

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

**UMA LECTINA DO LÍQUEN *Cladonia verticillaris*: PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

**ORIENTADORA: Prof^ª. LUANA CASSANDRA BREITENBACH BARROSO
COELHO, M.C., Ph.D.**

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA, M.C., Dr.

MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

**UMA LECTINA DO LÍQUEN *Cladonia verticillaris*: PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

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

FEVEREIRO/2004

MICHELE DALVINA CORREIA DA SILVA

**UMA LECTINA DO LÍQUEN *Cladonia verticillaris*: PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL**

Aprovada por:

Prof^a. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, M.C., Ph.D. - Presidente
(Doutorado em Bioquímica – University of London, UL – London, England)

Prof^a. Dra. Adriana Carla Cavalcante Malta Argolo, M. C., Dra. – 1º Examinador
(Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE – Recife)

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão, M. C., Dr. – 2º Examinador
(Doutorado em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE – Recife)

Prof^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, M. C., Dra. – 3º Examinador
(Doutorado em Ciências Biológicas/Biologia Molecular – Universidade Federal de São Paulo,
UNIFESP – São Paulo)

FEVEREIRO/2004

**Aos meus pais Arnaldo e Maria, irmãos Arnaldo e Helen,
e futuro sobrinho Allan, dedico.**

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, pela orientação científica, confiança e oportunidade dada para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Dra. Maria Tereza dos Santos Correia, pela co-orientação e incentivo constante.

À professora Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva, pela colaboração nesta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Glicoproteínas, estagiários, mestrandos, doutorandos, funcionários e professoras, pela amizade, apoio, estímulo e ajuda presentes desde o início.

Aos funcionários e amigos Maria Reis, João Virgínio, Flávio, Jorge, Neide, Miron, Djalma, Helena, Otaviano e demais funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, pela amizade e auxílio concedido sempre que solicitado.

Agradeço especialmente, a Deus (por TUDO) e à minha família, pelo amor, dedicação, compreensão, força e tudo o mais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURA	VII
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 LECTINAS: GENERALIDADES	01
<i>Denominação</i>	01
<i>Detecção e Especificidade</i>	01
<i>Distribuição</i>	03
<i>Papéis Fisiológicos em Plantas, Fungos e Líquens</i>	03
<i>Propriedades Biológicas e Aplicações</i>	04
<i>Características Estruturais das Lectinas</i>	06
<i>Classificação</i>	07
<i>Evolução Adaptativa</i>	08
1.2 PURIFICAÇÃO DE LECTINAS	08
1.3 CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS	11
1.4 LIQUENS	13
<i>Considerações Gerais</i>	13
<i>Líquens e Lectinas</i>	14
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	16
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
5 ARTIGO CIENTÍFICO	28
6 CONCLUSÕES	56
7 ANEXO	57

LISTA DE FIGURA

	Página
Figura 1 – Líquen <i>Cladonia verticillaris</i>	15

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que possuem sítios de ligação para carboidratos e/ou glicoconjugados. Uma lectina do líquen *Cladonia verticillaris* foi purificada através de cromatografia de exclusão molecular. O líquen triturado foi submetido à extração e uma purificação parcial por fracionamentos utilizando sulfato de amônio. As amostras foram submetidas a ensaios de atividade hemaglutinante (AH) e suas concentrações protéicas foram estimadas. A fração mais ativa, F₁ (0-30 %), foi submetida a ensaios de inibição, a ensaios de estabilidade térmica e de dependência de íons divalentes, assim como a ensaios cromatográficos para a purificação e caracterização lectínica. ClaveLL foi isolada através de cromatografia de exclusão molecular de F₁, e submetida aos mesmos ensaios; foi também avaliada quanto à estabilidade da AH em valores de pH compreendidos de 2 a 12. F₁ e ClaveLL foram analisadas em eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas nativas ácidas e básicas, assim como para proteínas desnaturadas. F₁ foi inibida parcialmente por carboidratos (N-acetil-D-glicosamina, xilose, arabinose, ramnose e manose) e glicoproteínas (fetuína, caseína, ovalbumina e peroxidase) ou totalmente (glicoproteínas presentes em soro fetal bovino e em soro de coelho). ClaveLL foi inibida parcialmente por carboidratos (N-acetil-D-glicosamina, galactose, ramnose, manose, glicose e trealose) e ovalbumina, e inibida totalmente por fetuína, asialo-fetuína, caseína, asocaseína e glicoproteínas presentes em colostro, soro de coelho e soro fetal bovino. F₁ foi termoestável, mantendo sua AH a 80°C, enquanto ClaveLL foi sensível ao aumento de temperatura. F₁ e ClaveLL não foram dependentes de íons, mas MnCl₂, BaCl₂, CaCl₂ e MgCl₂ estimularam sua AH. ClaveLL foi mais ativa nos valores de pH ácido (5,5) ou básico (11,0). PAGE contendo SDS resolveu F₁ e ClaveLL como única banda polipeptídica (glicosilada) com peso molecular menor que 14 kDa. F₁ glicosilada pode ter resíduos glicose/manose uma vez que se ligou à Cramoll 1,4-Sepharose, uma matriz de afinidade com a lectina de semente de *Cratylia mollis*, isoformas 1 e 4 glicose/manose específica, imobilizada à Sepharose CL-4B. PAGE para proteínas nativas ácidas detectou em ClaveLL uma única banda que migrou junto com a frente de corrida; o mesmo foi observado em PAGE para proteínas nativas básicas. Cromatografia de ClaveLL através de filtração em gel em sistema ÄKTA-FPLC, resolveu três picos distintos com AH, que sugeriram formas de agregados moleculares para a lectina nativa, com pesos moleculares estimados em 170, 110 (pico principal) e 82 kDa. Concluindo, ClaveLL glicosilada altamente purificada é estável a pH e principalmente inibida por glicoproteínas.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of nonimmune origin with binding sites to carbohydrates and/or glycoconjugates. A lectin from the lichen *Cladonia verticillaris* was purified through molecular exclusion chromatography. The ground lichen was submitted to extraction and a partial purification by ammonium sulphate fractionations. Samples were assayed to haemagglutinating activity (HA) and proteins were estimated. The most active fraction, F₁ (0-30 %), was submitted to inhibition assays, thermal stability and divalent ions dependency assays, as well as chromatographic assays to lectin purification and characterization. ClaveLL was isolated through molecular exclusion chromatography of F₁, and submitted to the same assays; it was also evaluated in relation to HA stability in pH ranging from 2 to 12. F₁ and ClaveLL were analyzed in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for native, acidic and basic proteins, as well as denatured proteins. F₁ was partially inhibited by carbohydrates (N-acetyl-D-glucosamine, xylose, arabinose, rhamnose and mannose) and glycoproteins (fetuin, casein, ovalbumin and peroxidase); it was totally inhibited by bovine fetal serum and rabbit serum glycoproteins. ClaveLL was partially inhibited by carbohydrates (N-acetyl-D-glucosamine, galactose, rhamnose, mannose, glucose and threolose) and ovalbumin; it was totally inhibited by fetuin, asialo-fetuin, casein, asocasein, colostrum, rabbit and bovine fetal serum glycoproteins. F₁ was thermostable, keeping HA till 80 °C (30 min) while ClaveLL was sensible to increase of temperature. F₁ and ClaveLL were not ion dependents, but MnCl₂, BaCl₂, CaCl₂ and MgCl₂ stimulated HA. ClaveLL was most active in acidic (5.5) or basic (11.0) pH values. PAGE containing SDS resolved F₁ and ClaveLL as unique polypeptide bands (glycosylated), with molecular weight smaller than 14 kDa. Glycosylated F₁ might have glucose/mannose residues since it did bind to Cramoll 1,4-Sepharose, an affinity matrix with *Cratylia mollis* seed lectin, isoforms 1 and 4 glucose/mannose specific, immobilized to Sepharose CL-4B. PAGE for native and acidic proteins detected in ClaveLL a unique band that migrated with the front line; the same it was observed in PAGE for native and basic proteins. ClaveLL gel filtration chromatography in ÄKTA-FPLC system, resolved three distinct peaks with HA, that suggested molecular aggregates forms to the native lectin, with molecular weights estimated in 170, 110 (principal peak) and 82 kDa. In conclusion, highly purified glycosylated ClaveLL is pH stable and mainly inhibited by glycoproteins.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS: GENERALIDADES

Denominação

Stillmark em 1888, estudando a toxicidade de extratos de *Ricinus communis* (mamona) observou sua capacidade para aglutinar eritrócitos devido à presença de uma proteína extraída, a ricina, marcando o início das pesquisas envolvendo lectinas (Sharon & Lis, 1988).

O termo *lectina* (originado do latim “lectus”, que significa selecionado, escolhido) foi utilizado por Boyd & Shapleigh (1954) para designar o grupo de proteínas que apresentam a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que apresentam dois ou mais sítios de ligação capazes de interagir, de forma reversível, com carboidratos e glicoconjugados (Goldstein *et al.*, 1980).

A ênfase que é dada quanto à origem não imune das lectinas serve para distingui-las de anticorpos anticarboidratos que aglutinam células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem entre si quanto à composição aminoacídica, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas não são apenas encontradas em animais, mas também em outros organismos que não possuem sistema imune, como plantas e bactérias (Moreira *et al.*, 1990).

Essas moléculas foram definidas como uma classe de proteínas de origem não imunológica que reconhecem carboidratos, livres ou conjugados a superfícies celulares, através de seus sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade característica é a principal força de interação (Kennedy *et al.*, 1995).

Detecção e Especificidade

As lectinas são, em sua maioria, di ou polivalentes e são capazes de formar pontes entre carboidratos ou glicoproteínas que se apresentam em solução ou são ligadas à membrana celular (Flemming *et al.*, 1992).

A presença de lectinas numa amostra pode ser facilmente detectada a partir de ensaios de aglutinação, nos quais estas interagem com células, através de seus sítios de ligação, formando diversas ligações reversíveis entre células opostas. O ensaio de hemaglutinação é o mais comumente utilizado por promover a visualização desta propriedade de aglutinação de eritrócitos por lectinas. Os eritrócitos utilizados no ensaio podem ser de origem humana ou de outros animais, tratados por enzimas ou quimicamente (Nomura *et al.*, 1998; Coelho & Silva,

2000) assim como não tratados (Sampaio *et al.*, 1998a; Sampaio *et al.*, 1998b; Wititsuwannakul *et al.*, 1998; Mo *et al.*, 2000).

Landsteiner e Raubitscheck (1908) observaram que vários extratos de sementes apresentavam diferentes atividades hemaglutinantes com eritrócitos de diferentes fontes animais e que aglutininas vegetais eram específicas para certos tipos sanguíneos. Boyd & Reguera (1949), estudando a aglutinina de *Phaseolus limenses*, descobriram sua especificidade para eritrócitos do tipo A, determinando que algumas aglutininas têm especificidade para determinado grupo do sistema ABO. Portanto, lectinas podem apresentar especificidade para eritrócitos, como a lectina de *Zizyphus mauritiana* (Gupta & Srivastava, 1998) que só aglutina eritrócitos humanos, as lectinas de *Charybdis japonica* (Umetsu, 1991) e do cogumelo *Marasmius oreades* (Winter *et al.*, 2002) específicas para eritrócitos tipo B, e a lectina de *Tachypleus tridentatus* (Nagai, 1999) específica para eritrócitos tipo A; outras lectinas, no entanto, são caracterizadas como não específicas para grupos sanguíneos (Banerjee *et al.*, 2004).

A habilidade de aglutinar células distingue lectinas de outras macromoléculas capazes de ligar carboidratos e é por isso incluída na definição de lectinas, de acordo com aquela proposta por Goldstein *et al.* (1980).

Outra forma de avaliar a presença de lectinas numa amostra é através de ensaios de precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas (Moreira *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998).

A detecção de lectinas através do ensaio de hemaglutinação é confirmada pelo fenômeno de inibição desta hemaglutinação na presença de um (ou mais) carboidrato(s) em concentração determinada na solução do ensaio.

A determinação da especificidade de uma lectina é dada pelo monossacarídeo que, em menor concentração, possua maior habilidade para inibir sua atividade de hemaglutinação ou de precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas; no entanto, algumas lectinas não apresentam um monossacarídeo inibidor e são inibidas apenas por oligossacarídeos. De acordo com Sharon & Lis (1990) algumas lectinas apresentam interações mais fortes com oligossacarídeos em comparação com monossacarídeos, outras são quase exclusivas para oligossacarídeos. Assim, as lectinas podem ser classificadas com especificidade para monossacarídeo ou para oligossacarídeo.

Muitas lectinas de plantas podem ser inibidas por mono ou dissacarídeos; geralmente as concentrações de tais carboidratos necessárias para inibição são relativamente altas, quando comparadas às concentrações de oligossacarídeos complexos, inibidores de outras lectinas.

Essa elevada capacidade de reconhecer oligossacarídeos como inibidores é devido ao fato de que o sítio de ligação das lectinas é mais complementar para oligossacarídeos (Peumans & Van Damme, 1998).

