(GROSS et al., 2002; MIRANZI et al., 2008), além de promover estresse oxidativo induzindo formação de produtos de glicação e ativação da proteína quinase C (PKC) (NISHIKAWA et al, 2000).

Diante de um desequilíbrio metabólico no DM1 são decorrentes distúrbios nos balanços hídricos e eletrolíticos, como o aumento da glicose sanguínea leva também ao aumento da carga filtrada de glicose pelos rins, que excede a capacidade reabsorvida do túbulo proximal. A glicose não absorvida produz a diurese osmótica, poliúria e sede intensa, ou seja, polidipsia; visto que a poliúria pode causar hipotensão, a falta de insulina também provoca efluxo de K^+ , resultando em hipercalemia (BELL et al., 2010; WOLFSDORF et al., 2006; DUNGER et al., 2004; GIUGNO et al., 2005), além de acelerar o desenvolvimento da aterosclerose (ARONSON e RAYFIELD, 2002) visto também redução da síntese de prostaciclina e óxido nítrico (COLWELL e NESTO, 2003).

Dentre outras complicações é vista a neuropatia periférica, anormalidade sensorio-motora em regiões periféricas do corpo abrangendo inúmeras manifestações em um conjunto de síndromes (GAGLIARDI, 2003; SCHEUERMANN-FREESTONE et al., 2003).

Estudos apontam em diabéticos alterações cardiovasculares macroangiopatias (grandes vasos) e microangiopatias (pequenos vasos) (HODGSON et al., 1990; RAHMAN et al., 2006), sendo a hipertensão associada à alteração da função e estrutura dos vasos, um considerável fator de risco cardiovascular (JONHSTONE et al., 1993; COOPER et al., 2001; RAHMAN et al., 2006). Outras microangiopatias foram encontradas como a retinopatia que é conhecida como a causa mais frequente de cegueira (SOBREVIA e MANN, 1997; KLEIN, 2010) e as forma de alterações microvasculares e macrovasculares estão associadas com mortalidade em DM1 (SHIVU et

al., 2010).

Complicações decorrentes de doenças metabólicas o Diabetes Mellitus que são comuns nas emergências médicas são complicações como coronariopatias, acidentes vasculares, doenças renais e contribui para amputações das extremidades inferiores (GUYTON e HALL, 2000; GAMBA et al., 2004; BORTOLETTO, 2010).

Dentre os portadores de DM1 a evolução clínica da doença é rápida, sendo necessário acompanhamento médico para diagnóstico e tratamento que exige início precoce, oportunamente com insulina (ROCHA et al., 2002), incluindo cuidados com endocrinologista (RIBEIRO et al., 2006), visto também a possível necessidade de acompanhamento psicológico, diante da possibilidade de depressão (POUWER et al, 2010).

Em crianças e adolescentes com DM1 cetoacidose diabética é uma causa frequente de admissão em Emergências Hospitalares ou Unidades de Tratamento, sendo vista como principal causa de morte relacionada com edema cerebral (WOLFSDORF et al., 2006; DUNGER et al., 2004; LAWRENCE et al., 2005).

Tratamento dado a portadores de DM1 é baseado em doses de insulina por longo prazo, apenas em alguns casos DM2 necessitam fazer uso, sendo necessárias diferentes formulações de insulina, pois diferem em sua duração e ação; cada formulação de insulina é indicada de acordo com cada caso clínico, sendo insulina humana produzida por tecnologia do DNA recombinante (RANG et al., 2007).

Diabetes mellitus, doença metabólica caracterizada por aumento anormal da glicose no sangue, já afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. A estimativa é de que, até 2025, esse número aumente para 380 milhões. No Brasil, a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas (DADOS ESTATÍSTICOS – DIABETES, 2011),

sendo que 5% a 10% desses são acometidos pelo DM1 (FRANCO, 2005).

O diabetes representa um alto custo financeiro para a sociedade e para os sistemas de saúde, devido alto índice de morte e incidência da doença. O Sistema Único de Saúde (SUS), devido a demanda e os gastos para prevenção, diagnóstico e tratamento precisa de ações financiadas e executadas pelos gestores dos três níveis de governo: federal, estadual e municipal (DADOS ESTATÍSTICOS – DIABETES, 2011).

2.3.1 Camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*)

A linhagem NOD foi estabelecida a partir de uma raça com catarata (ICR), onde uma sublinhagem desenvolveu diabetes espontaneamente, por cruzamento entre irmãos, essa linhagem inicialmente foi desenvolvida no Japão (KIKUTANI e MAKINO, 1992; MAKINO et al., 1980).



Figura 5. Camundongos NOD (ATKINSON e LEITER, 1999).

Os camundongos da linhagem NOD desenvolvem uma autoimunidade, que causa diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, semelhante a desenvolvida em humanos (KODAMA et al., 2003).

Com a destruição de 95% das células beta produtoras de insulina, se manifesta o diabetes nos camundongos NOD (HERNANDORENA et al., 2001).

Na incidência do diabetes espontâneo há uma variância entre 50 e 90% em fêmeas e 0 e 20% em machos, variando nas diversas colônias pelo mundo (KIKUTANI

e MAKINO, 1992; BACH, 1994).

Para desenvolvimento do diabetes espontâneo é preciso que os camundongos sejam mantidos em ambiente livre de patógenos específicos (SPF), sabendo que em condições contrárias, a incidência do diabetes diminui (BACH, 1994; BOWMAN et al., 1994; SINGH e RABINOVITCH, 1993).

A partir de colônias matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França, foi introduzida no Brasil a colônia da linhagem NOD, na Universidade Estadual de Campinas (PAVIN e ZOLLNER et al., 1994).

Atualmente como modelos experimentais, os camundongos NOD, são estudados para compreensão de processos como sinalização de citocinas (SPOLSKI et al., 2008; GRINBERG-BLEYER et al., 2010; ABLAMUNITIS et al., 2012), antígenos específicos para as ilhotas de Langerhans (BENDING et al., 2009), processo inflamatório nas células betas pancreáticas (JAIN et al., 2008), efeitos da glicose e inflamação na vascularização também das ilhotas de Langerhans e células betas (AKIRAV et al., 2011) como também genes que podem modular a suscetibilidade ao diabetes auto-imune (CHEN et al., 2011) tais fatores são determinantes para desenvolvimento de DM1.

Outros estudos com NOD buscam por novas intervenções terapêuticas diante do estudo das células reguladoras para proteção contra o desenvolvimento auto-imune (D'ALISE et al., 2008). Como também pesquisas relacionadas com células dendríticas (TARBELL et al., 2007), células-tronco embrionárias (HANNA et al., 2009) e asma alérgica (AUMEUNIER et al., 2010), dessa forma os NOD são considerados bons modelos experimentais para diversas áreas pesquisas, para diabetes por desenvolverem espontaneamente DM1 são o modelo experimental que mais se aproxima do DM1 encontrado em humanos.

2.4 Possível composto hipoglicemiante espécie *Bauhinia monandra*

O uso de produtos naturais como ferramenta em pesquisas médicas e bioquímicas é de grande interesse econômico para o Brasil diante de diversos estudos que comprovam a ação hipoglicemiante das plantas do gênero *Bauhinia*, observando também outros estudos que apontam toxicidade presente em extratos por conterem diversos compostos, é preciso um estudo que comprove a possível atividade hipoglicemiante de um composto pré-purificado ou puro, presente em alguma das espécies do gênero *Bauhinia*, que não apresente a toxicidade encontrada nos extratos, na busca por um princípio bioativo para o tratamento da diabetes.

Sendo a lectina BmoLL da *B. monandra*, por ser purificada em quantidades de miligramas torna esse estudo possível, como também o crescimento científico usando um modelo de impacto regional no Brasil, visando também uma melhoria na qualidade de vida dos portadores do diabetes mellitus.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade hipoglicemiante da lectina de folhas de *B. monandra* em camundongos NOD (diabéticos não obesos).

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Purificar BmoLL.
- ✓ Verificar atividade hemaglutinante da lectina.
- ✓ Avaliar concentrações de proteína da lectina purificada.
- ✓ Determinar o efeito da BmoLL em camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*), analisando os níveis de glicose.
- ✓ Avaliar estatisticamente os resultados.

