

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AGREGANTE E ANTIAGREGANTE
PLAQUETÁRIA DE FORMAS MOLECULARES DAS LECTINAS DE
SEMENTES DE *Cratylia mollis* MART.**

Mestrando: José Melquiades de Rezende Neto

Orientadora: Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho

Recife, 2003

JOSÉ MELQUIADES DE REZENDE NETO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AGREGANTE E ANTIAGREGANTE
PLAQUETÁRIA DE FORMAS MOLECULARES DAS LECTINAS DE
SEMENTES DE *Cratylia mollis* MART.**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Bioquímica para o cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovada por:

Recife, 2003

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AGREGANTE E ANTIAGREGANTE
PLAQUETÁRIA DE FORMAS MOLECULARES DAS LECTINAS DE
SEMENTES DE *Cratylia mollis* MART.**

Mestrando: José Melquiades de Rezende Neto

Banca Avaliadora:

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Dra. Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha

Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

José Melquiades de Rezende Neto

Aos meus pais José Alves e Maria Lucia

À minha esposa Rejane Lenier

Aos meus filhos Kid e Mateus

Ao meu amigo Edison Eloi

AGRADECIMENTOS

Em especial a Deus, que me deu a vida, e me deu tantos talentos e as oportunidades de multiplica-los estando sempre presente em todos os momentos.

À professora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, pela extraordinária orientação científica, pelo exemplo de pesquisadora e exemplo de vida acadêmica.

À professora Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela valiosa contribuição científica.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica da UFPE, pelos exemplos de docência, desmistificando a bioquímica.

A todos os funcionários pela colaboração irrestrita, buscando sempre facilitar ao máximo a minha vida acadêmica.

Aos mestrandos mais antigos, em especial a todos do laboratório de Glicoproteínas, que sempre buscaram meios de nos ajudar.

Aos companheiros do curso de Mestrado, que sempre me ajudaram sobre todos os aspectos a nunca desistir, caminhando sempre ao meu lado.

À Flávia por ter cedido gentilmente as amostras, tão dificilmente conseguidas por ela.

Aos meus pais, Baiano e Lúcia por todo amor, carinho e dedicação, essenciais para realização deste e de todos os projetos de minha vida.

A Rejane, esposa, amiga e companheira inigualável, pelo amor incondicional sem o qual eu não teria conseguido.

Aos meus filhos, Kid e Mateus, jóias que Deus me honrou cuidar e guardar, pelos quais todos os esforços são prazerosos.

Ao meu sócio e amigo Edison Elói que, resignadamente permitiu-me ausentar, assumindo tão honradamente as minhas obrigações no laboratório.

A todos os colegas da UNIT, que direta ou indiretamente contribuíram para esta caminhada.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Membranaplaquetária – Esquema da anatomia.	11
Figura 2: Microfotografia de plaqueta não ativada.	13
Figura 3: Formação de tampão plaquetário em resposta a injúria vascular	14
Figura 4: Microfotografia de plaquetas inativas e agregadas	15
Figura 5: Sinalização bidirecional na superfície plaquetária	18
Figura 6: Estado conformacional de GPIIb-IIIa	22
Figura 7: Representação esquemática do conteúdo de grânulos.	24
Figura 8: Microfotografia de agregação induzida por agonistas.	24

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Proteínas plaquetárias de superfície e seus ligantes	17
Tabela 2: Grânulos plaquetários e seus componentes	22
Tabela 3: Importantes propriedades de lectinas	31

LISTA DE ABREVIATURAS

GP:	Glicoproteínas
MP:	Membrana plasmática
SCCS:	Sistema canalicular conectado à superfície
vWF:	fator de von Willebrand
DTS:	Sítio tubular denso
LIBS:	Sítio de ligação ligante induzido
PLA ₂ :	Fosfolipase A ₂
PLC:	Fosfolipase C
DAG:	1,2-diacilglicerol
IP ₃ :	1,4,5-inositoltrifosfato
TXA ₂ :	Tromboxano A ₂

SUMÁRIO**AGRADECIMENTOS****LISTA DE FIGURAS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE ABREVIATURAS****SUMÁRIO****RESUMO****ABSTRACT**

1. 1. INTRODUÇÃO	11
1.1. PLAQUETAS	12
1.1.1. ASPECTOS GERAIS	12
1.1.2. EVENTOS ASSOCIADOS COM AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	17
1.1.3. CITOESQUELETO PLAQUETÁRIO	20
1.1.4. AGONISTAS PLAQUETÁRIOS	23
1.1.4.1. ADENOSINA DIFOSFATO (ADP)	23
1.1.4.2. EPINEFRINA	23
1.1.4.3. COLÁGENO	23
1.1.4.4. TROMBINA	24
1.1.5. IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO ESTUDO DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA	25
1.2. LECTINAS	28
1.3. LECTINAS versus PLAQUETAS	30
2. RELEVÂNCIA DO TRÁBALO	32
3. OBJETIVOS	33
3.1. GERAL	33
3.2. ESPECÍFICOS	3
4. RELEVÂNCIA DO TRÁBALO	22
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
6. ÀRTIGO “Evaluation of platelet aggregation and antiaggregation ctivity of molecular forms from <i>Cratylia mollis</i> Mart. Seed lectin”	45
7. CONCLUSÕES	63

RESUMO

Plaquetas representam um importante elemento celular, regulando a reatividade células-vasos, baseando-se na interação com glicoproteínas de membrana. Lectinas reconhecem seletivamente e reversivelmente carboidratos e glicoconjugados, constituindo instrumentos apropriados para estudar a composição e distribuição de glicoproteínas celulares, bem como, para avaliar e quantificar a função dessas glicoproteínas de plaquetas. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito das isolectinas e isoformas (Iso) das lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cra) sobre indução e inibição da agregação plaquetária. A ação de Cra Iso 1,4 (preparação lectínica contendo Cra Iso 1 e Cra Iso 4), Cra Iso 1 e Cra Iso 3 foram analisadas e comparadas com aglutinina de germe de trigo (WGA) e concanavalina A (Con A), duas lectinas que induzem agregação plaquetária. As lectinas foram testadas em três concentrações (25, 50 e 100 µg/ml). O melhor resultado foi obtido com 100 µg/ml para todas as lectinas de *C. mollis*; Cra Iso 1 apresentou a maior agregação ($16,65 \pm 2,02$ %) similar a Con A ($20,02 \pm 1,42$ %). Inibição da agregação com epinefrina como agonista e as lectinas de *C. mollis* na concentração que não induziu agregação (percentual de agregação menor do que 10 %) foi negativa. Quando os específicos carboidratos inibidores das lectinas, manose e metil- α -D-manosídeo (Cra Iso 1,4 e Cra Iso 1) e galactose (Cra Iso 3) foram usados nas concentrações de 50 e 100 mM nenhuma indução foi observada. Os resultados mostraram que Cra Iso 1,4, Cra Iso 1 e Cra Iso 3 induzem agregação plaquetária através de seus respectivos sítios de ligação a carboidratos.

Palavras Chaves: Lectinas *Cratylia mollis*, plaquetas, agregação.

ABSTRACT

Platelets represent an important cellular element in the circulation, controlling cell-blood vessel reactivity, based on interactions with membrane glycoproteins. Lectins recognize selectively and reversibly carbohydrates and glyconjugates; they constitute appropriate instruments to study cell glycoprotein composition and distribution, as well as, to evaluate and quantify platelet glycoprotein functions. The aim of this work was the evaluation of isolectins or isoforms (Iso) from *Cratylia mollis* seed lectin (Cra) effects on platelet aggregation induction and inhibition. The action of Cra Iso1,4 (lectin preparation containing Cra Iso 1 and Cra Iso 4), Cra Iso 1 and Cra Iso 3 were analysed and compared with wheat germ agglutinin (WGA) and concanavalin A (Con A), two lectins that induce platelet aggregation. The lectins were assayed with three different concentrations (25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$). The best results were obtained with 100 $\mu\text{g/ml}$ to all lectins; Cra Iso 1 showed the highest aggregation ($16.05 \pm 1,09 \%$) similar to Con A ($20.34 \pm 4.05 \%$). Inhibition of aggregation using epinephrine as agonist and the lectin concentration that did not induce aggregation (aggregation percentual smaller than 10 %) were negative. When the specific lectin carbohydrate inhibitors mannose and methyl- α -D-mannoside (Cra Iso1,4 and Cra Iso 1) or galactose (Cra Iso 3) were used at 50 and 100 mM concentration, none aggregation induction was observed. The results showed that Cra Iso1,4, Cra Iso 1 and Cra Iso 3 induced platelet aggregation through respective carbohydrate binding sites.

Key-words: *Cratylia mollis* lectin, platelets, aggregation.

1. INTRODUÇÃO

Plaquetas, fragmentos plasmáticos de megacariócitos, possuem uma membrana celular lipoprotéica contendo glicoproteínas que funcionam como receptores importantes para a ativação plaquetária (Figura 1).

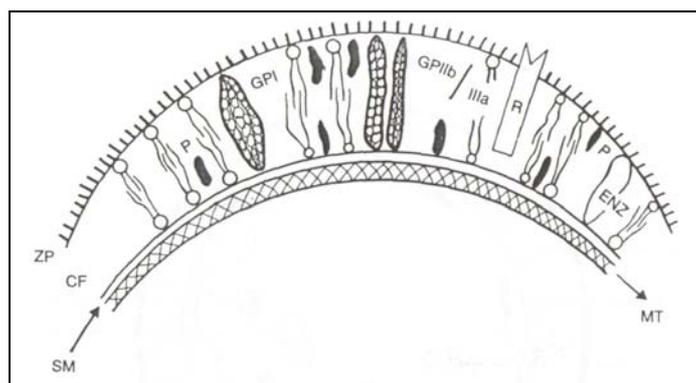


Figura 1 – Membrana plaquetária – Esquema da anatomia. ZP = zona periférica; CF = camada dupla de fosfolípidios; P = proteína; GP = glicoproteínas; R = receptor; ENZ = enzima; SM = submembrana; MT = microtúbulos (Lorenzi, 1999).

As duas principais reações de plaquetas são adesão e agregação, sendo mediadas por proteínas de membrana, a maioria das quais funciona na superfície plaquetária como receptor para compostos biologicamente ativos de alto e baixo peso molecular (Cawthern, 2001; Davie, 1983). Todos os receptores podem ser considerados como glicoproteínas (GP) desde que todos eles são mais ou menos glicosilados e pelo fato de lectinas poderem interagir especificamente com diferentes carboidratos em glicoproteínas, são usadas para o isolamento bem como o estudo de proteínas estruturais na membrana das plaquetas (Diaz, 1999; Franceschini, 1996). Várias características importantes da cadeia de carboidratos dessas glicoproteínas foram reveladas usando diferentes lectinas, incluindo aglutinina de germe de trigo (WGA), concanavalina A (Con A) dentre outras. Lectinas demonstraram que uma das maiores proteínas da membrana plaquetária – GP Ib, receptor do fator de von Willebrand (vWF), é a proteína mais glicosilada da superfície plaquetária. A concentração de carboidrato desta proteína representa mais de 50% do seu peso molecular. Suas cadeias α -hélice contêm principalmente O-glicanos ricos em ácido N-acetilneuramínico, galactose, N-acetil-D-glicosamina e N-acetil-D-galactosamina e as cadeias β contêm N-glicanos ricos

em manose e fucose. Outra importante glicoproteína da membrana plaquetária, complexo GPIIb-IIIa (α IIB- β 3-integrina), que atua como receptor para o fibrinogênio, é menos glicosilada e contém principalmente ramificações N-glicanos. Cadeias de carboidrato de GPIIb são ricas em fucose enquanto que GPIIIa em resíduos de manose. Lectinas são também empregadas no estudo da glicosilação de outras proteínas plaquetárias, incluindo GP IV, V, IX e várias GP menores (Cawthern, 2001; Ganguly, 1981). Lectinas são amplamente usadas não somente para o estudo estrutural, mas também para o isolamento de GP da membrana plaquetária.

A interação de lectinas com a superfície celular pode induzir a aglutinação e proliferação celular, ancoragem de proteínas da superfície celular, e algumas outras reações (Franceschini, 1996; Ganguly, 1979; Grubhoffer, 1997). Estudos do efeito de lectinas na função plaquetária têm mostrado que algumas delas são hábeis para estimular a agregação plaquetária e secreção de grânulos intraplaquetários (George, 1986; Ghosh, 1999). Interação de lectinas com a superfície plaquetária poderia também indicar a ativação de um segundo sistema mensageiro, incluindo diferentes proteínas tirosinoquinases, e subsequente fosforilação de algumas proteínas plaquetárias intracelulares (Greenberg, 1984). Tais propriedades de lectinas são então úteis não somente para análises da estrutura de carboidratos em GP plaquetárias, mas também no estudo do envolvimento dessas moléculas nos processos de ativação plaquetária (Patscheke, 1977).

Evidências têm sugerido que a adesão de plaquetas ao colágeno pode ser mediada por resíduos de galactose presentes no colágeno e uma específica glicosiltransferase presente na superfície plaquetária (Jamielson, 1997). Entretanto tem também sido sugerido que uma das razões às diferentes respostas celulares para lectinas é a localização de receptores específicos para açúcares da cadeia lateral de carboidrato de glicoproteínas de membrana (Goldman, 1996).

1.1 PLAQUETAS

1.1.1 ASPECTOS GERAIS

Plaquetas humanas em circulação têm morfologia discóide, medindo de 2 a 4 μ , superfície relativamente lisa e não contém núcleo. A ultraestrutura de plaquetas normais

(Figura 2) revela um sistema canalicular conectado à superfície (SCCS) o qual é um sistema de membrana contínuo estendendo-se à membrana plasmática (MP). A MP contém muitas proteínas que servem como receptores para agonistas que iniciam a resposta à ativação plaquetária ou para moléculas de adesão que mediam a adesão e/ou agregação plaquetária (Bachelot *et al.*, 1995, Fijnheer *et al.*, 1997).

O SCCS propicia a passagem para o plasma de componentes bem como de substâncias vasoativas que são liberadas após a ativação das plaquetas. Plaquetas possuem vários tipos de grânulos, cujos conteúdos são liberados após ativação plaquetária. O sítio tubular denso (DTS) tem sido mostrado como local onde o cálcio é liberado iniciando a ativação de muitas enzimas cálcio-dependentes e eventos contráteis como resposta à ativação da plaqueta (Kulikov & Muzya, 1998).