Distribuição

Lectinas estão largamente distribuídas na natureza, sendo freqüentemente isoladas de sementes (Cavada *et al.*, 1998; Gupta & Srivastava, 1998; Moreira *et al.*, 1998; Machuka *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2002; Rego *et al.*, 2002; Konozy *et al.*, 2003) e, em menores proporções, de outros tecidos vegetais (Bertrand *et al.*, 1998; Nomura *et al.*, 1998; Sampaio *et al.*, 1998a; Sampaio *et al.*, 1998b; Wititsuwannakul *et al.*, 1998; Coelho & Silva, 2000; Martinez & Cordoba, 2000; Naeem *et al.*, 2001; Ambrosio *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004). São também detectadas em invertebrados (Nagai *et al.*, 1999; Pace *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2004), vertebrados (Bazil & Entlicher, 1999; Dunphy *et al.*, 2002), microorganismos (Muniasamy *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998; Syed *et al.*, 1999; Kawagishi *et al.*, 2001; Candy *et al.*, 2003; Wang & Ng, 2003a; Wang *et al.*, 2003) e organismos simbióticos como líquens (Elifio *et al.*, 2000; Molina & Vicente, 2000).

Papéis Fisiológicos em Plantas, Fungos e Líquens

Com base nas suas propriedades gerais e localização em diferentes tecidos, muitas funções fisiológicas para lectinas já foram sugeridas. Lectinas vegetais poderiam desempenhar importantes papéis tais como proteínas de reserva, no mecanismo de defesa contra microorganismos fitopatogênicos, insetos e animais predadores (Ponchel & Irache, 1998; Machuka *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2002; Wang & Ng, 2003b), e como mediadores da simbiose planta-microorganismo (Rudiger, 1998; Naeem *et al.*, 2001; Limpens & Bisseling, 2003).

As lectinas são as únicas proteínas de origem vegetal com capacidade para reconhecer e se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos ou no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros (Peumans & Van Damme, 1998); tais moléculas parecem desempenhar um importante papel de proteção do vegetal contra esses organismos predadores, afetando o crescimento e desenvolvimento de insetos e apresentando atividades tóxicas em animais herbívoros. Algumas lectinas já são conhecidas quanto à sua toxicidade, tais como a lectina de *Sambucus sieboldiana* (Rojo *et al.*, 1997), a aglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), a lectina de *Robinia pseudoacacia* e a lectina de *Sambucus nigra* (Peumans & Van Damme, 1998).

De acordo com alguns estudos, lectinas de plantas são potentes inibidores *in vitro* de viroses animais e humanas. Algumas delas podem ter um papel antiviral indireto; por exemplo, a presença de lectinas inseticidas pode prevenir e/ou reduzir a difusão de doenças virais transmitidas por insetos (Peumans & Van Damme, 1995).

De forma contrária, algumas lectinas, como a aglutinina de *Dolichos biflorus*, e a aglutinina de soja, podem promover o aumento da infecção de certas células por determinados vírus, quando estas são tratadas antes ou durante a inoculação viral (Ogino *et al.*, 1999).

Lectinas possuem a capacidade de se ligarem especificamente a hifas fúngicas, e atuam impedindo o consumo de nutrientes e a incorporação de precursores necessários para o crescimento do fungo. Atuam ainda sobre a germinação de esporos fúngicos, provavelmente num estágio muito inicial do processo, inibindo-a, de modo que há um prolongamento do período latente que precede a germinação (Lis & Sharon, 1981).

Lectinas de fungos podem estar envolvidas na biossíntese da parede celular e diferenciação do micélio, na adesão de esporos de espécies patogênicas a insetos hospedeiros e a nematodos (Kellens & Peumans, 1990), no reconhecimento fungo-micoparasitas, atuar como proteínas estoque, e apresentar atividade pesticida (Trigueros *et al.*, 2003). A lectina presente em *Rhizoctonia solani* parece desempenhar um papel fisiológico de proteína de estocagem, além de atuar no reconhecimento específico desse fungo aos micoparasitas *Trichoderma* (Kellens & Peumans, 1990).

Em líquens, tem sido sugerido que as lectinas de origem fúngica podem estar envolvidas no estabelecimento da simbiose (Lockhart *et al.*, 1978). Lectinas micobiontes têm sido implicadas no reconhecimento do cianobionte por um micobionte. Porém, pesquisas englobando observações diretas, experimentos sobre lectina-ligante e análises de intron de tRNA^{Leu} indicam uma ampla ou baixa especificidade cianobionte-micobionte (Rai & Bergman, 2002).

Propriedades Biológicas e Aplicações

As lectinas, por suas propriedades características, são importantes ferramentas em pesquisas na área da Bioquímica, da Biologia Celular, da Medicina, da Imunologia e áreas relacionadas.

Tais moléculas desempenham os mais variados efeitos sobre as células, dentre os quais aglutinação, estimulação mitogênica, redistribuição de componentes de superfície celular, modificação da atividade de enzimas de membrana, inibição de crescimento fúngico, toxicidade *in vitro* e *in vivo*, entre outros.

Algumas lectinas são capazes de atuar sobre linfócitos, fazendo com que estas células passem de um estado quiescente para um estado de crescimento e proliferação. A lectina de *Aloe arborescens* (Koike *et al.*, 1995), as lectinas de *Phytolacca americana* (Kino *et al.*, 1995) a lectina de *Cladrastis lítea* (Van Damme *et al.*, 1995), a lectina de *Belamyia bengalensis* (Banerjee *et al.*, 2004) e a lectina de semente de *Cratylia mollis*, Cramoll (Maciel *et al.*, 2004) são alguns exemplos de lectinas com atividade mitogênica.

Várias lectinas de cogumelos também têm exibido atividade mitogênica sobre vários tipos celulares, como células T de esplenócitos de camundongos (Ho *et al.*, 2004) e atividade anti-proliferativa (Ngai & Ng, 2004) sobre células tumorais da leucemia (L1210 e M1) e de hepatoma (Hep G2).

Lectinas, como a aglutinina de *Canavalia ensiformes* (Con A), a aglutinina de germe de trigo (WGA), entre outras, são citotóxicas para células de mamíferos tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, a toxicidade destas proteínas é muito baixa quando comparada com outras toxinas de plantas, tais como ricina e abrina. A ação tóxica de lectinas sobre células é geralmente seletiva; elas são muito mais ativas sobre células transformadas, que são mais sensíveis aos seus efeitos quando comparadas a células normais (Lis & Sharon, 1986).

A sielboldina-b, uma lectina presente em *Sambucus sieboldiana*, foi avaliada quanto à sua toxicidade *in vivo* em camundongos suíços, e citotoxicidade *in vitro* sobre células HeLa; apesar de não ter apresentado ação tóxica *in vivo* quanto à síntese protéica. Foi fortemente citotóxica *in vitro*, mostrando habilidade como proteína ribossomo-inativadora (RIP) inibindo a síntese protéica (Rojo *et al.*, 1997). Outra lectina, isolada de *Viscum album*, também apresentou propriedades citotóxicas sobre células Molt4 de humanos, uma linhagem celular derivada de células T de leucemia (Peumans *et al.*, 1996).

A lectina de *Phaseolus acutifolius* foi testada *in vivo* em camundongos e mostrou possuir baixa toxicidade, podendo ser utilizada em estudos carcinogênicos que possam levar a terapia do câncer (Reynoso-Camacho *et al.*, 2003).

Uma lectina de *Galanthus nivalis*, GNA, foi fusionada a uma neurotoxina de aranha, SFI1 (inseto-específica); a lectina atuou como carreadora da neurotoxina, levando-a à hemolinfa das larvas de lepidópteros; a fusão SFI1/GNA mostrou potencial utilização como pesticida em cultivos de plantas (Fitches *et al.*, 2004).

Lectinas têm sido utilizadas em Histologia e Patologia como ferramentas em ensaios citoquímicos para localização de glicoconjugados em diferentes tecidos de animais invertebrados (Franceschini *et al.*, 2000), em ensaios histoquímicos e imunohistoquímicos para detecção de resíduos glicosilados em superfícies teciduais de humanos e animais (Meyer

et al., 2000; Barou *et al.*, 2002; Pedini *et al.*, 2002), e como ferramentas glicohistoquímicas para análises de estruturas de tecidos humanos normais e alterados. Essas proteínas têm sido aplicadas na exploração de tecidos renais de humanos e de outros animais, e têm fornecido contribuições importantes para o prognóstico e diagnóstico de doenças em humanos, como o câncer (Danguy *et al.*, 1998; Kabir, 1998), para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (Basu *et al.*, 2003), para caracterizar e avaliar o padrão de ligação em tecidos humanos de mama transformados (Beltrão *et al.*, 1998), para detecção de modificações celulares em vários tecidos (Kunstfeld & Petzelbauer, 2001), para detectar inflamação e alterações associadas à neoplasia em intestino humano (Brinck *et al.*, 1998), e para a caracterização de patologias cerebrais, como a hidrocefalia fetal humana (Ulfig *et al.*, 2003) e prognóstico/diagnóstico de patologias em tecidos cerebrais, como mudanças degenerativas convencionais (Nishi *et al.*, 2003) e tumor meningotelial (Beltrão *et al.*, 2003).

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e citoinvasão de drogas (Gabor *et al.*, 2004), essas moléculas têm sido exploradas quanto à sua utilização em sistemas de liberação de drogas. Nesse sentido, lectinas têm sido avaliadas em ensaios biotecnológicos; BmoLL (lectina de folhas de *Bauhinia monandra*) e LC (lectina de *Lens culinaris*) foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando ser potenciais ferramentas para a utilização dessas nanopartículas em medicamentos de administração oral com liberação controlada (Rodrigues *et al.*, 2003).

Características Estruturais das Lectinas

As diferenças estruturais entre as lectinas são devido a variações no número de subunidades por molécula e na natureza dos polipeptídeos. Pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio e também as interações hidrofóbicas podem estar presentes nas subunidades de associação (Kennedy *et al.*, 1995); as interações entre as subunidades parecem desempenhar um papel dominante na estabilidade dessas proteínas (Mitra *et al.*, 2002).

As especificidades e afinidades dos sítios associados são alcançadas principalmente por pontes de hidrogênio, com a ajuda de forças de van der Waals e interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos aromáticos que estão próximos às porções hidrofóbicas de monossacarídeos (Sharon, 1993) contribuindo para a estabilidade e especificidade dos complexos formados.

Algumas lectinas apresentam íons metálicos ligados à sua estrutura; tais ligações são coordenadas por moléculas de água, que também servem para mediar as interações das lectinas com carboidratos (Sharon & Lis, 2002).

A especificidade de lectinas de plantas a carboidratos é primeiramente determinada pela estrutura tridimensional dos seus sítios de ligação, que se apresentam conservados a nível aminoacídico, dentro de famílias de lectinas (Peumans & Van Damme, 1998). As lectinas exibem uma elevada homologia em seus resíduos de aminoácidos, incluindo aqueles envolvidos na ligação a monossacarídeos e a maioria dos que coordenam os íons metálicos necessários à integridade das subunidades e ao correto posicionamento dos resíduos para a ligação (Sharon, 1993).

Classificação

As lectinas de plantas têm sido agrupadas dentro de famílias distintas de proteínas homólogas que apresentam propriedades estruturais comuns. A família de lectinas de leguminosas é a mais bem estudada e caracterizada; outras famílias de lectinas são ainda conhecidas, como o caso da família de lectinas de solanáceas e a família de lectinas de cereais (gramíneas), pouco estudada e cujo único membro já bem caracterizado é a aglutinina de germe de trigo ou WGA (Sharon, 1993).

Baseando-se na estrutura global das lectinas de plantas, estas podem ser divididas em três principais tipos distintos: as merolectinas, as hololectinas e as quimerolectinas (Peumans & Van Damme, 1995). As merolectinas são proteínas formadas exclusivamente por um domínio de ligação a carboidrato; são proteínas pequenas, formadas por um único polipeptídeo e, por conta de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas também são exclusivamente formadas de domínios de ligação a carboidratos, mas contêm dois ou mais destes domínios que são idênticos ou muito semelhantes; este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As quimerolectinas são a fusão de proteínas contendo um domínio de ligação a carboidrato com um domínio não relacionado (que possui uma atividade catalítica definida ou não apresenta atividade biológica) que atua de forma independente. Outro tipo sugerido por Van Damme *et al.*, 1996, são as superlectinas; este tipo de lectina consiste de moléculas com pelo menos dois domínios de interação a carboidratos distintos.

As lectinas de plantas podem ainda ser classificadas de acordo com sua especificidade de interação com carboidratos, em lectinas glicose/manose específicas (Correia & Coelho, 1995; Nomura *et al.*, 1998), galactose específicas (Cavada *et al.*, 1998; Machuka *et al.*, 1999; Coelho & Silva, 2000), ácido-siálico específicas, manose-específicas (Mo *et al.*, 1993; Koike *et al.*, 1995), entre outras.

Evolução Adaptativa

Dentre os argumentos indicativos de que as lectinas possuem um papel de defesa nas plantas, o mais importante é a capacidade de ligação dessas moléculas a glicoconjugados de outros organismos. Tais moléculas, em geral, ligam-se a carboidratos simples; no entanto, elas possuem uma afinidade muito alta por oligossacarídeos que são incomuns ou totalmente ausentes em plantas. Exemplos deste fato são as lectinas de plantas quitina-ligantes, como a lectina de *Viscum album* (Peumans *et al.*, 1996), e as lectinas ácido-siálico-ligantes. As primeiras reconhecem um carboidrato típico da parede celular de fungos e do exoesqueleto de invertebrados; as segundas reconhecem um carboidrato que é ausente em plantas, mas que é o principal componente de glicoproteínas animais. Além dessa capacidade característica de ligação, lectinas de plantas possuem estabilidade elevada, mesmo quando submetidas a condições desfavoráveis como mudanças de pH, de temperatura ou exposição a proteases de insetos e animais. Essas moléculas parecem ainda estar preferencialmente associadas com determinadas partes vegetais que são mais suscetíveis ao ataque de outros organismos (geralmente órgãos de estocagem e sementes) e que necessitam de um sistema de defesa (Peumans & Van Damme, 1995).

As lectinas de sementes e outros tecidos de estocagem parecem desempenhar um papel como proteínas de estocagem devido a suas propriedades bioquímicas, sua abundância e seu papel na regulação do desenvolvimento do vegetal. No entanto, como proteínas de estocagem, essas moléculas parecem ainda desempenhar uma dupla função: elas atuam como proteína de defesa, sendo tóxicas contra diversos organismos predadores, ao mesmo tempo em que estocam nitrogênio. As diferentes especificidades de ligação a carboidratos de diferentes lectinas para reconhecer uma grande diversidade de carboidratos ou glicoproteínas presentes em microorganismos e outros animais, assim como sua dupla função de estocagem/defesa contra predadores podem ser consideradas características resultantes de uma grande evolução adaptativa de plantas (Peumans & Van Damme, 1998).

1.2 PURIFICAÇÃO DE LECTINAS

Devido à amplitude de propriedades e aplicações, lectinas têm sido purificadas por métodos já convencionais que se baseiam nos seus aspectos moleculares gerais, como proteínas que são, e seus aspectos particulares, como um grupo de proteínas com afinidade por carboidratos e glicoconjugados.

O primeiro passo no processo de purificação de lectinas, em especial aquelas de material vegetal, é a extração dessas proteínas em solução salina (Kawagishi *et al.*, 2001) ou solução tampão (Trigueros *et al.*, 2003). Tal solução é misturada ao triturado do vegetal de forma a constituir um extrato com concentração determinada. O material é submetido à extração sob período de tempo e condições de temperatura estabelecidos, sob agitação constante. O método de extração utilizando tais soluções resulta num aumento de solubilidade das proteínas do triturado e, portanto, é um passo importante ao processo de purificação protéica. O material extraído é filtrado e o extrato sobrenadante é centrifugado em centrífuga refrigerada para obtenção do extrato bruto, livre do triturado.

Após extração dessas moléculas, em geral é procedido o método de precipitação protéica por fracionamento salino com sulfato de amônio (Elifio *et al.*, 2000); tal processo baseia-se na separação de moléculas de acordo com suas diferenças de solubilidade. A precipitação utilizando sais neutros é possível porque estes sais, em função de sua força iônica, afetam a solubilidade de proteínas globulares; em concentrações reduzidas, eles aumentam a solubilidade de proteínas (*salting in*), mas quando a força iônica é aumentada, há uma redução da solubilidade protéica e estas podem chegar a ser quase completamente precipitadas (*salting out*); proteínas precipitadas são capazes de manter sua conformação nativa e podem ser dissolvidas sem sofrer desnaturação. Assim, diferentes fracionamentos são procedidos para purificação parcial de várias lectinas presentes num extrato, já que proteínas diferentes apresentam reações diferentes em resposta a concentrações salinas.

As lectinas parcialmente purificadas são geralmente submetidas ao processo de diálise em membranas semipermeáveis, método baseado na separação de moléculas por diferenças de peso molecular; as proteínas ficam retidas enquanto que moléculas menores - como carboidratos ou sais - presentes na amostra passam para a solução solvente.

Um outro método utilizado para purificação protéica é a cromatografia, que pode ser do tipo troca iônica (Wang *et al.*, 2003), exclusão molecular e cromatografia por biosseletividade (Candy *et al.*, 2003). Alguns protocolos de purificação podem combinar os três métodos cromatográficos para a purificação total da lectina (Wang & Ng, 2003a).

A cromatografia por troca iônica possui uma fase estacionária altamente carregada a qual moléculas (como proteínas) com carga de sinais contrários são seletivamente adsorvidos da fase móvel. As moléculas adsorvidas podem então ser eluídas, pela utilização de outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Este método de separação baseia-se na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz; essa diferença de afinidade se deve a diferenças

de carga, e pode ser controlada por fatores como o pH e a força iônica (Spadaro, 1997). A cromatografia por troca iônica permite a purificação de lectinas, tais como a de *Viscum album* (Peumans *et al.*, 1996), e a de *Hevea brasiliensis* (Wititsuwannakul *et al.*, 1998); esse método cromatográfico permite também a separação de isoformas de preparações lectínicas, pela utilização de um gradiente salino crescente (Mishra *et al.*, 2004).

Matrizes orgânicas como o dextrano e a agarose podem ser usadas na cromatografia de troca iônica, porém a mais utilizada é a celulose. A celulose é um biopolímero de glicose que apresenta ligações cruzadas de pontes de hidrogênio, tendo grupos hidroxílicos que são facilmente oxidáveis a grupos carboxílicos, sendo esta a razão que capacita a celulose como trocador (Spadaro, 1997). Dentre os trocadores utilizados, derivados da matriz de celulose, estão o dietilaminoetilcelulose (DEAE-celulose), um trocador aniônico, e o carboximetilcelulose (CM-celulose), um trocador catiônico, ambos carregados em pH neutro.

A cromatografia de exclusão molecular, quando aplicada a uma série homóloga de polímeros tais como proteínas, tendo densidade e formas semelhantes, permite purificar, determinar a massa molecular de lectinas (Cavada *et al.*, 1998; Freire *et al.*, 2002), e também defini-las como estruturas mono, di, tri ou tetraméricas, quando os resultados são comparados a corridas eletroforéticas (Kawagishi *et al.*, 2001). Esta cromatografia também conhecida como filtração em gel, permeação em gel, ou peneira molecular de fusão restrita, promove uma distribuição seletiva e dinâmica das moléculas entre fases líquidas distintas, dependentes da fase estacionária composta por poros de tamanho controlado. A matriz é composta por um gel constituído de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis. As partículas estacionárias formam um gel com características de inércia química, estabilidade e baixo teor de íons. A fase estacionária controla o movimento das substâncias que por ela passam, variando suas velocidades e promovendo a separação (Rothschild, 1997).

Os géis utilizados comumente como matriz de exclusão molecular são dextrano (Sephadex), os géis de poliácridamida (Bio-Gel), os géis de agar e agarose e outros. O Sephadex, dentre todos eles, é o mais utilizado. Trata-se de um biopolímero (polissacarídeo) obtido por fermentação da sacarose, pela ação bacteriana; é formado por unidades de glicose predominantemente unidas por ligações α -1-6, apresentando ramificações que variam entre 1-2, 1-3 e 1-4 (Spadaro & Fonseca, 1997). Seu tratamento com substâncias químicas produz ligações cruzadas nas cadeias polissacarídicas fornecendo um material que, em água, produz um gel com estrutura tridimensional (Rothschild, 1997) útil para sua utilização em processos de purificação de lectinas.

O princípio da cromatografia por biosseletividade corresponde ao isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, pela utilização das propriedades dessas substâncias de se ligarem de forma reversível a ligantes específicos. A amostra é aplicada à coluna; as moléculas sem afinidade passam sem ligar à matriz, e as específicas são retidas. Estas são eluídas pela alteração do pH e/ou força iônica do meio, ou pelo emprego de substâncias com maior afinidade ao ligante (Spadaro & Fonseca, 1997).

Vários suportes podem ser úteis em cromatografia por biosseletividade, como a matriz de celulose, a matriz de gel de guar, a agarose, a Sepharose e o dextrano. Suportes de afinidade têm sido amplamente utilizados como processo de purificação de lectinas, como o Sephadex (Gupta & Srivastava, 1998; Bazil & Entlicher, 1999) para lectinas com afinidade por glicose/manose, o gel de guar para lectinas galactose específicas (Cavada *et al.*, 1998; Sampaio *et al.*, 1998a; Coelho & Silva, 2000), e a Sepharose (Arreguín-Espinosa & Arreguín-Lozano, 1997; Candy *et al.*, 2003) também para lectinas com afinidade por galactose.

1.3 CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS

A caracterização de lectinas envolve, entre outros métodos, o ensaio de hemaglutinação, utilizado para detecção das mesmas e útil para caracterizá-las quanto à especificidade dentro do sistema ABO ou entre eritrócitos de animais. Ensaio de atividade hemaglutinante e de inibição por carboidratos e/ou glicoconjugados são excelentes meios de caracterização lectínica, promovendo a descoberta da especificidade de ligação a eritrócitos (Nagai *et al.*, 1999) a mono, di ou oligossacarídeos e quanto à capacidade de interação da lectina a outras moléculas como glicoproteínas, glicolípídeos ou polissacarídeos (Gupta & Srivastava, 1998; Moreira *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 1998; Machuka *et al.*, 1999) contribuindo para a determinação do suporte de afinidade ideal para a sua purificação.

A determinação da dependência ou não de lectinas por íons metálicos constitui outra etapa necessária na caracterização, pois algumas lectinas precisam da presença destes íons para promover sua atividade biológica (Sampaio *et al.*, 1998a). Muitas lectinas são metaloproteínas; precisam de cátions divalentes tais como Ca^{2+} e Mn^{2+} para exibir atividade. A presença de cátions na estrutura da proteína promove termoestabilidade e uma relativa resistência a ação enzimática. Exemplos de lectinas dependentes de metais são a lectina isolada de sementes de *Dioclea altissima* (Moreira *et al.*, 1997) e a lectina de *Pitilota filicina* (Sampaio *et al.*, 1998a).

O teste de temperatura para determinação da estabilidade protéica constitui outro passo na caracterização. Algumas lectinas são termossensíveis, e outras, termoestáveis; isso significa que tais proteínas têm sua atividade biológica otimizada em determinadas temperaturas e ausente em temperaturas desfavoráveis à manutenção da estrutura nativa. Algumas lectinas apresentam uma atividade acentuada, depois de submetidas a temperaturas relativamente altas (Correia & Coelho, 1995).

A estabilidade da atividade lectínica em função de diferentes valores de pH também deve ser avaliada, uma vez que estas devem ser mantidas em soluções que apresentem condições ideais à sua utilização, em condições nativas, nos diferentes experimentos a que podem ser submetidas. Proteínas podem sofrer desnaturação em pH desfavorável; o pH pode ser determinante para a purificação e estabilização de uma lectina.

Técnicas eletroforéticas (Reisfeld *et al.*, 1962; Davis, 1964; Laemmli, 1970) que servem para indicar basicidade ou acidez de uma lectina, assim como para determinar sua estrutura quanto ao número de subunidades, peso molecular (Rego *et al.*, 2002) ou ainda para caracterizá-la como uma glicoproteína (Coelho & Silva, 2000), são importantes na caracterização lectínica. Outro importante método eletroforético, é o método de eletrofocalização ou focalização isoelétrica, útil para determinar o ponto isoelétrico da proteína de interesse.

Estes e muitos outros métodos e ensaios, tais como a imunodifusão, a difusão dupla, e especialmente o seqüenciamento aminoacídico, são ferramentas importantes na caracterização de lectinas; o seqüenciamento expõe informações valiosas sobre a estrutura e função das moléculas, avalia a pureza e a concentração protéica, é capaz de detectar erros na sua formação e modificações estruturais, servindo também de base para o entendimento de outras questões, incluindo aquelas ligadas à evolução das espécies de onde as diferentes lectinas são isoladas.

O seqüenciamento de lectinas tem permitido detectar isoformas, e identificar membros de novas famílias homólogas destas proteínas, em grupos de organismos, através da comparação de seqüências de lectinas com elevada homologia entre si (Candy *et al.*, 2003; Trigueros *et al.*, 2003); a análise da estrutura primária permite sugerir a presença de pontes dissulfeto em pontos específicos da molécula, e indica que alguns resíduos são determinantes da atividade biológica (Zhang *et al.*, 2003).

A técnica de HPLC-RP (cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa) constitui um meio útil de obter lectinas puras que já tenham sido pré-purificadas, de estimar massas moleculares, caracterizar e fracionar proteínas e peptídeos muito semelhantes. A

cromatografia líquida de alta resolução, FPLC, tem sido amplamente utilizada como um passo final de purificação mais refinada de lectinas, após a utilização de outros métodos cromatográficos (Ng *et al.*, 2003; Wong & Ng, 2003) e como um método de caracterização de massa molecular destas proteínas; FPLC e HPLC-RP têm sido utilizadas para estabelecer a homogeneidade de lectinas puras, para separar estruturas em subunidades, assim como determinar se essas moléculas são monoméricas ou não (Wang *et al.*, 2001).

1.4 LIQUENS

Considerações Gerais

As algas que compõem a associação líquênica são unicelulares, clorofíceas ou cianofíceas, enquanto que os fungos são pertencentes geralmente aos ascomicetos e, menos freqüentemente, aos basidiomicetos e deuteromicetos (Xavier-Filho & Rizzini, 1976; Alexopoulos & Mims, 1979).

Os organismos líquênicos são associações simbióticas com uma ou mais espécies de algas (fotobiontes) e uma espécie de fungo (micobionte), o qual localiza-se na parte externa do organismo (Harksworth & Hill, 1984). Tal associação de simbiose presente no organismo é tida como mutualista, benéfica para ambos os seres constituintes. Em geral, cada membro de uma associação mutualista é especializado para executar uma função complementar com o outro. No líquen, uma alga fotossintética se junta ao fungo e pode obter nutrientes de substratos difíceis, tais como cascas de árvores ou superfícies rochosas (Ricklefs, 1996). Os líquens são capazes de fixar alimentos do ar atmosférico e de absorver sais minerais de substrato para sua alimentação.

Um talo líquênico é formado por camadas sucessivas de algas e fungos. O córtex superior do talo é composto por hifas entrelaçadas que protegem a camada gonidial formada por algas. A terceira camada, a medula, é formada por um feixe de hifas frouxas e, logo abaixo, está o córtex inferior, formado por outro feixe de hifas (Nash, 1996).

Os líquens têm sido objeto de estudo devido ao fato de suas substâncias apresentarem, dentre outras, ação antimicrobiana (Pereira *et al.*, 1991), antimitótica, antitumoral, antifúngica e citotóxica (Nascimento *et al.*, 1995).

Dentre as substâncias produzidas pela simbiose, há depsídios, depsidomas, dibenzofuranos e ácido úsnico. Alguns destes produtos originados do metabolismo secundário dos líquens, possivelmente desempenham um papel importante na sua fisiologia, além da defesa característica (Yano-Melo *et al.*, 1999).

Líquens e Lectinas

Os primeiros estudos para detecção de lectinas em espécies de líquens foram iniciados por Estola & Vartia (1955); estes pesquisadores utilizaram 100 espécies e observaram que apenas 8 destas apresentavam atividade lectínica, 6 das quais pertencentes ao mesmo gênero.

Barret & Howe (1968) avaliaram extratos salinos de líquens e verificaram que 22 espécies de gêneros diferentes apresentaram AH e que não mostraram especificidade para os vários tipos de eritrócitos testados. Em 1970, Howe & Barrett conseguiram isolar uma lectina de líquen inespecífica para um tipo sangüíneo. Desde então vem crescendo o interesse quanto ao isolamento de lectinas presentes em espécies liquênicas, organismos estes que apresentam inúmeras atividades biológicas já avaliadas.

As pesquisas objetivando purificar lectinas de líquens continuaram e, em 1978, Lockhart *et al.* observaram que as espécies *Peltigera canina* e *Peltigera polydactyla* apresentavam lectinas, as quais pareciam estar envolvidas no processo de estabelecimento da associação simbiótica entre fungo e alga. Desde então, outras lectinas têm sido isoladas de espécies de líquens (Ingram, 1982; Petit, 1982; Petit *et al.*, 1983; Kardish *et al.*, 1991; Elifio *et al.*, 2000; Molina & Vicente, 2000) e têm contribuído para o esclarecimento do seu papel na relação de simbiose destes organismos.

2 JUSTIFICATIVA

O gênero *Cladonia* e a espécie *Cladonia verticillaris* (Figura 1) têm sido avaliados em sua composição química e propriedades biológicas.

Sessenta e cinco espécies do gênero *Cladonia* foram analisadas quanto à composição em ácidos aromáticos, e boa parte delas apresentou alto teor de ácido fumarprotocetrárico, um aromático; *Cladonia verticillaris* apresenta uma proporção relativa desse ácido, de 79,9/95,7% (Huovinen *et al.*, 1990) e de 78,6% em extração total (Yano-Melo *et al.*, 1999).

Pereira *et al.* (1991) detectaram atividade antimicrobiana em extratos do líquen *Cladonia substellata*, da região Nordeste do Brasil.

Líquens pertencentes à família Cladoniaceae apresentaram extratos com atividade citotóxica (Nascimento *et al.*, 1995).

Extratos da espécie *Cladonia verticillaris* apresentam efeito alelopático; o ácido fumarprotocetrárico, isolado da espécie, apresenta atividade alelopática, dependendo de sua concentração, sobre o comprimento da radícula de *Allium cepa* (Yano-Melo *et al.*, 1999).

A espécie *Cladonia verticillaris* foi avaliada quanto à possível atividade antitumoral, e foi verificado que seus extratos e frações produziam este efeito sobre o crescimento de tumores, o sarcoma-180; os resultados indicaram que a sazonalidade influencia na atividade antitumoral apresentada pela espécie, e que o material coletado no período mais seco continha maior teor de princípios ativos antitumorais (Santos, 1996).

A fácil obtenção do líquen *Cladonia verticillaris*, devidamente identificado, assim como o interesse na purificação de lectinas permitiu o desenvolvimento desse trabalho.



Figura 1 – Líquen *Cladonia verticillaris*

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Purificar e caracterizar uma lectina presente no líquen *Cladonia verticillaris*.

Objetivos Específicos

Purificar parcialmente uma lectina presente no líquen através dos métodos de extração, precipitação protéica por fracionamento salino e diálise;

Determinar quantitativamente a presença de proteína em preparações da espécie liquênica;

Avaliar a presença de lectina nas preparações através dos ensaios de determinação da atividade hemaglutinante e de inibição da atividade com carboidratos e glicoproteínas;

Purificar uma lectina presente na preparação mais ativa da espécie liquênica através de métodos cromatográficos;

Caracterizar a lectina parcialmente e/ou totalmente purificada através de ensaios de estabilidade térmica, estabilidade em diferentes valores de pH, dependência de íons, difusão radial e métodos eletroforéticos para proteínas nativas e desnaturadas.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C. J., MIMS, C. W. **Introductory Micology**, New York, J. Wiley & Sons, 1979, 632 p.
- AMBROSIO, A. L., SANZ, L., SÁNCHEZ, E. I., WOLFENSTEIN-TODEL, C., CALVETE, J. J. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 415, p. 245-250, 2003.
- ARREGUÍN-ESPINOSA, R., ARREGUÍN-LOZANO, B. Biochemical properties of hemagglutinins in the mollusk *Pomacea flagellata*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 43, n. 6, p. 1241-1251, 1997.
- BANERJEE, S., CHAKI, S., BHOWAL, J., CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.
- BAROU, O., MEKRALDI, S., VICO, L., BOIVIN, G., ALEXANDRE, C., LAFAGE-PROUST, M. H. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. **Bone**, v. 30, n. 4, p. 604-612, 2002.
- BARRETT, J. T., HOWE, M. L. Hemagglutination and hemolysis by lichen extracts. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 1137-1139, 1968.
- BASU, P. S., MAJHI, R., BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 373-376, 2003.
- BAZIL, V., ENTLICHER, G. Complexity of lectins from the hard roe of perch (*Perca fluviatilis* L.). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 431-442, 1999.
- 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**, v. 74, p. 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 tumor. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 139-142, 2003.
- BERTRAND, O., COCHET, S., CARTRON, J-P. Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline. **Journal of Chromatography A**, v.822, p. 19-28, 1998.

- BOYD, W. C., REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **J. Immunol.**, v. 62, p. 333- 339, 1949.
- BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, Washington, v. 119, p. 419, 1954.
- BRINCK, U., KORABIEWSKA, M., BOSBACH, R., GABIUS, H. J. Detection of inflammation - and Neoplasia – associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 219-233, 1998.
- CANDY, L., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., MENU-BOUAOUICHE, L., ERARD, M., ROUGÉ, P. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, p. 396-402, 2003.
- CAVADA, B. S., SANTOS, C. F., GRANGEIRO, T. B., NUNES, E. P., SALES, P. V. P., RAMOS, R. L., DE SOUSA, F. A. M., CRISOSTOMO, C. V., CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675-680, 1998.
- COELHO, L. C. B. B., SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.
- CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.
- DANGUY, A., DECAESTECKER, C., GENTEN, F., SALMON, I., KISS, R. Applications of lectins and Neoglicoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 206-218, 1998.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404-427, 1964.
- DUNPHY, J. L., BARCHAM, G. J., BISCHOF, R. J., YOUNG, A. R., NASH, A., MEEUSEN, E. N. T. Isolation and characterization of a novel eosinophyl-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14916-14924, 2002.
- ELIFIO, S. L., DA SILVA, M. D. C. C., IACOMINI, M., *et al.* A lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **New Phytology**, v. 148, n. 2, p. 327-334, 2000.

- ESTOLA, E., VARTIA, K. O. Phytagglutinins in lichens. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, v. 33, p. 392-395, 1955.
- FITCHES, E., EDWARDS, M. G., MEE, C., GRISHIN, E., GATEHOUSE, A. M. R., EDWARDS, J. P., GATEHOUSE, J. A. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 61-70, 2004.
- FLEMMING, C., ULRICH, M., SCHWALL, G., SCHRODER, H. C., MULLER, W. E. G. W. Determination of lectin characteristics by a novel agglutination technique. **Analytical Biochemistry**, v. 205, p. 251-256, 1992.
- FRANCESCHINI, V., LAZZARI, M., CIANI, F. Lectin cytochemical localization of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*. **Anatomy and Embryology**, v. 202, n. 1, p. 49-54, 2000.
- FREIRE, M. G. M., GOMES, V. M., CORSINI, R. E., MACHADO, O. L. T., DE SIMONE, S. G., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S., MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.
- GABOR, F., BOGNER, E., WEISSENBOECK, A., WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *article in press*, 2004.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R. C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.
- GUPTA, N., SRIVASTAVA, P. S. Purification and characterization of a lectin from seeds and cotyledonary callus of *Zizyphus mauritiana*. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 552-556, 1998.
- HARKSWORTH, D. L., HILL, D. J. **The Lichen Forming Fungi**, New York, Chapman & Hall, 1984. cap. 1, p. 1-15. The liquen habit.
- HO, J. C. K., SZE, S. C. W., SHEN, W, Z., LIU, W. K. Mitogenic activity of edible mushroom lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, *article in press*, 2004.
- HOWE, M. L., BARRETT, J. T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 215, p. 97-104, 1970.
- HUOVINEN, K., AHTI, T. STENROOS, S. The Composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia* section *Cladonia* and group *Furcatae*. V. 38, p. 209-241, 1990.
- INGRAM, G. A. Haemagglutinins and haemolysins in selected lichen species. **The Bryologist**, v. 85, n. 4, p. 389-393, 1982.

- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211, 1998.
- KARDISH, N., SILBERSTEIN, L., FLEMINGER, G., GALUN, M. Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. Localization and function. **Symbiosis**, v. 11, p. 47-62, 1991.
- KAWAGISHI, H., TAKAGI, J., TAIRA, T., MURATA, T., USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.
- KELLENS, J. T. C., PEUMANS, W. J. Developmental accumulation of lectin in *Rhizoctonia solani*: a potential role as a storage protein. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 2489-2495, 1990.
- KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M., COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.
- KINO, M., YAMAGUCHI, K., UMEKAWA, H., FUNATSU, G. Purification and characterization of three mitogenic lectins from the roots of pokeweed (*Phytolacca americana*). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 683-688, 1995.
- KOIKE, T., BEPPU, H., KUZUYA, H., MARUTA, K., SHIMPO, K., SUZUKI, M., TITANI, K., FUJITA, K. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "Kidachi Aloe" (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). **The Journal of Biochemistry**, v.118, p. 1205-1210, 1995.
- KONOZY, E. H. E., BERNARDES, E. S., ROSA, C., FACA, V., GREENE, L. J., WARD, R. J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, p. 222-229, 2003.
- KUNSTFELD, R., PETZELBAUER, P. A unique case of a benign disseminated angioproliferation combining features of Kaposi's sarcoma and diffuse dermal angioendotheliomatosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, n. 4, p. 601-605, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANDSTEINER, K. & RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über hamolyse und hamagglutination. **Cbl. Bakt.**, vol. 45, p. 660-667, 1908.

- LIMPENS, E., BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 343-350, 2003.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins in higher plants. In: MARCUS, A. **The Biochemistry of Plants, a Comprehensive Treatise**. Proteins and nucleic acids, New York, Academic Press, v. 6, p. 371-447, 1981.
- LIS, H., SHARON, N. Biological properties of lectins. In: Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein I. J. editors. **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**, New York, Academic Press, p. 265-291, 1986.
- LOCKHART, C. M., ROWELL, P., STEWART, W. D. P. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 3, p. 127-130, 1978.
- MACHUKA, J. S., OKEOLA, O. G., VAN DAMME, E. J. M., CHRISPEELS, M. J., LEUVEN, F. V., PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterization of galactose-specific lectins from African yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, p. 721-728, 1999.
- MACIEL, E. V. M., ARAUJO-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**, *article in press*, 2004.
- MARTINEZ, M., CORDOBA, F. Isolation of fully active and stable corn coleoptile lectins. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 199-208, 2000.
- MEYER, W., BOLLHORN, M., STEDE, M. Aspects of general antimicrobial properties of skin secretions in the common seal *Phoca vitulina*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 41, n. 1, p. 77-79, 2000.
- MISHRA, V., SHARMA, R. S., YADAV, S., BABU, C. R., SINGH, T. Purification and characterization of four isoforms of Himalayan mistletoe ribosome-inactivating protein from *Viscum album* having unique sugar affinity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *article in press*, 2004.
- MITRA, N., SRINIVAS, V. R., RAMYA, T. N. C., AHMAD, N., REDDY, G. B., SUROLIA, A. Conformational stability of legume lectins reflect their different modes of quaternary association: solvent denaturation studies on Concanavalina A and winged bean acidic agglutinin. **Biochemistry**, v. 41, p. 9256-9263, 2002.
- MO, H., VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from shallot (*Allium ascalonicum*) bulbs. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 306, n. 2, p. 431-438, 1993.

- MO, H., WINTER, H. C., GOLDSTEIN, I. J., Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-10629, 2000.
- MOLINA, M. C., VICENTE, C. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 300-307, 2000.
- MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A., AINOUIZ, I. L. Plant lectins. In: OLIVEIRA, B. & SGARBIERI, V. **Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. p. 71-96. 1990.
- MOREIRA, R. A., MONTEIRO, A. C. O., HORTA, A. C. G., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* Var. *megacarpa* seed lectin. **Phytochemistry**, v. 46, n. 1, p. 139-144, 1997.
- MOREIRA, R. A., CASTELO-BRANCO, C. C., MONTEIRO, A. C. O., TAVARES R. O., BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.
- MUNIASAMY, N., AMBEDKAR, S. S., NAIK, S. R. Purification of protein A from *Staphylococcus aureus* by affinity chromatography using crosslinked macroporous glycidyl polymer. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 3, p. 263-266, 1998.
- NAEEM, A., KHAN, R. H., VIKRAM, 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, n. 1, p. 99-105, 2001.
- NAGAI, T., KAWABATA, S., SHISHIKURA, F., SUGITA, H. Purification, characterization, and amino acid sequence of an embryonic lectin in perivitelline fluid of the horseshoe crab. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 37673-37678, 1999.
- NASCIMENTO, S. C., PEREIRA, E. C., OLIVEIRA, A. F. M., SILVA, N. H., BOITARD, M., BERIEL, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: *Cladoniaceae*. **Acta Botânica Brasileira**, v. 8, n.1, 1995.
- NASH, T. H. Lichen Biology. Cambridge University Press, 1996. 303 p.
- NG, T. B., LAM, Y. W., WOO, N. Y. S. The immunostimulatory activity and stability of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) roe lectin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 94, p. 105-112, 2003.

- 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**, v. 314, p. 988-993, 2004.
- NISHI, K., TANEGASHIMA, A., YAMAMOTO, Y., USHIYAMA, I., IKEMOTO, K., YAMASAKI, S., NISHIMURA, A., RAND, S., BRINKMANN, B. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. **Legal Medicine**, v. 5, p. 117-131, 2003.
- NOMURA, K. ASHIDA H., UEMURA, N., KUSHIBE, S., OZAKI, T., YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 667-673, 1998.
- OGINO, M., YOSHIMATSU, K., EBIHARA, H., ARIKAWA, J. N-acetylgalactosamine (GalNAc)-specific lectins mediate enhancement of Hantaan virus infection. **Archives of Virology**, v. 144, n. 9, p. 1765-1777, 1999.
- PACE, K. E., LEBESTKY, T., HUMMEL, T., ARNOUX, P., KWAN, K., BAUM, L. G. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13091-13098, 2002.
- PEDINI, V., SCOCCO, P., GARGIULO, A. M., CECCARELLI, P., LORVIK, S. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 1363-1372, 2002.
- PEREIRA, E. C., CAMPOS-TAKAKI, G. M., SILVA, N. H., VICENTE, C., LEGAZ, M. E., XAVIER-FILHO, L. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v.64, p. 173-186, 1991.
- PETIT, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. **New Phytology**, v. 91, p. 705-710, 1982.
- PETIT, P., LALLEMANT, R., SAVOYE, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker *in situ*. **New Phytology**, v. 94, p. 103-110, 1983.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, p. 347-352, 1995.
- PEUMANS, W. J., VERHAERT, P., PFÜLLER, U., VAN DAMME, E. J. M. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). **FEBS Letters**, v. 396, p. 261-265, 1996.

- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 7, p. 199-228, 1998.
- PONCHEL, G., IRACHE, J. M., Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 34, P. 191-219, 1998.
- RAI, A. N., BERGMAN, B. Cyanolichens. **Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy**, vol. 102B, n. 1, p. 19-22, 2002.
- REGO, E. J. L., CARVALHO, D. D., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-446, 2002.
- REISFELD, R. A., LEWIS, U. J., WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-283, 1962.
- REYNOSO-CAMACHO, R., DE MEJÍA, E. G., LOARCA-PIÑA, G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 21-27, 2003.
- RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996. parte 5, p. 259-329. Interações das espécies.
- RODRIGUES, J. S., SANTOS-MAGALHÃES, N. S., COELHO, L. C. B. B., COUVREUR, P., PONCHEL, G., GREF, R. Novel core(polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 103-112, 2003.
- ROJO, M. A., YATO, M., ISHII-MINAMI, N., MINAMI, E., KAKU, H., CITORES, L., GIRBÉS, T., SHIBUYA, N. Isolation, cDNA cloning, biological properties, and carbohydrate binding specificity of sieboldin-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 340, p. 185-194, 1997.
- ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. cap. 6, p. 95-115, 1997.
- RUDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 130-152, 1998.
- SAMPAIO, A. H., ROGERS, D. J., BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998a.

- SAMPAIO, A. H., ROGERS, D. J., BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina**, v. 41, p. 427-433, 1998b.
- SANTOS, N. P. Estudo comparativo da atividade antitumoral dos extratos e frações purificadas de *Cladonia verticillaris* (líquen) contra diferentes tumores sólidos experimentais. Dissertação de Mestrado, U.F.PE, 1996. 112 p.
- SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Science**, v. 18, p. 221-226, 1993.
- SHARON, N., LIS, H., A Century of lectin research. **Trends in Biochemical Science**, v. 12, p. 488-491, 1988.
- SHARON, N., LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **Federation American Societies Experimental Journal**, Bethesda, v. 4, p. 3198-3208, 1990.
- SHARON, N., LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6586-6591, 2002.
- SPADARO, A. C. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. cap. 5, p. 71-94, 1997.
- SPADARO, A. C. C., FONSECA, M. J. V. Cromatografia por bioafinidade. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. (coordenadores). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP. cap. 7, p. 117-140, 1997.
- SYED, F. B. F., JOSHI, B. N., SIVARAMAN, H., KHIRE, J. M., KHAN, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, n. 3, p. 361-367, 1999.
- TRIGUEROS, V., LOUGARRE, A., ALI-AHMED, D., RAHBÉ, Y., GUILLOT, J., CHAVANT, L., FOURNIER, D., PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-298, 2003.
- ULFIG, N., BOHL, J., NEUDORFER, F., REZAIE, P. Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. **Brain & Development**, Article in Press, 2003.
- UMETSU, K., YAMASHITA, K., SUZUKI, T. Purification and carbohydrate-binding specificities of a blood type B binding lectin from hemolymph of a crab (*Charybdis japonica*). **The Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 718-721, 1991.
- VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., BEMER, V., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in

- the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Molecular Biology**, v. 29, p. 579-598, 1995.
- VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J., PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.
- WANG, H., NG, T. B. Isolation of a novel N-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. **Protein Expression and Purification**, v. 29, p. 156-160, 2003a.
- WANG, H. X., NG, T. B. Purification of castamollin, a novel antifungal protein from Chinese chestnuts. **Protein Expression and Purification**, v. 32, p. 44-51, 2003b.
- WANG, H., NG, T. B., LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-539, 2003.
- WANG, R., KONG, C., KOLATKAR, P., CHUNG, M. C. M. A novel dimer of a C-type lectin-like heterodimer from the venom of *Calloselasma roddostoma* (Malayan pit viper). **FEBS Letters**, v. 508, p. 447-453, 2001.
- WITITSUWANNAKUL, R., WITITSUWANNAKUL, D., SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, 1998.
- WINTER, H. C., MOSTAFAPOUR, K., GOLDSTEIN, I. J. The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1,3Gal and Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14996-15001, 2002.
- WONG, J. H., NG, T. B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 301, p. 545-550, 2003.
- XAVIER-FILHO, L., RIZZINI, C. T. **Manual de Liquenologia Brasileiro**, Recife, Editora U.F.PE, 1976. 431 p.
- YAMAGUCHI, M., JIMBO, M., SAKAI, R., MURAMOTO, K., KAMIYA, H. Purification and characterization of *Microcystis aeruginosa* (freshwater cyanobacterium) lectin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 119, p. 593-597, 1998.
- YANO-MELO, A. M., VICENTE, C., XAVIER-FILHO, L. Allelopathic effect of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlings in *Allium cepa* L. **Tropical Bryology**, v. 17, p. 133-139, 1999.

ZHANG, P-F., CHEN, P., HU W-J., LIANG, S-P. Huwentoxin-V, A novel insecticidal peptide toxin from the spider *Selenocosmia huwena*, and a natural mutant of the toxin: indicates the key amino acid residues related to the biological activity. **Toxicon**, v. 42, p. 15-20, 2003.

5 Artigo a ser submetido ao periódico *Biologicals*

**PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A
LECTIN FROM THE LICHEN *Cladonia verticillaris***

SILVA, M. D. C.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S. & COELHO, L. C. B. B.

**PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM
THE LICHEN *CLADONIA VERTICILLARIS***

**SILVA, M. D. C.^a; PAIVA, P. M. G., M. C., Dra.^a; CORREIA, M. T. S., M. C., Dra.^a &
COELHO, L. C. B. B., M.C., Ph.D.^{a*}**

**^aUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de
Bioquímica, Rua Prof. Nelson Chaves S/N, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, PE,
Brasil.**

***Corresponding author: Michele Dalvina Correia da Silva, e-mail address:**

micheledalvina@ig.com.br

Supported by CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

ABSTRACT

Cladonia verticillaris lichen lectin ClaveLL was purified through molecular exclusion chromatography of F₁ (0-30 % ammonium sulphate fraction). Ground lichen was submitted to extraction and a partial purification by ammonium sulphate fractionations. Samples were assayed to haemagglutinating activity (HA) and proteins were estimated. The most active fraction, F₁, and ClaveLL were submitted to inhibition, thermal stability and ion dependency assays, as well as chromatographies. ClaveLL was evaluated in relation to HA stability in pH values (2 to 12) assays. F₁ and ClaveLL were analyzed in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for native, acidic and basic proteins, as well as denatured proteins. F₁ was partially inhibited by carbohydrates and glycoproteins; it was totally inhibited by bovine fetal serum and rabbit serum glycoproteins. ClaveLL was partially inhibited by carbohydrates and ovalbumin, or totally inhibited by fetuin, asialo-fetuin, casein, asocasein, colostrum, rabbit and bovine fetal serum glycoproteins. F₁ was thermostable (80 °C, 30 min) while ClaveLL was sensible to temperature (above 70 °C, 30 min). F₁ and ClaveLL were not ion dependents, but MnCl₂, BaCl₂, CaCl₂ and MgCl₂ stimulated HA. ClaveLL was most active in acidic (5.5) or basic (11.0) pH values. SDS-PAGE resolved F₁ and ClaveLL as unique polypeptide bands (glycosylated), with molecular weight smaller than 14 kDa. Glycosylated F₁ might have glucose/mannose residues since it did bind to Cramoll 1,4-Sepharose, an affinity matrix with *Cratylia mollis* seed lectin, isoforms 1 and 4 glucose/mannose specific, immobilized to Sepharose CL-4B. PAGE for native, acidic and basic proteins also revealed a ClaveLL unique band with low molecular weight. ClaveLL gel filtration chromatography in ÄKTA-FPLC system, resolved three distinct active peaks, that suggested molecular aggregate forms to the native lectin, with molecular weights 170, 110 (principal peak) and 82 kDa. In conclusion, highly purified glycosylated ClaveLL is pH stable and mainly inhibited by glycoproteins.

Key words: lectin, lichen lectin, *Cladonia verticillaris*, glycoprotein.

INTRODUÇÃO

Os líquens são organismos simbióticos, formados pela associação entre uma ou mais espécies de algas, *Cyanobacteria* e *Chlorophyta*, fotobiontes, e uma espécie de fungo, micobionte. Em torno de 20 % das espécies fúngicas conhecidas formam líquens, dentre os quais, a maioria são ascomicetos (98 %), e alguns deuteromicetos (1,6 %) e basidiomicetos (0,4 %) (Rai & Bergman, 2002).

Um talo líquênico é formado por camadas sucessivas de algas e fungos. O córtex superior do talo é composto por hifas entrelaçadas que protegem a camada gonidial formada por algas. A terceira camada, a medula, é formada por um feixe de hifas frouxas e, logo abaixo, está o córtex inferior, formado por outro feixe de hifas (Nash, 1996).

Os líquens têm sido objeto de estudo devido ao fato de suas substâncias apresentarem, dentre outras, ação antimicrobiana (Pereira *et al.*, 1991), antimitótica, antitumoral, antifúngica e citotóxica (Nascimento *et al.*, 1995). Dentre as substâncias produzidas pela simbiose, há depsídeos, depsídomas, dibenzofuranos e o ácido úsnico. Algumas destas substâncias originadas do metabolismo secundário, possivelmente desempenham um papel importante na sua fisiologia, além do papel de defesa (Yano-Melo *et al.*, 1999).

Lectinas constituem uma classe de proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que reconhecem carboidratos ou glicoconjugados, de forma reversível, livres ou conjugados a superfícies celulares, através de seus sítios de ligação nos quais a hidrofobicidade característica é a principal força de interação (Kennedy *et al.*, 1995). Essas moléculas possuem distribuição ampla na natureza, sendo mais frequentemente isoladas de sementes vegetais (Freire *et al.*, 2002; Rego *et al.*, 2002), mas também detectadas e purificadas de organismos como vertebrados (Dunphy *et al.*, 2002), invertebrados (Pace *et al.*, 2002), bactérias (Syed *et al.*, 1999), leveduras, algas (Ambrosio *et al.*, 2003), fungos (Trigueros *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003) e líquens (Howe & Barrett, 1970; Lockhart *et al.*,

1978; Ingram, 1982; Elifio *et al.*, 2000; Molina & Vicente, 2000). Alguns autores têm sugerido que lectinas de líquens podem ter um papel importante no estabelecimento da simbiose, como um fator de reconhecimento entre as espécies fotobiontes e micobionte (Lockhart *et al.*, 1978; Petit, 1982; Petit *et al.*, 1983; Kardish *et al.*, 1991; Elifio *et al.*, 2000; Molina & Vicente, 2000).