4 REFERÊNCIAS

- ABLAMUNITTS, V.; HENEGARIU, O.; HANSEN, J.B.; OPARE-ADDO, L.; PRESTON-HURLBURT, P.; SANTAMARIA, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; HEROLD, K.C. Synergistic Reversal of Type 1 Diabetes in NOD Mice With Anti-CD3 and Interleukin-1 Blockade: Evidence of Improved Immune Regulation. **Diabetes**. v. 61, p. 145-54, 2012.
- AGRAWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. **Biochemical Journal**, v.96, 23 c. 1965.
- AKIRAV, E.M.; LEBASTCHIA, J.; GALVANA, E.M.; HENEGARIUA, O.; AKIRAVB, M.; ABLAMUNITSA, V.; LIZARDIC, P.M.; HEROLDA, K.C. Herolda Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 19018–19023, 2011.
- ALVAREZ-MANILLA, G.; WARREN, N.L.; ATWOOD, J.; ORLANDO, R.; DALTON, S.; PIERCE, M. Glycoproteomic analysis of embryonic stem cells: identification of potential glycobiomarkers using lectin affinity chromatography of glycopeptides. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2062–2075, 2010.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N.; DAVIS, B. Lectins: Tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 3, p. 1593-608, 2005.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 32, p. S62–S67, 2009.
- ANDRADE, C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L.; MELO, C.P.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; NOGUEIRA, M.L.; SINGH, P.R.; ZENG, X. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and *Bauhinia monandra* lectin, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, p. 517–523, 2011.
- ANKLI, A.; HEINRICH, M.; BORK, P.; WOLFRAM, L.; BAUERFEIND, P.; BRUN, R.; CHMID, C.; WEISS, C.; BRUGGISSER, R.; GERTSCH, J.; WASESCHA, M.; STICHER, O. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 43-52, 2002.
- ARAB, M.R., S. SALARI, M. KARIMI, AND H. MOFIDPOUR, Lectin histochemical study of cell surface glycoconjugate in gastric carcinoma using *Helix pomatia* agglutinin. **Acta Medica Iranica**, v. 48, p. 209-213, 2010.
- AIRES, M.M. **Fisiologia / Margarida de Melo Aires**; colaboração de Ana Maria de Lauro Castrucci... [et al]. – 3º ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- ARGÔLO, A.C.C.M.; SANT'ANA, A. E.G.; PLETSCH, A. M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**. v. 95, p. 229-233, 2004.

- ARONSON, D.; RAYFIELD, E.J. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. **Cardiovascular Diabetology**, v. 1, p. 1-10, 2002.
- ATKINSON, M.A.; LEITER, E.H.L. The NOD mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? **Nature Medicine**, v. 5, p. 601 – 604, 1999.
- AUMEUNIER, A.; FRANÇOISE, G.; ABDULRAOUF, R.; LINH, P.V.; EMILIE, B.; ALEJANDRO, G.A.; PASCALE, J.; SHIZUO, A.; JEAN-FRANÇOIS, B.; NATHALIE, T. Systemic Toll-Like Receptor Stimulation Suppresses Experimental Allergic Asthma and Autoimmune Diabetes in NOD Mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010.
- BACH, J.F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocrine Reviews**, v. 15, p. 516-42, 1994.
- BARONDES, S.H. bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trend in Biochemical Science**, v. 13, p. 480-482, 1988.
- BATTISON, A.L.; SUMMERFIELD, R.L.; Isolation and partial characterisation of four novel plasma lectins from the American lobster *Homarus americanus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 198-204, 2009.
- BELL, C.G.; TESCHENDORFF, A.E.; RAKYAN, V.K.; MAXWELL, A.P.; BECK, S.; SAVAGE, D. A. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. **BMC Med Genomics**, v. 3, p. 2-11, 2010.
- BENDING, D.; DE LA PEÑA, H.; VELDHOFEN, M.; PHILLIPS, J.M.; UYTENHOVE, C.; STOCKINGER, B.; COOKE, A. Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p. 565–572, 2009.
- BIANCO, E. M.; SANTOS, C. A. M. Propriedades antioxidantes de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) J. F. Macbr. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 238-241, 2010.
- BORTOLETTO, M.S.S.; VIUDE, D.F.; HADDAD, M.D.L.; KARINO, M.E. Caracterização dos portadores de diabetes submetidos à amputação de membros inferiores em Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 32, p. 205-213, 2010.
- BOWMAN, M.A.; LEITER, E.H.; ATKINSON, M.A; Prevention of diabetes in the NOD mouse: implications for therapeutic intervention in human disease. **Immunol Today**, v. 15, p. 115-20, 1994.
- CARTWRIGHT JR, THARIA HA, BURNS I, SHRIVE AK, HOOLE D, GREENHOUGH TJ. Isolation and characterisation of pentraxin-like serum proteins from the common carp *Cyprinus carpio*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p.113-25, 2004.
- CHEN, J.; GUSDON, A.M.; MATHEWS, C.E. Role of genetics in resistance to type 1

diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 27, p. 849-853, 2011.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra* **Phytochemistry Analysis**. v. 11, p. 295-300, 2000.

COLWELL, J.A.; NESTO, R.W. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. **Diabetes Care**. v. 26, p. 2181-2188, 2003.

COMINETTI, M.R.; MARQUES, M.R.F.; LORENZINI, D.M.; LOFGREN, S.E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Characterization and partial purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 26, p. 715-721, 2002.

COOPER, M. E.; BONNET, F.; OLDFIELD, M.; JANDELEIT-DAHM, K. Mechanisms of diabetic vasculopathy: an overview. **American Journal of Hypertension**. v. 14, p. 475-486, 2001.

CORREIA MT, COELHO LC. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (*Camaratu bean*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 55, p. 261-73, 1995.

COSTANZO, L.S. 1947 – **Fisiologia**/Linda S. Costanzo; tradução de Vilma Ribeiro de Souza Varga – 3ªed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

CUNHA, A.M.; MENON, S.; MENON, R.; COUTO, A.G.; BÜRGER, C.; BIAVATTI, M.W. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine** v. 17, p. 37-41, 2010.

Dados Estatísticos – diabetes, 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1457 Acessado em: 21 nov. 2011.

D'ALISE, A.M.; AUYEUNG, V.; FEUERER, M.; NISHIO, J.; FONTENOT, J.; BENOIST, C.; MATHIS, D. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 19857–19862, 2008.

DAMODARAN, D., JEYAKANI, J., CHAUHAN, A., CancerLectinDB: a database of lectins relevant to cancer. **Glycoconjugate Journal**. v. 25, p. 191-198, 2008.

DEBRAY, H.; DECOUT, D.; STRECKER, G.; SPIK, G.; MONTREUIL, J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycoproteins related to *N*-glycoproteins. **European Journal of Biochemistry**. v. 117, p. 41-55, 1981.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.; GADELHA, C.A.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K.S.; FREIRE, V.N.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO, W.F.; CAVADA, B.S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia*

maritima (ConM) bin complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology** v. 154, p. 280–286, 2006.

DOM, Y.D.; FU, L.D.; JIA, Y.P.; DU, X.J.; WANG, Q.; WANG, Y.H.; ZHAO, X.F.; YU, X.Q.; WANG, J.X. A hepatopancreas-specific C-type lectin from the *Chinese shrimp, Fenneropenaeus chinensis* exhibits antimicrobial activity. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 348-361, 2008.

DUNGER, D.B.; SPERLING, M.A.; ACERINI, C.L.; BOHN, D.J.; DANEMAN, D.; DANNE, T.P.A.; GLASE, N.S. European Society for Paediatric Endocrinology/Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. **Pediatrics**. v. 113, p. 133-40, 2004.

FENG, K., Q.H. LIU, T.B. NG, H.Z. LIU AND J.Q. LI ET AL.; Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1573-1578, 2006.

FRANCO, L.L. **Diabetes: como prevenir, tratar e conviver**. São Paulo: Elevação, 2005.

FREGONESI, C.E.P.T.; FARIA, C.R.S.; MOLINARI, S.L.; MIRANDA-NETO, M.H. Etiopatogenia da Neuropatia Diabética. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 8, 2004.

GABOR, F.; BOGNER, E.; WEISSENBOECK, A.; WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 459-480, 2004.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells DU-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47, 2001.

GAGLIARDI, A.R.T. Neuropatia diabética periférica. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 02, p. 67-74, 2003.

GAMBA, M.A.; GOTLIEB, S.L.D.; BERGAMASCHI, D.P.; VIANNA, L.A.C. Amputações de extremidades inferiores por diabetes mellitus: estudo caso-controle. **Revista Saúde Pública**, v. 38, p. 399-404, 2004.

GERLACH, D.; WAGNER, M.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **Federation of European Microbiology Societies Letters**, v. 214, p. 61-68, 2002.

GIUGNO, K.; MÜLLER, H.; BAGATINI, A. **Cetoacidose diabética**. (Editores: Piva, J.; Garcia, P.C.) Medicina intensiva em pediatria. Rio de Janeiro: Revinter; p. 349-61, 2005.

GOLDFINE, I.R.; YOUNGREN, J.F. Contributions of the *American Journal of*

Physiology to the discovery of insulin. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. 207-208, 1998.

GOLDSTEIN IJ, HUGHES RC, MONSIGNY M, OSAWA T, SHARON N. What should be called a lectin? **Nature**, p. 255-66, 1980.

GOLDSTEIN, I.J.; WINTER, H.C.; AURANT, J.; CONFER, L.; ADAMSON, J.T.; HAKANSSON, K.; REMMER, H. A new α -galactose-binding protein from the mushroom *Lyophyllum decastes*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 467, p. 268-74, 2007.

GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; MÁRQUEZ, A.H.; CAPOTE-ZULUETA, J. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. **Fitoterapia**, v. 74, p. 84-90, 2003.

GOWER, T. “HowStuffworks – Causas da diabetes tipo 1”. Publicado em 26 de fevereiro de 2007 (atualizado em 04 de fevereiro de 2009). Disponível em: <http://saude.hsw.uol.com.br/causas-diabetes-tipo-1.htm>. Acesso em: 20 jan. 2012.

GRINBERG-BLEYER, Y.; BAEYENS, A.; YOU, S.; ELHAGE, R.; FOURCADE, G.; GREGOIRE, S.; CAGNARD, N.; CARPENTIER, W.; TANG, O.; BLUESTONE, J.; CHATENAUD, L.; KLATZMANN D.; SALOMON, B.L.; PIAGGIO, E. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, p. 1819-1823, 2010.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S.P.; CAMARGO, J.L.; REICHELT, A.J.; AZEVEDO, M.J. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 16-26, 2002.

GUYTON, A.; HALL, J.E. **Medical physiology** – 10^o ed. – Philadelphia: W.B. Saunders, p.884-898, 2000.

HANNA, J.; MARKOULAKI, S.; MITALIPOVA, M.; CHENG, A.W.; CASSADY, J.P.; STAERK, J.; CAREY, B.W.; LENGNER, C.J.; FOREMAN, R.; LOVE, J.; GAO, Q.; KIM, J.; JAENISCH, R. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 513–524, 2009.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 1019-1049, 2004.

HERNANDORENA, B.H.; GONZALES, J.C.R.; GARCIA, J.C.R. Animales de Laboratorio en La Endocrinología: Biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo 1. **Revista Cubana Endocrinologia**, v. 12, p. 168-77, 2001.

HIRSCH, A.M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 02, p. 320-326, 1999.

HODGSON, W.C.; KING, R.G.; BOURA, A.L. Augmented potentiation of renal

vasoconstrictor responses by TXA2 receptor stimulation in the alloxan diabetic rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 42, p. 423-427, 1990.

JAIN, R.; TARTAR, D.M.; GREGG, R.K.; DIVEKAR, R.D.; BELL, J.J.; LEE, H.H.; YU, P.; ELLIS, J.S.; HOEMAN, C.M.; FRANKLIN, ZAGHOUANI, H. Innocuous IFN γ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 207–218, 2008.

JAYATI, B.; ARUN, K.G.; BISHNU, P.C. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v 340, p. 1973-1982, 2005.

JIANG, J-F; HAN, Y; XING, L-J; Y-Y; XU, Z-H; CHONG, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. **Toxicon**, v. 47, p. 133-9, 2006.

JOHNSTONE, M.T.; CREAGER, S.J.; SCALES, K.M.; CUSCO, J.A.; LEE, B.K.; CREAGER, M.A. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**, v. 88, p. 2510-2516, 1993

KANIA, P.W.; SORENSEN, R.R.; KOCH, C.; BRANDT, J.; KLIEM, A.; VITVED, L.; HANSEN, S.; SKJODT, K. Evolutionary conservation of mannan-binding lectin (MBL) in bony fish: Identification, characterization and expression analysis of three bona fide collectin homologues of MBL in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, p. 910-920, 2010.

KAWAGISHI H, TAKAGI J, TAIRA T, MURATA T, USUI T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**; v. 56, p. 53-8, 2001.

KENNEDY, J. F. PALVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.

KESTWAL RM, KONOZY EHE, HSIAO C-D, ROQUE-BARREIRA MC, BHIDE SV. Characterization of α -mannosidase from *Erythrina indicaseeds* and influence of endogenous lectin on its activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1770, p. 24-28, 2007.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M.T.; BRUNETTI, I.L. Free Radical Scavenging Profile and Myeloperoxidase Inhibition of Extracts from Antidiabetic Plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoide.s*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p. 165-171, 2008.

KIKUTANI H, MAKINO S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. **Advances in Immunology**, v. 51, p. 285-322, 1992.

KILPATRICK, D. C. Review Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, p. 187– 197, 2002.

KLEIN, R.; LEE, K.E.L.; GANGNON, R.E.; KLEIN, B.E.K. The 25-Year Incidence of Visual Impairment in Type 1 Diabetes Mellitus: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy, **Ophthalmology**, v. 117, p. 63-70, 2010.

KODAMA, S.; KÜHTREIBER, W.; FUJIMURA, S.; DALE, E.A.; FAUSTMAN, D.L. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice. **Science**, v. 302, p. 1223-1227, 2003.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 45-55. 2010.

LAWRENCE, A.; PHILLIPS, O.L.; ISMODES, R.A.; LOPEZ, M.; ROSE, S.; WOOD, D.; FARFAN, J.A. Local values for harvested forest plants in Madre de Dios, Peru: Towards a more contextualized interpretation of quantitative ethnobotanical data. **Biodiversity and Conservation**, v. 14, p. 45-79, 2005.

LEWIS, G. P. Legumes of Bahia. **Royal Botanic Gardens**. p. 369, 1987.

LINO, C.D.; DIOGENES, J.P.L.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.P.G.; NETO, M.A.; ALVES, R.S.; De QUEIROZ, M.G.R.; de SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.

LUO, Y., XU, X., LIU, J., LI, J., SUN, Y., LIU, Z., LIU, J., VAN DAMME, E., BALZARINI, J., BAO, J., A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium divaricatum* (L.) Decne (family *Araceae*) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. **Journal Biochemistry and Molecular Biology**. v. 40, p.358-367, 2007.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 146, p. 486-498, 2007.

MAKINO S, KUNIMOTO K, MURAOKA Y, MIZUSHIMA Y, KATAGIRI K, TOCHINO Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu**. v. 29, p.1-13, 1980.

MELO, C.M.L. **Avaliação da atividade cicatrizante de lectina de *Cratylia mollis* em camundongos normais e imunodeprimidos experimentalmente**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) 2007. 72f – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

MELO, C.M.L.; PORTO, C.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; MENDES, C.M.; CAVALCANTI, C.C.B.; COELHO, L.C.B.B.; PORTO, A.L.F.; LEÃO, A.M.A.C.;

CORREIA, M.T.S. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 113–119, 2011.

MENEZES, F.S.; MINTO, A.B.M; RUELA, H.S.; KUSTER, R.M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)**, v. 17, p. 8-13, 2007.

MIRANZI, S.S.C.; FERREIRA, F.S.; IWAMOTO, H.H.; PEREIRA, A.G.; MIRANZI, M.A.S. Qualidade de vida de indivíduos com diabetes mellitus e hipertensão acompanhados por uma equipe de saúde da família. **Texto e contexto – Enfermagem**, v. 17, p. 672-679, 2008.

MO, H., WINTER, H. C. AND GOLDESTINE, I. J. Purification and characterization of a Neu5Ac a 2–6 Gal b-1–4 Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623–29, 2000.

MORAES, E.A.; REMPEL, C.; PÉRICO, E.; STROHSCHOEN, A.A.G. Avaliação do perfil glicêmico de portadores de Diabetes Mellitus tipo II em UBSs que utilizam infusão de folhas de *Bauhinia forficata* Link, **ConScientiae Saúde**, v.9, p. 569-574, 2010.

MOURE A, SINEIRO J, DOMÍNGUEZ H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. **Food Chemistry**; v. 74, p. 327-39, 2001.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**; tradução de Fabiana Horn; revisão técnica de Carla Dalmaz e Sandra Estrazulas Farias – 5ªed.– Porto Alegre: Artmed, 2011.

NG, T.B., YU, Y.L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 269-77, 2001.

NISHIKAWA, T.; EDELSTEIN, D.; DU, X.L.; YAMAGISHI, S.; MATSUMURA, T.; KANEDA, Y.; YOREK, M.A.; BEEBE, D.; OATES, P.J.; HAMMES, H.P.; GIARDINO, I.; BROWNLEE, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**. v. 13, p. 787-90, 2000.

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.A.; VAZ, A.F.M.; SANTANA, G.M.S.; GOMES, F.S.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, R.M.L.; LUCCA, R.A.S.; OLIVA, M.L.V.; GUARNIERI, M.C.G.; CORREIA, M.T.S. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 159, p. 57–63, 2011.

OJEZELE, M.O.; ABATAN, O.M. Hypoglycaemic and coronary risk index lowering effects of *Bauhinia thonningii* in alloxan induced diabetic rats. **African Health**

Sciences. v. 11, p. 85–89, 2011.

OLIVEIRA, J.E.P.; MILECH, A. **Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004.

OSHIKAWA K, AOKI K, YOSHINO Y, TERADA S. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Bioscience Biotechnology & Biochemistry**, v. 64, p. 2186-92, 2000.

OTTA, Y.; AMANO, K.; NISHIYAMA, K.; ANDO, A.; OGAWA, S.; NAGATA, Y. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 103-107, 2002.

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.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; COELHO, L. C. B. B. **Insecticide activity of lectins and secondary metabolites**. In: Perveen, F. (Org.). *Insecticides - Advances in Integrated Pest Management*. Rijeka: InTech, p. 579-598, 2011.

PAIVA, P. M. G., OLIVA, M.L.; FRITZ, H.; COELHO, L.C.; SAMPAIO, C.A. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type trypsin isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, v. 67, n. 6, p. 545-552, 2006.

PAREKH, J.; KARATHIA, N.; CHANDA, S. "Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of *Bauhinia variegata* L bark". **African Journal of Biomedical Research**. v. 09, p. 53-56, 2006.

PAVIN, E.J.; ZOLLNER, R.L. Implantação da linhagem "NOD-mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 38, p. 105-108, 1994.

PEPATO, M. T.; CONCEIÇÃO, C. Q.; GUTIERRES, V. O.; VENDRAMINI, R. C.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P.; BRUNETTI, I. L. Evaluation of the spouted bed dried leaf extract of *Bauhinia forficata* for the treatment of experimental diabetes in rats. **African Journal of Biotechnology** v. 09, p. 7165-7173, 2010.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199 - 228, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PEUMANS, W.J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C.H.; BALINT-KURTI, P.J.; ROVIRA, P.R.; MAY, G.D.; LEUVEN, F.V.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E.J.M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, v. 211, p. 546-554, 2000.

PORTH, C. M. **Essentials of pathophysiology**: Concepts of altered health states. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

POUWER, F.; GEELHOED-DUIJVESTIJN, P. H. L. M.; TACK, C. J.; BAZELMANS, A.-J. BEEKMAN, E.; HEINE, R. J.; SNOEK, F. J. Original Article: Education and Psychological Aspects Prevalence of comorbid depression is high in out-patients with Type 1 or Type 2 diabetes mellitus. Results from three out-patient clinics in the Netherlands. **Diabetic Medicine**, v. 27, p. 217-224, 2010.

RAHMAN, S.; RAHMAN, T.; ISMAIL, A. A1-S.; RASHID, A.R.A. Diabetes-associated macrovasculopathy: pathophysiology and pathogenesis. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 09, p. 767-80, 2006.

RAJANI, G.P.; ASHOK, P. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 41, p. 227-232, 2009.

RAJARAM, N.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and nutritional potential of the tribal pulses *Bauhinia purpurea*, *B. racemosa* and *B. vahlii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 55 p. 423-431, 1991.

RANG, H.P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.;_FLOWER, R. J. **Rang e Dale Pharmacology**; tradução de Raimundo Rodrigues Santos e outros – 6ªed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P.Syringae* pv *mori*. **Plant Science**. v. 160, p. 739-744, 2001.

REGO E.J., DE CARVALHO DD, MARANGONI S, DE OLIVEIRA B, NOVELLO JC. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**. v. 60, p. 441-446, 2002.

REZENDE,J.M. **Linguagem Médica – Diabetes**. Linguagem Médica. 3 ed. Goiânia: AB Editora e Distribuidora de Livros Ltda, 2004.

RIBEIRO, F.F.; MARIOSAS, L.S.; FERREIRA, S.R.G.; ZANELLA, M.T. Visceral fat and metabolic syndrome: more than a simples association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 230-238, 2006.

ROCHA, J.L.L.; BAGGIO, H.C.C.; CUNHA, C.A.; NICLEWICZ, E.A.; LEITE, S.A.O.; BAPTISTA, M.I.D.K. Aspectos Relevantes da Interface Entre Diabetes

Mellitus e Infecção. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, p.221-229, 2002.

ROSILIO,V.; BOISSONNADE, M.; COELHO, L.C.B.B.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; ANDRADE, C.A.S.; BASZKIN, A. Interaction of *Bauhinia monandra* lectin (BmoLL) with lipid monolayers. **Colloids Surf. A Physicochemical and Engineering Aspect**, v. 250, p. 491-497, 2004.

RÜDIGER, H. Plant letins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functional of plants lectins. **Acta Anatomia**. v. 161, p. 130-52, 1998.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Plant lectin: Ocurrance, biochemistry, functions and applications. **Glicoconjugates Journal**, v. 18, p. 589-613, 2001.

RÜDIGER, H.; SIEBERT, H-C.; SOLÍS, D.; BARBERO, J.J.; ROMERO, A.; LIETH, C.W.; MAURIÑO, T.D.; GABIUS, H-J. Medicinal Chemistry Based on the Sugar Code: Fundamentals of Lectinology and Experimental Strategies with Lectins as targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 389-416, 2000.

SÁ, R.A.; GOMES, F.S.; NAPOLEÃO, T.H.; SANTOS, N.D.L.; MELO, C.M.L.; GUSMÃO, N.B.; COELHO, L.C.B.B.; PAIVA, P.M.G.; BIEBER L.W. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, p. 85-95, 2009.

SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CESAR A.S. A.; MARIA T.S.C.; LUANA C.B.B.C.; SILENE C.N. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435–445, 2004.

SANZ-APARICIO, J. HERMOSO J.; GRANJEIRO TB., CALVETTE JJ.; Cavada BS. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters** v. 405, p. 114-118, 1997.

SARKER, A.B.; KOIRALA, T.R.; MURAKAMI, I. *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA) binding sites in human gastrointestinal tract. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 37, p. 21-28, 1993.

SCHEUERMANN-FREESTONE, M.; MADSEN, P.L.; MANNERS, D.; BLAMIRE, A.M.; BUCKINGHAM, R.E.; STYLES, P.; RADD, G.K.; NEUBAUER, S.; CLARKE, K. Abnormal cardiac and skeletal muscle energy metabolism in patients with type 2 diabetes. **Circulation**, v. 107, p.3040-3046, 2003.

SHARMA, A.; WONG, J.H.; LIN, P.; CHAN, Y.S.; NG, T.B. Purification and Characterization of a Lectin from the Indian Cultivar of French Bean Seeds, **Protein & Peptide Letters**, v. 17, p. 221-227, 2010.

SHARON, N. Trends Biochemical. **Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.

_____. Lectins: past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, p. 1457–1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888–1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488–491, 1988.

_____. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

_____. How Proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6586-6591, 2002.

_____. **Lectins**, – 2^aed. – *Kluwer Scientific Publishers*, Amsterdam, 2003.

_____. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, p. 53-62, 2004.

SHIVU, G. N.; PHAN, T.T.; ABOZGUIA, K.; AHMED, I.; WAGENMAKERS, A.; HENNING, A.; NARENDHAN, P.; STEVENS, M.; FRENNEAUX, M. Relationship Between Coronary Microvascular Dysfunction and Cardiac Energetics Impairment in Type 1 *Diabetes Mellitus*. **Circulation**, v. 121, p. 1209-1215, 2010.