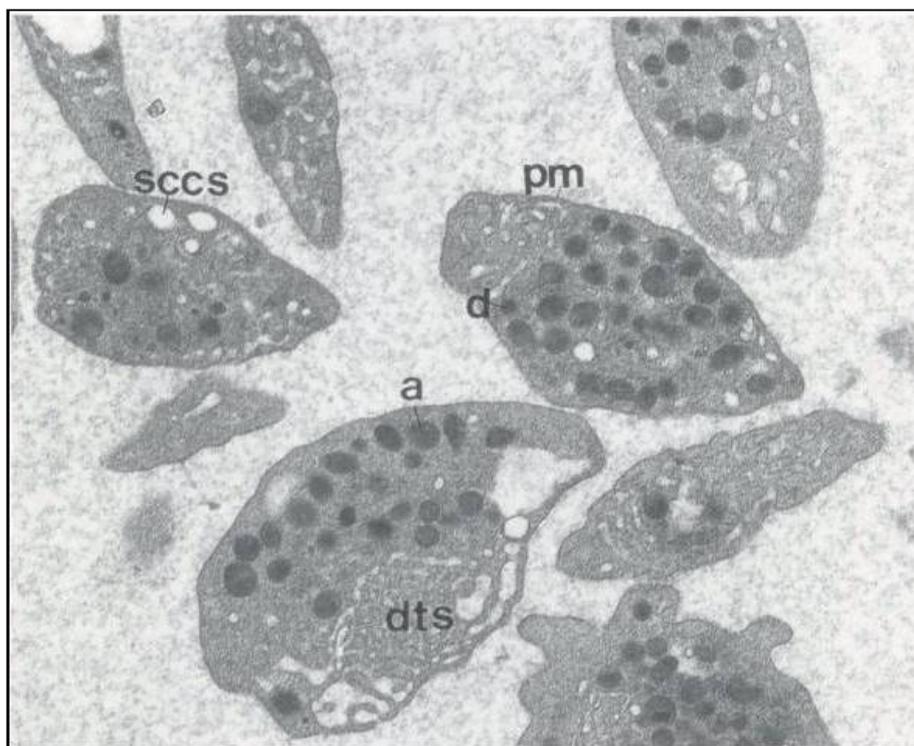


Figura 2 - Microfotografia de plaqueta não ativada. pm: membrana plasmática; dts: sistema tubular denso; d: grânulos densos; a: grânulos alfa; sccs: sistema canalicular conectado à superfície. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999)

Dano ao endotélio vascular usualmente indica a exposição da camada sub-endotelial, que estimula a aderência de plaquetas através de ligação a vários receptores, mas primariamente a glicoproteína Ib-IX-V. Plaquetas aderidas tornam-se ativadas e liberam o

conteúdo dos grânulos, recrutando plaquetas próximas em circulação, formando um agregado (Figura 3).

A formação do agregado de plaquetas ou trombo ocorre via ativação da glicoproteína GPIIb-IIIa e ligação a ligantes multiadesivos, fibrinogênio, ou vWF, o qual se liga a plaquetas ativadas adjacentes (Figura 4A). Um agregado é uma massa amorfa de muitas plaquetas (Figura 4B). Quanto maior a força do agonista maior o tamanho do agregado. Quando plaquetas estão inativadas, a GPIIb-IIIa está em um estado de baixa afinidade e não pode se ligar ao fibrinogênio solúvel. Após a ativação das plaquetas a GPIIb-IIIa sofre uma mudança conformacional que permite a ligação ao fibrinogênio. O fibrinogênio contém no mínimo três sítios de reconhecimento de plaquetas: Arg-Gly-Asp-

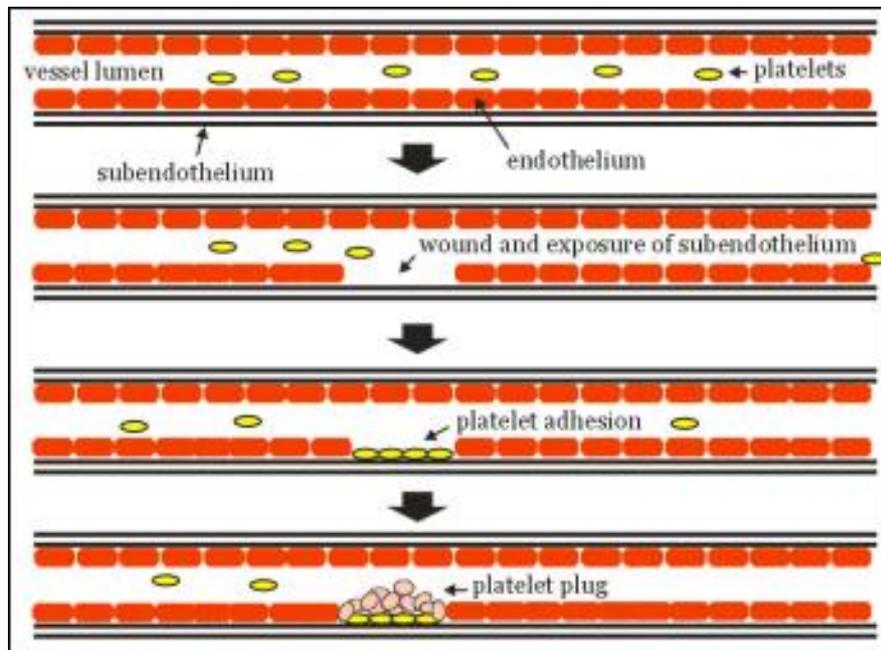


Figura 3 - Formação do tampão plaquetário em resposta à injúria vascular. Após injúria do vaso, plaquetas aderem ao sub-endotélio exposto. Ativação plaquetária e agregação ocorrem levando à formação do trombo. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999).

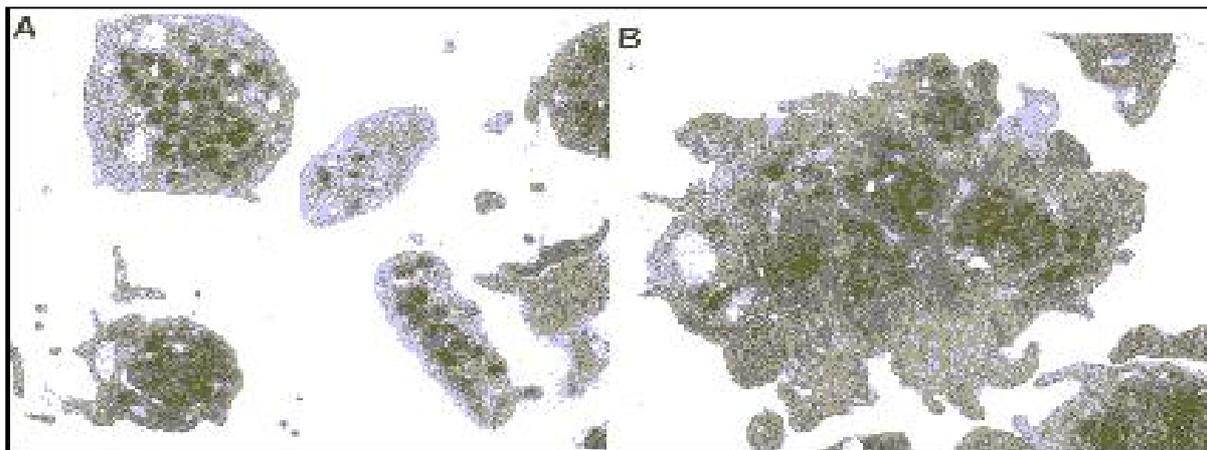


Figura 4 - Microfotografia de plaquetas inativas discóides (A) e plaquetas agregadas (B). Notar a presença de numerosos grânulos densos na plaqueta inativa discóide. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999).

Phe (RGDF), Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) e a seqüência dodecapeptídeo His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (RGDX). A molécula do fibrinogênio possui duas seqüências de RGDX, a ligação do fibrinogênio à plaqueta parece ser primariamente mediado pela seqüência dodecapeptídeo. Devido ao seu pequeno tamanho, peptídeos sintetizados dessas três seqüências ligados a GPIIb-IIIa regulam o estado de ativação da GPIIb-IIIa. Resultados experimentais usando essas seqüências de peptídeos mostram a importância dos múltiplos domínios do fibrinogênio em mediar adesão e agregação de plaquetas (Heath-Mondoro *et al*, 1996; Bachelot *et al*, 1995).

As plaquetas apresentam várias glicoproteínas de superfície, que desempenham importante função nas suas respostas a estímulos, tais como:

GPIb-IX-V

O receptor primário em plaquetas humanas, responsável pela adesão plaquetária é o GPIb-IX. GPIb-IX, é a maior proteína da superfície plaquetária, outra proteína de superfície GPV, é unida no complexo com GPIb-IX em uma proporção molar de 1:2 (GPV - GPIb-IX). O complexo formado representa a maior sialoglicoproteína da superfície plaquetária sendo também responsável pela carga negativa da superfície da plaqueta. GPIb-IX-V é necessário para adesão de plaquetas normais ao sub-endotélio pela ativação do vWF, exposto no sub-endotélio. Adicionalmente, GPIb-IX-V contém um sítio para trombina e

tem sido implicado na ampliação da resposta plaquetária a baixas concentrações de trombina. Pacientes com plaquetas que perderam GPIb-IX-V têm baixa expressão do complexo e apresentam desordens hemorrágicas chamadas síndrome de Bernard-Soulier (BSS). Essas plaquetas são incomumente grandes e não se ligam ao vWF, falhando na formação de um tampão hemostático efetivo (D'Souza *et al*, 1997, Gachet *et al*, 1997).

GPIIb-IIIa

GPIIb-IIIa é a chave para interação plaqueta-plaqueta ou agregação plaquetária, receptor primário para fibrinogênio na plaqueta. Embora GPIIb-IIIa tenha função predominante na agregação plaquetária, tem sido sugerido que sob condições de grande perda sanguínea, ambas, GPIb e GPIIb-IIIa estão envolvidas na adesão plaquetária. A importância da GPIIb-IIIa na agregação foi primeiro documentada em estudo de pacientes com tromboastenia de Glanzmann's, cujas plaquetas perderam ou têm receptores GPIIb-IIIa disfuncionais. Estas plaquetas apresentam ausência de agregação para todos os agonistas testados. Uma GPIIb-IIIa funcional é a via final comum de agregação plaquetária. Pacientes diagnosticados com tromboastenia de Glanzmann's apresentam plaquetas com tamanho e contagem normais (D'Souza *et al*, 1997).

GPIIb-IIIa é um heterodímero cálcio dependente com aproximadamente 40.000 a 80.000 cópias por plaquetas. Embora a maioria da GPIIb-IIIa esteja localizada na superfície externa da membrana, estudos têm demonstrado que elas estão localizadas internamente nos grânulos- α e na rede de membranas que cobre o sistema canalicular o qual torna-se expresso após ativação das plaquetas. A extensão da expressão dessas moléculas de GPIIb-IIIa é dependente da força do agonista. Em adição à mediação da resposta agregante e talvez à extensão da adesão, GPIIb-IIIa é também crítica na retração do coágulo, um processo que consolida o tampão formado no local da lesão, através da interação entre GPIIb-IIIa e proteínas do citoesqueleto plaquetário (D'Souza *et al*, 1997).

GPIV

GPIV (CD36 ou GPIIb) é uma glicoproteína de membrana largamente distribuída em células humanas. Em plaquetas humanas, GPIV tem sido proposto como mediador de eventos iniciais de adesão plaquetária com o colágeno e servindo como um dos receptores

para trombospondina (TS-1). GPIV tem sido implicado em desordens clínicas, por exemplo: expressão de GPIV é aumentada em desordens mieloproliferativas, é também sítio de ligação endotelial para eritrócitos infectados com *Plasmodium falciparum* – Malária; também tem sido reportado que anticorpos anti-CD36 induzem ativação plaquetária (Gauchet *et al*, 1997).

CD9

CD9, uma proteína de membrana de superfície, expressa em plaquetas bem como muitos outros tipos celulares, pertence a uma nova família de proteínas, as tetraspaninas. Resultados de estudos usando plaquetas têm sugerido funções para CD9 em agregação e adesão. Associação molecular de CD9 com GPIIb-IIIa e com GPIb tem sido demonstrada (Bachelot *et al*, 1995).

As principais proteínas de superfície plaquetária e seus ligantes específicos são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 - Proteínas Plaquetárias de Superfície e Seus Ligantes

Proteína de membrana	Receptor
GPIa-IIa (VLA-3, $\alpha 2\beta 1$)	Colágeno
GPIb-IX-V	VWF e Trombina
GPIc-IIa (VLA-5, $\alpha 5\beta 1$)	Fibronectina
GPIIb-IIIa	Fibrinogênio, vWF, Fibronectina, Vitronectina
VnR ($\alpha v\beta 3$)	Fibrinogênio, vWF, Fibronectina, Vitronectina
GPIV	Trombospondina, Colágeno
GPVI	Colágeno
CD9	Fibronectina

1.1.2 EVENTOS ASSOCIADOS COM AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

SINALIZAÇÃO GPIIb-IIIa

GPIIb-IIIa esta envolvido na sinalização bidirecional através da membrana plaquetária (Figura 5). A interação do agonista com seu receptor inicia a ativação da via

intracelular, importante para ativação do receptor de GPIIb-IIIa o qual permite a ligação do fibrinogênio e vWF. A ligação desses ligantes, forma pontes entre plaquetas ativadas adjacentes, permitindo a formação do agregado plaquetário (Gulino *et al*, 1992).

Ativação de GPIIb-IIIa ocorre através da geração ou liberação de agonistas solúveis assim como trombina, tromboxano A₂, ADP ou serotonina. Estes agentes não atuam diretamente na GPIIb-IIIa, mas ligado ao receptor da plaqueta, o qual orienta para uma via clássica de transdução de sinal. Proteína G e tirosinaquinase usualmente traduzem este sinal, o qual resulta em ativação da fosfolipase C (PLC), trocas no cálcio citosólico e ativação das proteínas quinases celulares (Heath-Mondoro *et al*, 1996, Jennings *et al*, 1995).