No presente trabalho, uma lectina do líquen *Cladonia verticillaris* (ClaveLL) foi purificada e caracterizada parcialmente. Um protocolo simples foi desenvolvido para isolar em alta pureza uma lectina ativa com elevado peso molecular e grande afinidade por glicoproteínas.

MATERIAIS E MÉTODOS

PURIFICAÇÃO PARCIAL

A espécie *C. verticillaris* foi coletada pela manhã, no município de Alhandra, Estado da Paraíba, Brasil, e levada ao Laboratório de Glicoproteínas. O líquen foi limpo, seco em temperatura ambiente e triturado. A farinha do líquen foi acondicionada em vidros e armazenada a - 20°C. Uma parte desta farinha foi submetida à extração a 10 % (p/v) em tampão fosfato de sódio 0,15 M, contendo NaCl 0,15 M (TF), pH 7,0, por 16 h, em temperatura ambiente, seguida de filtração em gaze e centrifugação em centrífuga refrigerada a 8.000 rpm, por 20 min; o extrato bruto (E) foi submetido a fracionamentos com sulfato de amônio para precipitação protéica, em temperatura ambiente, por 4 h. Foram obtidas três frações, F₁ (0-30 %), F₂ (30-60 %) e F₃ (60-90 %), por centrifugação.

PURIFICAÇÃO POR MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Uma alíquota de 500 µl (18 mg) da fração mais ativa, F₁, foi aplicada à coluna de Sephadex G-100 (1,4 x 63 cm), utilizada como suporte de exclusão molecular. A coluna

contendo 100 ml de gel foi eluída com TF, pH 7,0, a um fluxo de 20 ml/h. As frações coletadas foram monitoradas por absorbância em UV a 280 nm e por AH.

A homogeneidade da lectina do líquen *C. verticillaris*, isolada por exclusão molecular (ClaveLL), assim como sua massa molar sob condições nativas, foram avaliadas através de cromatografia de filtração em gel. Uma alíquota de ClaveLL (1mg em 2 ml de solução de NaCl 0,5 M) foi aplicada a uma coluna de Sephacryl S-300 conectada a um sistema ÄKTA-FPLC.

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL

ENSAIOS DE ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE Em placas de microtitulação foram colocados 50 µl de NaCl 0,15 M em cada poço, e adicionadas as amostras obtidas no processo de purificação (50 µl) ao segundo poço de cada ensaio. As amostras foram diluídas de forma serial e, em seguida foram adicionados em todos os poços 50 µl de suspensão a 2,5 % (v/v) em NaCl 0,15 M de eritrócitos glutarizados (de animais e humanos). O título foi determinado após repouso durante 45 min. A atividade hemaglutinante (AH) foi avaliada como o inverso da maior diluição com aglutinação total. A AH específica (AHE) foi determinada como a AH dividida pela concentração protéica.

Alíquotas contendo F₁ e ClaveLL foram incubadas em temperaturas crescentes de 30 a 100 °C, por 30 min, seguidas de resfriamento imediato em temperatura ambiente e determinação da AH; uma alíquota de cada amostra foi submetida a aquecimento contínuo em todas as temperaturas.

ClaveLL foi incubada em soluções contendo íons divalentes (MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, HgCl₂, CdCl₂, CoCl₂) com concentrações entre 5 e 40 mM. Em placas de microtitulação foram colocados 50 µl de solução de diferentes íons nas concentrações referidas em todos os poços exceto no segundo poço de cada ensaio. Neste poço foram

colocados 50 µl de solução dos respectivos íons com o dobro da concentração em estudo, e adicionados 50 µl da amostra; após diluições seriais, a incubação foi feita com repouso por 15 min e, em seguida, foram adicionados em todos os poços 50 µl de suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho.

ClaveLL foi também incubada frente a valores de pH compreendidos entre 2 e 12, em placas de microtitulação, após diluições seriais, por 15 min; em seguida, foram adicionados em todos os poços 50 µl de suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho. O título foi determinado após repouso durante 45 min.

ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA AH DAS AMOSTRAS POR CARBOIDRATOS E GLICOPROTEÍNAS Em placas de microtitulação foram colocados 50 µl de solução de diversos carboidratos (concentrações entre 1,56 e 200 mM em NaCl 0,15 M) ou solução de glicoproteínas (concentrações entre 1,95 e 500 µg/ml, em NaCl 0,15 M) em todos os poços exceto no segundo poço de cada ensaio. Neste poço foram colocados 50 µl de solução dos respectivos carboidratos ou glicoproteínas com o dobro da concentração em estudo, e adicionados 50 µl das amostras contendo AH; foram procedidas diluições seriais e, após repouso por 15 min, foram adicionados em todos os poços 50 µl de suspensão de eritrócitos glutarizados de coelho. O título foi determinado após repouso durante 45 min. A inibição da AH foi determinada como o inverso da maior diluição com aglutinação total.

ESTIMATIVA DE PROTEÍNAS A determinação quantitativa de proteínas nas amostras obtidas foi procedida segundo Lowry *et al.* (1951) sendo utilizada uma curva padrão de albumina sérica bovina, com valores compreendidos entre 0 e 500 µg.

ENSAIOS DE DIFUSÃO RADIAL E, F₁ e ClaveLL foram submetidos ao ensaio de difusão radial em gel de agarose a 1 % em NaCl 0,15 M; as amostras foram aplicadas nos poços centrais dos géis e glicoproteínas/proteínas foram aplicadas nos poços periféricos dos géis. O ensaio foi deixado a 4 °C por 72 h; em seguida as placas foram lavadas dez vezes com NaCl 0,15 M e coradas com Azul de Coomassie. Após 24 h, as placas foram descoradas com solução de metanol/ácido acético e analisadas.

ELETROFORESES EM GEL DE POLIACRILAMIDA Foram realizadas técnicas eletroforéticas em gel de poliacrilamida (PAGE), para proteínas nativas, ácidas (Davis, 1964), nativas, básicas (Reisfeld *et al.*, 1962) e PAGE contendo sulfato sódico de dodecila (SDS-PAGE), para proteínas desnaturadas (Laemmli, 1970). Em SDS-PAGE as amostras foram aplicadas na forma liofilizada com ou sem tratamento com β-mercaptoetanol. As corridas foram realizadas com uma corrente constante, em temperatura ambiente. As bandas protéicas do gel para proteínas ácidas ou SDS foram detectadas com a utilização do corante Azul de Coomassie; a detecção de bandas no gel para proteínas básicas foi feita com o corante negro de amido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A facilidade de obtenção do líquen *C. verticillaris* devidamente identificado assim como o interesse em lectinas permitiu o desenvolvimento desse trabalho.

O protocolo de purificação estabelecido para ClaveLL está resumido na Tabela 1. E apresentou elevada concentração protéica (11 mg/ml) e AH (256), constituindo um material adequado para a purificação subsequente. E, F₁, F₂ e F₃ aglutinaram eritrócitos tratados com glutaraldeído de todos os tipos sanguíneos do sistema ABO, assim como eritrócitos glutarizados de coelho; essas amostras, no entanto, apresentaram maior AH com eritrócitos de

coelho. F₁ constituiu a amostra de escolha para os processos cromatográficos e caracterizações subseqüentes desde que apresentou maior AH, AH Total (AHT), concentração protéica e AHE (Tabela 1).

Através de cromatografia de exclusão molecular foram obtidos dois picos bem definidos: o primeiro apresentando-se clarificado e com AH, denominado ClaveLL; o segundo contendo uma forte coloração, típica de F₁, sem AH (Figura 1). O protocolo estabelecido para o isolamento de ClaveLL utilizando o suporte Sephadex G-100 constitui um meio bastante econômico, uma vez que o suporte é reutilizado por várias vezes consecutivas, resolvendo o isolamento de ClaveLL com o mesmo rendimento e apresentando-se totalmente limpo da coloração de F₁.

F₁ e ClaveLL apresentaram comportamento distinto frente a diferentes temperaturas (Figura 3); para F₁ o ensaio indicou que, a partir de 90 °C, há desnaturação protéica pela queda da AH. Nas demais temperaturas, a atividade lectínica manteve-se estável e, a 60 °C houve um aumento da AH. ClaveLL mostrou ser sensível ao aumento da temperatura, havendo uma queda gradual de sua AH a partir dos 40 °C que desapareceu completamente a 70 °C; comportamento semelhante foi observado para a lectina do líquen *Dictyonema glabratum* (Elifio *et al.*, 2000), que incubada por 30 min, perde gradualmente sua AH também a partir dos 40 °C, com perda total aos 80 °C. Outra lectina, do cogumelo *Mycoleptodonoides aitchisonii*, MAL (Kawagishi *et al.*, 2001) é termossensível perdendo totalmente sua AH em 50 °C. F₁ foi termoestável, suportando temperaturas de até 80 °C na qual ainda manteve AH elevada, tal como Cramoll (Correia & Coelho, 1995) e a lectina do cogumelo *Polyporus adusta* (Wang *et al.*, 2003), estável até os 70 °C apresentado perda total de AH somente aos 90 °C; além disso, F₁ sofreu estimulação de sua AH a 60 °C. Essa potencial estabilidade apresentada por F₁ pode ter ocorrido devido a possíveis interferentes presentes na amostra, que possam ter causado dispersão dos eritrócitos, quando o material foi aquecido.

Os ensaios de aglutinação para ClaveLL na presença de íons mostraram que a amostra teve sua atividade lectínica aumentada, quando incubada com MnCl_2 , BaCl_2 , CaCl_2 e MgCl_2 (Figura 4). ClaveLL não foi dependente, mas foi estimulada por estes íons em sua atividade lectínica.

ClaveLL apresentou atividade hemaglutinante em valores de pH básico a ácido (Figura 5); neste ensaio foi observado que a amostra é mais ativa em pH ácido (5,5) e pH básico (11,0), porém aglutina em todos os valores de pH compreendidos de 5,5 a 12,0 (houve dispersão de eritrócitos nos demais valores ensaiados, 2,0-5,0, impedindo a avaliação da AH).

A manutenção da AH de ClaveLL desde um pH ácido (5,5) à um pH básico (12,0) assim como a presença de dois picos (pH 5,5 e pH 11,0) de AH na amostra é indicativo da alta estabilidade da lectina em diferentes soluções, como observado em lectinas dos cogumelos *Mycoleptodonoides aitchisonii* (Kawagishi *et al.*, 2001) e *Ganoderma capense* (Ngai & Ng, 2004), que também apresentaram estabilidade da AH em valores de pH variando de 4 a 9 e de 4 a 11, respectivamente. Os dois picos de aglutinação sugerem também possíveis formas moleculares diferentes em ClaveLL.

E apresentou uma inibição parcial da AH na presença de galactose (25 e 50 mM), manose (50 e 100 mM) e lactose (concentrações entre 25 e 200 mM). As inibições parciais para F_1 e ClaveLL estão citadas em ordem decrescente de capacidade inibitória. Nos ensaios de inibição utilizando F_1 , a amostra foi parcialmente inibida por N-acetil-D-glicosamina, xilose, arabinose, ramnose e manose (Tabela 2), sendo totalmente inibida por glicoproteínas presentes em soro de coelho (em todas as concentrações testadas) e por soro fetal bovino (concentrações entre 62,5 e 500 $\mu\text{g/ml}$). Fetuína, caseína, ovalbumina e peroxidase inibiram parcialmente F_1 (Tabela 3). Nos ensaios utilizando ClaveLL, esta foi parcialmente inibida por N-acetil-D-glicosamina, galactose, ramnose, manose, glicose e trealose (Tabela 4). Glicoproteínas presentes em soro de coelho, soro fetal bovino, fetuína, asialo-fetuína, caseína,

asocaseína e glicoproteínas presentes em colostro inibiram totalmente a AH em todas as concentrações testadas; ovalbumina foi um inibidor parcial da AH de ClaveLL (Tabela 5).

No ensaio de difusão radial, observou-se que E migrou e reconheceu glicoproteínas presentes em soro de coelho (Figura 6 a); ClaveLL reconheceu a lectina de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll 1,4) (Figura 6 d) e glicoproteínas presentes em soro de coelho; F₁ reconheceu Cramoll 1,4 (Figura 6 b), glicoproteínas presentes em soro humano do tipo A⁺ (Figura 6 c) e presentes em soro de coelho.

F₁ e ClaveLL foram principalmente inibidas por glicoproteínas. A elevada afinidade das amostras por glicoproteínas foi novamente confirmada com o ensaio de difusão radial, onde houve forte ligação do E, F₁ e ClaveLL com glicoproteínas presentes em soro de coelho, assim como da F₁ e ClaveLL com a Cramoll 1,4; o reconhecimento com a Cramoll 1,4 (uma lectina não glicoprotéica, glicose/manose específica) indica que as amostras glicosiladas podem conter uma glicoproteína com resíduos de glicose/manose.

F₁ glicosilada pode possuir resíduos de glicose/manose, uma vez que em cromatografia em Cramoll 1,4-Sepharose (uma matriz de afinidade com a lectina de semente de *Cratylia mollis*, isoformas 1 e 4 glicose/manose específica, imobilizada à Sepharose CL-4B) F₁ apresentou um material adsorvido e eluído com NaCl 0,5 M (dado não mostrado).

