

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

CONVÊNIO UFPE E UNIVERSIDADE DO VALE DO ACARAÚ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA LECTINA DE ENTRECASCA DE AROEIRA
(*Schinus terebinthifolius* Raddi.)**

Mestranda: Ana Mary Alves Viana

Orientadora: Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva

Co-Orientadora: Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Orientadora Externa: Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Recife, 2002

ANA MARY ALVES VIANA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA LECTINA DE ENTRECASCA DE AROEIRA
(*Schinus terebinthifolius* Raddi.)**

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

Aprovada por: _____

Recife, 2002

A Deus

Aos meus pais, Geraldo e Rosimar, pela
dedicação e carinho

Aos meus irmãos, Rosângela, Roberto, Jane
e Alberto, pelo apoio e amizade

Ao meu noivo Camilo, pelo apoio, dedicação
e carinho

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Patrícia Maria Guedes Paiva, pela orientação científica, dedicação, confiança e estímulo constantes na execução deste trabalho.

À Professora Doutora Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, por sua co-orientação e atenção.

À Professora Doutora Iracilda Zeppone Carlos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista–UNESP, Campus de Araraquara, pela orientação científica, confiança e apoio durante o desenvolvimento dos experimentos em seu Laboratório.

À Professora Doutora Ana Célia Oliveira dos Santos, pela convivência amiga.

À técnica Maria Barbosa Reis da Silva, pela ajuda constante, dedicação e convivência amiga.

A todos que fazem o Laboratório de Glicoproteínas, pela colaboração e auxílio em todos os momentos solicitados.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPE, pela constante ajuda neste período. Em especial a José Miron de Oliveira.

Às amigas Andréa Santos, Flávia Araújo, Adriana Argolo, Adriana César, Flávia Peres e ao amigo Teodomiro Gomes, pela valiosa cooperação, apoio e amizade.

A todos que fazem o Laboratório de Imunologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da UNESP–Araraquara, pelo suporte técnico e científico, e principalmente pela acolhida durante a realização dos experimentos no Laboratório. Em especial, à técnica Marisa Campos Polesi Placeres, pela ajuda constante, dedicação e amizade.

Aos colegas do Mestrado, pela excelente convivência e ajuda diária, e de forma especial, Ana Claudia, Claudia Zeneida, Valéria Claudiane e Washington Kleber, pela dedicada amizade.

A todos que fazem a empresa Art Médica Comércio e Representação de Produtos Hospitalares, pelo ambiente de trabalho, apoio e incentivo. Em especial, Paulo Roberto Seabra, pelo apoio e estímulo constantes.

À minha família, de quem sempre recebi todo o carinho e estímulo em todos os momentos da minha vida. Um agradecimento especial à minha mãe Rosimar, a quem devo tudo o que sou hoje, pelo aprendizado na perspicácia da vida, pelo apoio e dedicação.

Ao meu noivo Camilo Jorge, que sempre esteve ao meu lado, incentivando e acreditando nos meus projetos.

A todos aqueles que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

Agradeço sobretudo a DEUS, pela oportunidade de viver este momento.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Isolamento de lectina através de cromatografia de afinidade	8
Figura 2: Entrecasca de <i>Schinus terebinthifolius</i>	13

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Famílias de lectinas de plantas: ocorrência e especificidade	3
Tabela 2: Lectinas de plantas: especificidade de ligação a carboidratos	7

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Atividade hemaglutinante

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome*)

Con A: Lectina de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A

IFN- γ : Interferon γ

INOS: Óxido nítrico sintase (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*)

LPS: Lipopolissacarídeo

Mr: Massa molecular

NO: Óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

RpbAI e II: Lectinas de *Robinia pseudoacacia*

RIP: Proteína inativadora de ribossomo (do inglês, *ribosome-inactivating protein*)

SJAbmI e II: Lectinas de *Sophora japonica*

Sumário

LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Lectinas	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Purificação e caracterização	5
1.1.3. Lectinas e imunologia	9
1.2. Relevância do trabalho	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
4. ARTIGO “A lectin isolated from <i>Shinus terebinthifolius</i> Bark stimulated nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages”.	24
5. CONCLUSÕES	45

RESUMO

Infusão de entrecasca de *Schinus terebinthifolius* Raddi., família Anacardiaceae (*aroeira*), tem sido comumente usada em medicina popular. Lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas capaz de reconhecer e reversivelmente ligar a carboidratos. O objetivo deste trabalho foi isolar a lectina de entrecasca de *S. terebinthifolius* e avaliar suas propriedades biológicas. Extrato obtido do pó de entrecasca foi submetido a ensaios de atividade hemaglutinante (AH) usando eritrócitos de coelho e humanos; extrato aquecido (100° C por 30 min) foi também usado. Proteínas do extrato foram precipitadas com sulfato de amônio e uma fração sobrenadante 40% (FS40) foi cromatografada em coluna de quitina; tampão borato de sódio 0,15 M (pH 7,4) e NaCl 1 M foram usados nas etapas de eluição. Ensaio de inibição da atividade da FS40 foi feito com carboidratos (frutose, fucose, galactose, glicose, maltose, manose, N-acetilglicosamina, rafinose, ramnose e xilose), como também com glicoproteínas (caseína, fetuína, ovoalbumina e tiroglobulina). A Lectina de entrecasca de *S. terebinthifolius* (SteBL) foi estudada com relação aos seus efeitos sobre liberação de peróxido de hidrogênio ou óxido nítrico por macrófagos e proliferação de linfócitos. SteBL aglutinou eritrócitos em diferentes graus; a mais elevada AH específica foi detectada com células humanas AB. A atividade da lectina foi estimulada após aquecimento e inibição foi obtida com fucose, galactose, N-acetilglicosamina, rafinose e glicoproteínas. O perfil cromatográfico mostrou picos protéicos eluídos com borato de sódio e NaCl 1 M; somente o último pico promoveu hemaglutinação. SteBL tem propriedades de produção de óxido nítrico, induziu a liberação de H₂O₂ por macrófagos e mostrou pequena atividade mitogênica. SteBL, uma nova lectina de entrecasca, tem perspectiva de aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

Bark infusions of *Schinus terebinthifolius* Raddi., Anacardiaceae family (*aroeira*), have been commonly used in popular medicine. Lectins constitute a heterogeneous protein group capable of recognizing and reversibly bind to carbohydrates. The aim of this work was to isolate a bark lectin from *S. terebinthifolius* and to evaluate its biological properties. Extract was obtained from bark powder and submitted to hemagglutinating activity (HA) assays using rabbit and human erythrocytes; heated extract (100° C by 30 min) was also used. Proteins of the extract were precipitated with ammonium sulphate and a 40% supernatant fraction (SF40) was chromatographed on a chitin column; 0.15 M sodium borate buffer (pH 7.4) and 1 M NaCl were used at the elution steps. Inhibition assay of SF40 activity was performed with carbohydrates (fructose, fucose, galactose, glucose, maltose, mannose, N-acetylglucosamine, raffinose, rhamnose and xylose), as well as glycoproteins (casein, fetuin, ovalbumin and thyroglobulin). *S. terebinthifolius* bark lectin (SteBL) was studied with regard to their effects on release of hydrogen peroxide or nitric oxide by macrophage cells and lymphocyte proliferation. SteBL agglutinated erythrocytes at different degrees; the highest specific HA was detected with human AB cells. The lectin activity was stimulated after heating and inhibition was obtained with fucose, galactose, N-acetylglucosamine, raffinose and glycoproteins. The chromatographic profile showed protein peaks eluted with sodium borate and 1 M NaCl; only the latter peak promoted hemagglutination. SteBL had nitric oxide-producing properties, induced release of H₂O₂ by macrophages and showed low mitogenic activity. SteBL, a new bark lectin, has perspectives of biotechnological applications.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Generalidades

Lectinas são proteínas amplamente difundidas na natureza (Ratanapo *et al.*, 2001), sendo encontrada nos seres unicelulares (Yamaguchi *et al.*, 1998), pluricelulares animais (Chen *et al.*, 1999; Ye & Ng, 2000) e vegetais (Cavalcanti *et al.*, 1990; Coelho & Silva, 2000). As plantas constituem uma rica fonte de lectinas, e sua estocagem orgânica ocorre principalmente nas sementes, tubérculos, bulbos, rizomas ou cascas (Rudiger, 1998). O termo lectina (do latim “*lectus*”, que significa “selecionado”) inicialmente referiu-se à habilidade de algumas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos da superfície celular aglutinando eritrócitos. O termo aglutinina é usado como um sinônimo para lectina, porque refere-se à habilidade de aglutinar eritrócitos ou outras células (Peumans & van Damme, 1995).

Goldstein *et al.*, (1980) definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, que se ligam a carboidratos através de pelo menos dois sítios de ligação, aglutinam células vegetais e/ou animais e precipitam polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. Peumans & van Damme (1995) apresentaram uma definição para lectinas, baseada em suas estruturas. Assim eles definem lectinas como proteínas ou glicoproteínas que possuam pelo menos um sítio de ligação reversível a um oligo ou monossacarídeo, sem apresentar função catalítica ou características estruturais imunológicas. Esta nova definição é mais abrangente, pois inclui uma série de proteínas com comportamentos diferentes do ponto de vista das propriedades aglutinantes e/ou de precipitar glicoconjugados.