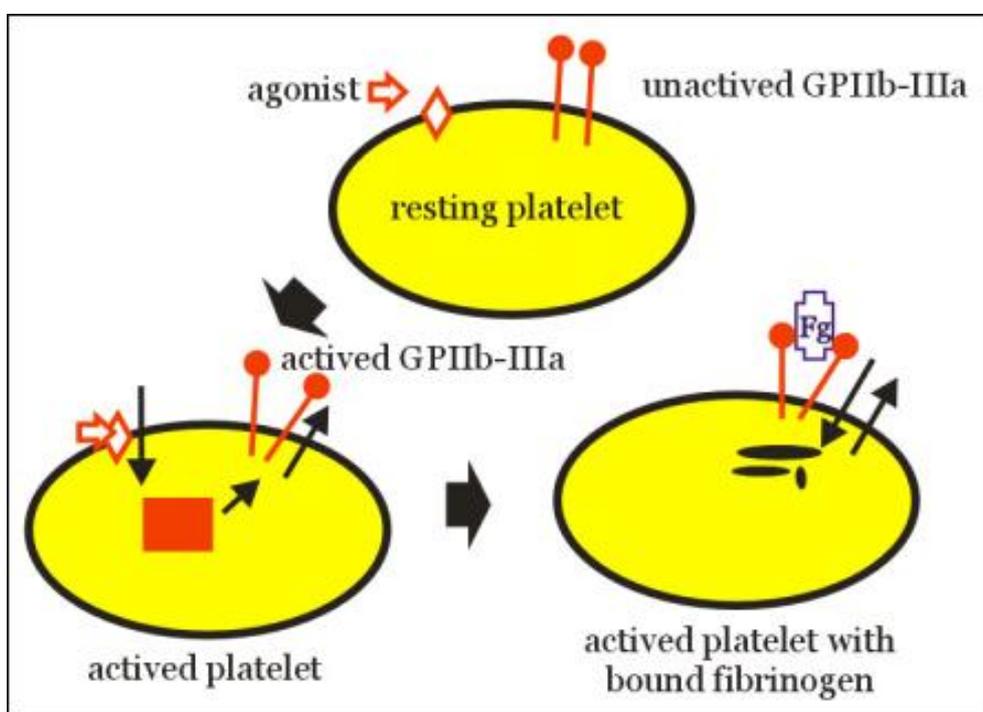


Figura 5 - Sinalização bidirecional de GPIIb-IIIa. GPIIb-IIIa expressada em plaqueta intacta não pode ligar-se ao fibrinogênio plasmático. Após ativação da plaqueta, moléculas de sinalização participam na indução de ativação do receptor de GPIIb-IIIa. O receptor de alta afinidade ativado liga-se ao fibrinogênio (ou fator de von Willebrand), e sinalizadores mecânico-químicos são transmitidos através da membrana para mediar eventos pós-ocupação do receptor, tal como retração do coágulo. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999).

Tem sido proposto que a sinalização para fora (“inside-out”) é mediada pelo domínio citoplasmático da GPIIb-IIIa em resposta a eventos intracelulares iniciados por

agonistas plaquetários. Trabalhos recentes têm implicado proteínas celulares tais como calreticulina e serina/treonina quinase, e membros da pequena família GTPase, tais como R-Ras e RhoA. GPIIb-IIIa está constitutivamente em estado de baixa afinidade e não pode ligar-se a fibrinogênio solúvel ou vWF até ser ativado o mecanismo de ativação da via e passar-se para uma conformação de alta afinidade. Inibidores desta via de transdução de sinal podem afetar a afinidade de ligação induzida pelo agonista. Em resposta a vWF ou fibrinogênio ocorre uma mudança adicional de conformação na integrina ativada que pode ser medida por uma classe especializada de anticorpos monoclonais (mAbs) chamada anti-LIBS (sítio de ligação ligante induzido). Certamente anti-LIBS inibem a retração do coágulo, agregação plaquetária completa, ou reverte à agregação presumivelmente pela interrupção da sinalização “inside-out” após ocupação do receptor. A função exata que a LIBS têm sobre o estado de alta afinidade da integrina esta ainda sob investigação. Tem sido reportado que a cauda citoplasmática da GPIIIa esta predominantemente fosforilada por resíduos de serina e treonina após ativação plaquetária e que a fosforilação desses sítios poderia regular a exposição da LIBS. Alem do mais, tem sido demonstrado que a sub-unidade GPIIa está fosforilada em resposta a agregação plaquetária mediada por trombina (Jennings *et al*, 1995).

Deslocamento de cátions divalentes durante a ligação com o ligante, poderia causar mudanças conformacionais através da membrana. É aparente que a GPIIb-IIIa é uma proteína regulada dinamicamente pelo estado de ativação da plaqueta e responde a ligação por moléculas de adesão. Entendimento do mecanismo de ativação desses receptores poderia fornecer um meio para regular a atividade de plaquetas em hemostasia e trombose. A molécula de GPIIb-IIIa esta numa conformação de repouso que não pode se ligar a ligantes solúveis tais como: fibrinogênio ou vWF. Após ativação plaquetária, ocorre uma mudança conformacional. A presença do ligante gera uma atividade de receptor para ligante ocupado, a qual é reconhecida pelo anticorpo anti-LIBS. A adição de um antagonista em plaquetas inativas pode causar uma transformação direta das conformações R1 para R3, desde que esse antagonista possa ligar-se a GPIIb-IIIa devido a seu pequeno tamanho, sem requerimento da conformação R2. Bloqueio pelos antagonistas da ligação com fibrinogênio e vWF (Figura 6), gera bloqueio da agregação (Topol *et al*, 1994, The Pursuit Trial Investigators, 1998).

1.1.3 CITOESQUELETO PLAQUETÁRIO

Uma das maiores proteínas plaquetárias é a actina. Muitas respostas plaquetárias requerem a força gerada por proteínas contráteis. Estas respostas incluem secreção, mudança de forma, agregação e retração do coágulo. Plaquetas inativas contêm uma rede de microfilamentos (MF) e uma membrana em rede de filamentos curtos de actina (ou filamentos sub-membrana - SMF) que são importantes na manutenção da integridade estrutural discóide da plaqueta inativa. O componente primário da superfície da membrana

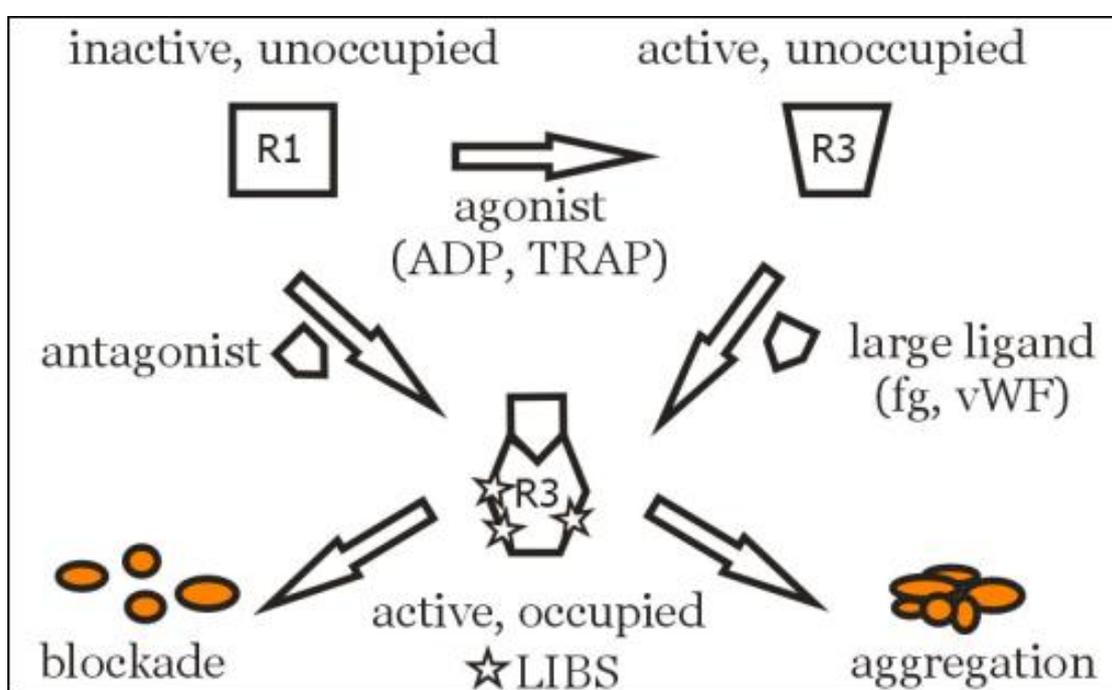


Figura 6 - O estado conformacional de GPIIb-IIIa quando ele está num estado inativo (desocupado) versus um estado ativo (ocupado). O receptor inativo R1, representa o receptor GPIIb-IIIa na plaqueta inativa. Após a plaqueta ser ativada por uma agonista, R1 assume a conformação de R2. Se muito ligante está presente, resulta em uma mudança conformacional adicional para R3. Ligação de fibrinogênio ou vWF e a ligação cruzada de plaquetas adjacentes resulta em agregação. Por outro lado, se plaquetas são tratadas com antagonistas de receptor GPIIb-IIIa, R1 converte-se diretamente em R3. Pequenas quantidades de antagonistas funcionam como inibidores competitivos de grandes quantidades de ligantes ligados, bloqueando a ocorrência de agregação. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999).

é o complexo GPIb-IX. Actina ligada à proteína promove a ligação de filamentos plaquetários para GPIb-IX. Após ativação plaquetária e como resultado do aumento dos níveis de cálcio citosólico, uma enzima chamada calpaína torna-se ativada e corta a ligação

da actina com proteína, liberando estes pontos de ligação, permitindo um aumento da mobilidade dos componentes plaquetários. Durante ativação plaquetária, as plaquetas sofrem mudanças dramáticas de forma, passando da forma discóide para forma arredondada com extensos pseudopodes. Esta mudança morfológica está associada com rearranjo do citoesqueleto plaquetário incluindo os microtúbulos (MT). A percentagem de filamentos de actina aumenta de aproximadamente 15% na plaqueta inativa para aproximadamente 70% na plaqueta ativa. Miosina plaquetária também está fosforilada e associada com filamentos de actina. Adicionalmente, novas ligações entre componentes do citoesqueleto plaquetário com GPIIb-IIIa ocorrem durante localização de moléculas de sinalização que facilitam a agregação plaquetária e a retração do coágulo (Harrison & Kramer 1993, Gachet *et al*, 1997).

Plaquetas contêm um grande número de moléculas ativas com seus grânulos (Figura 7). Os grânulos alfa (α) contêm coagulantes e proteínas adesivas como vWF, fibrinogênio, fibronectina, fator V, bem como fator de crescimento e inibidores. A liberação das proteínas PF4 e β TG de grânulos α têm sido usadas como um indicador de liberação (secreção) plaquetária. P-selectina, um componente de grânulos α (também conhecido como CD62P, GMP-140 e PADGEM), é translocada da superfície plaquetária para a superfície endotelial após ativação. Este antígeno tem sido implicado como promotor da interação plaqueta-leucócito. A expressão de P-selectina na superfície plaquetária tem sido usada como marcador para ativação plaquetária. Tem sido postulado que o aumento dos níveis de P-selectina solúvel pode ser um marcador para doença trombótica. (The PURSUIT Trial Investigators, 1998). O conteúdo dos grânulos plaquetários está apresentado na tabela 2. Os corpos densos armazenam serotonina, cálcio, nucleotídeos adenina e guanina, cátions divalentes e fósforo. Lisossomos contêm enzimas hidrolíticas como hidrolases ácidas, catepsina e heparitinase. Adicionalmente, peroxissomas têm sido identificadas contendo catalases. Geralmente, a liberação do conteúdo dessas organelas reflete a intensidade do estímulo a qual as plaquetas são expostas. (Gachet *et al*, 1997; Slupski *et al*, 1997).

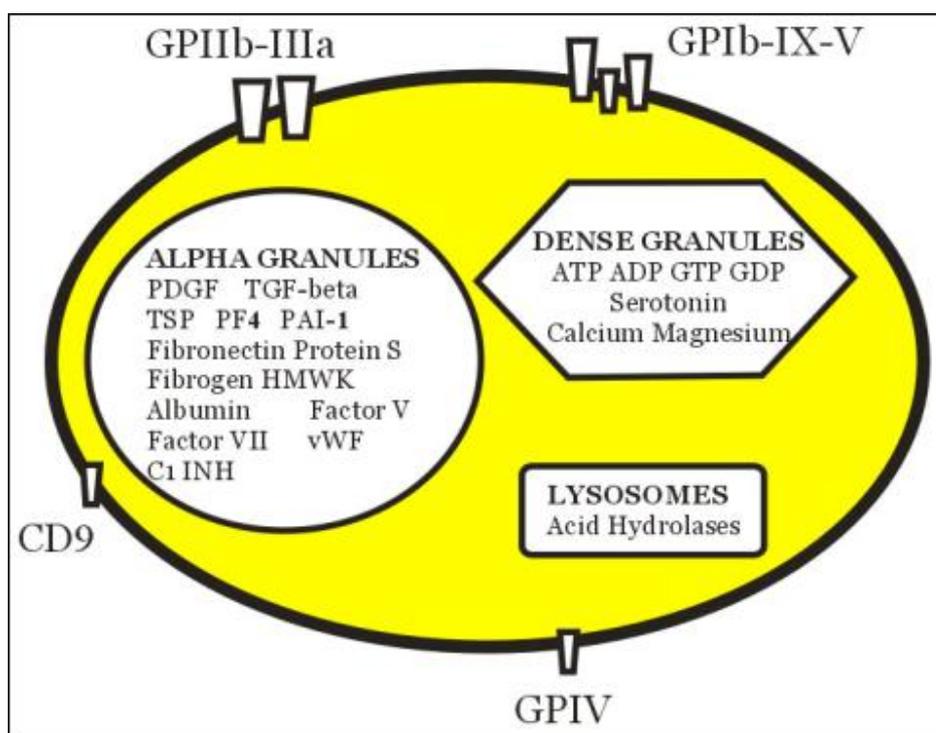


Figura 7 - Representação esquemática do conteúdo dos grânulos e principais proteínas da superfície plaquetária. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999).