Em SDS-PAGE F₁ (Figura 7 a) e ClaveLL (Figura 7 c) apresentaram uma única banda, com peso molecular aproximado de 14 kDa, caracterizada em ClaveLL como glicosilada por coloração com o reativo de Schiff (Figura 7 e). PAGE para proteínas nativas, ácidas apresentou uma banda única para ClaveLL (Figura 7 f), que migrou junto com a frente de corrida; o mesmo foi observado em PAGE para proteínas nativas, básicas (Figura 7 h), com uma única banda na frente de corrida porém, corada com maior intensidade. Estes resultados sugerem a possível presença de duas proteínas em ClaveLL, que podem ser duas lectinas ou apenas uma lectina e outra proteína.

A banda única detectada em F₁, de baixo peso molecular, também detectada em ClaveLL (glicosilada) parece estar presente em todas as preparações, incluindo os picos sem AH, da coluna de Sephadex G-100 (Figura 7 b e 7 d).

Cromatografia por filtração em gel em sistema ÄKTA-FPLC resolveu ClaveLL em três picos distintos com AH, com pesos moleculares estimados em 170, 110 (pico principal) e 82 kDa, e um pico sem AH, com peso molecular estimado em 44 kDa (figura 2). Os picos ativos sugerem formas de agregados moleculares para a lectina nativa, compostos por subunidades com baixos pesos moleculares, idênticos (ou subunidades microheterogêneas); a lectina isolada do cogumelo *Polyporus squamosus* (Mo *et al.*, 2000) apresentou massa molecular de 52 kDa através de filtração em gel, e massa de 28 kDa em SDS-PAGE mostrando ser um homodímero de subunidades idênticas de 28 kDa; da mesma forma, MAL (Kawagishi *et al.*, 2001) mostrou ser um homotetrâmero com peso molecular da proteína nativa estimada em torno de 64 kDa, por filtração em gel.

Em síntese, ClaveLL glicosilada altamente purificada é uma lectina estável a mudanças de pH e principalmente inibida por glicoproteínas.

Agradecimentos:

Os autores são gratos a liquenologista, Prof^a Dra. Eugênia Cristina Gonçalves Pereira, pela identificação do líquen *Cladonia verticillaris*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSIO, A. L., SANZ, L., SÁNCHEZ, E. I., WOLFENSTEIN-TODEL, C., CALVETE, J. J. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 415, p. 245-250, 2003.
- CORREIA, M. T. S., COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, Isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.
- DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 121, p. 404-427, 1964.
- DUNPHY, J. L., BARCHAM, G. J., BISCHOF, R. J., YOUNG, A. R., NASH, A., MEEUSEN, E. N. T. Isolation and characterization of a novel eosinophyl-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 14916-14924, 2002.
- ELIFIO, S. L., DA SILVA, M. D. C. C., IACOMINI, M., *et al.* A Lectin from the lichenized basidiomycete *Dictyonema glabratum*. **New Phytology**, v. 148, n. 2, p. 327-334, 2000.
- FREIRE, M. G. M., GOMES, V. M., CORSINI, R. E., MACHADO, O. L. T., DE SIMONE, S. G., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S., MACEDO, M. L. R. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 61-68, 2002.
- HOWE, M. L., BARRETT, J. T. Studies on a hemagglutinin from the lichen *Parmelia michauxiana*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 215, p. 97-104, 1970.
- INGRAM, G. A. Haemagglutinins and haemolysins in selected lichen species. **The Bryologist**, v. 85, n. 4, p. 389-393, 1982.

- KARDISH, N., SILBERSTEIN, L., FLEMINGER, G., GALUN, M. Lectin from the lichen *Nephroma laevigatum* Ach. Localization and function. **Symbiosis**, v. 11, p. 47-62, 1991.
- KAWAGISHI, H., TAKAGI, J., TAIRA, T., MURATA, T., USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.
- KENNEDY, J. F., PAIVA, P. M. G., CORREIA, M. T. S., CAVALCANTI, M. S. M., COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-30, 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LOCKHART, C. M., ROWELL, P., STEWART, W. D. P. Phytohaemagglutinins from the nitrogen-fixing lichens *Peltigera canina* and *P. polydactyla*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 3, p. 127-130, 1978.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MO, H., WINTER, H. C., GOLDSTEIN, I. J., Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-10629, 2000.
- MOLINA, M. C., VICENTE, C. Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xanthoria parietina*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 300-307, 2000.

- NASCIMENTO, S. C., PEREIRA, E. C., OLIVEIRA, A. F. M., SILVA, N. H., BOITARD, M., BERIEL, H. Screening de atividade citotóxica de extratos liquênicos: *Cladoniaceae*. **Acta Botânica Brasileira**, v. 8, n. 1, 1995.
- NASH, T. H. Lichen Biology. Cambridge University Press, 1996. 303 p.
- 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**, v. 314, p. 988-993, 2004.
- PACE, K. E., LEBESTKY, T., HUMMEL, T., ARNOUX, P., KWAN, K., BAUM, L. G. Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 15, p. 13091-13098, 2002.
- PEREIRA, E. C., CAMPOS-TAKAKI, G. M., SILVA, N. H., VICENTE, C., LEGAZ, M. E., XAVIER-FILHO, L. Fractionation of *Cladonia substellata* crude extracts and detection of antimicrobial activity. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v. 64, p. 173-186, 1991.
- PETIT, P. Phytolectins from the nitrogen-fixing lichen *Peltigera horizontalis*: the binding pattern of primary protein extract. **New Phytology**, v. 91, p. 705-710, 1982.
- PETIT, P., LALLEMANT, R., SAVOYE, D. Purified phytolectin from the lichen *Peltigera canina* var *canina* which binds to the phycobiont cell walls and its use as cytochemical marker *in situ*. **New Phytology**, v. 94, p. 103-110, 1983.
- RAI, A. N., BERGMAN, B. Cyanolichens. **Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy**, vol. 102B, n. 1, p. 19-22, 2002.
- REGO, E. J. L., CARVALHO, D. D., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., NOVELLO, J. C. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattlebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-446, 2002.

REISFELD, R. A., LEWIS, U. J., WILLIAMS, D. E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, v. 195, p. 281-283, 1962.

SYED, F. B. F., JOSHI, B. N., SIVARAMAN, H., KHIRE, J. M., KHAN, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, n. 3, p. 361-367, 1999.

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

YANO-MELO, A. M., VICENTE, C., XAVIER-FILHO, L. Allelopathic effect of the *Cladonia verticillaris* lichen extracts and fumarprotocetraric acid on the early growth of germinated seedlings in *Allium cepa* L. **Tropical Bryology**, v. 17, p. 133-139, 1999.

WANG, H., NG, T. B., LIU, Q. A novel lectin from the wild mushroom *Polyporus adusta*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 535-539, 2003.

Tabela 1. Purificação da lectina de *Cladonia verticillaris*, ClaveLL, isolada da F₁

Amostra	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	AH	AHE	AHT	R %	Purificação
EB	120,0	11	1320,00	256	23,27	30.720	100	-
F ₁	15,5	36,5	565,75	8.192	224,43	126.976	413	9,64
ClaveLL	372,0	0,0631	23,47	32	507,13	11.904	38,75	21,79

Tabela 2. Inibição da AH de F₁ utilizando carboidratos

Carboidratos	Concentrações (mM)							
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56
Ramnose	4.096	1.024	1.024	1.024	2.048	4.096	4.096	4.096
Lactose	*	*	*	*	*	*	*	*
Galactose	*	*	*	*	*	*	*	*
Glicose	*	*	*	*	*	*	*	*
Rafinose	*	*	*	*	*	*	*	*
Frutose	*	*	*	*	*	*	*	*
Maltose	*	*	*	*	*	*	*	*
Xilose	*	2.048	2.048	2.048	2.048	2.048	4.096	4.096
Arabinose	4.096	4.096	4.096	4.096	4.096	2.048	2.048	2.048
Manose	*	*	*	4.096	4.096	4.096	4.096	4.096
N-Acetil-D-Glicosamina	1.024	2.048	4.096	4.096	2.048	2.048	2.048	2.048

* Ausência de Inibição

F₁ com AH = 8.192

Tabela 3. Inibição da AH de F₁ utilizando glicoproteínas

Glicoproteínas	Concentrações (µg/ml)								
	500	250	125	62,5	31,25	15,62	7,81	3,90	1,95
Soro de coelho	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soro fetal bovino	0	0	0	0	32	128	256	1.024	2.048
Fetuína	64	128	512	1.024	2.048	4.096	8.192	16.384	16.384
Caseína	64	256	512	1.024	2.048	4.096	8.192	16.384	*
Ovalbumina	2.048	2.048	2.048	4.096	8.192	16.384	16.384	16.384	*
Peroxidase	8.192	16.384	32.768	32.768	32.768	32.768	32.768	32.768	16.384

* Ausência de Inibição

F₁ com AH = 524.288

Tabela 4. Inibição da AH de ClaveLL utilizando carboidratos

Carboidratos	Concentrações (mM)			
	200	100	50	25
Glicose	32	32	32	32
Galactose	16	16	16	16
Manose	16	32	32	*
Fucose	*	*	*	*
Ramnose	16	16	16	32
Trealose	32	32	32	32
N-Acetil-D-Glicosamina	8	16	16	32

* Ausência de inibição

ClaveLL com AH = 64

Tabela 5. Inibição da AH de ClaveLL utilizando glicoproteínas

Glicoproteínas	Concentrações (µg/ml)			
	500	250	125	62,5
Soro de coelho	0	0	0	0
Soro fetal bovino	0	0	0	0
Fetuína	0	0	0	0
Caseína	0	0	0	0
Ovalbumina	4	4	4	4
Asialo-fetuína	0	0	0	0
Asocaseína	0	0	0	0
Colostro	0	0	0	2
ClaveLL com AH = 64				

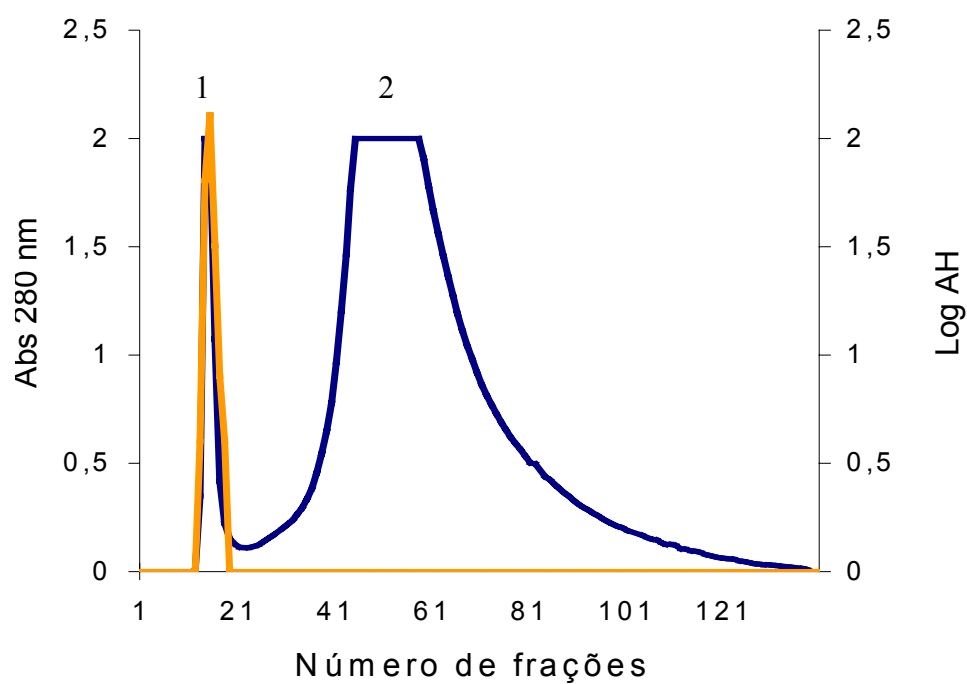


Figura 1. ClaveLL isolada da F_1 através de cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna de Sephadex G-100, e sua AH.

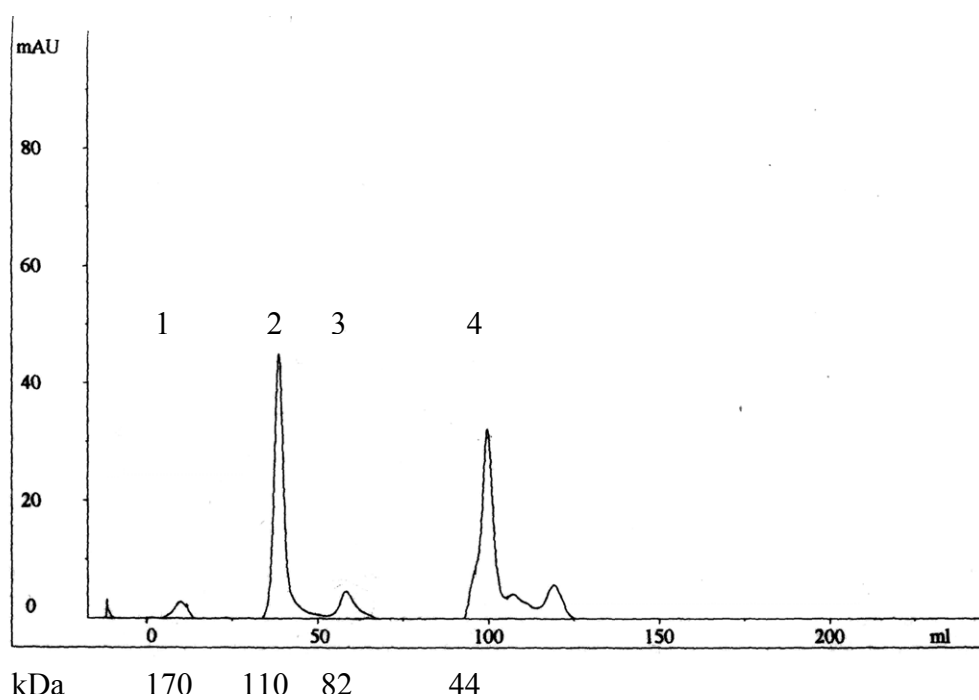


Figura 2. ClaveLL resolvida em dois picos principais através de cromatografia de exclusão molecular utilizando coluna de Sephacryl S-300 conectada a um sistema ÄKTA-FPLC.

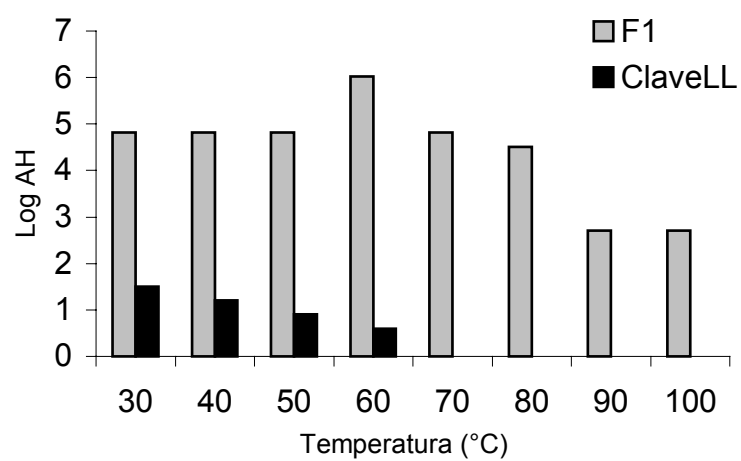


Figura 3. Efeito da temperatura sobre a AH de F₁ e ClaveLL isolada dessa fração. A AH de F₁ e ClaveLL em temperatura ambiente corresponde a observada em 30 °C.

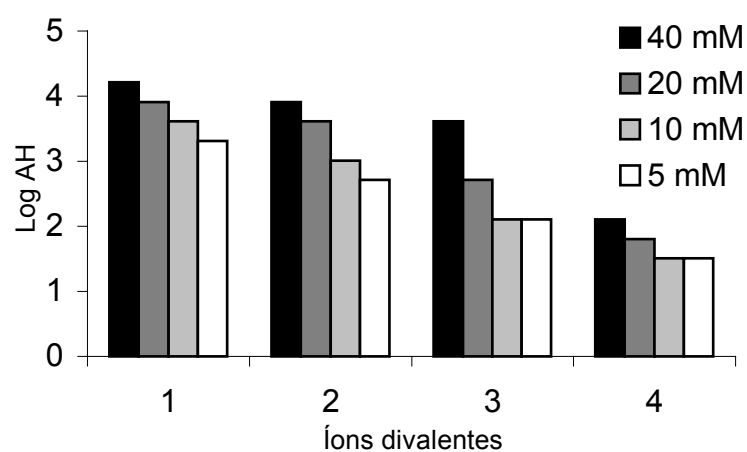


Figura 4. Efeito de íons sobre a AH de ClaveLL isolada da F₁. 1, MnCl₂; 2, BaCl₂; 3, CaCl₂; 4, MgCl₂. A AH de ClaveLL na ausência de íons corresponde a observada no ensaio 4, concentrações de 5 e 10 mM.

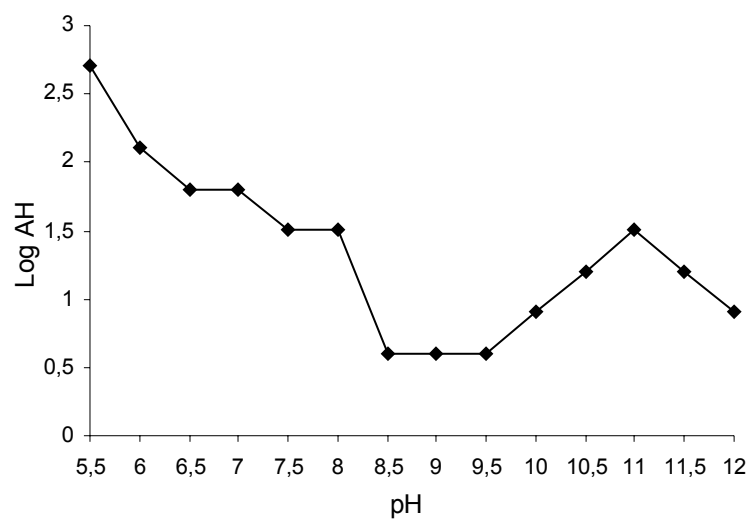


Figura 5. Efeito do pH sobre a AH de ClaveLL isolada da F₁. A AH de ClaveLL em pH de extração corresponde a observada nos valores de pH 7,5 e 8,0.

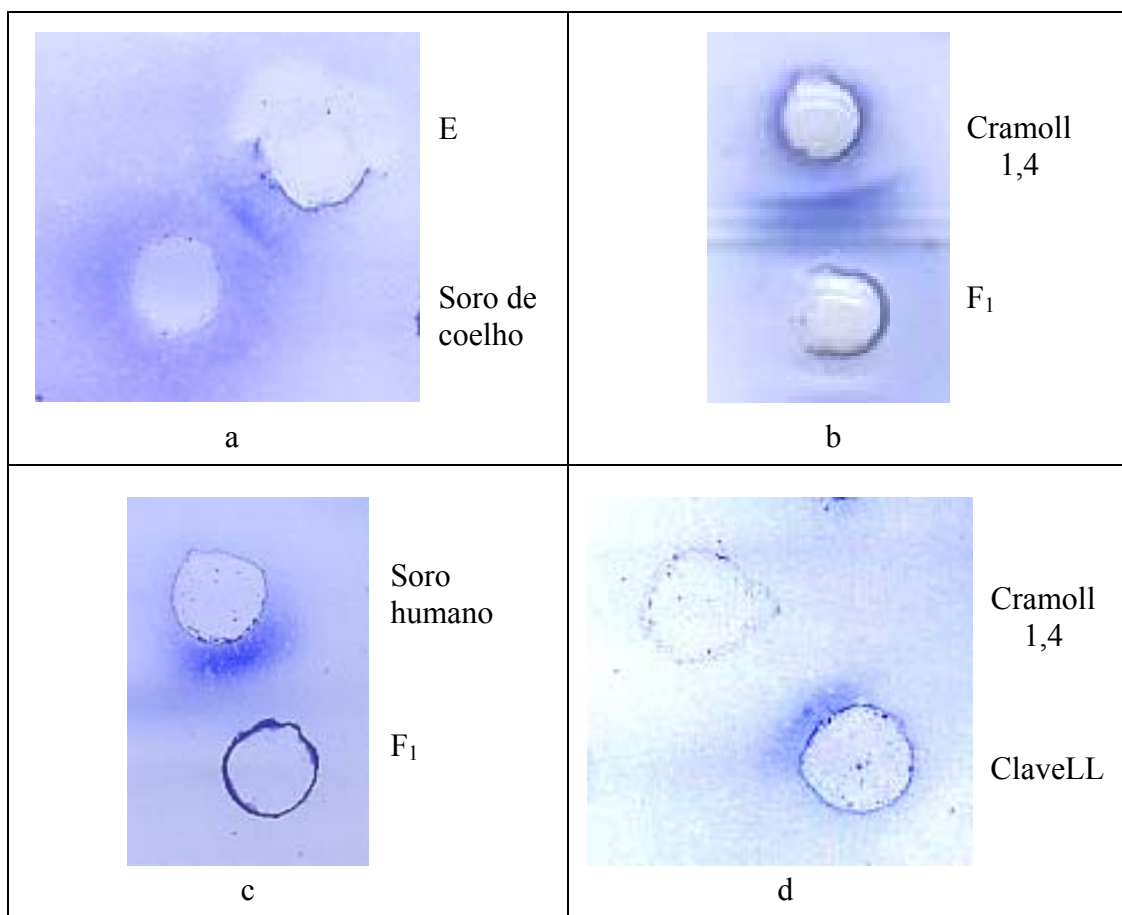


Figura 6. Difusão Radial com E (a), F₁ (b) e (c), e ClaveLL (d) utilizando diferentes proteínas.

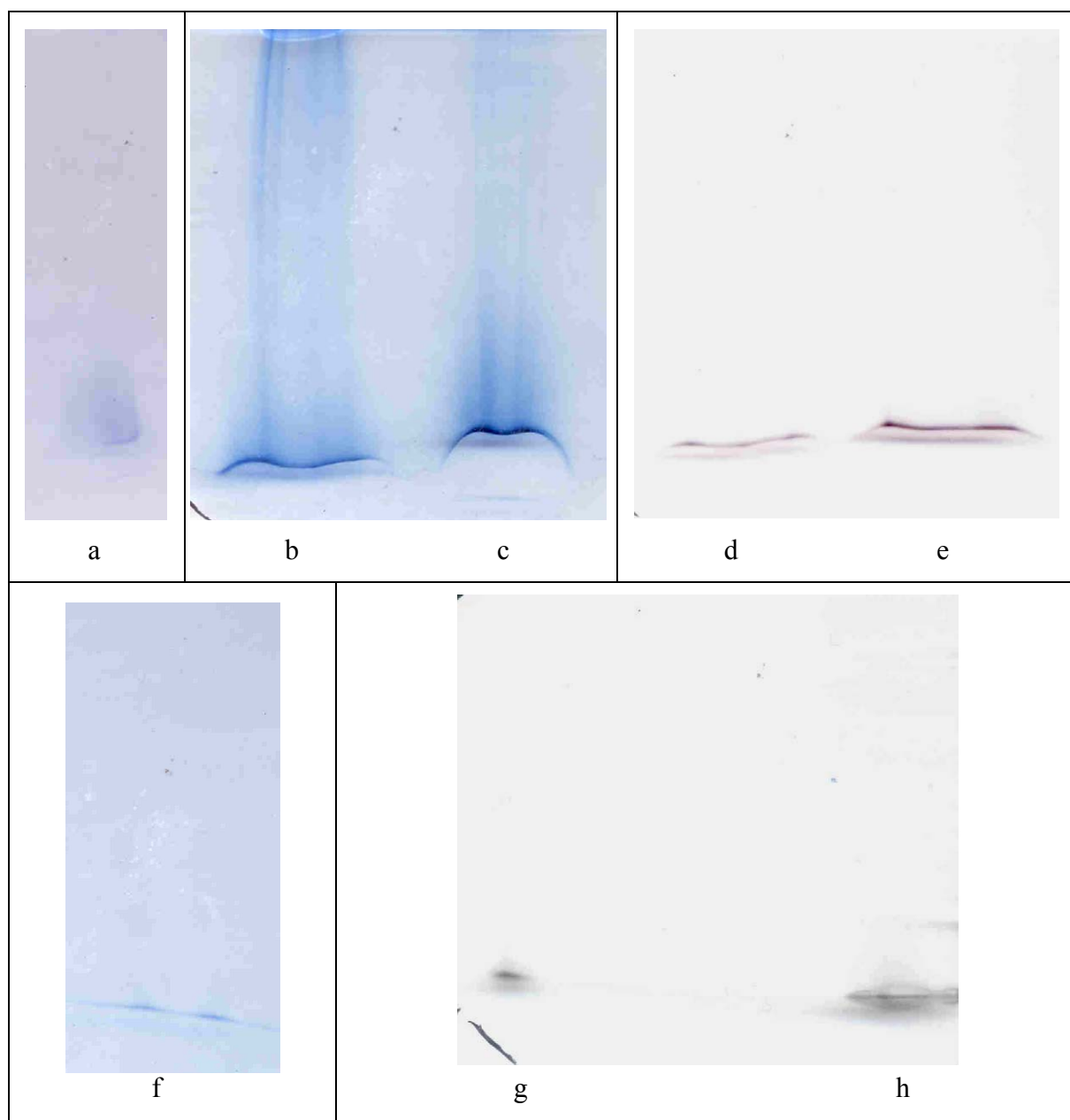


Figura 7. Perfil em SDS-PAGE de F₁ (a); ClaveLL utilizando coloração com azul de Coomassie (c); ClaveLL utilizando coloração com o reativo de Schiff (e); pico de Sephadex G-100 sem AH (b) e (d); ClaveLL em PAGE nativa, ácida (f); ClaveLL em PAGE nativa, básica (h); Citocromo (g).

6 CONCLUSÕES

1. Um protocolo simples foi estabelecido pra o isolamento da lectina ClaveLL presente na fração 0-30 % (F₁) obtida do extrato de *C. verticillaris*.
2. *C. verticillaris* é um material de excelência para purificação lectínica; a partir de apenas 20 g da farinha é possível obter 23 mg de ClaveLL utilizando cromatografia em Sephadex G-100.
3. A lectina isolada é termossensível, não dependente de íons, estável em pH ácido e básico, glicosilada e apresenta elevada afinidade por glicoconjugados.
4. A lectina ativa possui elevado peso molecular (110 kDa) e parece ser constituída por agregados moleculares formados por pequenos peptídeos.

7 ANEXO