Tomando-se como base a natureza estrutural as lectinas foram subdivididas em três classes distintas: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. Merolectinas são proteínas que consistem exclusivamente de um sítio de ligação a carboidrato. São pequenas, incapazes de aglutinar células, devido à natureza monovalente. Incluem as proteínas monoméricas ligantes de manose e a lectina

de *Hevea brasiliensis* (heveína). Hololectinas, engloba um grupo de lectinas com dois ou mais sítios de ligação homólogos para carboidratos, e portanto, são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas conhecidas são hololectinas, comportando-se como hemaglutininas. Quimerolectinas são proteínas compostas de um ou mais sítios de ligação a carboidratos e um sítio com atividade catalítica bem definida (ou outra atividade biológica) que atua independentemente dos sítios de ligação a carboidrato. Exemplos típicos de quimerolectinas são quitinases classe I, com um sítio de ligação a carboidrato e um sítio catalítico; e RIPs tipo II, apresentando dois sítios de ligação a carboidrato e um sítio de inativação ribossômica. Mais recentemente, Peumans & van Damme (1998a) sugeriram a introdução de mais um tipo de lectinas, as superlectinas. Elas seriam proteínas com dois sítios de ligação a carboidratos estruturalmente diferentes, reconhecendo dois carboidratos diferentes. A lectina de bulbo de tulipa, com dois sítios, um específico para manose e o outro específico para N-acetilgalactosamina, é um exemplo de superlectina (Peumans *et al.*, 2001).

A grande maioria das lectinas de plantas conhecidas podem ser agrupadas em sete famílias, de acordo com a relação evolucionária e estrutural (tabela 1); as famílias mais numerosas correspondem àquelas isoladas de legumes e as ligadoras de quitina (Peumans & van Damme, 1998b).

As lectinas são particularmente abundantes em sementes de leguminosas, chegando a constituir até 10% da proteína total (Spilatro *et al.*, 1996). A quantidade presente em sementes pode variar bastante; em algumas, constitui 2% do peso seco (Rudiger *et al.*, 1998).

Porém tem crescido o interesse por lectinas presentes em tecidos vegetativos como folhas (Coelho & Silva, 2000; Ratanapo *et al.*, 2001), entrecasca (Spilatro *et al.*, 1996; van Damme *et al.*, 1997a,b; Wititsuwannakul *et al.*, 1998) e raízes (Naeem *et al.*, 2001). A principal proteína da entrecasca de *Robinia pseudoacacia* (falsa acacia) é uma aglutinina. Em 1978, Horejsi *et al.* isolaram esta lectina e determinaram ser uma proteína de massa molecular (Mr) 110.000 composta de duas subunidades de Mr 29.000 e 31.500 que exibiam

especificidade para N-acetilgalactosamina. Tazaki & Yoshida (1992) purificaram esta lectina por cromatografia de troca iônica; descobriram que trata-se de uma proteína homotetramérica (106.000) composta de um único tipo de subunidade Mr 29.000. Para explicar as aparentes discrepâncias na literatura concernentes a estrutura molecular desta lectina, foi realizada uma reinvestigação detalhada, onde foram caracterizadas duas lectinas diferentes para *R. pseudoacacia*, chamadas de RpbAI e RpbAII. Determinou-se que RpbAI é composta de dois polipeptídios homólogos de Mr 29.000 e 31.500. A RpbAII é uma proteína homotetramérica composta de subunidades de Mr 26.000, mas desprovida de atividade aglutinante (van Damme *et al.*, 1995).

Tabela 1. Famílias de lectinas de plantas: ocorrência e especificidade

Família	Ocorrência (número de lectinas identificadas)	Especificidade
Legumes	>100	Manose/glicose Fucose Gal/GalNAc (GlcNAc) _n Ácido Siálico Complexos
Ligadoras de quitina	>100	(GlcNAc) _n GlcNAc
Ligadoras de manose de monocotiledôneas	>50	Manose
Cucurbitaceae	<10	(GlcNAc) _n
Amaranthaceae	<10	GlcNAc
Jacalina	<10	Gal/GalNAc Manose/maltose
RIP Tipo 2	>20	Gal/GalNAc Sia α 2-6Gal/GalNAc

Gal, galactose; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglicosamina

Outras lectinas de entrecasca têm sido intensivamente estudadas. Incluem-se as isoladas de três espécies de sabugueiro *Sambucus nigra*, *S. canadense* e *S.*

sieboldiana (Shybuya *et al.*, 1989) e sófora do Japão, *Sophora japonica* (Ueno *et al.*, 1992). Esta última lectina possui Mr 120.000, e encontra-se como duas lectinas diferentes, SJAbmI e SJAbmII, altamente similares, compostas de quatro subunidades de 30.000 (van Damme *et al.*, 1997b).

Evidências enfatizam uma forte semelhança entre as clássicas proteínas de armazenamento em sementes e suas homólogas funcionais em tecidos de entrecasca. Primeiro, as proteínas de armazenamento de entrecasca, que são definidas como as proteínas presentes nos tecidos da entrecasca, em grande quantidade durante o inverno e ausente durante o verão, estão sujeitas a um rigoroso controle evolucionário. Segundo, todas as proteínas de armazenamento de entrecasca estudadas acumulam-se em células parenquimais depositadas em organelas similares aos corpos protéicos das sementes. Terceiro, a composição de aminoácidos das proteínas de armazenamento da entrecasca se assemelha fortemente com as proteínas de armazenamento das sementes. Conclui-se que ambas as proteínas apresentam funções fisiológicas semelhantes na planta. As lectinas de entrecasca de *S. nigra*, *R. pseudoacacia* e *S. japonica*, são consideradas verdadeiras proteínas de armazenamento, baseando-se na sua quantidade, flutuação sazonal e localização (van Damme *et al.*, 1995).

As funções fisiológicas das lectinas não estão claramente definidas. Sugere-se que possuem diferentes papéis nas plantas, incluindo transporte de carboidratos, estocagem e mobilização de proteínas de reserva e carboidratos, alongamento da parede celular, interação entre plantas e microorganismos e defesa contra o ataque de fungos, vírus e insetos. Interações e lectinas vegetais com bactérias patogênicas humanas têm sido extensivamente estudadas; entretanto interações entre lectinas de plantas e suas bactérias fitopatogênicas têm sido menos investigadas. Recentemente foi demonstrado que uma lectina da Solanaceae *Cyphomandra betace*, com especificidade para N-acetilglicosamina, inibiu o crescimento de algumas bactérias fitopatogênicas (Ratanapo *et al.*, 2001).

As proteínas de entrecasca têm papel importante no metabolismo do nitrogênio de árvores da região temperada (van Damme *et al.*, 1995), e tem sido sugerido sua participação no mecanismo de defesa da planta (Rojo *et al.*, 1997).

Outras funções sugeridas para estas lectinas incluem a participação no metabolismo dos carboidratos e estocagem de proteínas de reserva (Spilatro *et al.* 1996).

Devido às suas propriedades peculiares, as lectinas têm sido amplamente usadas em pesquisa. As lectinas são muito estáveis e apresentam distinto reconhecimento de carboidratos; constituem ferramentas poderosas em estudos citoquímicos e histoquímicos (Danguy *et al.*, 1998), para o isolamento e estudos estruturais de oligossacarídeos (Endo, 1996; Matsui *et al.*, 2001) e glicoconjugados (Gilljam *et al.*, 1994), fracionamento de células (Ohba *et al.*, 2002) e como moléculas bioadesivas na entrega de drogas (Gabor *et al.*, 2001).

A ligação de lectinas às células pode resultar em uma variedade de propriedades biológicas, que incluem, aglutinação de eritrócitos (Paiva & Coelho, 1992; Coelho & Silva, 2000), estimulação mitogênica de linfócitos T humanos (Pajic *et al.*, 2002), liberação de óxido nítrico por macrófagos (Andrade *et al.*, 1999) e de peróxido de hidrogênio por neutrófilos (Timoshenko *et al.*, 1995), antiinflamatória (Assreuy *et al.*, 1999), antitumoral (Elsasser–Beile *et al.*, 2001), antifúngica (Freire *et al.*, 2002) e hipotensiva (Wang *et al.*, 1996).