Tabela 2 – Grânulos Plaquetários e Seus Componentes

α-grânulos	Grânulos densos	Lisossomos
PDGF	ATP	Hidrolase ácida
TGF- β	ADP	
CTAP III	GTP	
Fator plaquetário 4	GDP	
TSP	Serotonina	
Fibronectina	Cálcio	
Fibrinogênio	Magnésio	
Vitronectina		
Fator Von Willebrand		
Albumina		
Fatores V e VII		
Proteína S		
PAI-1		
HMWK		
C1 INH		

PDGF = fator de crescimento derivado de plaqueta; TGF- β = fator de crescimento diferencial-beta; CTAP III = peptídeo ativador de tecido conjuntivo; PAI-1 = inibidor do plasminogênio ativador-1; HMWK = kininogênio de alto peso molecular; C1 INH = C1 inibidor; TSP = trombospodina

1.1.4 AGONISTAS PLAQUETÁRIOS

1.1.4.1 ADENOSINA DIFOSFATO (ADP)

Adição de ADP às plaquetas causa mudanças na forma e exposição de sítios de ligação a fibrinogênio ao GPIIb-IIIa, ligação de fibrinogênio, e agregação plaquetária (Figura 8A), como também aumento nos níveis citoplasmáticos de cálcio livre pela liberação de reservas internas, bem como pelo influxo de Ca^{2+} . ADP inibe estimulação da adenilato ciclase e também causa reorganização do citoesqueleto plaquetário. ADP é um ativador fraco da fosfolipase C. Evidências sugerem que podem existir dois receptores plaquetários para ADP: um responsável pela mediação da agregação que esta acoplada a proteína G e o outro que é responsável pelo influxo de cálcio e mudança na forma (Ohlmann *et al*, 1995).

1.1.4.2 EPINEFRINA

Epinefrina é único entre os agonistas plaquetários porque ele causa agregação plaquetária e liberação, mas não mudança de forma (Figura 8B). Ativação da fosfolipase C pela epinefrina é dependente da formação de tromboxano A_2 e é inibida pelo tratamento com aspirina. Entretanto parece que a formação de tromboxano A_2 não é requisito absoluto para agregação induzida por epinefrina. A ativação de GPIIb-IIIa e ligação ao fibrinogênio podem ainda ocorrer em plaquetas inibidas por aspirina quando expostas a epinefrina. Outro mecanismo de ativação inclui a possibilidade da influência da epinefrina na medida da saída de Na^+/H^+ através da membrana plaquetária, adesão, liberação de grânulos e agregação de plaquetas, o qual pode afetar ativação da fosfolipase A_2 - PLA_2 . (Slupsky *et al*, 1997, Warkentin *et al*, 1998).

1.1.4.3 COLÁGENO

Colágeno é uma proteína insolúvel que induz ativação, adesão, liberação de grânulos e agregação de plaquetas. Agregação plaquetária induzida por baixa concentração de colágeno é altamente dependente da reação de liberação e é muito sensível a inibição pela aspirina. Vários candidatos têm sido selecionados como receptores de colágeno. Os dois mais prováveis são GPIa/IIa (integrina $\alpha_2\beta_1$) e GPVI. GPIV tem também sido

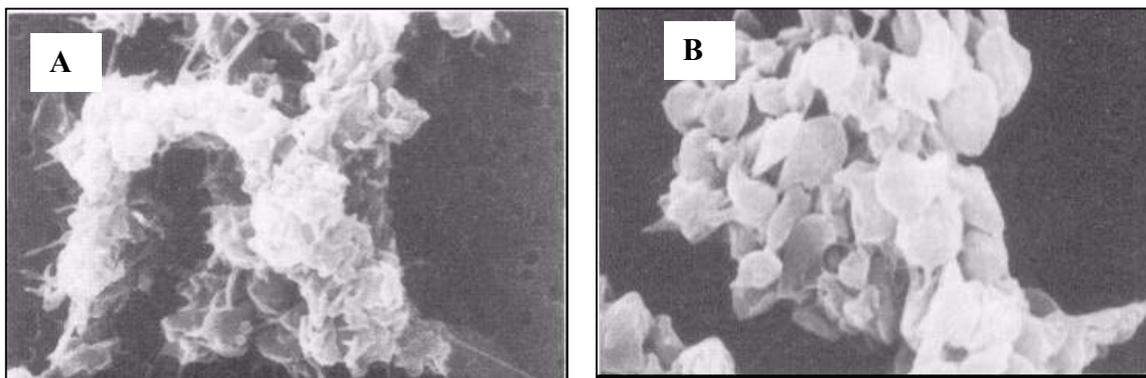


Figura 8- Microfotografia de (A) ADP e (B) epinefrina induzindo agregação. Notar a aparência lisa do agregado com epinefrina em oposição à massa amorfa com pseudópodes no agregado com ADP. (Platelets Protocols, Academic Press, 1999)

implicada como tendo atividade de ligação a colágeno. Como outros agonistas, ADP e trombina, a ativação de plaquetas por colágeno resulta em um aumento da concentração de cálcio citosólico e mudanças em fosfoinosítídeos. Experiências em câmaras de perfusão que simulam as condições dos vasos sanguíneos mostram que a adesão de plaquetas ao colágeno é dependente da interação do vWF com GPIb plaquetário. vWF ligado ao colágeno exposto e plaquetas, aderem ao vWF imobilizado via GPIb. Plaquetas aderem também com colágeno imobilizado, provavelmente através de GPIa/IIa e GPVI, resultando em ativação plaquetária e recrutamento de plaquetas próximas para formar o agregado (Law *et al*, 1996; Umemura *et al*, 1997; Slupsky *et al*, 1997).

1.1.4.4 TROMBINA

Trombina é o mais potente agonista plaquetário. O receptor de trombina é uma proteína integral com 425 aminoácidos que aparece na membrana várias vezes. Quebra dessa região aminoterminal cria um novo terminal amino que se liga a qualquer região do receptor. Ativação de plaquetas pela trombina é mediada pela ativação da PLA₂. A PLC catalisa a quebra do fosfolípídeo inositol da membrana plasmática, resultado na geração de 1,2-diacilglicerol (DAG) e 1,4,5-inositol trifosfato (IP₃). DAG ativa proteína quinase C e IP₃ induzindo a mobilização de cálcio para reservas intracelulares. PLA₂ media a geração de ácido araquidônico que pode ser convertido internamente no potente agonista tromboxano A₂ (TXA₂). TXA₂ pode difundir através da membrana e ligar-se a receptores

de TXA₂, potencializando assim a resposta ativa das plaquetas. Outros eventos incluem a ativação da proteína quinase C, ativação da fosfatidilinositol 3-quinase, polimerização da actina, fosforilação de cadeias leves de miosina, ativação de tirosina quinase e ativação de GPIIb-IIIa (Slupsky *et al*, 1997; Phillips *et al*, 1997).

1.1.5 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO ESTUDO DA FUNÇÃO PLAQUETÁRIA

Desordens de Armazenamento de Grânulos (SPD) e Defeitos de Liberação, bem como, abordagem terapêutica para inibição da função plaquetária, são aspectos importantes no estudo da função plaquetária.

Fenômeno componente da hemostasia junto à coagulação, a agregação plaquetária e sua avaliação, têm suas aplicações dentro da situação de um quadro hemostático de um paciente que irá, por exemplo, sofrer uma intervenção cirúrgica, fazer uso de antiagregantes como terapia preventiva nas cardiopatias, infartos do miocárdio e principalmente, na monitoração da ação dessas drogas antiagregante (Wu *et al*, 1996, Finkle *et al*, 1998, Gresel *et al*, 1997).

A atividade plaquetária, durante o fenômeno da agregação, pode ser medida opticamente como um decréscimo na densidade óptica do plasma rico em plaquetas (PRP), causado pela agregação das plaquetas presentes na amostra (Colman *et al*, 1994).

O mecanismo de disparo da agregação tem início com a sinalização por metabólitos fosfolipídicos (da via da ciclooxygenase) na presença do agonista no meio plasmático, e as plaquetas reagem, sofrendo uma extraordinária série de mudanças como resposta a esta mensagem (Casonato *et al*, 1998).

A primeira mudança observada é a morfológica, e pode ser observada microscopicamente, quando a plaqueta passa de uma forma discóide para uma globular (esférica). Esta fase é reconhecida opticamente como a “lag phase” no agregômetro, quando o PRP se torna momentaneamente mais turvo, e é notada de modo particularmente intenso quando se usa colágeno como agonista. A partir desta alteração, caso as plaquetas apresentem perfil funcional íntegro, surgem finos pseudópodes partindo da superfície plaquetária, que com isso toma aspecto irregular, os pseudópodes vão formando um

entrelaçado entre as plaquetas vizinhas, aproximando-as e formando o início do tampão plaquetário (Chamonde *et al*, 1984).

Durante esta formação, os pseudópodes vão liberando pelas extremidades, pequenas “bolhas” lipídicas (chamada poeira plaquetária), que apresentam sítios de receptores para vários dos fatores de coagulação (Fatores V, X e protrombina). Muitas destas partículas aderem à superfície plaquetária tornando-as pró-coagulantes. Aparentemente, a adesão das partículas lipídicas coincide com a liberação dos mensageiros hormonais como ADP e serotonina, que estão envolvidos com o recrutamento de novas plaquetas para o tampão plaquetário em formação na região da injúria ao vaso sanguíneo. Com os agonistas ADP e serotonina as plaquetas apresentam uma primeira onda de agregação, imediatamente seguida de uma segunda onda quando liberam suas próprias reservas endógenas de ADP e tromboxane A₂ no plasma circundante. Este fenômeno é referido como reação bifásica da agregação (Colman, 1994).

Estudos têm esclarecido a inter-relação entre as plaquetas e o fibrinogênio plasmático. O complexo da glicoproteína IIb-IIIa é um receptor específico para o fibrinogênio, e o acoplamento do fibrinogênio a estes sítios, só disponíveis após a ativação plaquetária, está relacionado à ligação entre as plaquetas ativadas, e pode ser reconhecido na agregação (Colman, 1994).

Um grande número de fármacos pode induzir alterações na função plaquetária, produzindo interferências em vários dos passos que resultam na agregação irreversível das plaquetas, com variadas manifestações clínicas. Basicamente, os agentes antiplaquetários são usados como preventivos em pacientes em risco de formação de tampões plaquetários, origem provável dos trombos arteriais (Lancet , 1996; Fitzgerald, 1996).

A agregação plaquetária é regulada pela produção de prostaciclina pelo endotélio, e tromboxane A₂ pelas plaquetas (Lancet , 1996).

O equilíbrio dinâmico entre a síntese da prostaciclina e do tromboxane A₂ pode ser alterado basicamente por três caminhos: inibição da via do ácido araquidônico, alteração da ação da fosfodiesterase ou interferência nos sítios receptores das membranas das plaquetas. As principais drogas com ação antiplaquetária agem pelos dois caminhos iniciais (Mueller *et al*, 1997).

O controle da atividade plaquetária pode ser feito usando-se os recursos de um agregômetro, em amostras colhidas sob condições específicas, que são descritas abaixo (Melanie & Jennings, 1999):

1. A coleta deve ser conduzida com materiais plásticos ou siliconizados, já que as plaquetas reagem ao contato com o vidro ou outras superfícies molháveis. É essencial que a amostra não esteja hemolizada, os eritrócitos contêm o agonista adenosina em seu interior.
2. Deve ser preferida a coleta em pacientes em jejum, a lipemia pode atrapalhar a leitura óptica do aparelho, comprometendo a precisão do resultado.
3. O anticoagulante de escolha é o citrato de sódio, a disponibilidade de cálcio iônico é imprescindível para que o fenômeno de agregação se processe normalmente.
4. A presença de fibrinogênio plasmático também é requerida para a agregação.
5. Os estudos de agregação devem ser conduzidos em simulação do ambiente fisiológico, com um pH de 7,4 aproximadamente (as cubetas de ensaio devem ser tampadas para prevenir a perda de CO₂) e com controle de temperatura no decorrer do ensaio.
6. As amostras devem ser mantidas em temperatura ambiente durante o processamento, e aquecidas no momento do início do teste. O resfriamento da amostra compromete a ação plaquetária como um todo.
7. Não devem ser empregadas amostras com mais de três horas de coleta. A função plaquetária pode já estar alterada depois desse período.
8. A presença de trombocitopenia dificulta a realização dos ensaios de agregação plaquetária.
9. Os agentes agonistas empregados nos ensaios devem ser preparados e conservados com todo o rigor possível.
10. Testes de amostras com valor conhecido ou “pool” de pacientes normais devem ser empregados como controle.

1.2 LECTINAS

O estudo das lectinas foi iniciado por *Stillmark* em 1888 ao descrever o fenômeno de hemaglutinação com extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis*). A proteína responsável pela aglutinação dos eritrócitos foi denominada Ricina. Mais tarde *Hellin* descobriu que o extrato tóxico de sementes de *Abrus precatorius* também produzia aglutinação de eritrócitos, a proteína responsável foi chamada Abrina (Diaz & Gonzalez, 1999).

A primeira lectina que se obteve na forma cristalina foi a Con A extraída do feijão *Canavalia ensiformis* em 1919 por *James B. Sumner*. No final da década de 40 *William C. Boyd* e *Rose M. Reguera* reportaram que certas sementes continham aglutininas específicas para antígenos dos grupos sanguíneos humanos (Sharon & Lis, 1972). *Boyd* e *Shapleigh* (1954) introduziram o termo lectina para definir estas proteínas.

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem pelos menos um sítio de ligação a carboidratos ou derivados (aminoaçúcares, alquilaçúcares, desoxiaçúcares, etc.), sem apresentar função catalítica nem características estruturais imunológicas e que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (Peumans & Van Damme, 1995; Ghosh *et al.*, 1999). Nesta definição, as lectinas podem ser classificadas quanto à natureza e atividade dos seus sítios ligantes em três subgrupos: **merolectinas** apresentam apenas um grupo ligante para carboidrato, **hololectinas** apresentam dois ou mais grupos ligantes homólogos para carboidratos ou derivados, **quimerolectinas** possuem grupos ligantes distintos com especificidade para diferentes moléculas de carboidrato (Peel & Bulmer, 1996; Grubhoffer *et al.*, 1997).

A especificidade sacarídea de uma lectina pode ser definida através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, fazendo uso de monossacarídeos simples ou carboidratos complexos, determinando-se aquele que mais efetivamente inibe sua aglutinação por eritrócitos (Kennedy *et al.*, 1995).

As lectinas de diferentes fontes, para serem purificadas, em geral requerem, inicialmente, a preparação de extratos em soluções aquosas salinas. Alguns extratos com atividade lectínica são submetidos à purificação parcial por diversos métodos, tais como: diálise exaustiva e/ou fracionamento salino, em especial, com sulfato de amônio (Sage &

Green, 1972; Strosberg *et al.*, 1986; Coelho & Silva, 2000) ou utilizando o sistema de micelas invertidas (Nascimento *et al.*, 2002). As lectinas em sua maioria são purificadas por cromatografia de afinidade, técnica que se baseia na atividade das mesmas em se ligarem específica e reversivelmente a carboidratos (Lis & Sharon, 1972; Kennedy *et al.*, 1995; Naeem *et al.*, 2001; Gelach *et al.*, 2002).

Mesmo após um século de pesquisas bioquímicas, fisiológicas e moleculares com lectinas, proteínas amplamente distribuídas na natureza, as funções deste grupo particular de moléculas são ainda pouco conhecidas. Atuam como fator antinutricional, de proteção contra pragas, fixador de bactérias, como fator envolvido na diferenciação de parasitas em células de hospedeiros (Strosberg *et al.*, 1986). A propriedade das lectinas de se ligarem a carboidratos específicos pode ser considerada como fator determinante das diferentes funções propostas (Peumans & Van Damme, 1995).

Devido à sua inerente especificidade biológica para carboidratos lectinas têm uma grande aplicação na pesquisa médica e bioquímica. Dentro dos estudos de membranas, se tem reportado na literatura o uso de lectinas para avaliar mudanças estruturais nos glicoconjugados presentes nas superfícies celulares e desta forma, detectar mudanças morfológicas ocorridas, para analisar a distribuição sub-celular de epítomos e terminações glicoproteicas, bem como alterações na expressão de moléculas presentes na superfície celular (Peel & Bulmer, 1996; Franceschini *et al.*, 1996; Kulikov & Muzya, 1998, Aguilera *et al.*, 2001; Chaco & Appukuttan, 2001; Chava *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2002; Yamagata *et al.*, 2003).

Outra área importante na qual se empregam as lectinas é a detecção de transformações malignas em células, através da aglutinação preferencial que mostram as lectinas com células transformadas. Além do mais se tem realizado investigações para utilizar lectinas e polímeros sintéticos unidos como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, pois tem sido observado que diminuem o crescimento das células tumorais. Utiliza-se também para imunização contra vírus produtores de imunodeficiência e alguns tumores, assim como medicamento para prevenir metástases (Hansen, 1993; Diaz & González, 2002). As propriedades citotóxicas de algumas lectinas como a Ricina e a Abrina despertam interesses como potenciais armas terapêuticas no tratamento do câncer (Tanda *et al.*, 1996; Kulikov & Muzya, 1998; Karasaki *et al.*, 2001; Ohba *et al.*, 2002).

As lectinas se empregam igualmente na caracterização de grupos sanguíneos humanos, assim como na aglutinação e agregação plaquetária. Algumas lectinas são específicas em suas reações com os grupos sanguíneos ABO, MN, A₁ e A₂ de humanos (Sharon & Lis, 1972). A maioria das lectinas aglutina eritrócitos de todos os grupos sanguíneos e atua em concentrações similares, sendo consideradas lectinas não específicas (não significa que não tenham especificidade aos açúcares); algumas lectinas específicas já foram identificadas (Diaz & Gonzalez, 1999).

As lectinas vegetais são um grupo muito heterogêneo de proteínas que se agrupam em função de sua capacidade para reconhecer especificamente e unir-se a carboidratos. As lectinas de leguminosas se localizam principalmente nas sementes, ainda que se tenham descrito nos diferentes tecidos vegetativos (Peumans & Van Dame, 1995).

Na semente, as lectinas têm função como proteínas de reserva e de defesa. As funções específicas das lectinas vegetais não estão claras, poderiam estar envolvidas nas interações simbióticas entre plantas e microorganismos, ou estar relacionadas com o metabolismo de carboidratos, empacotamento das proteínas de reserva, a defesa da planta ou o “stress” fisiológico (Kocourek, 1986).

As lectinas, particularmente aquelas de sementes de leguminosas, constituem um grupo de proteínas homólogas (40-50 % de identidade na seqüência primária), que se ligam seletivamente com resíduos de carboidratos, em solução ou na superfície de células. Dessa interação decorrem inúmeros efeitos biológicos, tais como o conhecimento de certos tipos celulares, resultando em aglutinação e/ou ativação-inativação das células e macromoléculas, efeitos no sistema imune, na inflamação e ação tóxica sobre diversos organismos, inclusive insetos (Diaz & González, 2002).

Importantes características de diversas lectinas são apresentadas na tabela 3, destacando sua origem vegetal, lectina característica e especificidade a carboidrato.

1.3 LECTINAS versus PLAQUETAS

As duas principais reações plaquetárias, adesão e agregação são mediadas principalmente por proteínas de membrana que funcionam na superfície plaquetária como receptores para compostos biologicamente ativos de alto e baixo peso molecular

Tabela 3 - Importantes Propriedades de Lectinas

Origem (espécie de planta)	Lectina (Nome)	Peso Molecular	Número de Sub- unidades	Glicoproteína	Especificidade
<i>Arachis hypogaea</i> (amendoim)	Aglutinina de amendoim (PNA)	110.000	4	-	β -D-galactose
<i>Canavalia ensiformis</i> (feijão)	Concanavalina A (Con A)	102.000	4	-	α -D-glicose α -D-manose
<i>Dolichus biflorus</i>	<i>Dolichus biflorus</i> -aglutinina (DBA)	111.000	2+2	+	N-acetil- α -D-galactosamina N-acetil- α -D-galactosamina β -D-galactose
<i>Glycine max</i> (soja)	Aglutinina de soja (SBA)	110.000	4	+	α -D-glicose α -D-manose
<i>Lens culinaris</i> (lentilha)	<i>Lens culinaris</i> -aglutinina	48.000	2	+	N-acetil- α -D-galactosamina
<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão comum)	<i>Phaseolus</i> – aglutinina I (PHA-I)	118.000	4	+	α -D-glicose α -D-manose
<i>Pisum sativum</i> (ervilha)	Lectina de ervilha – I (PSA)	49.000	2+2	+	β -D-galactose, N-acetil- α -D-galactosamina
<i>Ricinus communis</i> (arroz)	Aglutinina de arroz (RCA-120) (RCA-60)	120.000 60.000	2+2 1+1	++	(N-acetil- β -(1,4)-D-glicosamina) _{>2} Quitina, Quitotriose
<i>Triticum vulgare</i> (trigo)	Aglutinina de germe de trigo (WGA)	34.000	2		

(Segundo J.C. BROWN e R.C. HUNT, 1978)

(Clemetson, 1985, Mazurov & Vasiliev, 1994). Todos esses receptores podem ser considerados como glicoproteínas (GP) desde que todos eles são mais ou menos glicosilados. Lectinas podem interagir especificamente com diferentes componentes carboidratos de GP, sendo usadas para isolamento e análise estrutural das proteínas de membrana. Várias características importantes da cadeia de carboidrato dessas GP foram

reveladas usando diferentes lectinas, incluindo WGA, Con A, entre outras. (Lakhtin, 1995, Kocourec & Freed, 1990).

Uma das maiores proteínas da membrana plaquetária, GPIb – o receptor do vWF e um dos receptores de trombina - é a proteína mais glicosilada da superfície plaquetária. A cadeia de carboidrato dessa proteína representa aproximadamente 50% do seu peso molecular (Lakhtin, 1995, Kocourec & Freed, 1990).

Estudos dos efeitos de lectinas sobre funções plaquetárias têm mostrado que algumas delas são hábeis para estimular agregação e secreção de grânulos internos de plaquetas (Torti *et al.*, 1995). Interação de lectinas com a superfície plaquetária poderia também induzir a ativação de um sistema de segundo mensageiro, incluindo diferentes proteínas tirosinoquinases e subsequente fosforilação de algumas proteínas plaquetárias intracelulares (Yatomi, 1995). Tais propriedades das lectinas podem também ser usadas não somente para a análise da estrutura de carboidrato das GP plaquetárias, mas também no estudo do envolvimento dessas moléculas no processo de ativação plaquetária (Smirnova & Khaspekova, 1998).

Baseado em evidências indiretas tem sido sugerido que a adesão de plaquetas ao colágeno pode ser mediada por resíduos de galactose presentes no colágeno e uma glicosiltransferase específica presente na superfície plaquetária. Uma evidência adicional desta hipótese foi à inibição da adesão pelo uso de lectinas específicas para galactose, bloqueando o sítio receptor no colágeno (Patscheke *et al.*, 1977; Samal *et al.*, 1998; Cawthern *et al.*, 2001).

Várias lectinas têm sido examinadas quanto aos seus efeitos na indução de agregação plaquetária, reações de liberação (secreção) e aglutinação de membrana, e por seu efeito inibitório na iniciação destes fenômenos pelo colágeno, ADP e trombina (Ralph & Lawrence, 1982; Sminorva & Khaspekova, 1998; Karpatkin & Karpatkin, 1974).

2. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Cratylia mollis Mart., Feijão camaratuba ou camaratu é uma leguminosa da Região Semi-Árida do Estado de Pernambuco . Lectinas de sementes de *C. mollis* (Cra) têm sido investigada no Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica, do Centro

de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Quatro formas moleculares, isolectinas e isoformas (Iso) já foram detectadas em sementes de *C. mollis* e apresentam diferentes atividades monossacarídicas; denominadas Cra Iso 1, Cra Iso 2, Cra Iso 3 e Cra Iso 4. Cra Iso 1, 2 e 3 já foram reconhecidas como isolectinas.

A função das plaquetas nos processos de aterogênese e trombogênese é do interesse de todos os especialistas relacionados com o diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades aterotrombóticas. O conhecimento acerca das características estruturais e funcionais das plaquetas permitiria uma melhor compreensão dos fenômenos de trombogênese e do mecanismo de ação de um fármaco antiagregante plaquetário tão antigo quanto à aspirina, assim como o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antiagregante plaquetária (Tisdale, 1998).

A partir da análise global da composição das plaquetas e os elementos que regem seu funcionamento fica claro que se trata de uma célula complexa e sujeita a uma grande diversidade de fatores. É evidente a importância de inibir a ativação plaquetária para prevenir a trombose arterial, assim como o significado prático que poderiam ter os estudos de função plaquetária para o diagnóstico de estados pré-trombóticos, o qual é reforçado pelo aumento da reatividade plaquetária que ocorre nas horas do dia em que são mais frequentes o infarto do miocárdio e a morte súbita cardíaca (Tofler GH *et al*, 1987).

Lectinas ligam-se especificamente a carboidratos em superfícies celulares e causam aglutinação de eritrócitos e uma variedade de transformações celulares. Por causa dessas propriedades as lectinas têm sido usadas para explorar a estrutura de membranas em plaquetas e outras células (Greenberg & Jamieson, 1974; Davies & Palek, 1982; Ralph & Lawrence, 1982).

As isolectinas de *C. mollis* têm sido estudadas para avaliar seus diversos potenciais biotecnológicos, para análise estrutural e para as mais diversas aplicações. Assim sendo, a busca de inibidores de agregação plaquetária é de grande interesse para uso biotecnológico, sendo as lectinas excelentes ferramentas no estudo deste processo.

3. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito das formas moleculares da lectina de *Cratylia mollis* no processo de agregação plaquetária humana.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito ativador das formas moleculares da lectina de *C. mollis* no processo de agregação plaquetária.
- Avaliar o efeito inibidor das formas moleculares da lectina de *C. mollis* na agregação plaquetária por indução com epinefrina.
- Avaliar o efeito da adição dos carboidratos específicos às lectinas sobre o processo de agregação plaquetária.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, A., GONZÁLEZ-GIL, S. Lectin Analysis of Surface Saccharides During the Cell Cycle in Four Dinoflagellate **Species**. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 256, p. 149-166, 2001.

BACHELOT, C., SAFFROY, R., GANDRILLE, S., AIACH, M., RENDU, F. Role of FcyRIIA gene polymorphism in human platelet activation by monoclonal antibodies. **Thromb. Haemost.**, v. 74, p. 1557-1563, 1995.

BARROW, D.A, Platelet Agregation Testing. **Clinical Hemostasis Review**. Denver, v6 – Nbr 3. P.1-4. 1992.

BICK, R.L., MURANO, G. Physiology of Haemostasis. In Bick RL (De). **Hematology. Clinical and laboratory practice**. Mosby, StLouis 1995;1285-1308.

CAPRIE STEERING COMMITTEE. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). **Lancet**, v. 348, p. 1329-1339, 1996.

CAWThERN, K. M., DILORENZO, M. E, LOCK, J. B. Antiplatelet Agents in Tissue Factor-Induced Blood Coagulation. **Blood**, v. 97, nº 8, p. 2314-2323, 2001.

CHACKO, B., APPUKUTTAN, P. S. Peanut (*Arachis hypogaea*) Lectin Recognizes α -Linked Galactose, but not N-Acetyl Lactosamine in N-linked Oligosaccharide Terminals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, p. 365-371, 2001.

CHAMONE, D.A .F, FUJIMURA, A .Y.H, BELLOTI, G, Mecanismos de agregação plaquetária. Ver. **Bras. Med.** – Rio de Janeiro, v3: 20-26, 1984.

CHAVA, A. K., CHATTERJEE, M., SUNDAR, S., MANDAL, C. Development of an Assay for Quantification of Linkage-Specific O-Acetylated Sialoglycans on Erythrocytes; its Application in Indian Visceral Leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 9172, p. 1-10, 2002.

CLEMETSON, K. J. Platelet Membrane Glycoproteins. **Clin. Haematol.**, London, 1985.

COELHO, L. C. B. B., SILVA, M. B. R.. Simple method to purify miligram quantities of the galactose – specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical analysis**. v. 11, p. 1-6, 2000.

COLMAN, R.W., HIRSH, J., SALZMAN, E.W. “**Hemostasia and Thrombosis: Basic and Clinical Practice**” 3rd ed. Lippincott 1994, Philadelphia.

DAVIES, G. E., PALEK, J. Platelet Protein Organization: Analysis by Treatment with Membrane-Permeable Cross-Linking Reagents. **Blood**, v. 59, n° 3, p. 502-513, 1982.

DÍAZ, P. H., GONZÁLEZ, O. M. Aplicaciones de Las Lectinas. **Revista Cubana de Hematología Inmunología Hemoterapia**, v.15, p. 91-95, 1999.

D’SOUZA, S. E., HAAS, T. A., PIOTROVICZ, R. S., BYERS-WARD, V., MCGRATH, D. E., SOULE, H.R., CIERNIEWSKI, C. Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the β_3 integrin: cation displacement is involved in ligand binding. **Cell**, v. 70, p. 659-667, 1997.

EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa in high-risk coronary angioplasty. **New England Journal of Medicine**, v. 330, p. 956-961, 1994.

FIJNHEER, R., FRIJNS, C. J. M., KORTEWEG, J., ROMMES, H., PETERS, J. H., and Sixma J.J. The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. **Thromb. Haemost.**, v. 77, p.1081-1085, 1998.

FINKLE C. D., S. T. PIERRE, WINOCOUR, P. D. BCH-2763, a novel potent thrombin inhibitor, is an effective antithrombotic agent in rodent models of arterial and venous

thrombosis – comparisons with heparin, r-hirudin, hirulog, inogatran, and argatroban. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 431-438, 1998.

FITZGERALD, G. A. The human pharmacology of thrombin inhibition. **Coronary Artery Disease**, v. 7, p. 911-918, 1996.

FRANCESCHINI, V, LAZZARI, M, CIANI, F. Identification of surface glycoconjugates in the olfactory system of turtle. **Brain Res** 1996; 725(1): 81-87.

GACHET, C., CATTANEO, M., OHLMANN, CAZENAVE, J.P. Purinoreceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. **Br. J. Haematol.**, v. 91, p. 434-444, 1997.

GACHET, C., HECHLER, B., LEON, C., CAZENAVE, J. P.. Activation of ADP receptors and platelet function. **Thromb. Haematol.**, v. 78, p. 271-275, 1997.

GANGULY, P., FOSSETT, N. G. Inhibition of Thrombin-Induced Platelet Aggregation by a Derivative of Wheat Germ Agglutinin. Evidence for a Physiologic Receptor of Thrombin in Human Platelets. **Blood**, v. 57, nº 2, p. 343-352, 1981.

GANGULY, P., GOULD, N. L., SIDHU, P. Interaction of Lectins with Human Platelets? Effects on Platelets Stimulation by Thrombin and Ristocetin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 586, p. 574-586, 1979.

GEORGE, J. N., PICKETT, E. B., SUCERMAN, S. Studies on Resting and Activated Platelets and Platelet Membrane Microparticles in Normal Subjects, and Observations in Patients during Adult Respiratory Distress Syndrome and cardiac Surgery. **Journal of Clinical Investigation** v. 78, p. 340-348, 1986.

GRESEL, P., CATALANO, M., DAVI, G. Platelet activation markers in patients with peripheral arterial disease: a prospective comparison of different platelet function tests. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1337-1434, 1997.

GULINO, D., BOUDIGNOM, C., ZHANG, L., MARGUERIE, G. Ca²⁺ binding properties of the platelet glycoprotein Iib ligand-interaction domain. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 1001-1007, 1992.

GERLACH, D., WAGNER, M., SCHHLOTT, B., ZÄHRINGER, U., SCHMIDT, K.-H. Chemical and Physicochemical Characterization of the Sialic Acid-Specific Lectin from *Cepaea hortensis*. **FEMS microbiology letters**, v. 10579, p. 61-68, 2002.

GHOSH S., MANJUMDER M., MANJUMDER S., GANGULY N., CHATTERJEE B.P. Saracin: A lectin from *Saraca indica* seeds integument induces apoptosis in human t-lymphocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, u. 371, n 2, Nov. 15, p. 163-68, 1999.

GOLDMAN, R., SHARON, N., LOTAN, R. Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion. **Exp. Cell Research**, v. 99, p.408-422, 1996.

GOLDSTEINS, J. (ed.). The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. **New York: Academic press**. 1986, cap. 3, p. 251-263.

GREENBERG, J. H., JAMIESON, G. A. The Effects of Various Lectins on Platelet Aggregation and Release. **Biochimica et Biophysica Acta**, 345: 231-234, 1984.

GRUBHOFFER, L., HYPISA, V., VOLFF, P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. **Parasitology**, v. 4, p. 203-16, 1997.

HARRISON, P., CRAMER, E.M. Platelet α -granules. **Blood Rev.**, v. 7, p. 52-62, 1993.

HEATH-MONDORO, T., WALL, D. C., JENNINGS, L. K.. Selective induction of a glycoprotein IIIa ligand-induced binding site by fibrinogen site by fibrinogen and von Willebrand factor. **Blood.** , v. 88, p. 3824-3830, 1996.

DIAZ, H., MARTIN, P., ODALYS, G.. 2002. Laboratorios BETERA. Aplicaciones de las Lectina.

Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. The PURSUIT Trial Investigators. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 339, p. 436-443, 1998.

JAMIELSON, G. A, URBAN, C. L., GREENAWAY, P. J. Changes in the distribution of platelet membrane glycoproteins in patients with myeloproliferative disorders. **Nature New Biology**, v 234, p. 5-7. 1997.

JENNINGS L. K., WHITE M. M. Expression of LIBSs (Ligand Induced Binding sites) on GPIIb-IIIa complexes and the effect of various inhibitors. **Am. Heart J.**, v. 135, p. 5179-5183, 1998.

JENNINGS L. K., WHITE M.M., MANDRELL T. D. Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIb-IIIa functional activity. **Thromb. Haemost.**, v. 74, p. 1551-1556, 1995.

JENSEN, R., E. N. S. GORDONE. Antiplatelet Therapy. **Clin. Hemostasis Review**. Denver , v6 – Nbr 3. p1-4. 1992.

KARASAKI, Y., TSUKAMOTO, K., SUGIURA, T., GOTOH, S. A Garlic exerted an Antitumor Activity and Induced Apoptosis in Human Tumor Cells. **Food Research International**, v. 34, p. 7-13, 2001.

KARPATKIN, S., KARPATKIN, M. Inhibition of the Enzymatic Activity of Thrombin by Concanavalin A. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 57, nº 4, p. 1111-1118, 1974.

KOCOUREC, J., FREED, D. Lectins: Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Vol. 7, **Sigma** Chemical Co., St. Louis, p.462, 1990.

KOCOUREC, J. In The lectins, Properties, Function and Applications in Biology and Medicine. Ed by LIENER.E.I., SHARON.N AND GOLSTEIN.I.J. **Academic Press**, Inc. Orlando, Florida 1986, pp. 23- 26.

KULIKOV, V. I., MUZYA, G. I. The Bioregulatory Role of Platelet-Activating Factor in Intracellular Processes and Cell-Cell Interactions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 63, nº 1, p. 57-66, 1998.

LAKHTIN, V.M. **Biochemistry (Moscow)**, **60**, 197-217, 1995.

LAW, D.A., NANNIZZI-ALAIMO, L., PHILLIPS, D.R. Outside in integrin signal transduction. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p.10811-10815, 1996.

MAZUROV, A.V., VASILIEV, S.A. **Gematol. Transfuziol.**, **39**, Nº 1, 29-39, 1994.

MELANIE M. W, JENNINGS L. K. Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures. **Academy Press**, 1999.cap 2, p 28-66.

MUELLER, M. R., SALAT, A., WOLNER, E. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in-patient submitted to peripheral arterial angioplasty. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1003-1007, 1997.

NAEEM, A., KHAN, R. H., VIKRAN, H., AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* Root Lectin and its Interaction with Rhizobial Lipopolysaccharide as Studied by Different Spectroscopic Techniques. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 396, p. 99-105, 2001.

OHBA, H., BAKALOVA, R., MORIWAKI, S., NAKAMURA, O. Fractionation of Normal and Leukemic T-Cells by Lectin-Affinity Column Chromatography. **Cancer Letters**, v. 184, p. 207-214, 2002.

OHLMANN, P., LAUGWITZ, K.L., SPICHER, K., GACHET, C. The human platelet ADP receptor activates G_i2 proteins. **Biochem. J.**, v. 312, p. 775-779, 1995.

PATSCHEKE, H., BROSSMER, R., WORNER, P. D-Galactose-Binding Lectins Induce a Differential Response of Blood Platelets. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 75, Nº 1, p. 200-206, 1977.

PEEL, S., BULMER, J. C. Lectins histochemistry of pregnant rat uterine tissues. **Journal Anatomy** 1996; 188(Pt 1): 197-205.

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

PHILLIPS, D. R., TENG, W. S., SCARBOROUGH, R. M. Effect of Ca^{++} on Integrilin™ GPIIb-IIIa interactions: enhanced GPIIb-IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate. **Circulation**, v. 96, p. 1488-1494, 1997.

RALPH, L. N., LAWRENCE, L. K. L. Complex Formation of Platelet Membrane Glycoproteins IIb and IIIa with Fibrinogen. **Journal of Clinical Investigation**, v. 69, p. 263-269, 1982.

SAGE, H., GREEN, R. W.. Common lentil (*Lens culinaris*) phytohemagglutinin. **Methods in Enzymology**, u. 28, p. 332-39, 1972.

SAMAL, A. B., TIMOSHENKO, A. V., LOIKO, E. N., KALTNER, H. Formation of Lactose-Resistant Aggregates of Human Platelets Induced by the Mistletoe Lectin and Differential Signaling Responses to Cell Contact Formation by the Lectin or Thrombin. **Biochemistry (Moscow)**, v. 63, p. 516-522, 1998.

SHARON N., LIS H. Lectins cell agglutinating and sugar-specific proteins. **Science** 1972; 177:949-958.

SMIRNOVA, I. V., KHASPEKOVA, S. G. Interaction of Wheat Germ Agglutinin and Concanavalin A with Platelets. Stimulation of Platelet Functional Reactions and Binding with Membrane Glycoproteins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 63, n° 6, p. 710-718, 1998.

SLUPSKY J. R., CAWLEY J. C., KAPLAN C., ZUZEL M. Analysis of CD9, CD32, and p67 signalling: use of degranulated platelets indicates direct involvement of CD9 and p67 in integrin activation. **Br. J. Haematol.**, v. 96, p. 275-286, 1997.

STROSBERG, A. D., BUFFARD, D., LAUWEREYS, M., FORJES, A.. Legume lectins: a large family of homologus. In: LIENER, I. E., SHARON, N.,

TANDA, N., MORI, S., NOSE, M., SAITO, T, SONG, S. T., SATO, A. Expression of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin-binding oligosacharides in oral squamous cell carcinoma: possible association whit the metastic potential. **Pathology Journal** 1996; 46(9): 639-45.

TISDALE J, E. Antiplatelet therapy in coronary artery disease: Review and update of efficacy studies. **Am J Health Syst Pharm** 1998; 55 (Supl 1): S8-16.

TOPOL E. J., CALIFF R. M., WEISMAN H. F., ELLIS S. G., TCHENG J. E., WORLEY S. *et al.*, On behalf of Epic Investigators. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet Iib/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis, results at six months. **Lancet**, v. 343, p. 881-886, 1994.

TPRTI, M., RAMACHI, G., MONSTSARRAT, N. SINIGAGLI, F., MAUCO, G. **J. Biol. Chem.** v. 270, 13179-13185, 1995.

UMEMURA, K., KONDO, K., NAKASHIMA, M. Enhancement by ticlopidina of the inhibitory on in vitro platelet aggregation of the glycoprotein Iib-IIIa inhibitor tirofiban. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 1381-1384, 1997.

VERMYLEN, J., BADENHORST, P. N., DECKMIN, H., ARNOULT, J. Normal mechanisms of platelet function. **Clin. Haematol.**, London, v12, p.107-154, 1983.

VOSTAL, J. G., MONDORO T., H. Liquid cold storage of platelets: a revitalized possible alternative for limiting bacterial contamination of platelet products. **Transf. Med. Rev.**, v. 1, p. 286-295, 1997.

WARKENTIN, T. E., BENG, H. C., GREINACHER, A. Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 1-7, 1998.

WEI, Q., LU, Q.-M., JIN, Y., LI, R., WEI, J.-F., WANG, W.-Y., XIONG, Y.-X. Purification and Cloning of a Novel C-Type Lectin-Like Protein with Platelet Aggregation Activity from *Trimeresurus mucrosquamatus* Venom. **Toxicon**, v. 40, p. 1331-1338, 2002.

WU, Y. P., VAN BREUGEL, H. H., SIXMA, J. J. Platelet adhesion to multimeric and dimeric von Willebrand factor and to collagen type IIIpreincubated with von Willebrand factor. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 16, p.611-620,1996.

YAMAGATA, Y., SHIMIZU, K., NAKAMURA, K., HENMI, F., SATOMURA, S., MATSUURA, S., TANAKA, M. Simultaneous Determination of Percentage of *Lens culinaris* Agglutinin-Reactive α -Fetoprotein and α -Fetoprotein Concentration Using the LiBASys Clinical Auto-Analyzer. **Clinica Chimica Acta**, v. 327, p. 59-67, 2003.

YATOMI, Y., OZAKI, Y., KOIKE, Y., SATON, K., and KUME, S. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.191, 453-458, 1995.

5. ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PLANTA MEDICA

**EVALUATION OF PLATELET AGGREGATION AND
ANTIAGGREGATION ACTIVITY OF MOLECULAR FORMS FROM
Cratylia mollis SEED LECTIN**

**EVALUATION OF PLATELET AGGREGATION AND ANTIAGGREGATION
ACTIVITY OF MOLECULAR FORMS FROM *Cratylia mollis* SEED LECTIN**

Rezende-Neto, J.M., Araujo, F.F.B., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B. & Correia, M.T.S.*

Departamento de Bioquímica, CBB/UFPE, Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária,
Recife-PE, 50670-420, Brasil.

ABSTRACT

Cratylia mollis seed lectin (Cra) contains molecular forms (Cra Iso) which have previously been highly purified. The effects on platelet aggregation induction and inhibition of Cra Iso1,4 (preparation containing Cra Iso 1 and Cra Iso 4), Cra Iso 1 and Cra Iso 3 were analysed and compared with wheat germ agglutinin (WGA) and concanavalin A (Con A), two lectins that induce platelet aggregation. The lectins were assayed with three different concentrations (25, 50 and 100 µg/ml). The best results were obtained with 100 µg/ml to all lectins; Cra Iso 1 showed the highest aggregation ($16.05 \pm 1,09$) similar to Con A (20.34 ± 4.05). Inhibition of aggregation using epinephrine as agonist and the lectin concentration that did not induce aggregation (aggregation percentual smaller than 10 %) were negative. When the specific lectin carbohydrate inhibitors mannose and methyl- α -D-mannoside (Cra Iso1,4 and Cra Iso 1) or galactose (Cra Iso 3) were used none aggregation induction was observed. The results showed that Cra Iso1,4 and Cra Iso 1 induced platelet aggregation through respective carbohydrate binding sites.