SILVA, C. D. C.; CORIOLANO, M.C.; LINO, M.A.S.; MELO, C.M.L.; BEZERRA, R.S.; CARVALHO, E.V.M.M.; SANTOS, A.J.G.; PEREIRA, V.R.A.; COELHO, L.C.B.B. Recognition Lectin from *Oreochromis niloticus* (Tilapia Fish): Cytokine Production in Mice Splenocytes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 424-35, 2012.

SILVA, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas DO Gênero *Bauhinia*: Composição Química E Potencial Farmacológico. **Química Nova**, v. 25, p. 449-454, 2002.

SILVA, M.C. **Caracterização parcial da lectina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 53f Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SINGH, B, RABINOVITCH, A. Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. **Autoimmunity**, v. 15, p. 209-13, 1993.

SINGH, R.S.; BHARI, R.; SINGH, J.; TIWARY, A.K. Purification and characterization of a mucin-binding mycelial lectin from *Aspergillus nidulans* with potent mitogenic activity, **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 547–554, 2011.

SISENANDO, H.A.A.A.C.N.; MACEDO, M.F.S.; SATURNINI, A.C.R.D.; COELHO, L.C.B.B.; MEDEIROS, S.R.B. Evaluation of the genotoxic potential of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL). **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 303-308, 2009.

SOBREVIA, L.; MANN, G.E. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 423-452, 1997.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S., PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 65 p. 696-702, 2011.

SPOLSKI, R.; KASHYAP, M.; ROBINSON, C.; YU, Z.; LEONARD, W.J. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse, **PNAS**, v. 105, p. 14028–14033, 2008.

STRYER, L. Bioquímica, Rio de Janeiro, **Guanabara Kooagan**. 2004.

TARBELL, K.V.; PETIT, L.; ZUO, X.; TOY, P.; LUO, X.; MQADMI, A.; YANG, H.; SUTHANTHIRAN, M.; MOJSOV, S.; STEINMAN, R.M. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4⁺ CD25⁺ CD62L⁺ regulatory T Cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. **Journal of Experimental Medicine**. v. 204, p. 191-201, 2007.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**; v. 26, p. 5-20, 2003.

TOLEDO, K.A.; SCWARTZ, C.; OLIVEIRA, A.F.; CONRADO, M.C.; BERNARDES, E.S.; FERNANDES, L.C.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; PEREIRA-DASILVA, G.; MORENO, A.N. Neutrophil activation induced by ArtinM: release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, v. 123, p. 14-20, 2009.

TRIGUEIROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, J.; CHAVANT, L.; FOURNIER, D.; PAQUEREA, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, p. 292-298, 2003.

VAN DAMME, E. J. M; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-592, 1998

VIDJAYA-KUMARI, K.; SIDDHURAJU, P.; JANARDHANAN, K. Chemical composition and nutritional potential of the tribal pulse (*Bauhinia malabarica* Roxb). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, p. 291-298, 1993.

WANG, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; TAIT, L.; BALAN, V.; HOGAN, V.; PIANTA, K.J.; RAZ, A. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. **The American Journal of Pathology**, v. 174, p. 1515-23, 2009.

WOLFSDORF, J.; GLASER, N.; SPERLING, M.A. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes

Association. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1150-1109, 2006.

WU, J. H.; SINGH, T.; HERP, A.; WU, A. M. Carbohydrate recognition factors of the lectin domains present in the *Ricinus communis* toxic protein (ricin). **Biochimie**, V. 88, N. 2, P. 201-217, 2006.

YAMAGUCHI, M; JIMBO, M; SAKAI, R; MURAMOTO, K; KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (*Freshwater cyanobacterium* lectin). **Comparative Biochemistry and Phisiology Part B**, v. 119, p. 593-597, 1998.

YAN, Q.; ZHU, L.; KUMAR, N.; JIANG, Z.; HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 589-595, 2010.

YEASMIN, T.; TANG, M.A.; RAZZAQUE, A.; ASBAR, N. Purification and characterization of three galactose specific lectins from mulberry seeds (*Morus* sp.) **European Journal of Biochemistry**. v. 268, p. 6005-6010, 2001.

YEH, G.Y.; EISENBERG, D.M.; KAPTCHUK, T.J.; PHILLIPS, R.S. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. **Diabetes Care** v. 26 p. 1277–1294, 2003.

ZHAO, Z.Y.; YIN, Z.X.; XU, X.P.; WENG, S.P.; RAO, X.Y.; DAI, Z.X.; LUO, Y.W.; YANG, G.; LI, Z.S.; GUAN, H.J.; LI, S.D.; CHAN, S.M.; YU, X.Q.; HE, J.G. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. **Journal of General Virology**, v.83, p. 347–56, 2009.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

HYPOGLYCEMIC ACTIVITY EVALUATION OF *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) in NOD (NON OBESE DIABETIC)mice

Chrisjacele Santos Ferreira de Araújo^a, Thiago Henrique Napoleão^a, Carina Malaguti^b,
Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Vera Lúcia de Menezes Lima^a, Anibal Eugenio Vercesi^b
and Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.*

*Corresponding author. E-mail: luanacassandra@terra.com.br

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic disorders resulting from defects in secretion and/or insulin action leading to hyperglycemia. Studies with various plants having folk medicine reputation for its antidiabetic potencial have shown promising results in experimental models of diabetes, such as leaf extract from *Bauhinia monandra*. Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin which recognize and bind carbohydrates in a specific and reversible approach. This study aims to investigate whether a highly purified *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) have hypoglycemic activity, in an experimental model. Non obese diabetic mice (NOD) were treated by intraperitoneal administration of BmoLL (60 mg/kg/day), for 21 days. Its effect was compared with that of diabetic untreated NOD, and with a group of normoglycemic mice that received vehicle (water). After the treatment with BmoLL the animals exhibited a significant ($p=0.002$) reduction (from 307.50 ± 83.30 mg/dL to 137.50 ± 68.26 mg / dL) in serum glucose, value similar to normoglycemic group (110.50 ± 16.66 mg/dL). The diabetic untreated NOD group showed glucose concentration about 3-fold higher (364.5 ± 106.24 mg/dL). Furthermore, the concentrations of triglycerides, total cholesterol and cholesterol of VLDL were also significantly reduced by the treatment with BmoLL as compared with the diabetic untreated animals. Therefore, this work suggests that BmoLL was able to control blood glucose levels to normal values and minimized secondary complications of hyperglycemia. The results may have a clinical significance for the diabetes mellitus and may explain the basis for its use in folk medicine.

Key Words: *Bauhinia monandra*, BmoLL, NOD mice, *Diabetes Mellitus*, hypoglycemic action.

This work was supported by: FACEPE, CNPq and CAPES.

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is characterized by being a group of metabolic diseases resulting from defects in the secretion and/or insulin action leading to hyperglycemia. The diabetes Type 1 (DM1) and type 2 (DM2) are classified according to their etiology and not as "insulin-dependent" or "non-insulin dependent" [1].

The DM1 is characterized by a immunologic response, autoimmune destruction of the beta cells that produce insulin, and occurs frequently in young people in an age group 0-15 years, in some cases between 40 to 50 years [2; 3].

DM represents a high financial cost to society and health systems as well as shows a high mortality rate. Currently, it affects about 347 million people worldwide and it is estimated that it will be the 7th leading cause of death in 2030 [4]. Data from 2007 inform that, in Brazil, the average occurrence of diabetes in the adult population (over 18 years) is 5.2%, representing 6,399,187 people among which 5 to 10% are affected by DM1 [5].

The studies with herbal medicinal plants occur in various regions of the world such as Africa, Asia and Central and South America. The plants of the genus *Bauhinia*, belonging to the family *Fabacea*, known as "paw-of-cow" or "cow's claw" are used in form of teas or other preparations for treatment of diabetes and other diseases, such as infections and pain processes [6; 7; 8].

Studies have revealed hypoglycemic activity in *Bauhinia* plants which are used in popular medicine, such as aqueous extract of *Bauhinia monandra* leaves in rats [9], and aqueous extract of *B. megalandra* leaves [10], *B. variegata* [11] and *B. forticata* [12; 13].

In humans, patients who had used any medication for *Diabetes mellitus* type 2, has seen a significant decrease in blood glucose levels for the group treated with

infusion of *B. forticata* in the control group [14].

Lectins are proteins with at least one carbohydrate recognition domain and can bind specifically and reversibly to carbohydrates [15, 17]. The function of plant lectins are discussed because they are related to their structural diversity, their specificity to carbohydrates, as well as their biological function [16].

The lectin purified from leaves of *B. monandra* (BmoLL, *B. monandra* leaf lectin) in milligram quantities; it is galactose-specific and can be isolated by affinity chromatography on guar gel column [18]. BmoLL is constituted by a glycosylated subunit of 33 kDa and a non-glycosylated subunit of 26 kDa; it is possible to obtain more than 2 mg of BmoLL from 5 g of the powder from dried leaves [19]. The biotechnological applicability of BmoLL is large: it possesses ability to interact with lipid monolayers [20], showed insecticidal activity against larvae of *Zabrotes subfasciatus* and *Anagasta kuehniella* [21], and is able to selectively recognize dengue serotypes [22]. BmoLL did not show genotoxicity and cytotoxicity in a series of cell-free and bacterial assays displaying a protective antioxidant effect [23].

The DM (non-obese diabetic) models are considered excellent for developing DM1 similar to that found in humans. The NOD strain of mice develop autoimmune diabetes by causing the destruction of insulin-producing cells, similar to that developed in humans [24], with the destruction of 95% of the insulin-producing beta cells manifested diabetes in NOD mice [25].

The NOD strain mouse was established from a cataract-prone strain (ICR), that developed spontaneous autoimmune diabetes, by inbreeding; this strain was originally developed in Japan [26; 27]. The incidence of spontaneous diabetes vary among 50 and 90% in females and 0 e 20% in males [26; 28].

Colony matrices from the Laboratory INSERM U-25 Neker, Paris, France were

introduced in Brazil at the Universidade Estadual de Campinas [27].

Thus there are studies for new diabetes therapies and experimental models help to search for compounds that can assist in lowering blood glucose levels. Currently popular medicine has opened possibilities of new compounds from plants many of which have a glycemic control on patients with DM1 and DM2.

The hypoglycemic action of extracts from leaves of *Bauhinia* species, including *B. monandra*, stimulates the identification of the active principles. In this study we investigated the effect of BmoLL on reducing blood glucose levels of NOD female mice when intraperitoneally injected.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

B. monandra leaves were collected at the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE), Recife, Brazil. A voucher specimen is archived under number 57,462 at the Herbarium *Dárdano de Andrade Lima* from the *Instituto Agronômico de Pernambuco*, Recife. The leaves were washed with tap water and dried at 28 °C for 2-3 days; following, tissues were powdered using a blender.

2.2. Animals

NOD mice were maintained in the *Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área do Laboratório de Ciência Animal* (CEMIB) at the *Universidade Estadual de Campinas* (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil. The colony was originated from matrices maintained at the Laboratory INSERM U-25 Neker, Paris, France. The animals were kept at a temperature of 22 ± 2°C with light and dark cycles

of 12/12 h (light from 6 to 18 h and dark from 18 to 6 h). The mice received food and water *ad libitum* in the animal vivarium under sanitary conditions and free of known pathogens (SPF). The mice are fasted for 12 h and after this period they have free access to food. Animals were anesthetized intraperitoneally with sodium thiopental (Thiopentax, Cristália Chemicals Pharmaceuticals Ltd., Brazil) at the end of treatments and sacrificed [28]. This work was approved by the Ethics Committee on Animal Research (process number 23076.055063/2009-61; UFPE).

2.3. Purification of BmoLL

BmoLL was purified by a previously defined protocol [17]. *B. monandra* leaf powder (15 g) was added to 150 ml of 10 mM citrate-phosphate buffer pH 6.5, containing 0.15 M NaCl. The mixture was kept overnight at 4 °C under gentle shaking using a magnetic stirrer. Next, the material was passed through gauze and centrifuged for 15 min at 12,000 *g* at 4 °C. Ammonium sulfate at 60% saturation was added to the supernatant in order to precipitate proteins; the material was kept under gentle agitation at 28 °C for 4 h and then centrifuged (12,000 *g*, 4 °C, 15 min). The precipitate (0-60% fraction) was resuspended with distilled water in a final volume of 20 ml and dialyzed against 10 mM citrate-phosphate buffer pH 6.5, containing 0.15 M NaCl. The 0-60% fraction was loaded onto a guar gel column previously equilibrated with the citrate-phosphate buffer. Extensive washing was performed until absorbance at 280 nm was zero; the adsorbed protein (BmoLL) was recovered from the column with 200 mM galactose prepared in citrate-phosphate buffer. BmoLL was evaluated for hemagglutinating activity, after dialysis against distilled water, according to Correia and Coelho [29] and protein concentration was measured according to Lowry et al. [30]. Purified BmoLL was stored at -20 °C.

2.4. Treatment of diabetic mice with BmoLL

The fasting blood glucose of female mice, after 10 weeks of age, was checked weekly using a glycomyte (OptiumXceed, Abbott Diabetes Care, USA), withdrawing blood sample from the animal tail vein. Mice that showed glucose levels greater or equal to 250 mg/dL were considered diabetic [31] and used in assays. The maximum threshold detection of the glycomyte used was 499 mg/dL. Thus, blood glucose levels higher than this value were considered as ≥ 500 mg/dL.

The effect of intraperitoneal treatment with BmoLL was evaluated in groups of diabetic mice treated with the lectin during 21 days. Each group (n=4) was formed by female NOD mice that had developed diabetes; one group was intraperitoneally treated with BmoLL at 60 mg/kg/day (BmoLL-treated diabetic group) and another was treated with distilled water (Non-treated diabetic group). A third group of non-diabetic animals (mice that did not develop diabetes from the 10th week of life) was monitored to evaluate normoglycemia levels (Non-diabetic group). Each treatment was performed in triplicate.

2.5. Biochemical and physiological analysis

The blood glucose levels from diabetic mice treated or not with BmoLL as well as from non-diabetic group was determined weekly during the 21 days of treatment. All glucose measurements were performed after a fast period of 12 h.

2.6. Evaluation of body weight

To analyze the gain or loss of weight of mice during the period of 21 days the weight of animals was determined at the starting time of treatment and weekly until the end (21st day). The starting time for each group corresponded to the time when diabetes

was detected and thus treatment was started (initial weight and relative value of 100%). The behavior of mice every day along experiment duration was also observed.

2.7. Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation; the significance of differences between the groups was assessed using the Student's *t*-test (significance at $p < 0.05$).

3. Results

3.1 Glucose Levels

Figure 1 shows the results from the weekly monitoring of blood glucose levels from diabetic NOD mice treated or not with BmoLL. Time zero did not show significant difference ($p > 0.05$) among hyperglycemic peaks of the group which would be submitted to treatment with BmoLL and the group that would receive only distilled water. The non-diabetic group showed normoglycemic level of 104.25 ± 22.43 mg/dL. BmoLL-treated diabetic group showed a decrease in blood glucose levels from the first week of treatment. The mean blood glucose level was 186.5 ± 109.3 mg/dL at the 7th day, with a high standard deviation value. The blood glucose levels did not alter significantly ($p > 0.05$) in the subsequent two weeks, however, there was a considerable decrease in the standard deviation which can be linked to a better stabilizing effect of the lectin on glucose levels. The non-treated diabetic group, in the same period, showed a significant ($p < 0.05$) increase in blood glucose concentration, reaching 443.5 ± 28.6 mg/dL at the 7th day and levels higher than 500 mg/dL at 14th and 21st days. The non-diabetic group showed similar normoglycemic levels during all the experiment. BmoLL-treated group

at the last week (21st day) showed glucose levels below that used to consider mice as diabetics (i.e. lower than 250 mg/dL) and close to the levels from non-diabetic (normoglycemic) group.

3.2 Evaluation Body weight

The control group normoglycemic keeps in a discrete weight gain in a very stable manner. When considering the standard deviation it does not become really significant with the initial value, with a value on the 21st day of $101.97 \pm 1.71\%$ compared with 100% from the beginning of treatment. The BmoLL treated group also compared to the initial time, presented a slight weight loss within the first 7 days of treatment relative value of $96.96 \pm 1.25\%$; it is possible that blood glucose levels in this group were not stable (**Figure 1**) being stable among 15 and 21 days, the results $98.94\% \pm 1.10$ and $99.79 \pm 1.34\%$, were obtained during which the group regain weight was observed (**Figure 2**).

Clearly weight loss occurred in the control group not treated for diabetes, throughout the period in comparison with the initial value of 100%; this group at day 21 had a relative value of $87.07 \pm 2.01\%$ (**Figure 2**).

It was observed in the mice during the entire time of 21 days some behavioral changes in the control group untreated diabetes at the last 15 days, with a much greater volume of urine, compared with other groups; also, it was observed in the same group a perceived difficulty in vision, which can be considered as polyuria and loss of vision.

4. Discussion

The purification of BmoLL in milligram amounts using the procedure established by Coelho and Silva [29] allowed the investigation of its *in vivo*

hypoglycemic activity. Our study aimed to yield a scientific basis for the popular use of *B. monandra* leaf extracts in order to reduce glycemia in diabetic people. Hypoglycemic effect in rats induced by aqueous extracts from leaves of *B. monandra* has been reported [8] but this activity was not attributed to any specific component.

The NOD mice that developed autoimmune diabetes by destruction of insulin-producing cells were used to evaluate BmoLL effect as well as a control group (non-treated diabetic). Some mice, as expected, did not reveal diabetes (normoglycemic) and then they were separated into a non-diabetic group; at the end of experiment, it was also observed whether these mice, in addition to be normoglycemic, did not show classic effects of diabetes. The characteristics determined in BmoLL-treated group were compared with those from both non-treated diabetic and non-diabetic groups.

The control group exhibited hyperglycemia that increased along the time. The results showed that BmoLL was effective in decreasing the serum glucose levels of diabetic NOD mice. Interestingly mice treated with BmoLL showed levels of glucose near to those found in the group that did not develop diabetes. These data suggest that BmoLL was able to compensate the lack of insulin production at least in regard to avoid high glucose concentrations in plasma.

Ojezele and Abatan [32] detected hypoglycemic activity of a *B. thoningi* leaf extract and hypothesized that the mechanism may involve inhibition of glucose absorption at digestive tract level as well as glycolysis stimulation and inhibition of gluconeogenesis. BmoLL, as a carbohydrate-binding protein, can interact with glycosylated molecules and receptors that are involved with absorption and metabolic use of glucose and thus may act in a similar form to that referred by these authors.

The non-diabetic group showed no significant variations in body weight while the non-treated diabetic mice continually lose weight at the same time as they presented

increasing hyperglycemic levels. BmoLL-treated group loses weight in just the first seven days when it still showed hyperglycemia but from the 15th day the mice recovered the lost weight showing final values near to the initial weight. These results allow considering a clear relationship between reduction of glucose levels by BmoLL and weight regain.

The difficulty in vision and polyuria observed in control group (untreated diabetes) are reported as consequences of diabetes. The poorly controlled DM results in microangiopathies such as retinopathy which is known as the most frequent cause of blindness [33, 34]. We observed that BmoLL-treated diabetic group and normoglycemic mice did not show difficulty in vision suggesting that the lectin effect also prevented this complication of diabetes.

The increase in urine volume in diabetes has been linked to intense thirst (polydipsia) due to disturbances in water balance and electrolytes as well as increased filtration of glucose by the kidney, which exceeds the capacity of reabsorption by the proximal tubule. The polyuria can cause hypotension and the lack of insulin also causes efflux of K^+ resulting in hypocalcaemia.

5. Conclusion

In summary, noting the consequences secondary to hyperglycemia presented to the control group untreated diabetes were not presented by the group treated with BmoLL nor the control group of normoglycemic levels, it is concluded that the effect of treatment with BmoLL to be able to control the blood glucose levels normal values continuously also minimized complications secondary to hyperglycemia during the entire 21 day of experimental period.

Acknowledgments

The authors thank CNPq, CAPES, and FACEPE for financial support. Maria Reis Barbosa da Silva, João Antônio, Alberich Real Virginio and Edilene Santos for technical assistance.

References

1. Buowari, O. Y. (2013), in *Diabetes Mellitus - Insights and Perspectives* (Oguntibeju, O.O., ed.). In Tech, Rijeka, pp. 131-148.
2. Nabors, L., Ritchey, P. N., Van Wassenhove, B. & Bartz, J. (2011), in *Type 1 Diabetes – Complications, Pathogenesis and Alternative Treatments*, (Liu, C.-P., ed.). In Tech, Rijeka, pp. 85-94.
3. Centers for Disease Control and Prevention (2011), National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
4. World Health Organization (2013), Diabetes. Fact sheet 312.
5. Dados estatísticos – diabetes 2007. Available from: <http://portal.saude.gov.br>. Accessed August 29, 2013.
6. Yeh, G.Y.; Eisenberg, D.M.; Kaptchuk, T.J. & Phillips, R.S. (2003). *Diabetes Care* v. 26, p. 1277-1294.
7. Khalil, N. M.; Pepato, M.T.; Brunetti, I.L. (2008) in *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 165-171.
8. Silva, K. L. & Cechinel-filho, V. *Química Nova* (2002) v. 25, p. 449-454.
9. Menezes, F.S.; Minto, A.B.M; Ruela, H.S.; Kuster, R.M.; Sheridan, H. & Frankish, N. *Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy)* (2007) v. 17, p. 8-13.

10. Gonzalez-Mujica, F.; Motta, N.; Márquez, A.H. & Capote-Zulueta, J. (2003) *Fitoterapia*, v. 74, p. 84-90.
11. Rajani, G.P. & Ashok, P.(2009) *Indian Journal of Pharmacology*, (2009) v. 41, p. 227-232.
12. Lino, C.D.; Diogenes, J.P.L.; Pereira, B.A.; Faria, R.A.P.G.; Neto, M.A.; Alves, R.S.; De Queiroz, M.G.R.; de Sousa, F.C.F.& Viana, G.S.B. (2004) *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, p. 125-127.
13. Moraes, E.A.; Rempel, C.; Périco, E. & Strohschoen, A.A.G. *ConScientiae Saúde*, (2010) v.9, p. 569-574.
14. Barondes, S.H. *Trend in Biochemical Science* (1988) v. 13, p. 480-482.
15. Ambrosi, M.; CAmeron, N. & Davis, B. *Organic and Biomolecular Chemistry* (2005) v. 3, p. 1593-608.
16. Lam, S.K.& Ng, T.B. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2010) v. 89, p. 45-55.
17. Silva, M.C. Caracterização parcial da lectina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 53f (2008) Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
16. Paiva, P. M. G., Pontual, E. V., Napoleão, T. H. & Coelho, L. C. B. B. (2013) Lectins and trypsin inhibitors – Biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae, 1st ed., Nova Science Publishers Inc., New York, NY.
17. Coelho, L. C. B. B. & Silva, M. B. R. (2000). *Phytochemical Analysis*, 11, 295-300.
18. Rosilio,V., Boissonnade, M., Coelho, L. C. B. B., Santos-Magalhães, N. S., Andrade, C. A. S. &Baszkin, A. (2004). *Colloids and Surfaces A*, 250, 491-497.
19. Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Silva, M. B. R. &Coelho, L. C. B. B. (2007). *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 146, 486-498.

20. Andrade, C. A. S., Oliveira, M. D. L., Melo, C. P., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S., Nogueira, M. L., Singh, P. R. & Zeng, X. (2011). *Journal of Colloid and Interface Science*, 362, 517–523.
21. Sisenando, H. A. A. A. C. N., Macedo, M. F. S., Saturnino, A. C. R. D., Coelho, L. C. B. B. & Medeiros, S. R. B. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 303-308.
22. Kodama, S.; Kühtreiber, W.; Fujimura, S.; Dale, E.A. & Faustman, D.L. *Science*, (2003) v. 302, p. 1223-1227.
23. Hernandorena, B.H.; Gonzales, J.C.R. & Garcia, J.C.R. *Revista Cubana Endocrinologia* (2001) v. 12, p. 168-77.
24. Kikutani H. & Makino S. *Advances in Immunology*, (1992) v. 51, p. 285-322.
25. Makino S., Kunimoto K., Muraoka Y., Mizushima Y., Katagiri K. & Tochino Y. *JikkenDobutsu*.(1980) v. 29, p.1-13.
26. Bach, J.F. *Endocrine Reviews* (1994).v. 15, p. 516-42.
27. Pavin, E.J. & Zollner, R.L. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, (1994) v. 38, p. 105-108.
28. Itoh, N., Imagawa, A., Hanafusa, T., Waguri, M., Yamamoto, K., Iwahashi, H., Moriwaki, M., Nakajima, H., Miyagawa, J., Namba, M., Makino, S., N. Agata, S., Kono, N. & Matsuzawa, Y. *Journal of Experimental Medicine* (1997) v.18; p. 613-618.
29. Correia, M. T. S. & Coelho, L. C. B. B. (1995). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55, 261-73.
30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
31. Karabas, M. K., Ayhan, M., Guney, E., Serter, M. & Meteoglu, I. (2013). *ISRN Endocrinology*, 2013, article 858690.

32. Ojezele, M. O. & Abatan, O. M. (2011). *African Health Sciences*, 11, 85–89.
33. Khan, T., Bertram, M. Y., Jina, R., Mash, B., Levitt, N., Hofman, K. (2013).
Diabetes Research and Clinical Practice, 101, 170-176.
34. Klein, R., Lee, K. E. L., Gangnon, R. E. & Klein, B. E. K. (2010). *Ophthalmology*,
117, 63-70.

Figure and captions

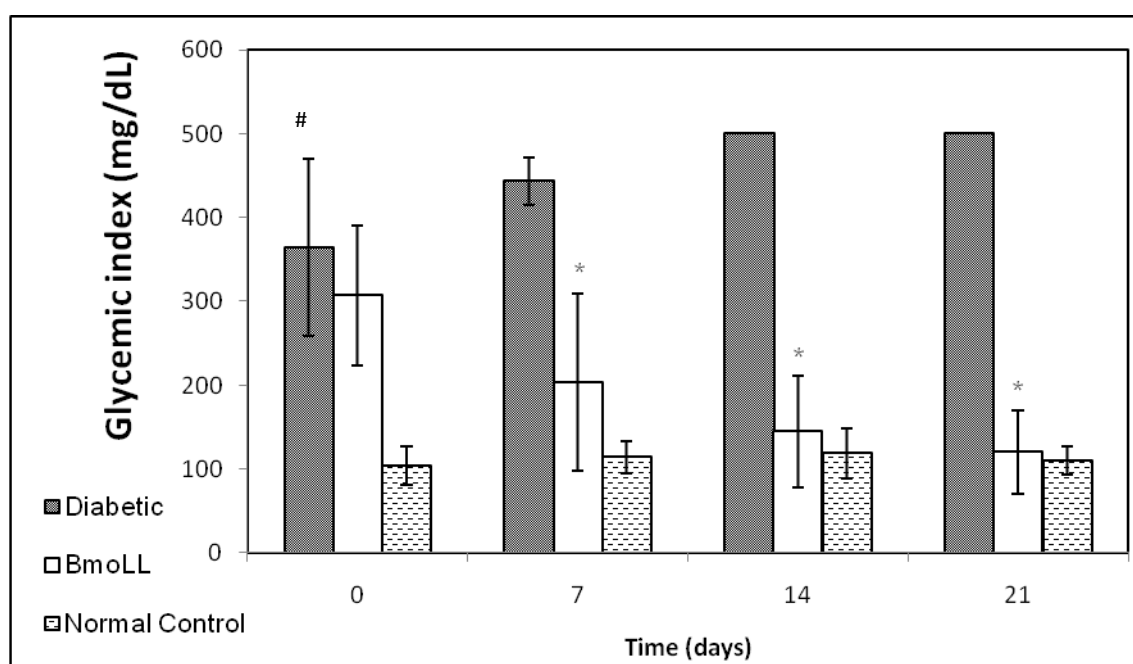


Figure 1. Blood glucose levels from NOD mice treatment with pure BmoLL. Time 0 (zero), before treatment; time 7, 14, and 21 days of treatment (three groups, n = 4); untreated diabetes group received vehicle (water); BmoLL treated diabetic group (60 mg/kg/day) and nondiabetic normoglycemic value group. BmoLL treated group showed a statistically significant difference ($p = 0.002$) as compared with control group not treated for diabetes treated group and compared with control group to normoglycemic levels showed no statistically significant difference ($p = 0.12$).

* $P < 0.05$ vs. NOD diabetic mice; # $P < 0.05$ for the Normal Control NOD mice.

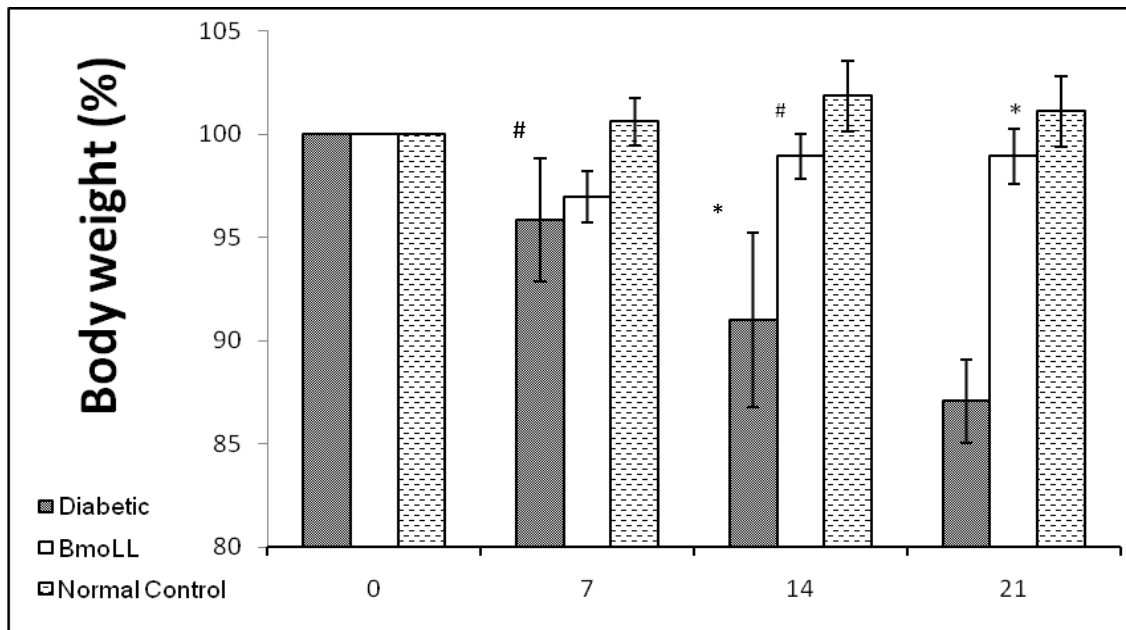


Figure 2. NOD mice weighing during treatment with pure BmoLL, divided into time 0 (zero) start of treatment, with 7, 14 and 21 days of treatment groups: control group received vehicle (water); group (BmoLL) treated (60mg/kg/day), non-diabetic group for normoglycemic values. BmoLL treated group showed a statistically significant difference ($p = 0.02$) as compared with control group not treated for diabetes, but the treated group compared with the control group to normoglycemic levels showed no statistically significant difference being ($p = 0, 12$).

* $P < 0.05$ vs. NOD diabetic mice; [#] $P < 0.05$ for Normal Control NOD mice.

6. CONCLUSÃO

Os efeitos da ação hipoglicemiante do tratamento de BmoLL purificada em camundongos NOD (*NON OBESE DIABETIC*), foi avaliado na utilização de três grupos de animais, cada grupo com (n=4), por 21 dias. O grupo tratado com BmoLL recebeu 60mg/kg/dia, o grupo controle para diabetes não tratado recebeu veículo, água. Grupo controle para valores normoglicêmicos foram camundongos que não desenvolveram diabetes. No grupo tratado os picos hiperglicêmicos foram vistos antes do tratamento, em uma média de glicose ($307,50 \pm 83,30$ mg/dL), equivalente ao grupo diabéticos não tratados $364,5 \pm 106,24$ mg/dl. No final do tratamento, 21dias, o grupo tratado ($137,50 \pm 68,26$ mg/dL) atingiu valores equivalentes ao grupo normoglicêmico ($110,50 \pm 16,66$ mg/dL). O controle nos níveis glicêmicos no grupo tratado mostrou apenas diferença estatística significativa ($p= 0,002$) em comparação com o grupo que recebeu apenas veículo. Observando as consequências secundárias a hiperglicemia apresentadas pelo grupo controle para diabetes não tratado, não foram apresentadas pelo grupo tratado com BmoLL nem pelo grupo controle de níveis normoglicêmicos; conclui-se que a ação do tratamento com BmoLL ao ser capaz de controlar os níveis glicêmicos a valores normais de forma continua minimizou também as complicações secundárias a hiperglicemia, durante todo o período de 21 dias. Necessários estudos posteriores para entendimento dos mecanismos pelos quais a BmoLL tem seu efeito hipoglicemiante.