1.1.2 Purificação e Caracterização

A purificação de lectinas, envolve técnicas comuns a processos de isolamento de proteínas (Fabre *et al.*, 1998). Uma primeira etapa na purificação é o preparo de extratos em solução salina ou tampão. Esses extratos apresentando atividade podem ter suas lectinas parcialmente purificadas através de procedimentos, tais como, fracionamento salino com sulfato de amônio e diálise exaustiva (Kabir, 1998; Coelho & Silva, 2000). São igualmente empregadas técnicas cromatográficas convencionais, tais como, cromatografia de troca iônica e gel filtração (Ratanapo *et al.*, 2001). A técnica mais utilizada atualmente é a cromatografia de afinidade desenvolvida por Cuatrecasas *et al.* (1968), que se baseia na propriedade das lectinas se ligarem especificamente a carboidratos (Kennedy *et al.*, 1995). Esta propriedade possibilita o emprego da cromatografia de afinidade como etapa determinante no processo de purificação de lectinas

(Paiva & Coelho, 1992; Nomura *et al.*, 1998; Padma *et al.*, 1999; Coelho & Silva, 2000; Ratanapo *et al.*, 2001; Pajic *et al.*, 2002). Nesta técnica, um ligante interage especificamente com a proteína que se deseja purificar. Quando uma solução contendo uma mistura de proteínas é passada por uma coluna cromatográfica, a proteína de interesse liga-se à matriz, enquanto outras substâncias são eluídas completamente pela adição de um tampão. A proteína de interesse será recuperada em sua forma purificada, mudando as condições de eluição para liberar a proteína do suporte (Khang *et al.*, 1990; Ye & Ng, 2002). Suportes polissacarídicos constituem ótimas matrizes de afinidade para o isolamento de lectinas. A seleção da matriz polissacarídica depende da especificidade monossacarídica dos sítios de ligação; em geral a lectina é seletivamente eluída pela irrigação da coluna de afinidade com solução do monossacarídeo competidor (Figura 1) ou uma solução de pH ou força iônica diferente (Correia & Coelho, 1995; Hage, 1999).

Lectinas específicas para glicose/manose e seus derivados podem ser purificadas utilizando-se polissacarídios, como os géis de dextranas, comercialmente disponíveis, como Sephadex (Koshte *et al.*, 1990). Aquelas com especificidade para galactose e seus derivados têm sido purificadas por colunas de afinidade utilizando-se os géis de agarose, comercializados como Sepharose (Peumans *et al.*, 1996) e goma guar (Kabir & Daar, 1994; Moraes *et al.*, 1996). As lectinas específicas para N-acetil-D-glicosamina e seus oligossacarídios, derivados de quitina, podem utilizar como suporte de afinidade a quitina (Shibuya *et al.*, 1986).

As lectinas podem ser caracterizadas por eletroforese, técnica que determina propriedades tais como, ponto isoelétrico e massa molecular aproximada. Eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas sob condições não desnaturantes é uma poderosa técnica de análise de pureza de estruturas moleculares nativas (Nemoto & Sato, 1998).

Um método eletroforético comumente utilizado para a determinação da pureza e da massa molecular de subunidades protéicas faz uso do detergente

sulfato sódico de dodecila (Machuka *et al.*, 1999; Pajic *et al.*, 2002). Depois de realizada a eletroforese as proteínas são visualizadas pela adição de um corante, o azul de Coomassie (Coelho & Silva, 2000).

A especificidade de uma lectina pode ser definida através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (AH), fazendo uso de monossacarídeos simples ou carboidratos complexos. De acordo com o monossacarídeo e/ou oligossacarídeo que mais efetivamente inibe sua aglutinação por eritrócitos, as lectinas são classificadas nos grupos de reconhecimento da especificidade (Tabela 2). Novos grupos de especificidade foram adicionados com a descoberta de lectinas de ligação à manose, como a de *Galanthus nivalis*, e de ligação manose/maltose, como a de *Calystegia sepium*. Muitas lectinas não se ligam a mono ou dissacarídeos, mas requerem glicanos complexos para uma eficiente inibição da AH (Peumans & van Damme, 1998a,b).

Tabela 2. Lectinas de plantas: especificidade de ligação a carboidratos

Especificidade	Lectinas
Grupo Fucose	
Fucose	<i>Ulex europaeus</i> 1
Grupo Galactose/N-acetilgalactosamina	
Galactose>>GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i>
Gal=GalNAc	<i>Clerodendron trichotomum</i>
Gal<<GalNAc	<i>Glicine max</i>
Grupo N-acetilglicosamina	
GlcNAc	<i>Triticum aestivum</i>
(GlcNAc) _n	<i>Urtica dioica</i>
Grupo Manose	
Manose	<i>Galanthus nivalis</i>
Manose/glicose	<i>Canavalia ensiformis</i>
Manose/maltose	<i>Calystegia sepium</i>
Grupo Ácido Siálico	
Ácido siálico	<i>Triticum aestivum</i>
Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	<i>Sambucus nigra</i>
Neu5Ac α (2,6)Gal/GalNAc	<i>Maackia amurensis</i>
Grupo Complexos Glicanos	
Complexos- especificidade conhecida	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Complexos- especificidade desconhecida	<i>Euonymus europaeus</i>

Gal, galactose; GalNAc, N-acetilgalactosamina; GlcNAc, N-acetilglicosamina

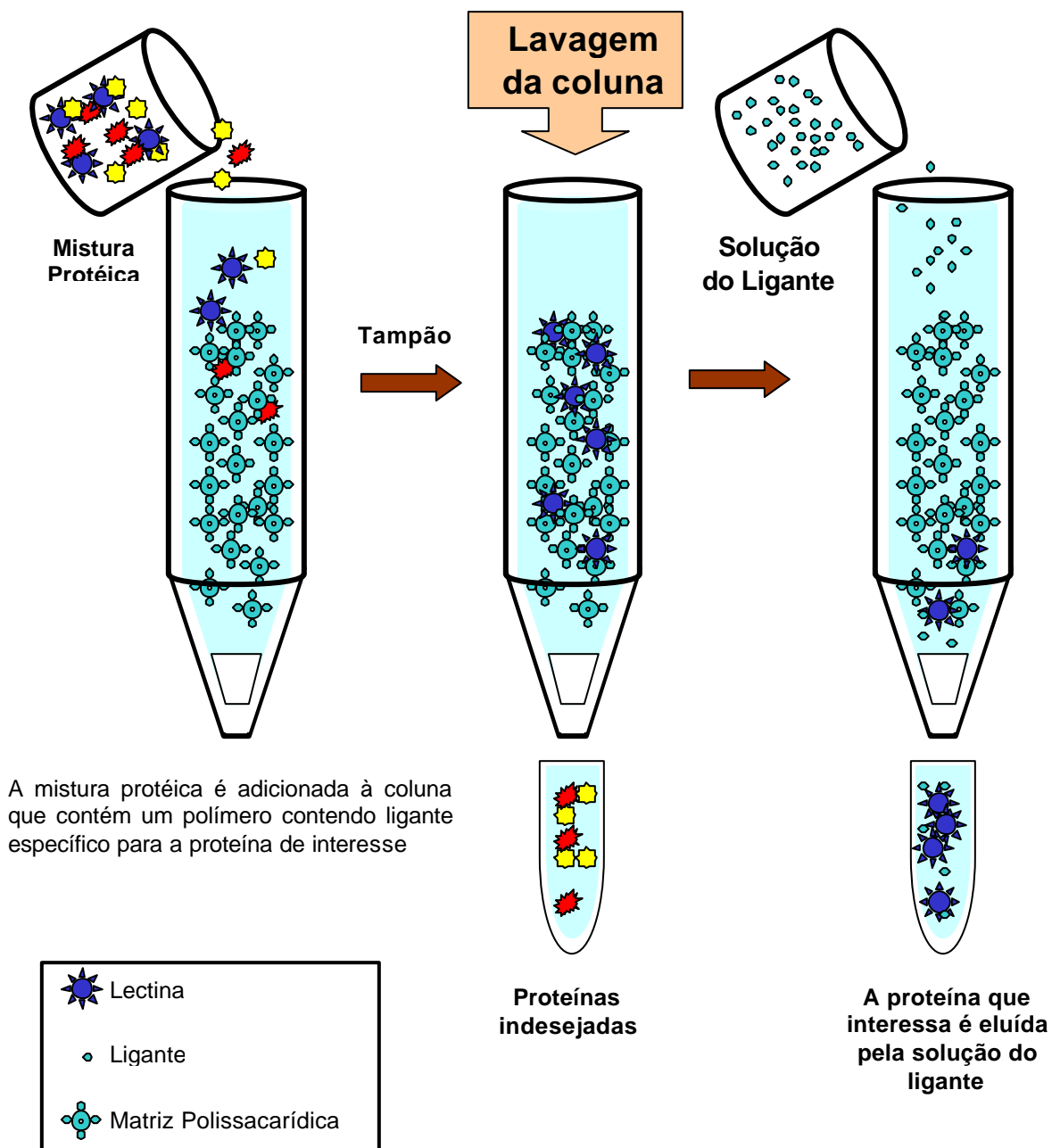


Figura 1. Isolamento de lectina através de cromatografia de afinidade.

As proteínas que se ligam especificamente ao suporte polissacarídico são as lectinas. As proteínas não-adsorvidas são lavadas da coluna e a lectina é eluída por uma solução contendo o ligante livre.

1.1.3 Lectinas e Imunologia

Vários estudos têm sido feitos associando lectinas e imunologia. Uma descoberta que dramaticamente atraiu a atenção para as lectinas foi feita em 1960 por Peter C. Nowell da Universidade da Pensilvânia, Filadélfia. Nowell encontrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina ou PHA, era mitogênica, isto é, possuía a habilidade de estimular linfócitos. Esta descoberta teve um impacto revolucionário na imunologia. Dentro de um curto período, algumas outras lectinas foram confirmadas ser mitogênicas. A lectina de *Canavalia ensiformis*, concanavalina A (Con A), age como um mitógeno e, ao contrário da PHA, sua atividade pode ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos, por exemplo, manose. A inibição da atividade levou à conclusão que a estimulação mitogênica resultou da ligação da lectina a carboidratos da superfície celular dos linfócitos (Sharon & Lis, 1987; Sharon, 1989).