Key-words: *Cratylia mollis* lectin, platelets, platelet aggregation, inhibition of platelet aggregation.

INTRODUCTION

Lectins recognize specifically carbohydrates on cell surfaces, these proteins or glycoproteins promote erythrocyte agglutination and a variety of cell transformations. Due to these properties lectins have been studied in order to investigate membrane structure of platelets within other cells [1]. Lectins have been purified, mainly, of mature legume seeds, either as single or multiple molecular forms, known as isolectins or isoforms [2], [3], [4]; isolectins and lectin isoforms may present distinct behavior when used in biological experiments [5].

Evidences showed that cross binding and receptor redistribution are pre-requisites for various lectin effects in cells. However, it has been suggested that one of the reasons for the different lectin cell reactions is the localization of their receptors, specifically carbohydrates, localized on glycoprotein membrane chains [6].

Studies of lectin effects on platelet functions have shown that some of them are able to stimulate platelet aggregation and agglutination [7] or to evaluate serotonin secretion [8]. Such lectin properties may be used not only to analyze the carbohydrate structures of platelet glycoproteins, but also to study how these molecules are involved in the process of activating the platelets [9]; *Canavalia ensiformis* lectin (Concanavalina A, Con A) showed to be able to react with glycoproteins (GP) Ib and IIIa [10] as well as to isolate GP III [11], [12] while *Lens culinaris* lectin was able to purify GP IIb-IIIa [13].

Cratylia mollis Mart (camaratu bean) is a leguminous, native from the Semi-Arid Region of Northeastern Brazil, used as forage. Isolectins and isoforms (Iso) of *C. mollis* lectin (Cra) were obtained from a saline extract; Cra Iso 1 (quantitatively the main isolectin), Cra Iso 2 and Cra Iso 3 isolectins as well as an isoform of Cra Iso 1, nominated

Cra Iso 4 [3], [14]. Cra Iso 1, Cra Iso 2 and Cra Iso 4 are specific for glucose/mannose; Cra Iso 3 is galactose specific. A preparation containing Cra Iso 1 and Cra Iso 4 (Cra Iso 1,4) presents a high hemagglutinating activity when compared with the pure isolectins and can be obtained in milligram quantities; 300 mg of Cra Iso 1,4 were obtained from 1 l of 10 % (w/v) *C. mollis* extract. Cra Iso 1 and Cra Iso 1,4 were used with success in different biological assays as well as in structural and electrochemical studies [15], [16], [17], [18], [19], [20], [21].

The aim of this work was to evaluate Cra Iso 1,4, Cra Iso 1 and Cra Iso 3 activity regarding the processes of platelet aggregation and antiaggregant action. The aggregant and antiaggregant platelet activity of samples was compared with the activity of wheat germ agglutinin (WGA) and Con A.

MATERIALS AND METHODS

The reagents were acquired from Sigma (USA), WGA and Con A from Pharmacia Chemical (Swedish) and epinephrine from the Hypofarma (Brazil).

Cra Iso 1,4, Cra Iso 1 and Cra Iso 3 were obtained following the previously established protocol [3], [14]; lectin concentrations were adjusted to 1 mg/ml.

Concentrated platelets were obtained from the Sergipe Hemocenter (HEMOSE), State of Sergipe, Northeast Brazil. Blood were collected from health human donor, with previous agreement in plastic bags and using 0.1 M sodium citrate.

PLATELET AGGREGATION

Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of a total blood sample at 150 x g for 15 min. Part of supernatant was extracted (PRP), then the rest of the sample was centrifuged (1,500 x g) to obtain platelet poor plasma (PPP).

Platelet concentration in PRP was corrected using the formula: number of platelets required / number of platelets obtained = volume (ml) of present PRP, to a final volume of 1 ml of PRP required. Volume was completed with PBS buffer, pH 7.4, to obtain between 250,000 and 300,000 platelets/mm³. Aggregation was measured by the Born and Cross turbidimetric method [22] using a single channel aggregometer (NetLab, São Paulo – Brazil). The instrument was adjusted for maximum transmittance with PPP. Cuvettes containing PRP (450 µl) were placed in the equipment, which already contained a magnetic bar, for pre-incubation (37 °C, 5 minutes) and posterior measurement of the changed light transmission after adding the corresponding agonist. All samples were confirmed with a previous test of platelet activity using epinephrine as the agonist.

Lectin solution was added to cuvette containing pre-incubated PRP; change light transmission was registered by equipment on the connected printer, for a period of 5 min, with a record of aggregation percentage obtained and represented on a graph (Figure 1). *C. mollis* samples were assayed in concentrations of 25, 50 and 100 µg/ml; WGA, Con A and epinephrine were used at concentrations of 20, 100 e 50 µg/ml, respectively. Each sample was 10 times assayed and the aggregation was always checked by visual observation.

PLATELET AGGREGATION IN CARBOHYDRATE PRESENCE

Specific carbohydrates were added to *C. mollis* lectins to a final carbohydrate concentration of 50 and 100 mM, using galactose (Cra Iso 3) and mannose or methyl- α -D-mannoside (Cra Iso 1 and Cra Iso 1,4) for final lectin concentration of 1.0 mg/ml.

PLATELET AGGREGATION INHIBITION USING AGONIST

C. mollis lectins assayed for their effect as aggregation inhibitors were incubated with PRP for 5 min before adding the aggregant agent. Lectin concentration for the inhibition study was the highest concentration that would not induce aggregation (aggregation percentage less than 10 %). After the earlier incubation with lectin, 50 μ g/ml of epinephrine were used as an agonist to evaluate the possible effect of aggregation inhibition.

STATISTICAL ANALYSIS

The results were subjected to a one-way analysis of variance and the significance between means determined by Tuckey's ($p > 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

C. mollis lectin samples presented discrete platelet aggregation activity in the different concentrations assayed with distinct percentages (Table 1). Cra Iso 1 showed the

highest result when compared with other lectins, with significant difference. None significant difference was observed to Cra Iso 1,4 and Cra Iso 3. Curves (Figure 2) obtained for the lectins did not present the lag phase (initial), that is produced by the change in the platelet shape before their aggregation, and is observed by the initial variation of the optical density (Figure 2A); also they did not present biphasic curves. These curves represent a second wave of aggregation following initial aggregation, induced by secretion of ADP and thromboxane A₂ endogene reserve of the platelets.

Platelets respond to certain lectins with aggregation and/or discharge of secretion organelles (reaction of secretion). There are some lectins that selectively induce aggregation and others which cause a strong secretion reaction without accompanied aggregation [23]. In this study, was demonstrated that the binding of *C. mollis* isolectins stimulated fresh human platelets, yet without triggering a second phase (wave) during the mechanism of aggregation (absence of biphasic curve).

The absence of a lag phase and of biphasic curve obtained from *C. mollis* lectin samples suggest that they act on the platelets without inducing a secretion reaction [23]. Absence of a second wave of aggregation could coincide with a first phase reversal, when the aggregates break up and PRP returns to its inactive optical condition [22].

The lectins assayed for ability to inhibit aggregation showed a discrete inhibition of aggregation activity triggered by epinephrine. The small aggregation activity inhibition triggered by epinephrine in the presence of *C. mollis* isolectins seem to indicate different activation mechanisms, as the activity of epinephrine which is based on activation of phospholipase C and depends on thromboxane A₂ formation [22]. As such, it is clear that the aggregation and secretion reaction are based on different induction mechanisms.

Aggregation activity was blocked when specific carbohydrates were added to lectin solutions: mannose and methyl- α -D-mannoside for Cra Iso 1,4 and Cra Iso 1 and galactose for Cra Iso 3; carbohydrates failed to trigger platelet aggregation in the assay (Table 2). The linear aspect of the aggregation curves obtained (figure 3) with only an initial dramatic change (not subsequently of transmittance), seems a reflection of transmittance difference in between PPP and PRP. The results not suggest, despite aggregation percentage values given by the equipment, the triggering existence of a response to action of the agonist in use (carbohydrates and a mixture of a specific carbohydrate with lectin). The statistical analysis of aggregation results obtained by the equipment do not represent significant differences.

The data of aggregation activity inhibition from lectin preparations coincide with what has been seen by other researchers [8]; reducing aggregant activity, a result of blocking lectin's binding sites with specific carbohydrates. Assuming that the residues of assayed carbohydrates are essential components to lectin's binding sites, the differentiated responses of the platelets suggest the additional importance of the lectins in indicating the cellular response. Inhibiting analysis of lectin dependent reactions showed that: 1. stimulation of platelet secretion and aggregation result from the interaction of lectins with the carbohydrate components of platelet membranes; 2. platelet aggregation depends on the activation of a second messenger system; and 3. platelet aggregation is mediated by the interaction of GP IIb-IIIa with fibrinogen.

The inhibition of Cra Iso 1,4, and Cra Iso 3 by their specific carbohydrates suggested that these isolectins act in different platelet membrane glycoproteins and could be used to analyze or purify them. Immobilized lectins in insoluble supports as affinity

matrix have been used to analyze and purify platelet glycoproteins. Con-A sepharose 4B column was efficient to isolate GP III, while GP IIa did not binding to the matrix [11], [12]. Chromatography in *Lens culinaris* provide a preparation rich in GP IIb-IIIa, containing small quantities of GP I [13].

Knibbs *et al.* [24] refereed that the elevated lectin affinities for cells can be due by factors just as: existence of non specific interactions with components of cellular surface from no carbohydrate nature; the presence, in lectin structure, of a binding site with oligosaccharide specificity and a cooperative effect resultant of the multivalent lectin nature.

Cra Iso 1, and Cra Iso 1,4, extracted from *C. mollis*, plant native from poor Region of Pernambuco State, are very stable (more than 10 years, 20 C) and can be used in clinical practice as a platelet aggregation activator, in contrast to epinephrine which has its activity reduced within a few minutes; the induction of aggregation takes place via its respective sites of carbohydrate binding. The inhibition of aggregation activity with agonist epinephrine was not effective, showing non-competitive modes of action.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Brazilian National for Scientific and Technological Development (CNPq). We thank Maria Barbosa Reis da Silva for her technical assistance.

REFERENCES

Greenberg, JH, Jamieson, GA. The effects of various lectins on platelet aggregation and release. *Biochimica et Biophysica Acta* 1984; 345: 231-234

Sharon, N, Lis, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. *FASEB Journal* 1990; 4: 198-208.

Paiva, PMG, Coelho, LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemical and Biotechnology* 1992; 36:113-118

Suseelan, KN, Bhatia, CR, MITRA, R. Characteristics of two major lectins from mungbean (*Vigna radiata*) seeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 1997; 50: 211-222

Konozy, EHE, Bernardes, ES, Rosa, C, Faca, V, Greene, LJ, Ward, RJ. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003; 410: 222-229

Davies, GE, Palek, J. Platelet protein organization: Analysis by treatment with membrane-permeable cross-linking reagents. *Blood* 1982; 59: 502-513

Samal, AB, Timoshenko, AV, Loiko, EN, Kaltner, J, Gabius, HJ. Formation of lactose-resistant aggregates of human platelets induced by the Mistletoe lectin and differential signaling responses to cell contact formation by the lectin or thrombin. *Biochemistry* 1998; 63: 516-522

Smirnova, IV, Khaspekova, SG. Interaction of wheat germ agglutinin and concanavalin A with platelets. stimulation of platelet functional reactions and binding with membrane glycoproteins. *Biochemistry (Moscow)* 1998; 63: 710-718

Ganguly, P, Gould, NL, Sidhu, P. Interaction of lectins with human platelets? Effects on platelets stimulation by thrombin and ristocetin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1979; 586: 574-586

Howard L, Shulman, S, Sadanandan, S, Karpatikin, S. Crossed immunoelectrophoresis of human platelet membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 257, n.14, p. 8331-8335, 1982.

Clemetson, KJ, Pfueller, SL, Luscher, EF, Jenkins, CSP. Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochimica Biophysica Acta* 1997;464: 493-508

Hagen, I, Bjerrum, OJ, Gogstad, G, Korsmo, R, Solum, NO. Involvement of divalent cations in the complex between the platelet glycoproteins IIb and IIIa. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982: 701: 1-6

Nachman RL, Leung, LLK. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. *Journal of Clinical Investigation* 1982: 263-269

Correia, MTS, Coelho, LCBB. Purification of a glucose mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1995: 55: 261-273

Tavares GA, Caracelli, I, Burger, R. Correia, MTS, Coelho, LCBB, Oliva, G. Crystallization and preliminary X-ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. *Acta Crystallographica* 1996: D52: 1046-7

Lima, VLM, Correia, MTS, Cechinel, YMN, Sampaio, CAM, Owen, JS, Coelho, LCBB. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers* 1997: 33, 27-32

Beltrão, EIC, Correia, MTS, Figueredo-Silva, J, Coelho, LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1998: 74: 125-34

Baszkin, A, Boissonnade, M, Santos-Magalhães, NS, Carvalho Júnior, LB, Correia, MTS, Coelho, LCBB. *Cratylia mollis* lectin at air-aqueous solution interface: adsorption and lectin interactions. *Colloids and Surfaces A* 2000: 17: 191-201

Souza, S, Correia, MTS, Pessoa, MMA, Kennedy, J, Lima Filho, JL, Coelho, Coelho, LCBB. A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. *Carbohydrate Polymers* 2001: 46: 191-193

Nascimento, CO, Coelho, LCBB, Correia, MTS, Cunha, MGC. Liquid-liquid extraction of lectin from *Cratylia mollis* seeds with reversed micelles. *Biotechnology Letters* 2002: 24: 905-907

Souza, S, Dutra, RF, Correia, MTS, Pessoa, MMA, Lima Filho, JL, Coelho, Coelho, LCBB. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technology* 2003: *in press*

Montecchio, M. Agregação plaquetária – interesse científico e informação. *NewsLab* 1999: 25: 70-75

Patscheke, H, Brossmer, R, Worner, P. D-Galactose-binding lectins induce a differential response of blood platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1977: 75: 200-206

Knibbs RN, Takagaki, M, Blake, DA, Goldstein, IJ. The role of valence on the high-affinity binding of Griffonia simplicifolia isolectins to type A human erythrocytes. *Biochemistry* 1998; 37: 16952-16957

*Corresponding author. Tel.: (+55-81) 3271-8540; Fax: (+55-81) 3271-8576
E-mail address: mcorreia@ufpe.br

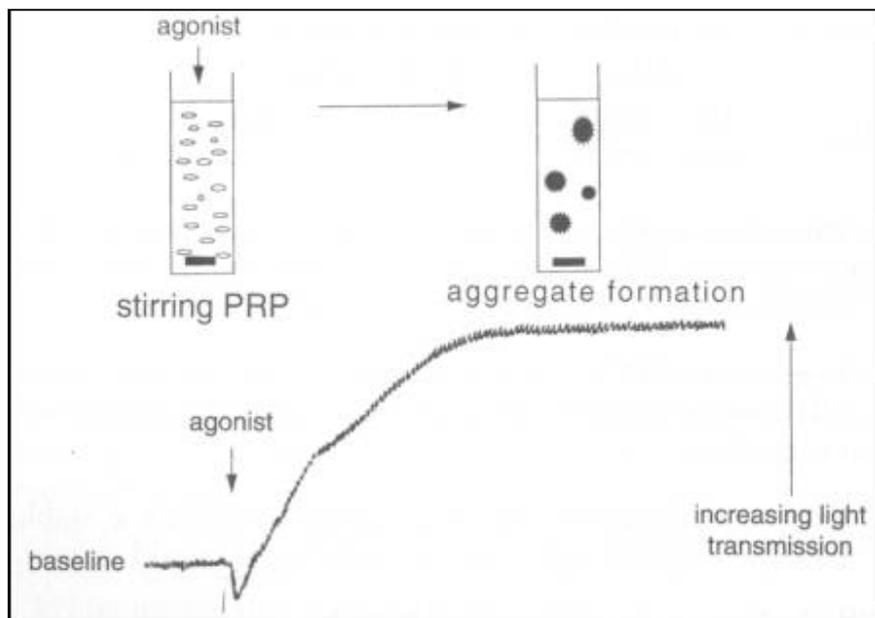
Table 1 – Effect of interaction between Cra Iso 1, Cra Iso 1,4, Cra Iso 3, Con A and WGA and platelets.

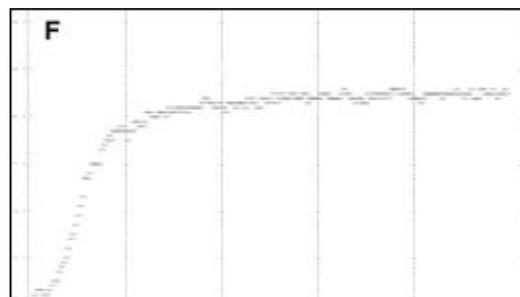
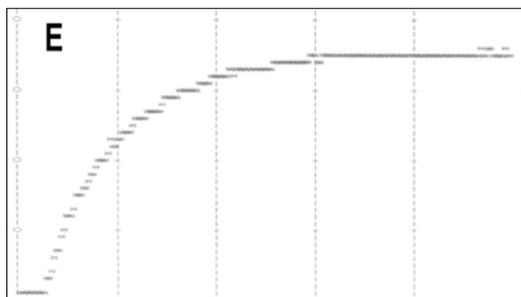
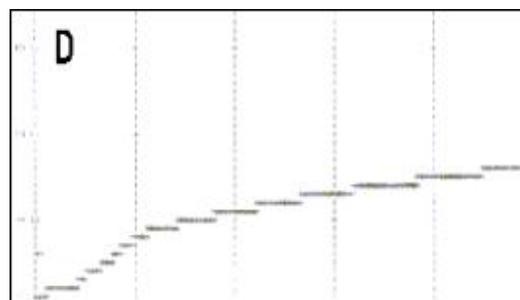
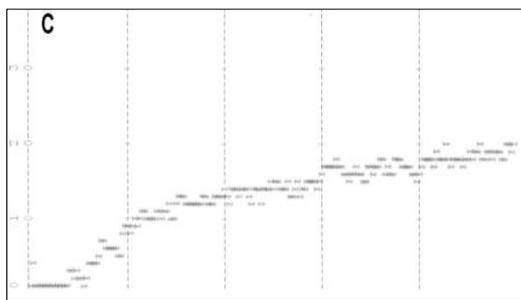
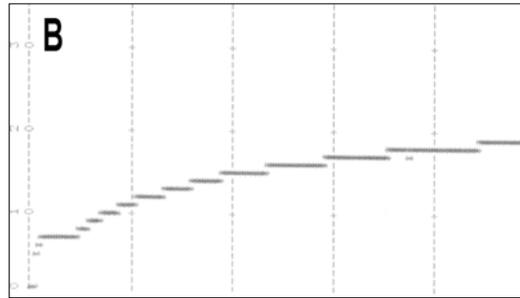
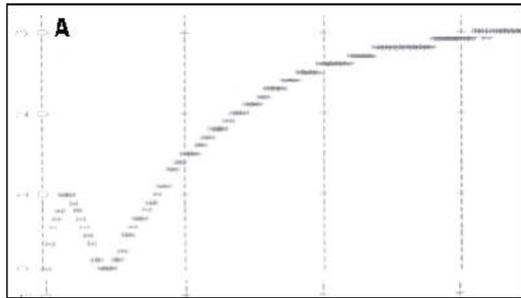
Sample	Aggregation (%)			
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	20	25	50	100
Cra Iso 1	Nd	$3,54 \pm 0.81^a$	7.77 ± 0.74^b	16.65 ± 2.02^c
Cra Iso 1,4	Nd	5.02 ± 0.76^a	11.44 ± 2.92^b	13.89 ± 1.61^d
Cra Iso 3	Nd	1.71 ± 0.47^a	7.10 ± 1.11^b	10.39 ± 0.81^d
Con A	Nd	Nd	Nd	20.02 ± 1.42^e
WGA	36.22 ± 3.07^f	Nd	Nd	Nd

Nd = not determined. Same letters represent values without significant statistic difference ($P < 0.05$).

Table 2 – Effect of specific carbohydrates in the interaction between Cra Iso 1, Cra Iso 1,4, Cra Iso 3, and platelets.

Sample	Aggregation (%)	
	Concentration (mM)	
	50	100
Cra Iso 1 + mannose	1.0 ± 0.8	1.0 ± 0.9
Cra Iso 1 + methyl-α-D-mannoside	4.0 ± 0.7	5.0 ± 0.5
Cra Iso 1,4 + mannose	6.0 ± 0.5	8.0 ± 0.7
Cra Iso 1,4 + methyl-α-D-mannoside	3.0 ± 0.7	3.0 ± 0.8
Cra Iso 3 + galactose	5.0 ± 0.6	4.0 ± 0.8
Mannose	5.0 ± 0.1	5.0 ± 0.3
Methyl-α-D-mannoside	1.0 ± 0.9	5.0 ± 0.4
Galactose	5.0 ± 0.3	3.0 ± 0.4





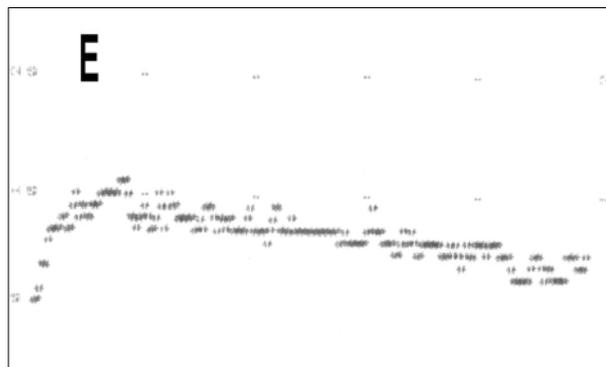
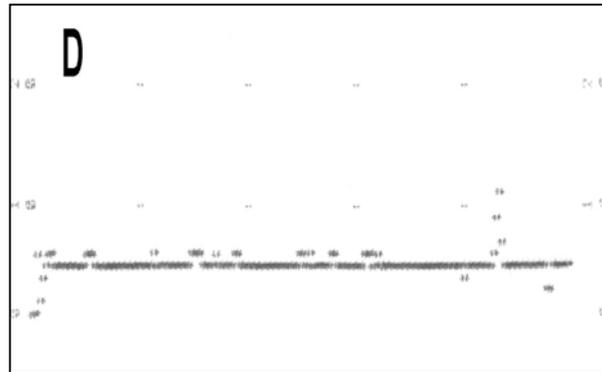
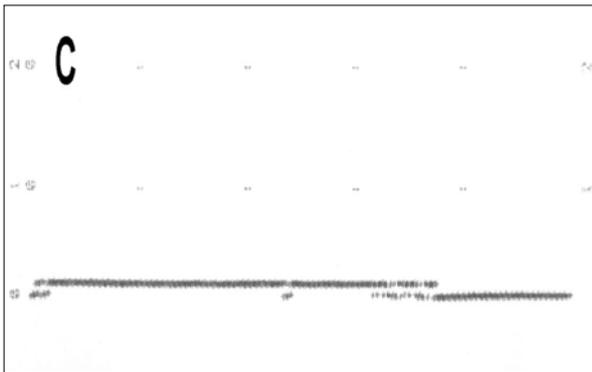
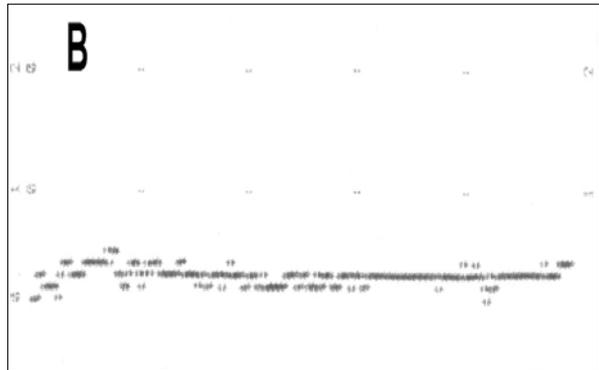
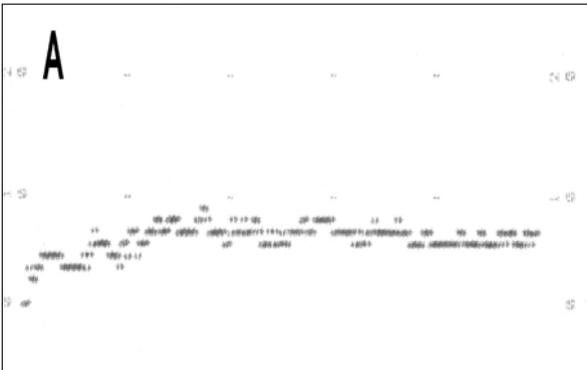


Figure 1 – Formation of platelet aggregate with corresponding increase in the light transmission

Figure 2 – Representation of aggregation curves

(A) Pattern of a curve with lag phase, (B) Cra Iso1 (C) Cra Iso 1,4, (D) Cra Iso 3, (E) Con A, (F) WGA.

Figure 3 - Representation of aggregation curves in carbohydrate presence

(A) Cra Iso 1,4 + mannose, (B) Cra Iso 1,4 + methyl- α -D-mannoside, (C) Cra Iso 1 + mannose, (D) Cra Iso 1 + methyl- α -D-mannoside, (E) Cra Iso 3 + galactose.

6. CONCLUSÕES

1. Lectinas extraídas de *C. mollis* apresentam atividade agregante plaquetária.
2. Aparentemente as formas moleculares de *C. mollis* não desencadeiam reação de secreção quando ativam plaquetas.
3. A inibição da atividade agregante frente ao agonista epinefrina, não foi efetiva, demonstrando, modos de ação não competitivos.
4. A atividade agregante plaquetária das lectinas de *C. mollis* se dá através do sítio de ligação a carboidratos.

Ata da defesa de dissertação do Mestrando **José Melquíades de Rezende Neto**, realizada em 26 de fevereiro de 2003, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:15 minutos do dia 26 de fevereiro de 2003, foi aberto, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, Depto. de Bioquímica/CCB, o ato da defesa de dissertação do mestrando **José Melquíades de Rezende Neto**, aluno do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando os trabalhos, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, (Coordenadora do curso supra citado), fez a apresentação do aluno, de sua orientadora, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, de sua Co-orientadora, Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, e da Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores: Maria Tereza dos Santos Correia, na qualidade de Presidente, Vera Lúcia de Menezes Lima, Maria das Graças Carneiro da Cunha, os três do Depto. de Bioquímica, e a Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, do Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou o aluno para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Avaliação da Atividade Agregante e Antiagregante Plaquetária de Formas Moleculares das Lectinas de Sementes de *Cratylia mollis* Mart.**", e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. O mestrando procedeu a explanação e comentários acerca do tema em 35 (trinta e cinco) minutos. Após a apresentação, a Sra. Presidente concedeu um intervalo de 10 minutos. Reiniciando os trabalhos, a mesma convidou a Banca para ocupar seus lugares e passou a palavra ao primeiro examinador, Profa. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, que após agradecer e fazer alguns comentários, iniciou sua arguição. Ao final, a referida professora deu-se por satisfeita, parabenizando o candidato e suas orientadoras. Em seguida, a palavra foi passada para a Profa. Maria das Graças Carneiro da Cunha, que após agradecer iniciou sua arguição. Finda a mesma, parabenizou o aluno e suas orientadoras. Continuando, a palavra foi passada para a Profa. Vera Lúcia de Menezes Lima, que fez alguns agradecimentos e comentários, iniciando sua arguição. Ao final, deu-se por satisfeita, parabenizando o aluno e suas orientadoras. Prosseguindo, a Sra. Presidente usou da palavra para fazer algumas considerações e agradecimentos ao aluno e à Banca Examinadora, passando depois a palavra a para a Profa. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho que também fez alguns agradecimentos. Finalizando, a Sra. Presidente convidou a Banca a se reunir na Secretaria do Curso, para proceder o julgamento na presença da Coordenadora. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovado com Distinção**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 26 de fevereiro de 2003.

José Miron de Oliveira
 Vera Lúcia de Menezes Lima
 Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão
 Maria das Graças Carneiro da Cunha
 Tereza Correia



José Miron de Oliveira
 Secretário do Curso do
 Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE