

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE LIGAÇÃO DE
ISOLECTINAS DE *Cratylia mollis* A LEVANAS E
GLICOPROTEÍNAS DE PLAQUETAS**

Gilvanely Cardoso Alves

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva

Recife - 2005

GILVANELY CARDOSO ALVES

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE LIGAÇÃO DE
ISOLECTINAS DE *Cratylia mollis* A LEVANAS E
GLICOPROTEÍNAS DE PLAQUETAS**

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

Recife - 2005

ÍNDICE ANALÍTICO

	Pág.
Agradecimentos	06
Lista de Figuras	07
Lista de Tabelas	07
Resumo	08
Abstract	09
1 Introdução	10
2 Relevância do Trabalho	18
3 Objetivos	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 Resultados	20
5 Conclusões	43
6 Referências Bibliográficas	44
7 Anexo	56

**“Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta de alguém que o que
mais queremos é tirar esta pessoa de nossos sonhos e abraçá-la.**

**Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você
possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.
Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz.
As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o
melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece
para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que
buscam e tentam sempre.**

**E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam
por suas vidas. O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente
vivido.**

**Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do
passado. A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma
eternidade. A vida não é de se brincar porque um belo dia se morre”.**

Clarice Lispector

**Aos meus pais, Antônio e Maria de Lourdes, e a minha irmã
Gilmara pelo amor incondicional e por toda luta
empreendida.**

AGRADECIMENTOS

Um curso de pós-graduação requer muito esforço, dedicação e força de vontade, por isso agradeço principalmente a Deus pela força incessante em todos os momentos.

Em especial aos meus pais, Antônio e Lourdes por todo amor, carinho e dedicação, essenciais para a realização deste e de outros projetos de minha vida.

A minha irmã Gilmara pelo incentivo, apoio e grande demonstração de carinho.

À Prof^ª Dr^ª Maria Tereza dos Santos Correia pela orientação, amizade e prestimosidade empreendidos neste trabalho.

À Prof^ª Dr^ª Patrícia Maria Guedes Paiva pelo incentivo, amizade e valiosa contribuição científica.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos científicos e de vida.

À coordenação do Mestrado em Bioquímica pela oportunidade de realização desta pós-graduação.

À técnica Maria Barbosa Reis da Silva pela inestimável colaboração no desenvolvimento das práticas laboratoriais.

A todos os funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial, Djalma, Miron, Neide e João pelo apoio técnico e por serem sempre prestativos nos momentos necessários.

Aos colegas da turma de Mestrado pela amizade e pelos momentos de alegria.

Aos amigos do Laboratório de Glicoproteínas pelo convívio sempre agradável.

Ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer imensamente a todas as pessoas, uma a uma, mas sei que é impossível. O bom é saber que todas estarão na minha memória.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1. Schematic curve of Cramoll 1,4 elution from FMZAG-12L particles (A) and electrophoresis to native and basic protein of a sample (100 µg) of aliquots 12 and 13 (B).	40
Fig. 2. Affinity chromatography of platelet glycoprotein preparations, crude preparation (A and B) and ammonium sulphate fractionation (C and D), on Cramoll 3-Sepharose (A and C) and Cramoll 1,4-Sepharose (B and D), in 0.15 M NaCl, at a flow rate of 10 ml/h and 1 ml of fractions.	41
Fig. 3. SDS-PAGE of adsorbed fractions (100 µg) from the affinity chromatography of platelet glycoprotein preparations, crude preparation (1 and 2) and ammonium sulphate fractionation (3, 4 and 5), on Cramoll 1,4-Sepharose (1, 3 and 4) or Cramoll 3-Sepharose (2 and 5). Molecular mass marker (6). The 7.5 % gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.	42

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABLE 1	38
Hemagglutinating activity inhibition of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 by levans.	

RESUMO

Lectinas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) contêm formas moleculares (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4), as quais foram previamente purificadas com elevado grau de pureza. O padrão de ligação de Cramoll 1,4 (preparação contendo Cramoll 1 e Cramoll 4) e de Cramoll 3 a levanas livres e magnetizadas e de Cramoll 1,4 e Cramoll 3 imobilizadas em Sepharose a preparações de glicoproteínas de plaquetas foram analisados. A ligação das lectinas às levanas (ZAG-12L, Z-1-81L, ZAPL e CP-50L) foi avaliada por ensaio de inibição da atividade hemaglutinante e a ligação às glicoproteínas de plaquetas foi avaliada por cromatografia em Cramoll 1,4-Sepharose e Cramoll 3- Sepharose. Incubação de Cramoll 1,4 e Cramoll 3 com ZAG-12 ferro magnetizado (FMZAG-12L) que promoveu a melhor inibição também foi testada. Eletroforese em gel de poliacrilamida foi usada para analisar o padrão das proteínas obtidas. A ZAG-12L e ZAPL inibiram ambas as isolectinas, enquanto Z-1-81L e CP-50L não inibiram estas. Quando Cramoll 1,4 foi incubada com FMZAG-12L obteve-se através da eluição específica com D-glicose um pico protéico que mostrou o mesmo padrão eletroforético observado para Cramoll 1,4 antes da incubação; Cramoll 3 não se ligou a FMZAG-12L. Glicoproteínas de plaquetas foram eluídas especificamente das isolectinas imobilizadas com diferentes padrões eletroforéticos. Os resultados mostraram que Cramoll 1,4 e Cramoll 3 possuem diferentes sítios de ligação e poderão ser utilizadas para caracterizar polímeros de carboidratos ou glicoproteínas.

ABSTRACT

Cratylia mollis seed lectin (Cramoll) contains molecular forms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), which have previously been highly purified. The binding pattern of Cramoll 1,4 (preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4) and Cramoll 3 free using levans and magnetized levan or Cramoll 1,4 and Cramoll 3 immobilized to Sepharose using platelet glycoprotein preparations was analyzed. The binding of the lectins to levans (ZAG-12L, Z-1-81L, ZAPL and CP-50L) was evaluated by hemagglutinating activity inhibition assay and the binding of platelet glycoproteins was evaluated by chromatography in Cramoll 1,4-Sepharose and Cramoll 3-Sepharose. Incubation of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 with ZAG-12 iron magnetized (FMZAG-12L) which promote the best inhibition was also assayed. Electrophoresis in polyacrylamide gels was used to analyze the pattern of obtained proteins. The ZAG-12 and ZAP inhibited both isolectins while Z-1-81 and CP-50 did not inhibit them. When Cramoll 4 was incubated with FMZAG-12L a protein peak was obtained with D-glucose 0,3 M specific elution which showed the same eletrophoretic pattern observed to Cramoll 1,4 before incubation; Cramoll 3 did not bind FMZAG-12L. Platelet glycoproteins were specifically eluted from immobilized isolectins with different eletrophoretic pattern. The results showed that Cramoll 1,4 and Cramoll 3 have different binding sites and could be used to characterize carbohydrate polymers or glycoproteins.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Generalidades

O estudo das lectinas começou em 1888 quando Hermann Stillmark apresentou uma tese descrevendo as propriedades aglutinantes da proteína ricina, que tinha sido extraída e parcialmente purificada das sementes de mamona (*Ricinus communis*). Algum tempo depois, Hellin também verificou a atividade hemaglutinante do extrato tóxico de jequiriti (*Abrus precatorius*) realizada pela proteína abrina. Esta proteína foi utilizada por Ehrlich em 1890, como potencial modelo antigênico (Sharon e Lis, 1987).

A especificidade sacarídica das lectinas foi descoberta por James Sumner que em 1919 isolou a Concanavalina A (Con A) de extratos do feijão *Canavalia ensiformis* por precipitação salina, cristalizando-a e obtendo pela primeira vez uma lectina pura (Sharon e Lis, 1987).

Boyd e Reguera (1949) descobriram que as aglutininas de plantas ou fitoaglutininas eram específicas para determinado grupo sanguíneo do sistema ABO quando estudando a aglutinina de *Phaseolus limenses* (feijão de lima) verificaram que a mesma aglutinava apenas eritrócitos humanos do tipo A. Estas aglutininas de plantas específicas de grupos sanguíneos foram denominadas de lectinas por Boyd e Shapleigh em 1954. O termo lectina vem do latim *legere* que significa selecionar. Este termo foi generalizado em 1972 para incluir todas as proteínas, de origem não imune, obtidas de plantas, animais ou microorganismos, que ligavam carboidratos, sendo específicas ou não para determinados grupos sanguíneos (Sharon e Lis, 1987).

Goldstein *et al.* (1980) definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que interagem com carboidratos através de pelo menos dois sítios de ligação, aglutinam células animais e/ou vegetais e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. A principal força de interação das lectinas com carboidratos é a hidrofobicidade (Quiocho, 1986).

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em microorganismos, animais e plantas (Gerlach *et al.*, 2002; Kilpatrick, 2002; Fenton-Navarro, 2003; Tasumi *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004; Ngai e Ng, 2004; Molchanova *et al.*, 2004; Gerlach *et al.*, 2005).

As plantas têm constituído o material de excelência para a obtenção de lectinas. Nas plantas, as lectinas ocorrem em cascas de árvores, bulbos, folhas, frutos, raízes, rizomas e tubérculos (Peumans *et al.*, 1997; Coelho e da Silva, 2000; Naeem *et al.*, 2001; Rabijns *et al.*, 2001; Ratanapo *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004; Ooi *et al.*, 2004). Entretanto, a grande maioria das lectinas isoladas e caracterizadas provém de sementes de leguminosas (Vattuone *et al.*, 2001; Rahman *et al.*, 2002; Sultan *et al.*, 2004).

Em algumas sementes de legumes, a localização das lectinas tem sido bem caracterizada. A maioria dos estudos indicou a presença da lectina em células parenquimatosas de armazenamento e em vacúolos especializados denominados de corpos protéicos. Outras pesquisas relataram as lectinas no interior do citoplasma e associadas a parede celular (Santos *et al.*, 2004).