A ativação e a proliferação induzidas por antígeno normalmente ocorrem nos tecidos linfóides e podem ser visualizadas *in vitro* através do cultivo de linfócitos na presença de ativadores entre eles, lectinas (Pajic *et al.*, 2002).

Lectinas que são capazes de ativar linfócitos em receptores de células B ou T (Janeway *et al.*, 2000) são conhecidas como mitógenos (indutores de proliferação). A estimulação *in vitro* dos linfócitos por mitógenos supostamente mimetiza a estimulação específica por antígenos. Con A é mitogênica para linfócitos T humanos e murinos (Kosonen *et al.*, 1997) e o caruru de cacho (*pokeweed mitogen*–PWM) estimula células T e B humanas (Janeway *et al.*, 2000).

As lectinas mitogênicas são ativadores policlonais, atuando em linfócitos independentemente de sua especificidade antigênica; constituem, portanto, as maiores ferramentas para estudos do mecanismo de ativação celular. A estimulação mitogênica pelas lectinas proporciona uma fácil e simples avaliação

de pacientes que sofrem de imunocompetência, presente em uma variedade de doenças, incluindo AIDS, sendo aplicada ainda para monitorar efeitos imunossupressivos e imunoterapêuticos (Lis & Sharon, 1998).

Embora extensivamente estudado, o mecanismo da estimulação mitogênica é desconhecido. É geralmente aceito que o passo inicial é a ligação da lectina aos carboidratos das superfícies celulares. Análise dos constituintes de membranas de linfócitos humanos demonstrou que cinco glicoproteínas distintas ligam-se as lectinas mitogênicas, mas não se ligam às não-mitogênicas. Tem sido sugerido que lectinas mitogênicas interagem com componentes das membranas celulares que podem atuar como “receptores desencadeadores” e que as lectinas não mitogênicas podem não reconhecer esses componentes. Evidências indicam que a ligação das lectinas mitogênicas aos linfócitos T acontece através de dois efeitos diferentes e independentes: (a) exposição ou indução da formação de receptores funcionais para interleucina-2 e (b) início da produção do fator de crescimento, que ativa a proliferação das células. Existem lectinas que podem ativar apenas a resposta inicial dos linfócitos, enquanto que as lectinas mitogênicas possuem a habilidade de induzir a produção e secreção de interleucina-2. Os passos que comandam a ligação da lectina provocando ativação ainda são obscuros. Para essa fase acredita-se que a ligação da lectina com receptores causa modificação da estrutura e função da membrana; um sinal hipotético é deste modo gerado e transmitido para o interior da célula disparando uma série de eventos bioquímicos que levam à ativação celular. De acordo com outra teoria, a ativação pode ocorrer através de um mecanismo indireto, onde as células modificadas como resultado da ligação da lectina mitogênica são reconhecidas como estranhas por outras células; mecanismo análogo ao que ocorre em uma reação de mistura de linfócitos, onde células de um genótipo causam estimulação de células de outro genótipo (Lis & Sharon, 1986).

Interação da interleucina-2 com receptores específicos presentes nas superfícies celulares inicia a segunda fase, a fase proliferativa da estimulação mitogênica, a qual leva à síntese de DNA e divisão celular. Permanece obscuro se a interleucina-2 que atua na proliferação é suficiente para a diferenciação e

maturação de precursores de células efetoras com atividades imunológicas bem definidas (Lis & Sharon, 1986).

Uma imunidade efetiva se dá pela interdependência entre macrófagos e linfócitos. Dentre as principais funções dos macrófagos estão a fagocitose de partículas estranhas, detectando a presença de antígenos, e a produção de citocinas e compostos intermediários de oxigênio, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e nitrogênio, óxido nítrico (NO) (Moreira *et al.*, 2001).

O NO é produzido durante a conversão da L-arginina em L-citrulina pela atividade enzimática da óxido nítrico sintase (So *et al.*, 1999). Quando os macrófagos são estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) ou Interferon- γ (IFN- γ), produzem grandes quantidades de NO seguida da indução do gene da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), isoforma da enzima não expressada em condições fisiológicas (Fushiya *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999b).

A presença da iNOS, causa uma produção prolongada de grandes quantidades de NO; esta molécula exerce efeitos citostático e citotóxico contra células tumorais, micróbios, vírus, bactérias e protozoários (Fushiya *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 1998). NO tem sido citado como uma molécula regulatória importante intra e intercelular (Kim *et al.*, 1999a).

NO possui diversas funções biológicas, incluindo neurotransmissão, defesa do hospedeiro (Kim *et al.*, 1999a; So *et al.*, 1999), inflamação (So *et al.*, 1999), citotoxicidade tumoral e homeostase vascular (Murata *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999a; So *et al.*, 1999), atividade antimicrobiana (Fushiya *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999a,b,c) e regulação do crescimento celular (Kim *et al.*, 1999a).

As plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, os quais diferem em termos de estrutura e propriedades biológicas (Moreira *et al.*, 2001). Uma das atividades biológicas de compostos de plantas que atrai grande interesse é a capacidade de estimular macrófagos.

Estudos têm sugerido que o H_2O_2 possui um importante papel nas funções dos macrófagos. Os produtos da queima oxidativa são usados para matar os patógenos fagocitados, e para a destruição extracelular de outras células. O papel

do H_2O_2 na toxicidade intra e extracelular está bem estabelecido. O H_2O_2 tem sido indicado como uma molécula sinalizadora importante em reações intra e intercelulares em diferentes tipos de células. As espécies reativas como o peróxido de hidrogênio são produzidas pelas células inflamatórias ativadas (Moreira *et al.*, 2001).

O zimosan é indicado como um potente imunoestimulador, detectado pela determinação de H_2O_2 (Moreira *et al.*, 2001). Zimosan é uma preparação da parede celular rica em carboidratos, derivada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, consistindo de dois componentes polissacarídicos de α -D-manana e β -D-glicano, ativando leucócitos para liberar espécies reativas de oxigênio (superóxidos, peróxidos de hidrogênio, e radicais hidroxil), envolvendo complementos receptores da superfície celular. Trabalhos têm relatado que macrófagos (Moreira *et al.*, 2001) e neutrófilos (Bussiere *et al.*, 2002), liberam as espécies reativas de oxigênio quando incubados com o zimosan.

1.2 Relevância do Trabalho

O Laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco tem como propósito, desde 1983, a obtenção de um painel de lectinas puras e a investigação do potencial biotecnológico das proteínas obtidas.

Infusão de entrecascas de *Astronium urundeuva* (família Anacardiaceae) mostrou atividades anti-ulcerogênica (Rao *et al.*, 1987) e antioxidante (Desmarchelier *et al.*, 1999). *Schinus terebinthifolius*, aroeira, é uma planta da mesma família de *A. urundeuva* que tem sido comumente utilizada na medicina popular como agente anti-inflamatório. Como anteriormente referido, lectinas já foram isoladas de entrecascas de árvores. Devido ao uso medicinal de *S. terebinthifolius* e visando ampliar o conhecimento sobre proteínas vegetativas, entrecascas desta planta (Figura 2), foram utilizadas para o isolamento de lectina. A reconhecida atividade mitogênica de lectinas justifica a avaliação desta propriedade biológica na lectina da entrecasca da aroeira. Por outro lado, a produção de NO (Andrade *et al.*, 1999) e H₂O₂ (Timoshenko *et al.*, 1995) por células, após contato com estas proteínas, estimula a avaliação do efeito da lectina isolada em cultura de macrófagos.



Figura 2: Entrecasca de *Schinus terebinthifolius*

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Obter a lectina da entrecasca de *S. terebinthifolius* com elevado grau de pureza, caracterizá-la parcialmente e avaliar seus efeitos sobre macrófagos e linfócitos.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar a lectina da entrecasca de *S. terebinthifolius*.
- Determinar a atividade hemaglutinante (AH) com diferentes eritrócitos.
- Definir a especificidade da lectina a carboidratos.
- Avaliar o efeito do pH, temperatura e íons sobre a AH.
- Determinar a massa molecular da lectina por eletroforese em gel de poliacrilamida.
- Avaliar o efeito da lectina em cultura de macrófagos quanto à produção de óxido nítrico e H_2O_2 .
- Avaliar a atividade mitogênica da lectina em cultura de linfócitos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; BARRAL-NETO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ASSREUY, A. M.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E.; BRITO, G. A.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **Journal of Urology**, v. 161, n. 6, p. 1988-1993, 1999.

BUSSIÈRE, F. I.; GUEUX, E.; ROCK, E.; GIRARDEAU, J. P.; TRIDON, A.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y. Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 107-113, 2002.

CAVALCANTI, M.S.M.; ALMEIDA, A.M.P. & COELHO, L.C.B.B. Interaction of lectins with *Yersinia pestis* strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 125-131, 1990.

CHEN, C.; ROWLEY, A.F.; NEWTON, R.P. & RATCLIFFE, N.A. Identification, purification, and properties of a beta-1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 122, p. 309-319, 1999.

COELHO, L.C.B.B. & DA SILVA, M.B.R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-6, 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.

CUATRECASAS, P.; WILCHEK, M.; ANFINSEN, C. B. Selective enzyme purification by affinity chromatography. **Proceedings National Academy of Science**, v. 70, p. 636-643, 1968.

DANGUY, A.; DECAESTECKER, C.; GENTEN, F.; SALMON, I.; KISS, R. Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 206-218, 1998.

DESMARCHELIER, C.; ROMAO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the Caatinga region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

ELSASSER-BEILE, U.; RUHNAU, T.; FREUDENBERG, N.; WETTERAUER, U.; MENGES, U. Antitumoral effect of recombinant mistletoe lectin on chemically induced urinary bladder carcinogenesis in a rat model. **Cancer**, v. 91, n. 5, p. 998-1004, 2001.

ENDO, T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 251-261, 1996.

FABRE, C.; CLAUSSE, H.; MOUREY, L.; KONINKX, J.; RIVIERE, M.; HENDRIKS, H.; PUZO, G.; SAMAMA, J.P.; ROUGÉ, P. Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. **Biochemical Journal**, v. 329, p. 551-560, 1998.

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.

FUSHIYA, S.; KABE, Y.; IKEGAYA, Y.; TAKANO, F. (+)-Rhododendrol and ϵ -rhododendrin suppress the NO production by activated macrophages *in vivo*. **Planta Medica**, v. 64, p. 598-602, 1998.

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

GILLJAN, G.; SIRIDEWA, K.; HAMMAR, L. Purification of simian immunodeficiency virus, SIV_{MAC251}, and of its envelope glycoprotein, gp148. **Journal of Chromatography A**, v. 675, p. 89-100, 1994.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGLES, R. C.; MONSIGNY, M. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

HAGE, D.S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, p. 593-615, 1999.

HOREJSI, V.; HASKOVEC, C.; KOCOUREK, J. Studies on lectins: isolation and characterization of the lectin from black locust bark (*Robinia pseudoacacia* L.). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 532, p. 98-104, 1978.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. & CAPRA, J.D. O estudo dos linfócitos e imunidade mediada por células T. **Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**, c. 2 e 8, p. 59-60 e 267-269, 4 ed., Artmed, 2000.

KABIR, S.; DAAR, A. S. The composition and properties of jacalin, a lectin of diverse applications obtained from the jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. **Immunological Investigations**, v. 23, n. 3, p. 167-188, 1994.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211, 1998.

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. 219-230, 1995.

KHANG, N. Q.; JEAN-LUC, G. HOEBEKE, J. A blood group A specific lectin from the seeds of *Crotalaria striata*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, p. 210-213, 1990.

KIM, H.-M.; OH, C.-H.; CHUNG, C.-K. Activation of inducible nitric oxide synthase by *Taraxacum officinale* in mouse peritoneal macrophages. **General Pharmacology**, v. 32, p. 683-688, 1999a.

KIM, H.-M.; OH, D.-I.; CHUNG, C.-K. Production of nitric oxide in mouse peritoneal macrophages after priming with interferon- γ by the stem of *Sinomenium acutum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 311-317, 1999b.

KIM, H.-M.; LEE, S.-O.; LEE, E.-H. The nitric oxide-producing properties of *Ulmii radicis* cortex extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 2, p. 295-306, 1999c.

KOSHTE, V. L.; VAN DIJK, W., VAN DER, M.E.; AALBERSE, R.C. Isolation and characterization of Ban Lec-1, a mannoside-binding lectin from *Musa paradisiacal* (banana). **Biochemical Journal**, v. 272, p. 721-726, 1990.

KOSONEN, O.; KANKAANRANTA, H.; VUORINEN, P.; MOILANEN, E. Inhibition of human lymphocyte proliferation by nitric oxide-releasing oxatriazole derivatives. **European Journal Pharmacology**, v. 337, p. 55-61, 1997.

LIS, H. & SHARON, N. Biological properties of lectins. In: **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1986. p. 265-285.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57, 2001.

MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V. P. T.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Eryrina velutina* forma *aurantiaca* seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, p. 977-985, 1996.

MOREIRA, R. R. D.; CARLOS, I. Z.; VILEGAS, W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 201-204, 2001.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; AINOUS, I.L. Lectinas de plantas. In: **Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins**. São Paulo: Editora da Unicamp, 1991. p. 71-96.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; VAN DAMME, E. J. M.; CHRISPPEELS, M. J.; VAN LEUVEN, F.; 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.

MURATA, K.; TAKANO, F.; FUSHIYA, S.; OSHIMA, Y. Enhancement of NO production in activated macrophages *in vivo* by an antimalarial crude drug, dichroa febrifuga. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 729-733, 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, p. 99-105, 2001.

NEMOTO, T.; SATO, N. Analysis of subunit structures of proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 190-192, 1998.

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, p. 667-673, 1998.

OHBA, H.; BAKALOVA, R.; MORIWAKI, S.; NAKAMURA, O. Fractionation of normal and leukemic T-cells by lectin-affinity column chromatography. **Cancers Letters**, v. 184, p. 207-214, 2002.

PADMA, P.; KOMATH, S. S.; NADIMPALLI, S. K.; SWAMY, M. J. purification in high yield and characterization of a new galactose-specific lectin from seeds of *Trichosanthes cucumerina*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 363-371, 1999.

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

PAJIC, I.; KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; SLADIC, D.; JURANIC, Z.; GASIC, MJ. A novel lectin from sponge *Haliclona cratera*: isolation, characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 132, p. 213-221, 2002.

PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 209-258, 1998a.

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

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

PEUMANS, W.J.; VERHAERT, P.; PFULLER, V.; VAN DAMME, 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.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. **In: The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. p. 27-54.

RAO, V.S.; VIANA, G.S.; MENEZES, A.M.; GADELHA, M. G. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* engl. II. aqueous extract. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 20, n. 6, 803-805.

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

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 siebolding-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of Japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 340, n. 2, p. 185-194, 1997.

RUDIGER, H. Plant lectins-more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 161, p.130-152, 1998.

SHARON, N. & LIS, H. A century of lectin research (1888-1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491, 1987.

SHARON, N. A centenary of lectins: impact on immunology. **In: Cellular Basis of Immune Modulation**. London: Alan R. Liss, 1989. p. 609-619.

SHIBUYA, N.; SHAFER, J. A.; PEUMANS, W. J.; BROEKAERT, W. F. carbohydrate binding properties of the stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizome lectin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 249, p. 215-224, 1986.

SHIBUYA, N.; TAZAKI, K.; SONG, Z. W.; TARR, G. E.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. A comparative study of bark lectins from three elderberry (*Sambucus*) species. **Journal of Biochemistry**, v. 106, n. 6, p. 1098-1103, 1989.

SPILATRO, S. R.; COCHRAN, G. R.; WALKER, R.E.; CABLISH, K. L.; BITTNER, C. C.; Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. **Plant Physiology**, v. 110, p. 825-834, 1996.

SO, H.-S.; PARK, R.; OH, H.-M.; CHAI, K.-Y.; LEE, J.-H.; CHUNG, H.-T. Enhancement of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of *spiraea prunifolia* var. *simplicifloras* root in raw 264.7 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, n. 2, p. 343-355, 1999.

TAZAKI, K.; YOSHIDA, K. The bark lectin of *Robinia pseudoacacia*: purification and partial characterization. **Plant Cell Physiology**, v. 33, n. 2, p. 125-129, 1992.

TIMOSHENKO, A. V. ; CHERENKEVICH, S. N.; GABIUS, H.J. Viscum album agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, n. 3, p. 153-158, 1995.

UENO, M.; ARAI, T.; KOJIMA, K.; OGAWA, H. K.; MATSUMOTO, I.; SENO, N. Improved affinity chromatographic purification of D-mannose-N-acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the bark of *Sophora japonica* eliminating the loss by sugar specific self-aggregation. **Journal of Chromatography**, v. 597, n. 1-2, p. 197-200, 1992.

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.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 449-456, 1997a.

VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; BEMER, V.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523-536, 1997b.

WANG, H. X.; OOI, V. E.; NG, T. B.; CHIU, K. W.; CHANG, S.T. Hypotensive and vasorelaxing activities of a lectin from the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Pharmacology Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 318-323, 1996.

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.

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. 127, p. 593-597, 1998.

YE, X.Y. & NG, T.B. Purification and characterization of glycolactin, a novel glycoprotein from bovine milk. **Life Science**, v. 66, p. 1177-1186, 2000.

YE, X.Y. & NG, T.B. Isolation of a new cyclophilin – like protein from chickpeas with mitogenic, antifungal and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities. **Life Science**, v. 70, p. 1129-1138, 2002.

4. Artigo a ser submetido ao periódico PLANTA MEDICA

**A LECTIN ISOLATED FROM *Schinus terebinthifolius* BARK STIMULATE
NITRIC OXIDE AND HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION BY MURINE
MACROPHAGES**

Viana, A. M. A.; Carloz, I. Z.; Coelho, L. C. B. B. & Paiva, P. M. G.

**A LECTIN ISOLATED FROM *Schinus terebinthifolius* BARK STIMULATE
NITRIC OXIDE AND HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION BY MURINE
MACROPHAGES**

Viana, A. M. A.¹; Carloz, I. Z.²; Coelho, L. C. B. B.¹ & Paiva, P. M. G.¹ *

¹Departamento de Bioquímica, CBB/UFPE, Av. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, Brazil.

²Departamento de Análises Clínicas, UNESP, Araraquara-SP, Brazil.

Abstract: In this paper we present the isolation and partial characterization of *Schinus terebinthifolius* bark lectin (SteBL) and its effects on macrophage functions by the liberation of H₂O₂ and NO, as well as lymphocyte proliferation. SteBL, purified by saline fractionation and affinity chromatography on chitin column, agglutinated erythrocytes from rabbit and all human blood types; it was mainly active at pH 7.5. SteBL was inhibited by carbohydrates and glycoproteins; heating at 100° C by 30 min and divalent ions stimulated hemagglutinating activity. SDS-PAGE under non reducing conditions revealed a polypeptide band of M_r 20,000; the lectin was not a glycoprotein. SteBL has nitric oxide-producing properties, promoted release of H₂O₂ by Swiss mice macrophage and had low mitogenic activity.

Keywords: Hydrogen peroxide, lectin, mitogenic activity, Swiss mice macrophage, nitric oxide, *Schinus terebinthifolius*.

Introduction

Lectins constitute a heterogeneous protein group capable of recognizing and reversibly bind to specific saccharide moieties. Lectins have been isolated from vegetative tissues; especially bark lectins from legume trees have been studied, including three species of elder, *Sambucus nigra* L., *S. canadensis* and *S. sieboldiana* (1), *Maackia amurensis* (2), *Sophora japonica* (3) and the black locust, *Robinia pseudoacacia* (4). These lectins have been reported to participate in the nitrogen (5) and carbohydrate (6) metabolism; they could also act as defense proteins (7). Additionally the sazonal fluctuation of bark lectin concentration and its localization in organeles similar to proteic bodies indicate them as reserve proteins (5). Lectins stimulate lymphocyte proliferation; the lectin from *Canavalia ensiformis* seeds, concanavalin A (Con A), is widely used as standard in mitogenic assays with T human or murine lymphocytes (8) while *Pellina semitubulosa* lectin stimulate both T and B murine cells (9). On the other hand, natural products that stimulate macrophages resulting in production of nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) have been investigated (10). NO participates in immune and inflammatory responses in many tissues (11) and H₂O₂ has emerged as an important intracellular and intercellular signaling molecule (10).

Bark extracts of the medicinal tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae family) showed anti-ulcerogenic (12), anti-diarrheal (13) and antioxidant (14) activities. Bark infusions of *Schinus terebinthifolius* Raddi., plant of the same family of *A. urundeuva*, have been commonly used as an antiinflammatory agent in the

Northeastern region of Brazil. The aim of this work was to isolate and characterize *S. terebinthifolius* bark lectin (SteBL). Additionally, the lectin effects on Swiss mice macrophage functions by the liberation of H_2O_2 and NO, as well as lymphocyte proliferation were analyzed.

Material and methods

Bark extract

Powder bark from *S. terebinthifolius* was suspended in the extracting buffer (0.01 M citrate phosphate buffer, pH 4.0) in a proportion of 10 g of powder to 100 ml of buffer. After agitation for 8 h at 28 °C followed by centrifugation (5,000 x g for 15 min, at 4 °C), the supernatant was through activated chalk filtered. The filtrate (extract) was then used as the starting material to lectin isolation.

Isolation of lectin

Ammonium sulphate was added to the extract to a final concentration of 40% saturation; the supernatant fraction (SF) was collected by centrifugation (5,000 x g for 15 min, at 4 °C) and dialyzed against 0.15 M NaCl. SF (3.0 mg of protein) was loaded onto a chitin column (7.0 x 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. Following wash step, the column was eluted with 0.015 M sodium borate buffer, pH 7.4 and 1.0 M NaCl. The active fraction corresponded to purified lectin (SteBL).

Hemagglutinating activity

Lectin activity of serially diluted samples was assayed using glutaraldehyde treated rabbit or human erythrocytes according to Paiva and Coelho (15). The hemagglutinating activity (titer) was defined as the reciprocal of the highest dilution

giving positive hemagglutination. Lectin inhibition assay was made with 100 mM carbohydrate or 0.5 mg/ml glycoprotein solutions.

Effect of temperature, pH and metal ions on lectin activity

The lectin thermosensibility assay was performed with the extract heated at 100° C by 30 min. The effect of 5 mM Mn^{2+} and Ca^{2+} on HA was measured with the extract previously dialyzed against 5 mM EDTA by 16 h at 4° C. The pH stability was evaluated with aliquots of the extract incubated by 24 h at 4° C, with pH values of 3.5, 6.0, 7.5 and 10.5. Following, the pH values were adjusted with 0.5 M HCl or NaOH to 7.0 and the extracts were submitted to hemagglutinating assays.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Electrophoresis of SteBL was carried out by the method of Laemmli (16) in a 12 % polyacrylamide gel with 0.1% sodium dodecyl sulphate. The gel was stained with either Coomassie Brilliant blue or Schiff's reagent.

Macrophage cultures

Thioglycollate (TG)-elicited macrophages were harvested 3 days after i.p. injection of 3.0 ml of TG to Swiss mice 6-8 weeks old. Peritoneal wash was performed with 5 ml of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 (H_2O_2 assay) or sodium phosphate buffer, pH 7.0 (NO assay). After centrifugation the cells were collected and resuspended in 1.0 ml of potassium phosphate buffer, pH 7.0 (H_2O_2 assay) or RPMI 1640 medium.

Determination of Hydrogen Peroxide (H_2O_2)

The determination of the liberation of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the culture of peritoneal macrophages from Swiss mice was made according to Pick

and Mizel (17). The macrophage suspension was pelleted at 4 °C by centrifugation for 5 min at 225 g, and the supernatant was removed. The cells were resuspended at a concentration of 2×10^6 cells/ml in a solution of phenol red containing 140 mM NaCl, 10 mM potassium phosphate, pH 7.0, 5.5 mM dextrose, 0.56 mM phenol red and type II horseradish peroxidase (0.01 mg/ml). Aliquots of 0.1 ml were transferred to flat-bottomed 96-well culture plates; 50 μ l of SteBL (500 μ g/ml) were then added. A positive control was used (Zymosan + culture media + cells). Samples were incubated for one hour at 37 °C in a humid atmosphere containing 5% CO₂ (v/v) and reaction was stopped by the addition of 5 N NaOH (50 μ l). Experiments were run in quadruplicate. Absorbance was determined in an automatic ELISA photometer with a 620 nm filter. The results were expressed as nanomoles of H₂O₂ from a standard curve established in each assay consisting of known molar concentrations of H₂O₂ in buffered phenol red.

Determination of nitric oxide (NO)

The determination of NO in the culture of peritoneal macrophages from Swiss mice was made by a microplate assay method (18). Initially aliquots (0.1 ml) were removed from supernatants of cultured macrophages and incubated with 100 μ l of SteBL (10 μ g/ml) at 37 °C for 24 h in a humid atmosphere containing 5% CO₂ (v/v). Following, 50 μ l of supernatant were removed and added 50 μ l of Griess reagent (0.1% sulfanilamide/ 0.1%N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄). After 15 min at room temperature the absorbance at 540 nm was determined in a ELISA reader. The assay used lipopolysaccharide (10 μ g/ml) as standard.

Mitogenic activity

Spleen cells were aseptically removed from Swiss mice (males, 6-8 weeks old, weighing 25 to 30 g). The cells were cultured at a concentration of 2.8×10^6 ml^{-1} in RPMI 1640 medium with 5% inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml of penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin and 5×10^{-2} M β -mercaptoethanol at 37 °C in an humidified atmosphere containing 5% CO_2 (v/v). Spleen cells were stimulated for 64 h with SteBL (10 $\mu\text{g/ml}$) or Con A (0.5 $\mu\text{g/ml}$) in a 96-well flat-bottomed microplate. After incubation, cultures were pulse-labelled with 0.5 μCi (15.1 $\mu\text{Ci/mmol}$) of tritiated thymidine per well, and new incubation step was made for 9 h. The tritiated thymidine incorporation into the cells was measured by a liquid scintillation counter.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation, and the Student's *t*-test was used to determine the significance of the differences between the control and experimental groups.

Results and discussion

The lectin contained in *S. terebinthifolius* bark extract agglutinated erythrocytes at different degrees (Table 1); the highest specific HA (SHA) was detected with AB⁺ human cells. Unlikely, *Hevea brasiliensis* bark lectin agglutinated erythrocytes from rabbit and all human blood types except AB⁺ (19).

SteBL was thermostable with maximal activity at pH 7.5, stimulated by divalent ions (Table 2) and mainly inhibited by N-acetylglucosamine and fetuin (Table 3), which are usual characteristics of bark lectins (3;19).

Affinity chromatography on chitin column was efficient to purify SteBL (Figure 1), a protocol also used for isolation of *S. japonica* bark lectin (3). Analysis of purification index and yield obtained at chromatographic step (Table 4) can indicate lost of activity after matrix contact (20). Although multiple molecular forms have been detected in *R. pseudoacacia* bark lectin (4), the protocol described here resulted in homogeneous SteBL; a protein band of M_r 20,000 was detected by SDS-PAGE (Figure 2). The polypeptide was smaller than those of *M. amurensis*, 32,000 and 37,000 (2) and *S. nigra*, 30,000 (21), but it was similar to the one obtained from *S. japonica*-BSJAll, of M_r 19,400 (3). SteBL was not a glycoprotein, unlike *S. nigra* bark lectin (SNA-II) that contained 7.8 % of carbohydrate (21).

SteBL revealed stronger NO producing activity than LPS (Figure 3), compound that promote the production of NO from inducible nitric oxide synthase by cultured macrophages (22). Similarly, the lectin from *Phytolacca americana* (pokeweed mitogen) induced NO production by murine macrophage; the effect was explained by the increase of nitric oxide synthase gene expression (23).

Macrophage zymosan stimulated produced twofold more H₂O₂ than those on lectin effect (Figure 4). The lectin from *Viscum album* was also described with capacity to release H₂O₂ by neutrophils (24).

The thymidine uptake of Swiss mice splenocytes in response to SteBL was approximately seven times lower than those obtained with half Con A concentration, a well known mitogen (Figure 5). It has been suggested that the ability of lectins to bind carbohydrate on glycosylated cell surface receptor resulted in mitogenicity (25) and lectins of different specificities were already mitogens (26; 27). Although

SteBL HA was inhibited by galactose, it was not a potent cell proliferation agent in comparison with Con A, unlike to other plant galactose-binding lectins (28; 25).

SteBL ability to stimulate macrophages allows its possible use as a standard for *in vitro* assays; also the low mitogenic activity of SteBL is an important parameter for its perspective use for *in vivo* assays. NO generation has been suggested for anti-tumoral activity of compound isolated from roots of *Dichroa febrifuga* (29); thus it would be interesting to explore the therapeutic uses of SteBL. Additionally, chitin-binding lectins have been associated to plant defense mechanisms because of its anti-fungal activity (30); SteBL will also be tested for this property.

Acknowledgements This paper was financially supported by the National Council for Technological and Scientific Development (CNPq). The authors are deeply grateful for the technical assistance of Maria Barbosa Reis da Silva and Marisa Campos Polesi Placeres.

References

1. Shibuya N, Tazaki K, Song ZW, Tarr GE, Goldstein IJ, Peumans WJ. A comparative study of bark lectins from three elderberry (*Sambucus*) species. *Journal of Biochemistry* 1989;106:1098-103.
2. van Damme EJM, van Leuven F, Peumans WJ. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. *Glycoconjugate Journal* 1997; 14: 449-56.
3. Ueno M, Ogawa H, Matsumoto J, Seno N. A novel mannose-specific and sugar specifically aggregatable lectin from the bark of the Japanese pagoda

- tree (*Sophora japonica*). *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266:3146-153.
4. Rabjins A, Verboven C, Rouge P, Barre A, van Damme EJ, Peumans WJ, De Ranter CJ. Structure of a legume lectin from the bark of *Robinia pseudoacacia* and its complex with N-acetylgalactosamine. *Proteins* 2001; 144:470-8.
 5. van Damme, EJM, Barre A, Bemer V, Rougé P, van Leuven F, Peumans WJ. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). *Plant Molecular Biology* 1995; 29: 579-98.
 6. Spilatro SR, Cochran GR, Walker RE, Cablish KL, Bittner CC. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. *Plant Physiology* 1996;110:825-34.
 7. Rojo MA, 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 siebolding-b, a type II ribosome-inactivating protein from the bark of japanese elderberry (*Sambucus sieboldiana*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997; 340:18594.
 8. Kosonen O, Kankaaranta H, Vuorinen P, Moilanen E. Inhibition of human lymphocyte proliferation by nitric oxide-releasing oxatriazole derivatives. *European Journal of Pharmacology* 1997; 337:55-61.
 9. Engel M, Bachman M, Schroder HC. A novel galactose-and arabinose-specific lectin from the sponge *Pellina semitubulosa*: isolation,

- characterization and immunobiological properties. *Biochimie* 1992; 74:527-37.
10. Moreira RRD, Carlos IZ, Vilegas W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2001; 24:201-04.
 11. Reuter U, Chiarugi A, Bolay H, Moskowitz MA. Nuclear factor-kappaB as a molecular target for migraine therapy. *Annals of Neurology* 2002; 51:507-16.
 12. Rao VS, Viana GS, Menezes AM, Gadelha MG. Studies on the anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva* Engl. II. aqueous extract. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1987; 20:803-5.
 13. Menezes AM, Rao VS. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1988; 21:531-3.
 14. Desmarchelier C, Romao RL, Coussio J, Ciccio G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the Caatinga region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 1999; 67: 69-77.
 15. Paiva PMG, Coelho, LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 1992; 36:113-8.
 16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
 17. Pick E, Mizel D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an

- automatic enzyme immunoassay reader. *Journal of Immunology Methods* 1981; 46:211-26.
18. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipp PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and nitrogen (N^{15}) nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 1982;126:131-8.
19. Wititsuwannakul R, Wititsuwannakul D, Sakulborirug C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Phytochemistry* 1998; 47:183-7.
20. Sampaht P, Subramanian C, Chandrakasan G. Extracellular proteases from *Streptomyces* spp. G157: purification and characterization. 1997; 26:85-90.
21. Kaku H, Peumans WJ, Goldstein IJ. Isolation and characterization of a second lectin (SNA-II) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990; 277:255-62.
22. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of *Ginkgo biloba* extract (Egg 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chemico-Biological Interactions* 2001; 137:43-58.
23. Jeon YJ, Lee JS, Jeong HG. Induction of inducible nitric oxide synthase gene expression by pokeweed mitogen. *Chemico-Biological Interactions* 1999; 118:113-25.
24. Timoshenko AV, Cherenkevich SN, Gabius HJ. *Viscum album* agglutinin-induced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 1995; 49:153-8.
25. Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim L, Ramos MV, Barral-Neto M. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunology* 1999; 194:98-102.

26. Kabir, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *Journal of Immunological Methods* 1998; 212:193-211.
27. 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). *Journal of Biochemistry* 1995; 118:1205-10.
28. Wang H, Ng TB, Liu Q. Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Sciences* 2002; 70:877-85.
29. Togun RA, Animashaun T, Kay JE, Aboderin AA. A galactose-binding T-cell mitogenic lectin from the seeds of *Telfairia occidentalis*. *Phytochemistry* 1994; 35:1125-30.
30. Murata K, Takano F, Fushiya S, Oshima Y. Enhancement of NO production in activated macrophages *in vivo* by an antimalarial crude drug, *Dichroa febrifuga*. *Journal of Natural Products* 1998; 61:729-33.
31. Freire MGM, Gomes VM, Corsini RE, Machado OLT, De Simone SG, Novello JC, Marangoni S, Macedo MLR. Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 2002; 40:61-8.

Table1. Specific hemagglutinating activity of *S. terebinthifolius* bark extract with different erythrocytes

ERYTHROCYTES	SHA
Human	
A	953
B	238
AB	15,241
O	7,620
Rabbit	238

To assay hemagglutinating activity (HA) SteBL preparation (50 μ l) was serially two-fold diluted in 0.15 M NaCl before addition of 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde treated erythrocytes (50 μ l). SHA, specific HA (titer/protein).

Table 2. Effect of ions, pH values and heating on lectin activity of *S. terebinthifolius* bark extract

CONDITION	SHA
Ion (5 mM)	
Ca ²⁺	30,482
Mn ²⁺	60,964
pH	
3.5	2
6.0	238
7.5	1,905
10.5	238
Heating (100° C)	3,810

Hemagglutinating activity (HA) was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. SHA, specific HA (titer/protein) of the extract with 0.15 M NaCl: 238.

Table 3. Inhibition of SF SteBL activity with carbohydrates and glycoproteins

CONDITIONS	SHA
Carbohydrate (100 mM)	
Fucose	602
Galactose	4.7
N-acetylglucosamine	4.7
Raffinose	2.3
Glycoproteins (500 mg/ml)	
Casein	301
Fetuin	9.4
Ovalbumin	38
Thyroglobulin	150

Hemagglutinating activity (HA) was performed with 2.5% (v/v) suspension of glutaraldehyde treated rabbit erythrocytes. SHA, specific HA (titer/protein), of SF SteBL 0.15 M NaCl diluted: 4,819. D(+) Fructose, D(+) glucose, D(+) maltose, D(+) mannose, D(+) trehalose and D(+) xylose did not inhibit SF40 SteBL.

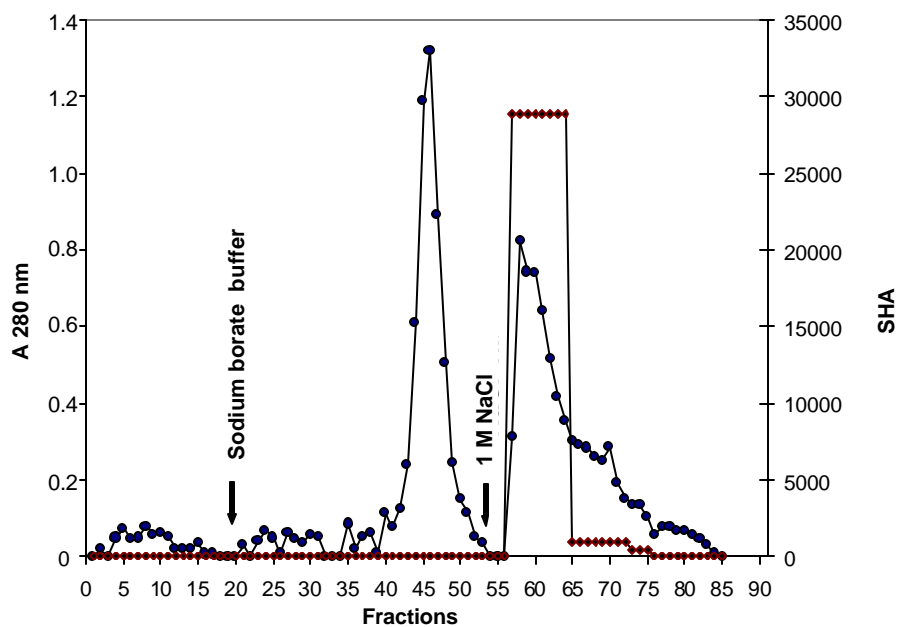


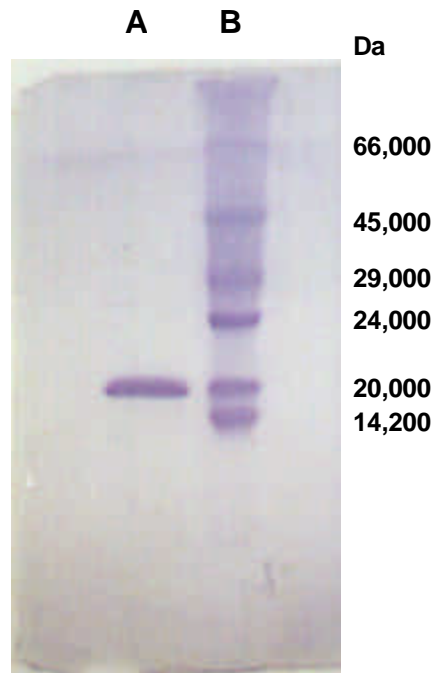
Figure 1. Affinity chromatography on chitin column. Sample of SF (3.0 mg of protein) was applied to a column (7.0 x 1.5 cm) equilibrated with 0.15 M NaCl. The retained proteins were eluted at a flow rate of 30 ml/h with 0.015M sodium borate buffer, pH 7.4 and 1.0 M NaCl. Fractions of 1.5 ml were collected. \bullet 280 nm \bullet (), SHA ().

Table 4. Purification of SteBL.

Preparations	Protein (mg)	Total HA	SHA	Purification (fold)	Yield (%)
Bark extract	533	126,976	238	1	100
Ammonium sulphate fraction	211	16,777,216	79,438	334	13,213
Chitin chromatography	0.9	30,413	34,133	143	12

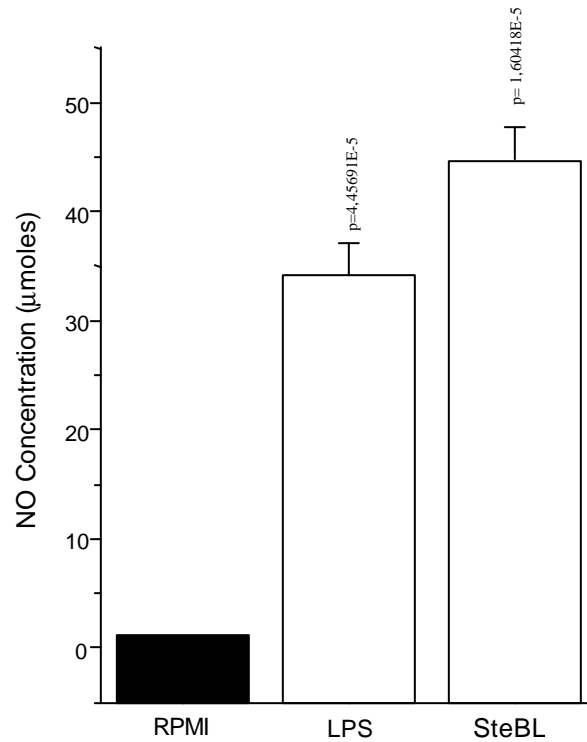
Hemagglutinating activity (HA) was made with 2.5% (v/v) suspension of rabbit glutaraldehyde treated erythrocytes. SHA, specific HA (titer/protein).

Figure 2. SDS-Polyacrylamide gel (12 %) of SteBL (A) and standards (B). The



lectin (60 μ g of protein) as well as bovine serum albumin (66,000), ovalbumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000), trypsinogen (24,000), trypsin inhibitor (20,000), and α -lactalbumin (14,200) were stained with Coomassie Brilliant blue. Staining of SteBL with Schiff's reagent was negative.

Figure 3. Nitric oxide production by Swiss mice macrophages.



TG-elicited peritoneal macrophages (5×10^6 cells/well) were cultured with LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) or SteBL (10 $\mu\text{g/ml}$). After 24 h of culture, NO release was measured by the Griess method. Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals.

Figure 4. Hydrogen peroxide production by Swiss mice macrophage.

The macrophages (2×10^6 cells/ml) were cultured for 1 h in the presence of zymosan (250 μ g/ml) or SteBL (500 μ g/ml). Each bar represents the mean \pm S.D. of four animals.

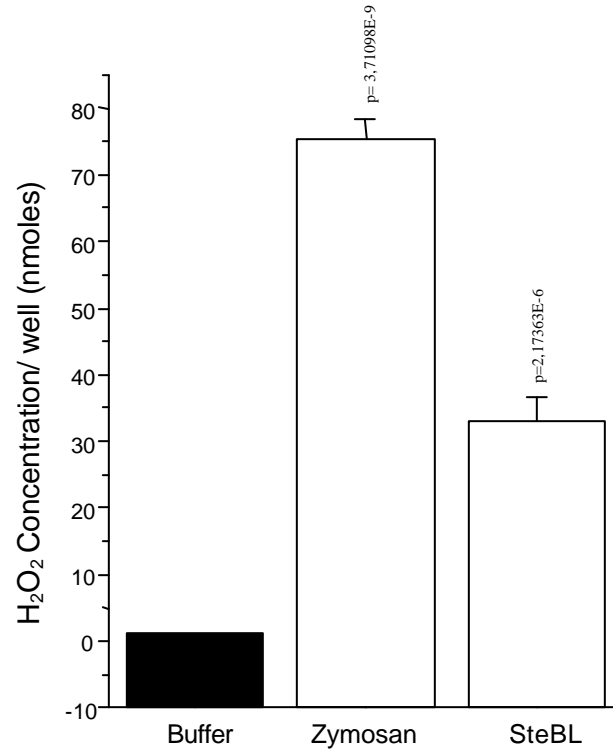
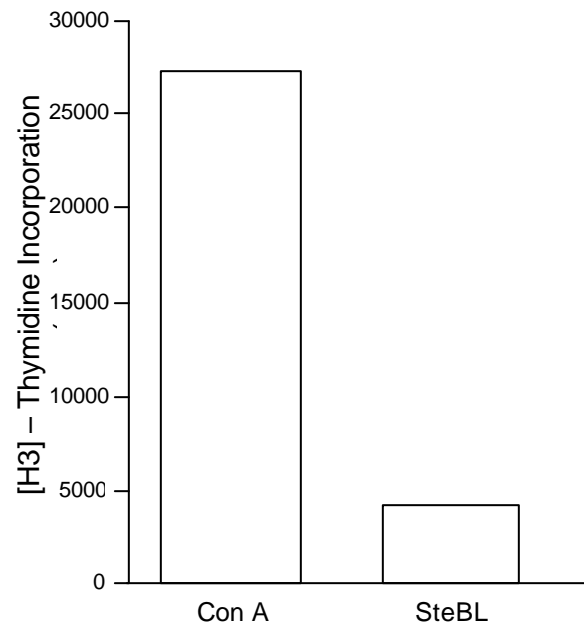


Figure 5. Mitogenic stimulation of splenocytes by lectins.

Splenocytes (2.8×10^6 cells/ml) were incubated for 64 h with Con A ($0.5 \mu\text{g/ml}$) or SteBL ($10 \mu\text{g/ml}$). The incorporation of [^3H]-thymidine was measured at 9 h.



CONCLUSÕES

1. Entrecasca de *S. terebinthifolius* contém lectina (SteBL).
2. Extrato de entrecasca aglutinou eritrócitos de coelho e humanos, porém foi principalmente ativa para eritrócitos tipo AB.
3. A atividade hemaglutinante do extrato foi estimulada por íons divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}), aquecimento (100°C) e pH 7,5.
4. A atividade da fração de sulfato de amônio mais ativa (FS) foi inibida por carboidratos (fucose, galactose, N-acetilglicosamina e rafinose) e glicoproteínas (caseína, fetuína, ovoalbumina e tiroglobulina).
5. SteBL foi obtida após cromatografia da FS em coluna de quitina.
6. SDS-PAGE revelou a presença de um polipeptídeo de massa molecular 21.000 Da.
7. SteBL estimulou a produção de óxido nítrico e liberação de H_2O_2 por macrófagos.
8. SteBL tem pequena atividade mitogênica.