As lectinas têm sido aplicadas, entre outras, para explorar superfícies celulares, ligando-se à porção carboidrato de glicoproteínas ou glicolipídios que se projetam da célula, como agentes mitogênicos, como hipoglicemiantes, na caracterização de polissacarídeos em biofilmes de bactérias, na diferenciação e crescimento celular, na detecção histoquímica das cadeias de açúcares da superfície da célula, no diagnóstico e prognóstico do câncer e na imobilização em suportes inertes (Remani *et al.*, 1994; Suvachittanont e Jaranchavanapet, 2000; Sarui *et al.*, 2001; Shibuya, 2001; Surolia e Satish, 2001; Wróblewski *et al.*, 2001; Strathmann *et al.*, 2002; Beltrão *et al.*, 2003; Ngai e Ng, 2004; Kim *et al.*, 2005).

A presença das lectinas é principalmente detectada através de um ensaio de hemaglutinação (Sharon e Lis, 2001). Neste ensaio é efetuada uma diluição seriada da lectina e, posteriormente uma incubação com eritrócitos humanos ou eritrócitos de outros animais (Coelho e Da Silva, 2000; Oliveira *et al.*, 2003; Molchanova *et al.*, 2004; Ngai e Ng, 2004; Gerlach *et al.*, 2005). A sensibilidade das células para a lectina é aumentada usando-se um tratamento enzimático (tripsina, papaína ou neuraminidase) ou um tratamento químico utilizando glutaraldeído ou formaldeído (Correia e Coelho, 1995; Coelho e Da Silva, 2000; Mo *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2004; Winter e Goldstein, 2004).

A inibição da atividade hemaglutinante (AH) por carboidratos é um método indispensável para se ter certeza de que o agente aglutinante é uma lectina, assim definindo-se a especificidade da mesma (Kawagishi *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2005)

A purificação das lectinas de diferentes fontes requer inicialmente, a preparação de extratos em soluções aquosas salinas (Kawagishi *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Tasumi *et al.*, 2004).

Os extratos que apresentam atividade lectínica são ainda parcialmente purificados por diálise exaustiva e fracionamento salino com sulfato de amônio (Coelho e Da Silva, 2000; Naeem *et al.*, 2001).

As técnicas convencionais de cromatografia que contribuem para a purificação das lectinas podem ser baseadas na carga ou tamanho da proteína (Zenteno *et al.*, 2000; Ratanapo *et al.*, 2001; Banerjee *et al.*, 2004; Ngai e Ng, 2004).

A cromatografia de troca iônica utiliza alguns suportes iônicos comerciais tais como DEAE-celulose, CM-celulose dentre outros. Esta é uma técnica comum utilizada para purificação de proteína. Trocadores iônicos comerciais disponíveis são ativados por grupos iônicos muito fortes para que eles possam adsorver uma percentagem máxima de proteínas de um dado extrato (Guisán *et al.*, 2004).

A cromatografia de afinidade é uma técnica extremamente poderosa para o isolamento de macromoléculas, visto que baseia-se em interações moleculares bioespecíficas do tipo não covalentes (Helmholz *et al.*, 2003).

A aplicação da cromatografia de afinidade para a purificação da lectina é principalmente baseada na habilidade da proteína de se ligar a carboidratos de um modo específico e reversível. Diferentes matrizes de afinidade para lectinas são escolhidas de acordo com a especificidade da lectina aos carboidratos (Oliveira *et al.*, 2003; Tasumi *et al.*, 2004; Gerlach *et al.*, 2005).

1.1.2 Lectinas Imobilizadas Como Suporte de Afinidade

A utilização de lectinas imobilizadas como suporte de afinidade é um processo vantajoso por causa da rápida obtenção de um grande número de glicoconjugados em um tempo relativamente curto. O método da imobilização é, portanto um dos mais importantes passos na análise da interação lectina-glicoconjugado (Masárova *et al.*, 2004).

A lectina imobilizada como suporte de afinidade é similar aos outros tipos de cromatografia de afinidade. Uma mistura de glicoproteínas heterogêneas é cromatografada em uma matriz com uma lectina particular imobilizada. A glicoproteína com uma seqüência de açúcar específica consegue adsorver na matriz por causa da sua

interação com a lectina imobilizada, enquanto outras proteínas ou glicoproteínas são lavadas. A glicoproteína adsorvida é eluída da coluna, bioespecificamente, usando um açúcar com uma estrutura complementar ou não bioespecificamente através da mudança da força iônica do meio ou do pH, e a sua pureza é confirmada posteriormente pela eletroforese. A lectina imobilizada como suporte de afinidade é uma ferramenta poderosa na purificação e caracterização de glicoconjugados, em diagnósticos clínicos e em aplicações médicas e biológicas (Cartellieri *et al.*, 2001; Satish e Surolia, 2001; Bakalova e Ohba, 2003; Franco-Fraguas *et al.*, 2003; Gottscalk *et al.*, 2003; Miyata *et al.*, 2004).

1.2 Plaquetas

As plaquetas são corpúsculos ou fragmentos que se originam dos megacariócitos. Os megacariócitos são células gigantes localizadas na medula óssea (Ramasamy, 2004). As plaquetas têm a forma de minúsculos discos arredondados, sem núcleo no seu interior, com diâmetro médio de 1,5 a 4 microns e espessura de 0,5 a 1 micron. Quando ativadas, as plaquetas entumescem substancialmente e podem alcançar diâmetros entre 25 e 50 microns. A vida média das plaquetas é de cerca de 10 dias (Lorenzi, 1999). No sangue circulante existem, em condições normais, entre 150.000 e 350.000 plaquetas por mililitro (Verrastro *et al.*, 1998).

A plaqueta é circundada por uma membrana plasmática que se estende através de um sistema canalicular no citoplasma. O sistema canalicular aberto aumenta grandemente a área superficial da plaqueta permitindo a expulsão de produtos secretados por suas organelas para o plasma e também a penetração de substâncias do plasma para o interior das plaquetas (Ramasamy, 2004).

As organelas dispersas no citoplasma das plaquetas são: mitocôndrias, partículas de glicogênio e lisossomos. Os grânulos α e os grânulos densos são os grânulos de armazenamento específicos das plaquetas. Os grânulos α contêm proteínas tais como o fator plaquetário 4, β -tromboglobulina, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, plasminogênio e fator von Willebrand (vWF). Uma das maiores proteínas da membrana plaquetária, GPIb – o receptor do vWF 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 (Kocourec e Freed, 1990;

Lakhtin, 1995). Os grânulos densos são ricos em serotonina, difosfato de adenosina (ADP), trifosfato de adenosina (ATP) e cálcio (Ramasamy, 2004).

O citoesqueleto plaquetário consiste de uma rede de longos filamentos de actina que são cruzados por uma variedade de proteínas acessórias. As maiores funções do citoesqueleto plaquetário são a regulação da forma discóide da plaqueta e a realização dos eventos contráteis tais como a secreção dos conteúdos plaquetários devido a contração dos filamentos de actina que comprime as organelas e os grânulos promovendo a liberação das substâncias produzidas pelas plaquetas através do sistema canalicular aberto (Ramasamy, 2004).

As plaquetas expressam na sua membrana uma variedade de receptores que são designados de GP Ib-IX-V, GP VI, GP Ia-IIa e GP IIb-IIIa. Estes receptores são glicoproteínas (GP) específicas que regulam as funções de adesão, ativação e agregação plaquetárias (Ramasamy, 2004). A nomenclatura das glicoproteínas utiliza numerais romanos e o critério para a seleção do numeral é a massa molecular; quanto maior a massa molecular, menor o numeral romano (Williams *et al.*, 1990). Portanto, a maior glicoproteína é designada de I e a menor de IX. As letras a e b foram acrescentadas quando técnicas eletroforéticas permitiram a resolução de bandas únicas em duas bandas separadas (Ramasamy, 2004).

Os receptores da superfície da membrana são importantes na função plaquetária, primeiro na adesão ao colágeno e, posteriormente, na agregação plaquetária. Os receptores que são glicoproteínas se associam formando complexos. O complexo GP Ia-IIa funciona como receptor da fibrila de colágeno para o (vWF). Os complexos GP Ib-IX-V e IIb-IIIa são os receptores plaquetários para o vWF. O complexo GPIb-IX-V media a deposição inicial das plaquetas ao subendotélio. Isto envolve uma interação entre o complexo GP Ib-IX-V e vWF. O vWF media a adesão das plaquetas aos locais de lesão pela formação de uma ponte entre os componentes do subendotélio e o complexo GPIb-IX-V (Ramasamy, 2004). As plaquetas desempenham um papel importante na hemostasia. No local de lesão vascular, as plaquetas circulantes aderem a diferentes componentes da matriz subendotelial, através da ação dos receptores de superfície (Torti *et al.*, 2004). A hemostasia é um mecanismo fundamental de defesa de todos os vertebrados e envolve dois processos complementares: a formação de um coágulo, ou trombo, para estancar a perda de sangue de um vaso lesado e o processo de dissolução do trombo, ou fibrinólise, depois que ocorrer a reparação endotelial (Gentry, 2003).

O primeiro passo na hemostasia após a lesão vascular é a aderência das plaquetas circulantes ao colágeno no subendotélio exposto. Neste momento em que as plaquetas aderem ao colágeno, elas são ativadas. Esta reação é rapidamente seguida pela agregação das plaquetas com a concomitante liberação de várias substâncias biologicamente ativas. Estes eventos caracterizam a hemostasia primária. Na hemostasia secundária tem-se a formação da trombina e conseqüentemente de um coágulo consistente, capaz de obstruir a lesão vascular, devido a deposição de uma rede de fibrina entre as plaquetas agregadas (Lorenzi, 1999).

1.3 Lectinas versus Plaquetas

A interação das lectinas e dos gliconjugados da membrana plaquetária é evidenciada em procedimentos que utilizam lectinas imobilizadas em suportes insolúveis como matrizes cromatográficas. A cromatografia de afinidade em coluna de aglutinina de germe de trigo (WGA - Wheat Germ Agglutinin) foi eficiente em separar diferentes GP da membrana das plaquetas; GP Ia, Ic e IIa foram eluídas com baixa concentração salina, enquanto GP IIb-IIIa e Ib ligaram-se fortemente a matriz sendo eluídas com altas concentrações de sal (Catimel *et al.*, 1991).

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 (Ganguly, 1979; Franceschini, 1996; Grubhoffer, 1997). Algumas lectinas são hábeis para estimular agregação e secreção de grânulos internos de plaquetas (George, 1986; Torti *et al.*, 1995; Ghosh, 1999). Interação de lectinas com a superfície plaquetária poderia também indicar a ativação de um segundo sistema mensageiro, incluindo diferentes proteínas tirosina quinases, e subsequente fosforilação de algumas proteínas plaquetárias intracelulares (Greenberg, 1984). 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 (Patscheke, 1977; Smirnova e Khaspekova, 1998).

Jamieson *et al.* (1997) propôs que adesão das plaquetas ao colágeno pode ser mediada pela formação de um complexo enzima-substrato entre o colágeno e a glicosiltransferase, ou seja, por resíduos de galactose presentes no colágeno e por uma glicosiltransferase específica presente na superfície plaquetária. 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). 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; Cawthern *et al.*, 2001).

1.4 Levanas

Levanas são polímeros de frutose compostos por resíduos D-frutofuranosil unidos por ligações β - 2,6 na cadeia principal e β - 2,1 nos pontos de ramificação (Kennedy *et al.*, 1989; Kang *et al.*, 1998). A levanassacarase transfere resíduos D-frutosil da sacarose para a cadeia de levana em crescimento, liberando glicose (Sangiliyandi *et al.*, 1999; Monsan *et al.*, 2001).

As levanas podem ser produzidas por diversas espécies de plantas e bactérias, onde a distribuição de peso molecular e o grau de ramificação dependem da fonte produtora deste biopolímero (Huber e Viney, 1998). As levanas produzidas por plantas apresentam baixo peso molecular e poucas ramificações, enquanto as levanas produzidas extracelularmente por bactérias exibem peso molecular elevado e podem conter numerosas ramificações (Simms *et al.*, 1990).

Muitos microrganismos tais como *Aerobacter levanicum*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium leviformans*, *Streptococcus salivarius* e *Zymomonas mobilis* produzem levana quando crescidos em meio contendo sacarose (Han, 1990). Entre os principais produtores de levana, a bactéria *Z. mobilis* é a que produz em larga escala (Ananthalakshmy e Gunasekaran, 1999).

Z. mobilis é uma bactéria Gram-negativa anaeróbica facultativa em forma de bastonete que produz etanol (Ananthalakshmy e Gunasekaran, 1999), descarboxilando piruvato (Gibbs e De Moss, 1951). As destilarias de etanol produzem levana como um valioso bioproduto (Bekers *et al.*, 2002).

Em uma mesma temperatura de produção, linhagens diferentes de *Z. mobilis* produzem levanas de diferentes pesos moleculares. Além disso, uma mesma linhagem de *Z. mobilis*, submetida a diferentes temperaturas, produz levanas com diferentes pesos moleculares (Calazans, 1997). Ao utilizar a técnica de precipitação fracionada, Vinhas (1999) verificou que a bactéria *Z. mobilis* designada ZAG-12, produziu levanas com diferentes faixas de pesos moleculares, onde a fração denominada 50 (precipitada numa

concentração de 50% de etanol na mistura hidroalcoólica) apareceu em maior quantidade.

Por possuírem elevada viscosidade, as levanas são utilizadas como agente espessante ou estabilizante na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos (Vina *et al.*, 1998). Segundo Han (1990) as levanas também são uma boa fonte de frutose, podendo ser utilizadas como adoçante.

Estudando a aplicação clínica da levana Calazans *et al.* (1997) verificaram que frações deste polímero, isoladas em diferentes concentrações de etanol, possuem atividades antitumorais variadas para carcinoma de Ehrlich e sarcoma 180. Um estudo mais profundo estabeleceu que a atividade antitumoral apresentada por levanas de *Z. mobilis* varia em função do peso molecular médio do polímero (Calazans *et al.*, 2000).

1.5 Lectinas de *Cratylia mollis*

A Região Semi-Árida no Nordeste do Brasil corresponde a uma vasta área, com espécies nativas de plantas ainda pouco exploradas. *Cratylia mollis*, (feijão camaratu), é uma forrageira nativa do estado de Pernambuco e pertence a família Fabaceae, taxonomicamente relacionada com a espécie *Canavalia ensiformis* da qual é obtida a Con A. As sementes de *C. mollis* têm sido consideradas uma importante fonte de lectinas, fornecendo múltiplas formas moleculares (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4) com diferentes especificidades para carboidrato (Paiva e Coelho, 1992; Correia e Coelho, 1995). A mais abundante isolectina purificada de semente de *C. mollis* é a Cramoll 1 a qual reconhece glicose/manose. Cramoll 2 e Cramoll 4 também ligam glicose/manose, enquanto Cramoll 3 é uma glicoproteína galactose específica. Estas isolectinas migram diferentemente na eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas nativas e básicas, têm diferentes seqüências N-terminal, mas aglutinam eritrócitos similarmente (Santos *et al.*, 2004). A Cramoll 1, semelhante a Con A quanto a especificidade para glicose/manose já foi imobilizada e seu potencial como matriz para isolar glicoproteínas do plasma foi demonstrado, sendo que a Cramoll 1 apresentou diferenças no número de proteínas purificadas, quando comparado à purificação usando-se Con A, indicando diferenças na especificidade por carboidratos complexos entre estas lectinas (Lima *et al.*, 1997). Estudos de caracterização estrutural e aplicações biológicas com Cramoll 1 e Cramoll 1,4 (preparação que contém Cramoll 1 e Cramoll 4) vêm sendo efetuados, demonstrando a versatilidade destas isolectinas (Beltrão *et al.*,

1998; De Souza, 2003; Santos *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2004; Maciel *et al.*, 2004).

2 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Estudar os sítos de ligação a carboidratos de isolectinas é de interesse para uma melhor caracterização das mesmas. A avaliação do padrão de interação das lectinas de *C. mollis* com polímeros de carboidratos (levanas) ou glicoproteínas contribuirá para uma melhor compreensão da atividade destas proteínas. Cramoll 1,4 (glicose/manose específica) e Cramoll 3 (galactose específica) já demonstraram capacidade de aglutinar plaquetas humanas e de coelho, deste modo a cromatografia de solução contendo GP plaquetárias em suportes contendo Cramoll 1,4 e Cramoll 3 imobilizadas em Sepharose CL-4B poderá contribuir para o estudo do sítio de ligação destas isolectinas, além de representar uma interessante ferramenta na purificação de GP das plaquetas. Purificar GP de plaquetas é importante para o estudo da função plaquetária, uma vez que, 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 (Clemetson, 1985; Mazurov e Vasiliev, 1994). O estudo da inibição da aglutinação de Cramoll 1,4 e de Cramoll 3 por diferentes levanas e a utilização destas em formas de partículas ferromagnéticas (LFM) como um novo suporte de afinidade para purificação de lectinas, constituem, também, uma ferramenta para o estudo de caracterização da especificidade de lectinas. As LFM se configuram com um suporte alternativo para a purificação de lectinas; os suportes atualmente utilizados são importados e de custo elevado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o padrão de ligação das isolectinas de *C. mollis*, Cramoll 1,4 e Cramoll 3, a levanas obtidas de diferentes linhagens de *Z. mobilis* e a glicoproteínas de plaquetas contidas em duas preparações distintas.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar a inibição da atividade hemaglutinante de Cramoll 1,4 e de Cramoll 3 frente as levanas ZAG-12L, Z-1-81L, ZAPL e CP-50L obtidas das linhagens ZAG-12, Z-1-81 e ZAP.

3.2.2 Avaliar o padrão de ligação e perfil de eluição bioespecífica de Cramoll 1,4 e Cramoll 3 à ZAG-12L magnetizada (FMZAG-12L).

3.2.3 Avaliar a atividade hemaglutinante e o padrão de bandas por eletroforese para proteínas básicas nativas das proteínas adsorvidas à FMZAG-12L.

3.2.4 Imobilizar Cramoll 1,4 e Cramoll 3 à Sepharose CL-4B.

3.2.5 Obter glicoproteínas de plaquetas a partir de plasma de coelho.

3.2.6 Cromatografar as preparações de glicoproteínas de plaquetas utilizando Cramoll 1,4-Sepharose e Cramoll 3-Sepharose como suportes de afinidade.

3.2.7 Avaliar por SDS-PAGE em condições redutoras o padrão de bandas das proteínas de plaquetas adsorvidas aos suportes contendo as isolectinas imobilizadas.

4 RESULTADOS

Trabalho a ser submetido ao periódico:

“CARBOHYDRATE POLYMERS”

FATOR DE IMPACTO: 1,597

TÍTULO DO ARTIGO:

**“EVALUATION OF THE BINDING SITE FROM *Cratylia mollis* ISOLECTINS
USING LEVAN AND PLATELET GLYCOPROTEINS “.**

**EVALUATION OF THE BINDING SITE FROM *Cratylia mollis* ISOLECTINS
USING LEVAN AND PLATELET GLYCOPROTEINS**

Gilvanely C. Alves¹, Flávia F. B. Araújo¹, Jackeline da Costa Maciel ², Luiz B. Carvalho Jr.^{1,2}, Glicia T. Calazans³, Luana C. B. B. Coelho¹, Maria da Paz C. da Silva^{1,2}, Patrícia M. G. Paiva¹, & Maria Tereza S. Correia,^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, CBB/UFPE, ²Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami – LIKA/UFPE, ³Departamento de Antibióticos, CBB/UFPE, Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: (+55-81) 2126-8540; Fax: (+55-81) 2126-8576

E-mail address: mcorreia@ufpe.br

Abstract

Cratylia mollis seed lectin (Cramoll) contains molecular forms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), which have previously been highly purified. The binding pattern of Cramoll 1,4 (preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4) and Cramoll 3 free using levans and magnetized levan or Cramoll 1,4 and Cramoll 3 immobilized to Sepharose using platelet glycoprotein preparations was analyzed. The binding of the lectins to levans (ZAG-12L, Z-1-81L, ZAPL and CP-50L) was evaluated by hemagglutinating activity inhibition assay and the binding of platelet glycoproteins was evaluated by chromatography in Cramoll 1,4-Sepharose and Cramoll 3-Sepharose. Incubation of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 with ZAG-12 iron magnetized (FMZAG-12L) which promote the best inhibition was also assayed. Electrophoresis in polyacrylamide gels was used to analyze the pattern of obtained proteins. The ZAG-12L and ZAPL inhibited both isolectins while Z-1-81 and CP-50 did not inhibit them. When Cramoll 4 was incubated with FMZAG-12L a protein peak was obtained with D-glucose 0,3 M specific elution which showed the same eletrophoretic pattern observed to Cramoll 1,4 before incubation; Cramoll 3 did not bind FMZAG-12L. Platelet glycoproteins were specifically eluted from immobilized isolectins with different eletrophoretic pattern. The results showed that Cramoll 1,4 and Cramoll 3 have different binding sites and could be used to characterize carbohydrate polymers or glycoproteins.

Keywords: *Cratylia mollis* lectin, platelet glycoproteins, levan, magnetized levan.

1. Introduction

Lectins are proteins that specifically and reversibly bind mono or oligosaccharides, are not products of an immune response and have not catalytic activity (Fenton-Navarro et al., 2003). They are normally found in a variety of organisms, being involved in numerous cellular processes (Hong, Cassely, Mechref, & Novotny, 2001).

On account of their ability to specifically bind cell surface carbohydrate which play important roles in biological recognition, lectins have, during the recent past, found extensive applications for differentiating between cells. The reason why lectins find applications across such a broad spectrum is that they are not only ubiquitously distributed in nature, and occur in abundance in plants, especially seeds of legumes, but also because of the ease of their purification to homogeneity and wide repertoire of carbohydrate specificities that they exhibit (Surolia & Satish, 2001).

A number of cellular recognition events are thought to involve the specific binding of a structure expressed on one cell surface to a particular receptor on another cell (Yamamoto, Ito, Yasukawa, Konami, & Matsumoto, 2005). Sugar moieties on the cell surface play important roles in these cellular recognition events. Therefore, it is important to understand the molecular bases for the specificity and affinity of these interactions, especially to assess the structures of sugar chains required for interaction with the lectins (Yamamoto et al., 2005). Conventional hapten inhibitions of haemagglutination using various sugars and sugars derivatives as inhibitors and affinity chromatography on immobilized lectin columns are useful assays to study the carbohydrate-binding specificities of lectins (Surolia & Satish, 2001; Yamamoto et al., 2005).

Studies of lectin effects on platelet functions have shown that some of them are able to stimulate platelet aggregation and agglutination (Samal, Timoshenko, Loiko, Kaltner, & Galbuis, 1998) or to evaluate serotonin secretion (Smirnova & Khaspekova, 1998). *Canavalia ensiformis* lectin (Concanavalina A, Con A) showed to be able in react with glycoproteins (GP) Ib and IIIa (Ganguly, Could, & Sidhu, 1979) as well as to isolate GP III (Clemetson, Pfueller, Luscher, & Jenkins, 1997; Howard, Shulman, Sadanandan, & Karpakitin, 1982) while *Lens culinaris* lectin was able to purify GP IIB-IIIa.

Levan is a fructose polymer from transfructosylation of sucrose by action of levansucrase. It is composed by β -2,6 linkage in the main chain and β -2,1 in the side chain (Kang, Lee, Lim, Jang, & Lee, 1998). Applications for levan in food industries, as an emulsifier, formulation aid, stabilizer, thickener, surface-finishing agent, encapsulating agent, and as a carrier of flavours and fragrances have been suggested (Calazans, Lopes, Lima, & França, 1997). Among the principal producing of levan, the bacteria *Zymomonas mobilis* is the one that it produces in wide scale (Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999) and ethanol distilleries produce levans as a valuable bioproduct (Bekers et al., 2002).

Cratylia mollis (camaratu bean), is a native forage from the Semi-Arid Region of North Eastern Pernambuco State, Brazil, and belongs to Fabaceae family, taxonomically related with *Canavalia ensiformis* specie which Con A is obtained. *C. mollis* seeds have been considered an important lectin font, giving multiple molecular forms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4) with different carbohydrate specificities (Correia & Coelho, 1995; Paiva & Coelho, 1992). Cramoll 1, Cramoll 2 and Cramoll 4 are specific for glucose/mannose; Cramoll 3 is galactose specific. A preparation containing Cramoll 1 and Cramoll 4 (Cramoll 1,4) presents a high hemagglutinating

activity when compared with the isolated Cramoll 1 and Cramoll 4. Cramoll 1,4 and Cramoll 1 were used with success in different biological assays as well as in structural and electrochemical studies (Andrade, Correia, Coelho, Nascimento, & Santos-Magalhães, 2004; Baszkin, Boissonnade, Santos-Magalhães, Carvalho Jr, Correia, & Coelho, 2000; Beltrão, Correia, Figueredo-Silva, & Coelho, 1998; Lima, Correia, Cechinel, Sampaio, Owen, & Coelho, 1997; Maciel, Araújo-Filho, Nakazawa, Gomes, Coelho, & Correia, 2004; Nascimento, Coelho, Correia, & Cunha, 2002; Souza, Correia, Pessoa, Kennedy, Lima-Filho, & Coelho 2001; Souza, Dutra, Correia, Pessoa, Lima-Filho, & Coelho, 2003; Tavares, Caracelli, Burger, Correia, Coelho, & Oliva, 1996).

The aim of this work was to evaluate the pattern of carbohydrate binding site of Cramoll 1,4 and Cramoll 3, free or immobilized to Sepharose, using levans, magnetized levans and platelet glycoprotein preparations.

2. Experimental

2.1 Materials

Sephadex G-75 and CM-Cellulose were purchased from Sigma. Sepharose 2-B was from Pharmacia Fine Chemicals.

Cramoll 1,4, and Cramoll 3 were obtained following the previously established protocol (Correia & Coelho, 1995; Paiva & Coelho, 1992).

Rabbit plasma was obtained from healthy adult animals by puncture of the marginal ear vein.

Levans (L) denominated ZAG-12L, Z-1-81L and ZAPL were produced by *Z. mobilis* strain (ZAG-12, Z-1-81 ZAP) that belonging to the Department of Antibiotics collection; and CP-50L was obtained by 50 % ethanol fractionated precipitation of ZAG-12. Ferromagnetic ZAG-12L (FMZAG-12L) was obtained by the method previously described (Carneiro-Leão, Oliveira, & Carvalho Jr, 1991).

All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2 Protein determination

The protein content was carried out by the method described by Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall (1951) using bovine serum albumin as standard. Reading of the absorbance at 280 nm was used to determine the relative concentration of the column eluteds.

2.3 Hemagglutinating activity and inhibition of lectin induced hemagglutination

Lectin sample solutions (50 µl) serial 2-fold diluted in 0.15 M NaCl, in microtiter U-plates, were incubated with of a 2.5 % suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes (50 µl), and the titer, defined as the lowest sample dilution which showed hemagglutination, was read after 45 min incubation according to Correia & Coelho (1995). Hemagglutinating activity (HA) corresponded to the reciprocal of titer and specific HA (SHA) corresponded to HA divide by the protein concentration.

HA inhibition (HAI) was assayed by lectin samples solutions (50 µl) serial 2-fold diluted in 50 µl of levan solutions (25, 50, 100 and 200 mM) followed by a 15 min

incubation and addition of the erythrocyte suspension. The HAI was obtained by HA read after 45 min.

2.4 Binding evaluation of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 to FMZAG-12L

Cramoll 1,4 and Cramoll 3 (1 ml) were incubated with FMZAG-12L particles (1 ml) with 2 h of constant agitation, at 4 °C. The unbound proteins were eluted by 0.15 M NaCl several washes (1 ml). The adsorbed lectins were eluted with 0.3 M D-glucose (Cramoll 1,4 incubation) or 0.3 M D-galactose (Cramoll 3 incubation) solutions in 0.15 M NaCl with several washes (1ml each wash); fractions with the highest absorbance were pooled and analysed by HA and PAGE for native and basic proteins according Reisfeld, Lewis, & Williams (1962). The supernatant from each wash were obtained using a 6,000 Oe magnetic camp. The support was re-equilibrated with 0.5 M followed by 0.15 M NaCl after biospecific elution.

2.5 Preparation of rabbit platelets

Rabbit plasma (10 ml) were collected in plastic tubes in presence of Alsever (1,6 ml for 1ml blood) and the Platelet Rich Plasma (PRP) was obtained by centrifugation (20 min, 3,0000 x g). The PRP (5 ml, 2.8×10^8 of platelets) were washed according to modified Tangem method (Tangem et al., 1971) by molecular exclusion chromatography in a column (8.8 x 2.2 cm) containing Sepharose 2-B (20 ml), equilibrated with 200 ml of Tyrode buffer (0.15 M NaCl, 0.0035 M KCl, 0.012 M NaHCO₃, 0.075 M NaH₂PO₄, 0.002 M CaCl₂, 0,05 M Dextrose and 2,5 g gelatine in 1 l distilled water), at 50 ml/h flux. Following, washed platelets were eluted with Tyrode

buffer and fractions (2ml) were collected in plastic tubers. Spectrophotometer read (405 nm) was performed and fractions rich in platelet were pooled (washed platelets).

The washed platelets were dissolved in Tyrode buffer containing 1 % of Triton X-100, disrupted by vigorous agitation by 5 min, followed rest (10 min at 4 °C) according Santoro, Barbaro, Da Rocha, Torquato, Hirata, & Sano-Martins (2004). The disrupted platelets were centrifuged (12,100 x g, 30 min at 4 °C). The supernatant named crude platelet preparation (CPP) was precipitated by ammonium sulphate fractionation 0 to 60 % ; the precipitate was resuspended in 0.15 M NaCl, centrifuged (12,100 x g, 30 min at 4 °C) and dialysed in NaCl 0.15 M (PF60). Preparations were kept at 4 °C until used.

2.6 Preparation of the Cramoll 1,4- Sepharose and Cramoll 3- Sepharose affinity supports

Sepharose CL-4B activated with cyanogen bromide was equilibrated according the manufacturer's recommendations. The lectins were immobilized to Sepharose followed the method described by Lima et al. (1997) to Cramoll 1,4 and that described by Paiva et al. (2003) to Cramoll 3.

2.7 Affinity chromatography for evaluation platelet glycoproteins binding

Columns (6.0 x 1.0 cm) were packed with 1 ml of Cramoll 1,4-Sepharose or Cramoll 3-Sepharose and were equilibrated with 0.15 M NaCl. Samples (1ml) of CPP (1.75 mg/ml with A 280 nm of 2.638) and PF60 (2.102 mg/ml with A 280 nm of 2.5) were applied to columns and re-circulated at least three times. The columns were

washed with 0.15 M NaCl and fractions (1 ml) were collected until the absorbance of washing at 280 nm reached zero. Elution was performed with 0.3 M D-glucose (Cramoll 1,4-Separose) or 0.3 M D-galactose (Cramoll 3-Separose) solutions in 0.15 M NaCl. Fractions containing the highest absorbance were pooled and analysed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

3. Results and discussion

3.1. Binding evaluation of *C. mollis* lectins to levans

The previous studies of Cramoll 1,4 specificity using different monosacharides showed that D-fructose solution inhibited Cramoll 1,4 HA at the same proportion than D-mannose solution; 6.2 mM of carbohydrates was required to inhibit 4 HA units. This fact justify the evaluation of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 binding to different levans for the investigation of possible analogies or differences between the isolectin binding sites. According Calazans (1997), in a same temperature of production, different *Z. mobilis* strains produce levans with distinct molecular weight. Besides, a same *Z. mobilis* strain submitted to different temperatures or precipitation by fractionation technique using solvents also results in levans with distinct molecular weight. The results showed (table 1) that the levans binding differently to lectins. While ZAG-12L and ZAPL were able to inhibit the isolectins, Z-181L and CP-50L, obtained by fractionation with 50% ethanol precipitation in the hydroalcoholic mixture using ZAG-12 *Z. mobilis* strain, did not; the results are a mean of four assays. Few works have been described in literature about

levans and lectins, however distinct levans could be useful and cheap tool for a best characterization of carbohydrate binding site of lectins. Mo, Winter, Van Dame, Peumans, Misaki, & Goldstein (2001) compared the carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin with Con A (lectin glucose/manose specific, structurally similar to Cramoll 1,4) observed that Con A bind to D-fructofuranosyl groups present in plant and microorganism levans whereas banana lectin react with only microorganism levans.

3.2. Evaluation of the capacity of FMZAG-12L to specific binding *C. mollis* lectins

The use of magnetized support has been proposed as an easy and cheap method of biomolecule purification. Supports can be conjugated to magnetite (Fe_3O_4) and been immediately recovered by the magnetic strength without lost of protein activity (Carneiro-Leão et al., 1991). The inhibition of lectins by levans suggested that magnetized levans could be potential affinity support to investigation or purification lectins that recognize fructose. Evaluation of the specific binding of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 to FMZAG-12L was based by the success to obtain magnetized FMZAG-12L and by the high inhibition of the lectins by ZAG-12L. When FMZAG-12L particles were used as affinity support to analyze the specific binding of Cramoll 1,4 (absorbance at 280 nm 1.5) by batch assay a yield of 36.67 % of retained protein was obtained (Fig. 1), none protein was specific binding to FMZAG-12L when Cramoll 3 was used. Characterization of the lectin binding site have been studied by many workers with finality to more understand these versatile proteins (Banerjee, Chaki, Bhowal, &

Chatterjee, 2004; Hong et al., 2001; Mo et al., 2001; Roy, Sardar, & Gupta, 2005; Yamamoto et al., 2005).

3.3. Evaluation of Platelet glycoprotein binding to Cramol 1,4-Sepharose and Cramoll 3-Sepharose

The two principal reactions with platelets, adhesion and aggregation, were mediated principally by membrane glycoproteins which have function at platelet surface as receptors to active biological compounds with high and low molecular weight (Mazurov & Vasiliev, 1994). Rabbit and human platelets share several features in common, which make rabbit a useful model for studying platelet physiology (Packham, Rand, & Kinlough-Rathbone, 1992). Santoro et al. (2004) had used Con A-Sepharose as affinity support to purify rabbit platelet glycoprotein to characterize and compare them with human platelet. *C. mollis* lectins immobilized to Sepharose were efficient to isolate glycoproteins from different sources (Lima et al., 1997; Paiva et al., 2003). Affinity chromatography of the two platelet preparations showed a specific bind to Cramoll 1,4 and Cramoll 3 (Fig. 2). It can be observed a similar profile to Cramoll 1,4 and Cramol 3 chromatographic curves. However, a distinct patten was observed when the different platelet preparations were used; preparation PF60 showed two adsorbed peak, while CPP showed only one peak. The electrophoretic patten of these peaks was distinct (Fig. 3).

4. Conclusions

Carbohydrates polymers and glycoproteins could be used to characterize lectin binding sites. Cramoll 1,4 and Cramoll 3 have discriminate between levans with distinct molecular wheight and levan could be useful support to purify lectins that recognize fructose demonstrated by the binding of Cramoll 1,4 to magnetized levan. The results with platelet preparations showed that the affinity chromatographies were efficient in purify platelet glycoproteins and the lectin supports resolved the distinct platelet preparations in different way.

It is the first communication of magnetized levan to purify lectin.

Acknowledgments

This research was supported by the Brazilian National for Scientific and Technological Development (CNPq) and by Science and Technologic Help Foundation at Pernambuco State (FACEPE). We thank Maria Barbosa Reis da Silva for her technical assistance.

References

- Andrade, C. A. S., Correia, M. T. S., Coelho, L. C. B. B., Nascimento, S., & Santos-Magalhães, N. S. (2004). Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutic*, 278, 435-445.
- Ananthalakshmy, V. K., & Gunasekaran, P.(1999). Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archieves of Biology and Technology*, 42, 291-297.
- Banerjee, S., Chaki, S.; Bhowal, J., & Chatterjee, B. P. (2004). Mucin bindind mitogenic lectin from fresh water Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 421, 125-134.

Baszkin, A., Boissonnade, M., Santos-Magalhães, N. S., Carvalho Jr, L. B., Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (2000). *Cratylia mollis* lectin at air-aqueous solution interface: adsorption and lectin interactions. *Colloids and Surfaces*, 17, 191-201.

Bekers, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., & Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, 38, 701-706.

Beltrão, E. I. C., Correia, M. T. S., Figueredo-Silva, J., & Coelho, L. C. B. B. (1998) Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 74, 125-134.

Calazans, G. M. T. (1997). *Produção de levana para uso clínico*. 115f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Calazans, G. M. T., Lopes, C. E., Lima, R. M. O. C., & França, F. P. (1997) Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, 19, 19-21.

Carneiro-Leão, A. M. A., Oliveira, E. A., & Carvalho Jr, L. B. (1991). Immobilization of protein on ferromagnetic dacron. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 31, 53-58.

Clemetson, K. J., Pfueller, S. L., Luscher, E. F., & Jenkins, C. S. P. (1997). Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochimica Biophysica Acta*, 464, 493-508.

Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (1995). Purification of a glucose/mannose specific, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Applied Biochemistry Biotechnology*, 55, 261-273.

Fento-Navarro, B., Arreguín-L, B., García-Hernández, E., Heimer, E., Aguilar, M. B., Rodríguez-A, C., & Arreguín-Espinosa, R. (2003). *Toxicon*, 42, 525-532.

- Ganguly, P., Could, N. L., & Sidhu, P. (1979). Interaction of lectins with human platelets? Effects on platelets stimulation by thrombin and ristocetin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 586, 574-586.
- Hong, M., Cassely, A., Mechref, Y., & Novotny, M. V. (2001). Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 752, 207-216.
- Howard, L., Shulman, S., Sadanandan, S., & Karpakitin, S. (1982). Crossed immunoelectrophoresis of human platelet membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 8331-8335.
- Kang, S. K., Lee, S. O., Lim, Y. S., Jang, K. L., & Lee, T. H. (1998). Purification and characterization of a novel levanotriose-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 27, 159-166.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lima, V. L. M., Correia, M. T. S., Cechinel, Y. M. N., Sampaio, C. A. M., Owen, J. S., & Coelho, L. C. B. (1997). Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, 33, 27-32.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Maciel, E. V. M., Araújo-Filho, V. S., Nakazawa, M., Gomes, Y. M., Coelho, L. C. B., & Correia, M. T. S. (2004). Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32, 57-61.

Mazurov, A.V., & Vasiliev, S.A. (1994). Structure and functions of platelet membrane glycoproteins. *Gematology Transfuziology*, 39, 29-34.

Mo, H., Winter, H. C., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Misaki, A., & Goldstein, I. J. (2001). Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin. *European Journal Biochemistry*, 268, 2609-2615.

Nascimento, C. O., Coelho, L. C. B. B., Correia, M. T. S., & Cunha, M. G. C. (2002). Liquid-liquid extraction of lectin from *Cratylia mollis* seeds with reversed micelles. *Biotechnology Letters*, 24, 905-907.

Packham, M. A., Rand, M. L., & Kinlough-Rathbone, R. L. (1992). Similarities and differences between rabbit and human platelet characteristics and functions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 103, 35-54.

Paiva, P. M. G., & Coelho, L. C. B. B. (1992). Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (amaruto bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 36, 113-118.

Paiva, P. M. G., Souza, A. F., Oliva, M. L. V., Kennedy, J. F., Cavalcanti, M. S. M., Coelho, L. C. B. B., & Sampaio, C. A. M. (2003). Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Bioresource Technology*, 88, 75-79.

Reisfeld, R. A., Lewis, V. J., & Williams, D. E. (1962). Disk electrophoresis of basic and peptides on polyacrilamide gels. *Nature*, 195, 281-283.

Roy, I., Sardar, M., & Gupta, M. N. (In press 2005). Cross-linked alginate-guar gum beads as fluidized bed affinity media for purification of jacalin. *Biochemical Engineering Journal*.

Samal, A. B., Timoshenko, A. V., Loiko, E. N., Kaltner, J., & Galbuis, H. J. (1998). 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*, 63, 516-522.

Santoro, M. L., Barbaro, K. C., Da Rocha, T. R. F., Torquato, R. J. S., Hirata, I. Y., & Sano-Martins, I. S. (2004). Simultaneous isolation of platelet factor 4 and glycoprotein IIb-III-a complex from rabbit platelets, and characterization of specific chicken antibodies to assay them. *Journal of Immunological Methods*, 284, 55-72.

Smirnova, I. V., & Khaspekova, S. G. (1998). Interaction of wheat germ agglutinin and concanavalin A with platelets, stimulation of platelet functional reactions and binding with membrane glycoproteins. *Biochemistry*, 63, 710-718.

Souza, S., Correia, M. T. S., Pessoa, M. M. A., Kennedy, J., Lima-Filho, J. L., & Coelho, L. C. B. B. (2001). A novel model to characterize the double electric layer of lectin from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. *Carbohydrate Polymers*, 46, 191-193.

Souza, S. R., Dutra, R. F., Correia, M. T. S., Pessoa, M. M. A., Lima-Filho, J.L., & Coelho, L. C. B. B. (2003). Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Bioresource Technology*, 88, 255-258.

Surolia, A., & Satish, P. (2001). Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49, 625-640.

Tangem, O., Berman, H. J., & Marfey, P. (1971). Gel filtration. A new technique for separation of blood platelets from plasma. *Thrombosis Diagnostic Haemorrhagic*, 25, 268-278.

Tavares, G. A., Caracelli, I., Burger, R., Correia, M. T. S., Coelho, L.C.B.B., & Oliva, G. (1996). Crystallization and preliminary X-Ray studies on the lectin from the seeds of *Cratylia mollis*. *Acta Crystallographica*, 52, 1046-1047.

Yamamoto, K., Ito, S., Yasukawa, F., Konami, Y., & Matsumoto, N. (2005). Measurement of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. *Analytical Biochemistry*, 336, 28-38.

Table 1

Hemagglutinating activity inhibition of Cramoll 1,4 and Cramoll 3 by levans

Levan	Cramoll 1,4	Cramoll 3
ZAG-12	32	64
Z-1-81	-	-
ZAP	32	32
CP-50	-	-

Hemagglutinating activity: Cramoll 1,4 = 4096; Cramoll 3 = 512

Fig. 1. Schematic curve of Cramoll 1,4 elution from FMZAG-12L particles (A) and electrophoresis to native and basic protein of a sample (100 μ g) of aliquots 12 and 13 (B).

Fig. 2. Affinity chromatography of platelet glycoprotein preparations, crude preparation (A and B) and ammonium sulphate fractionation (C and D), on Cramoll 3-Sepharose (A and C) and Cramoll 1,4-Sepharose (B and D), in 0.15 M NaCl, at a flow rate of 10 ml/h and 1 ml of fractions.

Fig. 3. SDS-PAGE of adsorbed fractions (100 μ g) from the affinity chromatography of platelet glycoprotein preparations, crude preparation (1 and 2) and ammonium sulphate fractionation (3, 4 and 5), on Cramoll 1,4-Sepharose (1, 3 and 4) or Cramoll 3-Sepharose (2 and 5). Molecular mass marker (6). The 7.5 % gel was stained with Coomassie Brilliant Blue.

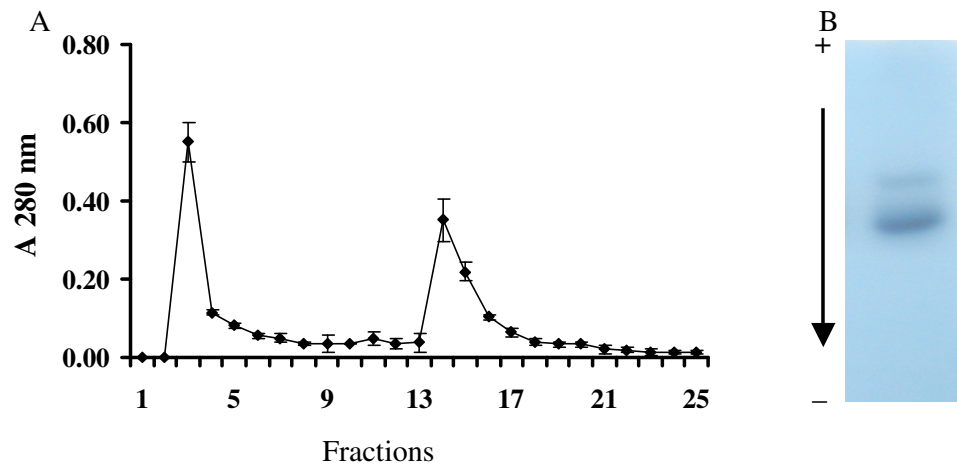


Figure 1

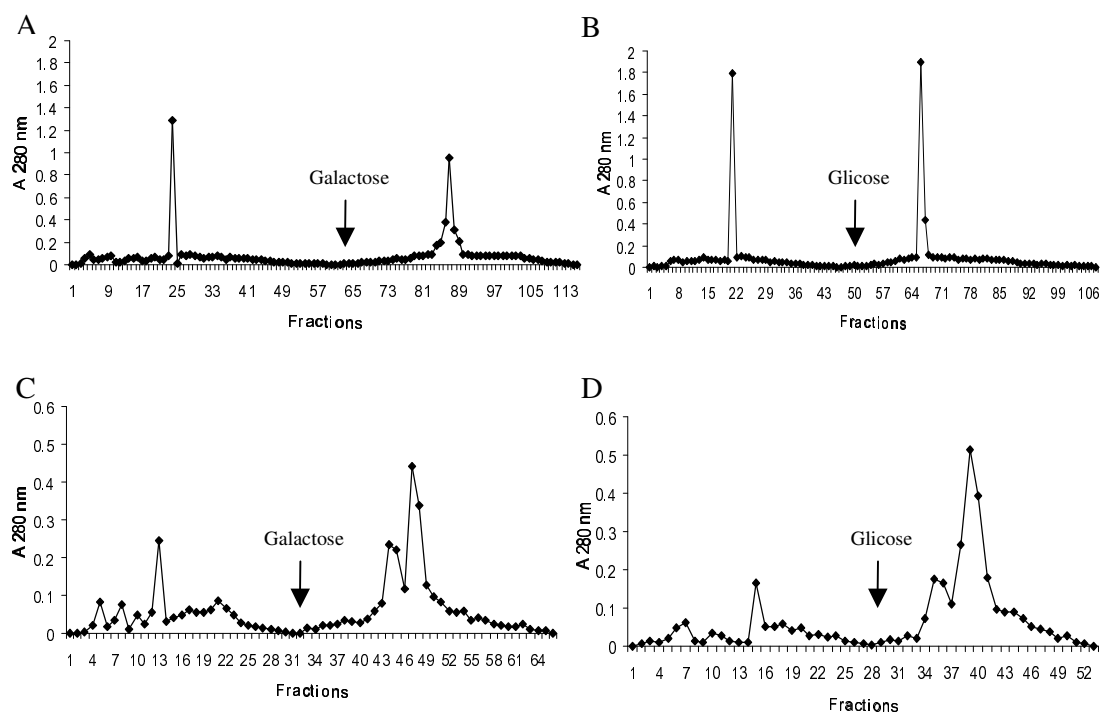


Figure 2

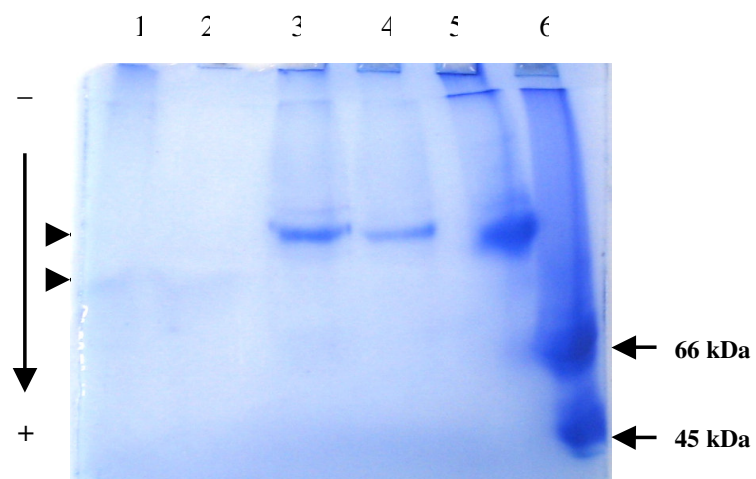


Figure 3

5 CONCLUSÕES

5.1 As diferentes levanas testadas inibiram de modo distinto as atividades das isolectinas de *C. mollis*.

5.2 Cramoll 1,4 ligou-se bioespecificamente a ZAG-12L magnetizada demonstrando a capacidade deste polímero como suporte de afinidade para purificação de lectinas.

5.3 Cramoll 1,4-Sepharose e Cramoll 3-Sepharose foram eficientes na purificação de glicoproteínas de plaquetas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. A. S., CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B., NASCIMENTO, S., SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutic**, 278, 435-445, 2004.

ANANTHALAKSHMY, V. K., GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 42, 291-297, 1999.

BAKALOVA, R., OHBA, H. Purification of normal lymphocytes from leukemic T-cells by lectin-affinity adsorbents-correlation with lectin-cell binding. **Cancer Letters**, 192, 59-65, 2003.

BANERJEE, S., CHAKI, S., BHOWAL, J., CHATTERJEE, B. P. Mucin bindind mitogenic lectin from fresh water Indian gastropod *Belamyia bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 421, 125 -134, 2004.

BEKERS, M., LAUKEVIES, J., UPITE, D., KAMINSKA, E., VIGANTS, A., VIESTURS, U., PANKOVA, L., DANILEVICS, A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. **Process Biochemistry**, 38, 701-706, 2002.

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

BELTRÃO, E. I. C., MEDEIROS, P. L., RODRIGUES, O. G., FIGUEREDO-SILVA, J., VALENÇA, M. M., COELHO, L. C. B. B., CARVALHO JR, L. B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. **European Journal of Histochemistry**, 47, 139-142, 2003.

BOYD, W. C., REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **Journal Immunology**, 62, 333-339, 1949.

BOYD , W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitation activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, 119, 419, 1954.

CALAZANS, G. M. T. **Produção de levana para uso clínico**. 115f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 1997.

CALAZANS, G. M. T., LOPES, C. E., LIMA, R. M. O. C., FRANÇA, F. P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, 19, 19-21, 1997.

CALAZANS, G. M. T., LIMA, R. C., FRANÇA, F. P., LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, 27, 245-247, 2000.

CARTELLIERI, S., HELMHOLZ, H., NIEMEYER, B. Preparation and evolution of *Ricinus communis* agglutinin affinity adsorbents using polymeric supports. **Analytical Biochemistry**, 295, 66-75, 2001.

CATIMEL, B., PARMENTIER, S., LEUNG, L. L. K., MCGREGOR, J. L. Separation of important new platelet glycoproteins (GPIa, GPIc, GPIc-star, GPIIa e GMP – 140) by FPLC-characterization by monoclonal – antibodies and gas-phase sequencing. **Biochemical Journal**, 279, 419-425, 1991.

CAWThERN, K. M., DILORENZO, M. E, LOCK, J. B. Antiplatelet Agents in Tissue Factor-Induced Blood Coagulation. **Blood**, 97, 2314-2323, 2001.

CLEMETSON, K. J. Structure and function of platelet membrane glycoprotein Ib and glycoprotein v – Effects of leukocyte elastase and other proteases on platelets response to von Willebrand factor and thrombin. **European Journal of Biochemistry**, 153, 1-11,1985.

COELHO, L. C. B. B., DA SILVA, M. B. R. Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, 11, 295-300, 2000.

CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry Biotechnology**, 55, 261-273, 1995.

DE SOUZA, G. A., OLIVEIRA, P. S. L., TRAPANI, S., SANTOS, A. C. O., ROSA, J. C., LAURE, H. J., FAÇA, V. M., CORREIA, M. T. S., TAVARES, G. A., OLIVA, G., COELHO, L. C. B. B.; GREENE, L. J. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, 13, 961-972, 2003.

FENTO-NAVARRO, B., ARREGUÍN-L, B., GARCÍA-HERNÁNDEZ, E., HEIMER, E., AGUILAR, M. B., RODRÍGUEZ-A, C., ARREGUÍN-ESPINOSA, R. Purification and structural characterization of lectins from the cnidarian *Bunodeopsis antillensis*. **Toxicon**, 42, 525-532, 2003.

FRANCESCHINI, V., LAZZARI, M., CIANI, F. Identification of surface glycoconjugates in the olfactory system of turtle. **Brain Research**, 725, 81-87, 1996.

FRANCO-FRAGUAS, L., PLÁ, A., FERREIRA, F., MASSALDI, H., SUAREZ, N., BATISTA-VIERA, F. Preparative purification of soy bean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**, 790, 365-372, 2003.

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**, 586, 574-586, 1979.

GENTRY, Patricia A. Comparative aspects of blood coagulation. **The Veterinary Journal**. "In press 2003".

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**, 78, 340-348, 1986.

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

GERLACH, D., SCHLOTT, B., ZÄHRINGER, U., SCHMIDT, K-H. N-acetyl-D-galactosamine/N-acetyl-D-glucosamine-recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunology and Medical Microbiology**, 43, 223-232, 2005.

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**, 371, 163-168, 1999.

GIBBS, M., DE MOSS, R. D. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, 34, 478-479, 1951.

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

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

GOTTSCALK, I., GUSTAVSSON, P-E., ERISSON, B., LUNDAHL, P. Improved lectin mediated immobilization of human red blood cells in superporous agarose beads. **Journal of Chromatography B**, 784, 203-208, 2003.

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., HYPSE, V., VOLF, P. Lectins (hemagglutinins) in the gut of the important disease vectors. **Parasitology**, 4, 203-216, 1997.

GUISÁN, J. M., PESSELA, B. C. C., MUNILLA, R., BETANCOR, L., FUENTES, M., CARRASCOSA, A. V., VIAN, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ion exchange using poorly activated supports, an easy way for purification of large proteins. **Journal of Chromatography A**, 1034, 155-159, 2004.

HAN, Y. W. Microbial levan. **Advances in Applied Microbiology**, 35, 171-194, 1990.

HELMHOLZ, H., CARTELLIERI, S., HE, L., THIESEN, P., NIEMEYER, B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, 1006, 127-135, 2003.

HONG, M., CASSELY, A., MECHREF, Y., NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, 752, 207-216, 2001.

HUBER, A. E., VINEY, C. Supramolecular liquid crystallinity: spherical coils of levan surrounding cylindrical rods of DNA. **Physical Review Letters**, 80, 623-626, 1998.

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

KANG, S.K., LEE, S. O., LIM, Y. S., JANG, K. L., LEE, T. H. Purification and characterization of a novel levanooctase-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 27, 159-166, 1998.

KAWAGISHI, H., TAKAGI, J., TAIRA, T., MURATA, T., USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, 56, 53-58, 2001.

KENNEDY, J. F., STEVENSON, D. L., WHITE, C. A., VIKARI, L. The chromatographic behaviour of a series of fructo-oligosaccharides derived from levan

produced by fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Carbohydrate Polymers**, 10, 103-113, 1989.

KILPATRICK, David C. Animals lectins: a historical introduction and over view. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1572, 187-197, 2002.

KIM, B-Y., JEONG, J. H., PARK, K., KIM, J-D. Bioadhesive interaction and hypoglycemic effect of insulin-loaded lectin-microparticle conjugates in oral insulin delivery system. **Journal of Controlled Release**, 102, 525-538, 2005.

KOCOUREC, J., FREED, D. Lectins: Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry. **Sigma Chemical**, 7, 462, 1990.

LAKHTIN, V.M. Use of lectins in the analysis of carbohydrate moieties of glycoproteins and other natural glycoconjugates. **Biochemistry (Moscow)** 60, 131-153, 1995.

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

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia, propedeutica e clínica**. 2ª edição Medsi Editora Médica e Científica LTDA. 161-215, 1999.

MACIEL, E. V. M., ARAÚJO-FILHO, V. S., NAKAZAWA, M., GOMES, Y. M., COELHO, L. C. B. B., CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, 32, 57-61.

MASÁROVA, J., DEY E. S., CARLSSON, J., DANIELSSON, B. Novel peptide surface for reversible immobilization of concanavalin A. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 60, 163-170, 2004.

MAZUROV, A.V., VASILIEV, S.A. Structure and functions of platelet membrane glycoproteins. **Gematology Transfuziology**, 39, 29-34, 1994.

MIYATA, T., JIKIHARA, A., NAKAMAE, K., HOFFMAN, A. S. Preparation of reversibly glucose-responsive hydrogels by covalent immobilization of lectin in polymer networks having pendant glucose. **Journal of Biomaterials Science**, 15, 1085-1098, 2004.

MO, H., WINTER, H. C., GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a neu5α2-6Galβ1-4GlcNAc specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus aquamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, 275, 10623-10629, 2000.

MOLCHANOVA, V., CHIKALOVETS, I., LI, W., KOBELEV, S., KOZYREVSKAYA, S., BOGDANOVICH, R., HOWARD, E., BELOGORTSEVA, N. New GlcNAc/GalNAc specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**. "In press 2004".

MONSAN, P., BOZONNET, S., ALBENNE, C., JOUCLA, G., WILLEMOT, R. M., SIMEÓN, M. R. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, 11, 675-685, 2001.

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**, 396, 99-105, 2001.

NGAI, P. H. K., NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 314, 988-993, 2004.

OOI, V. E. C., SUN, S. S. M., OOI, L. S. M. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandaceae). **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 36, 1440-1446, 2004.

OLIVEIRA, M. L., BELTRAMINI, L. M., DE SIMONE, S. G., BRUMANO, M. H. N., SILVA-LUCA, R. A., NAKAEMA, M. K. K.; PIRES, C. V., OLIVEIRA, M. G. A. Purification and partial characterization of a lectin from *Caesalpinia tinctoria* Domb, ex Dc fruits. **Brazilian Journal Plant Physiology**, 15, 119-122, 2003.

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

PATSCHEKE, H., BROSSMER, R., WORNER, P. D-Galactose-Binding Lectins Induce a Differential Response of Blood Platelets. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 75, 200-206, 1977.

PEUMANS, W. J., SMEETS, K., VAN NERUM, K., VAN LEUVEN, F., VAN DAMME, E. J. Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium porrum* L.) flowers. **Planta**, 201, 298-302, 1997.

QUIOCHO, F. A. Carbohydrate-binding proteins: tertiary structures and protein-sugar interactions. **Annual Review Biochemistry**, 55, 287-315, 1986.

RABIJNS, A., VERBOVEN, C., ROUGÉ, P., BARRE, A., VAN DAMME, E. J., PEUMANS, W. J., DE RANTER, C. J. Structure of a legume lectin from the bark of *Robinia pseudoacacia* and its complex with N-acetylgalactosamine. **Proteins**, 44, 470-478, 2001.

RAHMAN, M. A., KARSANI, S. A., OTHMAN, I., RAHMAN, P. S. A., HASHIM, O. H. Galactose-binding lectin from the seeds of champedak (*Artocarpus integer*): sequences of its subunits and interactions with human serum glycosylated glycoproteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 295, 1007-1013, 2002.

RAMASAMY, I. Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. **Oncology Hematology**, 49, 1-35, 2004.

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

REMANI, P., PILLAI, K. R., HASEENABEEVI, V. M., ANKATHIL, R., BHATTATHIRI, M., NAIR, M. K., VIJAYAKUMAR, T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology. **Neoplasma**, 41, 39-42, 1994.

SANGILIYANDI, G., KANNAN, T. R., CHANDRA RAJ, K., GUNASEKARAN, P. Separation of levan-formation and sucrose-hydrolysis catalyzed by levansucrase of *Zymomonas mobilis* using in vitro mutagenesis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 42, 375-379, 1999.

SANTOS, A. C. O., PEIXOTO, C. A., COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**, 35, 613-618, 2004.

SARUI, H., NAKAYAMA, T., TAKEDA, N., ISHIZUKA, T., YASUDA, K. Alphafetoprotein producing male breast cancer accompanied with hepatocellular carcinoma: assessment by lectin-affinity profile. **The American Journal of the Medical Sciences**, 322, 369-372, 2001.

SATISH, Posettihalli R., SUROLIA, Avadhesh. **Journal of Biochemical and Biophysical methods**, 49, 625-640, 2001.

SIMMS, P. J., BOYKO, W. J., EDWARDS, J. R. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. **Carbohydrate Research**, 208, 193-198, 1990.

SHARON, N., LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **Trends of Biochemical Science**, 12, 488-491, 1987.

SHARON, N., LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, 2, 1-19, 2001.

SHIBUYA, A. Childhood hypoplastic anemia with sugar chain anomaly of red cell membranes. **Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society**, 43, 597-604, 2001.

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**, 63, 710-718, 1998.

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

STRATHMANN, M., WINGENDER, J., FLEMMING, H-C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiological Methods**, 50, 237-248, 2002.

SULTAN, N. A. M., KENOTH, R., SWAMY, M. J. Purification, physicochemical characterization, saccharide specificity and chemical modification of a Gal/GalNac specific lectin from the seeds of *Trichosanthes dioica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 432, 212-221, 2004.

SUROLIA, A., SATISH, P. Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 49, 625-640, 2001.

SUVACHITTANONT, W., JARANCHAVANAPET, P. Mitogenic Effect of *Parkia speciosa* seed lectin on human lymphocytes. **Planta Médica**, 66, 699-704, 2000.

TASUMI, S., YANG, W-J., USAMI, T., TSUTSUI, S., OHIRA, T., KAWAZOE, I., WILDER, M. N., AIDA, K., SUZUKI, Y. Characteristics and primary structure of a galectin in the skin mucus of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Developmental and Comparative Immunology**, 28, 325-335, 2004.

TORTI, M., RAMASCHI, G., MONSTSARRAT, N., SINIGAGLI, F., MAUCO, G. Evidence for a glycoprotein IIb, IIIa independent and aggregation – Independent mechanism of phosphatidylinositol 3', 4' – Biphosphate synthesis in human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, 270, 13179-13185, 1995.

TORTI, M., BALDUINI, C., CANOBBIO, I. Signalling through the platelet glycoprotein Ib-V-IX complex. **Cellular Signalling**. “In press 2004”.

VATTUONE, M. A., SAMPIETRO, A. R., ISLA, M. I., QUIROGA, E. N. An N - acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, 160, 659-667, 2001.

VERRASTRO, T., LORENZI, T. F., NETO, S. W. **Hematologia e hemoterapia - fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica** - 1ª reimpressão - editora Atheneu, Rio de Janeiro, 181-191, 1998.

VINA, I., KARSAKEVICH, A., GONTA, S., LINDE, R., BEKERS, M. Influence of some physicochemical factors on the viscosity of aqueous levan solutions of *Zymomonas mobilis*. **Acta Biotechnology**, 18, 167-174, 1998.

VINHAS, G. M. **Estudo da produção e do fracionamento de levanas produzidas por *Zymomonas mobilis***. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1999.

WILLIAMS, W. J., BEUTLER, E., ERSLEV, A. J., LICHTMAN, M. A. **Hematology**, cap. 128 Composition of platelets. 4ªed, Mc Grw - Hill, 1191, 1990.

WINTER, H. C., GOLDSTEIN, I. J. Facile preparation of the α -Gal-recognizing Griffonia simplicifolia I-B4 isolectin. **Carbohydrate Research**, 339, 153-155, 2004.

WRÓBLEWSKI, S., BERENSON, M., KOPECKOVÁ, P., KOPECEK, J. Potential of lectin-N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-drug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, 74, 283-293, 2001.

YAMAMOTO, K., ITO, S., YASUKAWA, F., KONAMI, Y., MATSUMOTO, N. Measure ment of the carbohydrate-binding specificity of lectins by a multiplexed bead-based flow cytometric assay. **Analytical Biochemystry**,336,28-38, 2005.

ZENTENO, R., VASQUEZ, L., SIERRA, C., PEREYRA, A., SLOMIANNY, M. C., BOUQUELET, S., ZENTENO, E. Chemical characterization of the lectin from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 125, 243-250, 2000.

7 ANEXO

Guide for Authors

Submission of Papers to Carbohydrate Polymers

Contributors should submit their manuscripts electronically via the Author Gateway <http://authors.elsevier.com>. **This is the preferred method of submission, and facilitates processing of your manuscript.** The postal system is reserved solely for authors with no access to internet facilities. In such cases, the author should submit one original copy of the manuscript, plus two photocopies and a copy on disk, to one of the following:

Europe and Rest of the World:

Professor J. R. Mitchell, School of Biosciences, Division of Food Sciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, LE12 5RD, UK

Or:

Professor J. F. Kennedy, Birmingham Carbohydrate and Protein Technology Group, School of Chemical Sciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK

North America:

Dr P. A. Sanford, 2822 Overland Avenue, Los Angeles, CA 90064, USA

If you submit electronically via the Author Gateway, do not send another copy to the Editors either by e-mail or post. Submit to one editor only. Authors are requested to submit with their manuscripts, the names and contact details (including e-mail address) of three potential referees.

It is the authors responsibility to ensure that papers are written in clear and comprehensible English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission. English language help service: Upon request, Elsevier will direct authors to an agent who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact authorsupport@elsevier.com for further information.

All papers will be independently refereed.

Any revised papers returned later than three months after being sent the referees' comments will be treated as a new submission.

Submission of a paper implies that it has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher.

Types of Contributions

Research papers; review articles; short communications; book reviews; letters to the Editors.

Manuscript Preparation

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. A corresponding author should be identified who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and complete postal address.** Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Paper Length: Research papers should not exceed 10000 words of text plus appropriate illustrations and tables. Review papers should not exceed 15000 words plus illustrations and tables. Short communications should not exceed 2000 words plus illustrations and tables.

Abstracts: A concise and factual abstract is required (about 100-150 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Text: Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page

Illustrations – General Guidelines (only if not submitting electronically via the Author Gateway)

All illustrations should be provided in camera-ready form, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching.

Line drawings: Good quality printouts on white paper produced in black ink are required. All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e. g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35mm slides. Polaroid colour prints are not suitable.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript (e. g. in graphs)

Proofs

When your manuscript is received at the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'. One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility. A form with queries from the copy editor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated. Return corrections within two working days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted. Proofs are to be returned to the Log-in Department, Elsevier Ltd, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co Clare, Ireland.

Offprints

Twenty five offprints will be supplied free of charge. Additional offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders for reprints (produced after publication of an article) will incur a 50% surcharge.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/locate/permissions>.

Author Enquiries

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's [Author Gateway](#). Other questions or queries will also be dealt with via the website <http://authors.elsevier.com>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication. **Do not contact the editors – they do not have access to this information.**

***Carbohydrate Polymers* carries no page charges**

Alves, Gilvanely Cardoso

Avaliação do padrão de ligação de isolectinas de *Cratylia mollis* a levanas e glicoproteínas de plaquetas / Gilvanely Cardoso Alves. – Recife : O Autor, 2005.

56 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Bioquímica - Macromoléculas. 2. *Cratylia mollis* – Ligação de isolectinas (Cramoll 1, 2, 3 e 4) às levanas livres e magnetizadas – Inibição da atividade hemaglutinante. 3. Ligação da lectina com glicoproteínas de plaquetas – Cromatografia. 4. Isolectinas – Caracterização de polímeros de carboidratos ou glicoproteínas. I. Título.

**577.1
572**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-156**

FICHA DE APROVAÇÃO

Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Tereza dos Santos Correia - (Presidente) - Depto. de
Bioquímica/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Vera Lúcia de Menezes Lima - (Membro Interno) - Depto. de
Bioquímica/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho - (Membro Interno) -
Depto. de Bioquímica/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo - (Membro Externo) - Depto. de
Bioquímica/UFPE

Data de Aprovação 28 / 02 / 2005.

Ata da defesa de dissertação da mestranda **Gilvanely Cardoso Alves**, realizada em 28 de fevereiro de 2005, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 09:20 minutos do dia 28 de fevereiro de 2005, foi realizada, no Auditório Prof. Marcionilo Lins, a defesa de dissertação de **Gilvanely Cardoso Alves**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica/UFPE. Iniciando, a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, Coordenadora do curso supra citado, fez a apresentação da aluna, de sua orientadora, Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, da sua co-orientadora Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Maria Tereza dos Santos Correia, na qualidade de Presidente, Vera Lúcia de Menezes Lima, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, e Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, as quatro do Depto. de Bioquímica/UFPE, sendo a última externa ao Programa. Após as apresentações, a Sra. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: "**Avaliação do Padrão de Ligação de Isolectinas de *Cratylia mollis* a Levanas e Glicoproteínas de Plaquetas**", 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. A aluna procedeu a sua apresentação em 25 (vinte e cinco minutos). Após a defesa, a Sra. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para a Profa. Dra. Adriana Carla Cavalcante Argolo, em seguida para a Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, e finalmente para a Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho. Concluídas suas arguições, agradeceram e cumprimentaram a mestranda e suas orientadoras. Em seguida, a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na Secretaria do Curso, na presença da Coordenadora. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção "**Aprovada**". Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros da Banca Examinadora. Recife, 28 de fevereiro de 2005.

Gilvanely
Vera Lúcia de Menezes Lima
Tereza Correia
Adriana Carla Cavalcante Argolo
Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho