

REGINALDO BRUNO GONÇALVES

ISOLAMENTO DE LECTINA DE FEIJÃO E GERME DE TRIGO E SUAS
PRECIPITAÇÕES COM GLICOPROTEÍNAS SALIVARES E SÉRICAS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências,
na Área de Biologia e Patologia Buco Dental.

PIRACICABA

1993

ORIENTADOR: PROF. DR. CELSO PAULINO DA COSTA t

Este exemplar foi devidamente corrigido, conforme resolução da CCPG 036/8
Tirado em 08.02.94
R. Celso Paulino da Costa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio e Claudina
e a Lúcia Helena, pelo carinho,
compreensão, paciência e apoio.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. *CELSO PAULINO DA COSTA*, pela orientação, estímulo para pesquisa científica e amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. JAIME APARECIDO CURY e JOSÉ FRANCISCO HÖFLING, pela colaboração com o trabalho e fornecimento de drogas e equipamentos.

A Prof.Dra. MARIA TERESA VITRAL DE CARVALHO, pela realização das eletroforeses em gel de poliacrilamida em pH ácido.

Ao laboratório de Patologia Clínica (PREVLAB), na pessoa do Diretor técnico CESAR B. SANCHES, pela realização das eletroforeses em agarose.

Aos técnicos da Área de Bioquímica Oral Waldomiro e Marisa; e aos funcionários e alunos de pós graduação da Área de Microbiologia, pelo auxílio na realização de algumas técnicas.

Ao NILSON JOSÉ MORAL, pela colaboração e amizade.

A LUCIA HELENA REIS FREIRE pela ajuda com as fotos e slides.

ÍNDICE

PÁGINA

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 - Lectinas.....	3
2.1.1 - Histórico.....	3
2.1.2 - Lectinas na natureza.....	7
2.1.2.1 - Lectinas em animais superiores.....	7
2.1.2.2 - Lectinas em bactérias.....	9
2.1.2.3 - Lectinas em plantas.....	10
2.1.3 - Lectinas e reconhecimento celular.....	11
2.1.4 - Toxicidade.....	12
2.1.5 - Purificação.....	13
2.1.6 - Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA).....	15
2.1.7 - Lectina de germe de trigo (<i>Triticum</i> <i>vulgaris</i>).....	16
2.2 - Película adquirida.....	18
2.3 - Aderência bacteriana.....	19
2.4 - Placa bacteriana.....	21
2.5 - Ovomucóide.....	24
3 - MATERIAS E MÉTODOS.....	26
3.1 - Materiais.....	26
3.2 - Purificação do ovomucóide.....	26

3.3 - Preparação da coluna.....	27
3.4 - Preparação dos extratos brutos (EBs).....	28
3.5 - Fracionamento dos extratos através de cromatografia de afinidade.....	29
3.5.1 - Aplicação do extrato.....	29
3.5.2 - Eluição das proteínas aderidas à coluna.....	29
3.6 - Dosagem de proteínas.....	30
3.7 - Saliva.....	31
3.8 - Soro e sangue.....	31
3.9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	31
3.10 - Eletroforese em agarose	32
3.11 - Dupla difusão em agarose.....	32
4 - RESULTADOS.....	33
4.1 - Fracionamento dos extratos através de cromatografia de afinidade.....	33
4.1.1 - Fracionamento do extrato de feijão.....	33
4.1.2- Fracionamento do EB de germe de trigo	36
4.2 - Determinação da capacidade da coluna.....	36
4.3 - Eletroforese em gel de agarose.....	39
4.4 - Eletroforese em poliacrilamida.....	41
4.5 - Reação de dupla difusão.....	47
5 - DISCUSSÃO.....	51
6 - RESUMO.....	56

7 - SUMMARY.....	58
8 - CONCLUSÕES.....	60
9 - BIBLIOGRAFIA.....	61

ISOLAMENTO DE LECTINAS DE FEIJÃO E GERME DE TRIGO E SUAS
PRECIPITAÇÕES COM GLICOPROTEÍNAS SALIVARES E SÉRICAS

1 - INTRODUÇÃO

Proteínas capazes de reconhecimento específico e ligação reversível a carboidratos e compostos contendo açúcares e de aglutinar células ou glicoconjugados são conhecidas como lectinas, e vem despertando o interesse, desde o século passado, de pesquisadores das mais diversas áreas.

Estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em plantas, bactérias, fungos, vírus, células de mamíferos e outras fontes. Devido as suas propriedades particulares, tem se utilizado lectinas em pesquisas e em diversos procedimentos laboratoriais e clínicos. Seu uso oferece muitas vantagens incluindo alta estabilidade e disponibilidade de uma de grande quantidade de diferentes lectinas com especificidades diversas. Elas são importantes para propósitos analíticos e preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas afins.

Lectinas de *Phaseolus vulgaris* (feijão) aglutinam hemácias e estimulam a proliferação de linfócitos, estas propriedades são devidas a uma série de 5 isolectinas (MILLER et al, 1975). A lectina de germe de trigo (*Triticum vulgaris*) aglutina preferencialmente células malignas (AUB et al, 1963) e tem a capacidade de inibir a aglutinação de *Streptococcus mutans* pela saliva (MIRTH et al, 1979), além de diminuir a adesão destas

bactérias a hidroxiapatita .in vitro.. (GIBBONS & DANKER, 1981).

Neste trabalho procuramos desenvolver uma técnica para o isolamento de lectinas com afinidade para oligossacarídeos (*Phaseolus vulgaris* e *Triticum vulgaris*), através de cromatografia de afinidade, utilizando ovomucóide insolúvel como matriz.

Outra proposição nossa foi a de estudar as possíveis interações entre estas lectinas tanto com glicoproteínas salivares como séricas. A literatura apresenta poucos trabalhos em relação a este assunto mas lectinas presentes na dieta podem alterar a relação parasita hospedeiro influenciando assim a adesão bacteriana à superfície dental e à células epiteliais da cavidade oral. O desenvolvimento desta técnica para isolamento facilitará a obtenção destas lectinas em estado puro, possibilitando novos estudos a seu respeito, assim como sua utilização em técnicas já preconizadas.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - LECTINAS

2.1.1 - HISTÓRICO

Estudos sobre lectinas foram iniciados no século passado quando foi descoberto que extratos de plantas aglutinavam hemácias e eram tóxicos para os homens e animais. O primeiro trabalho a relatar que proteínas de plantas aglutinavam eritrócitos foi a tese de doutorado de Hermann Stillmark (1888,). Quando estudava a toxicidade de sementes de *Ricinus communis* ele observou que a mistura do extrato da planta com sangue resultava na aglutinação dos eritrócitos, notou ainda que os eritrócitos de diferentes animais reagiam diferentemente, e que aquela "ricina" aglutinava leucócitos, células do fígado e epiteliais.

Outros estudos se seguiram como o de Hellin (1891) que descobriu atividade hemaglutinante no extrato de *Abrus precatorius*, e ainda Mendel (1909) e Kobert (1913) que estudaram hemaglutinina de *Robinia pseudocacia*.

As propriedades tóxicas de ricina e abrina atraíram a atenção de Paul Ehrlich que utilizou estas proteínas como modelo de antígeno (EHRLICH, 1891a e 1891b), estabelecendo deste modo alguns dos princípios fundamentais da imunologia. Animais alimentados com *Abrus precatorius* desenvolviam uma certa imunidade contra abrina e esta imunidade era potencializada quando se injetava parenteralmente a proteína, resultando na produção de anticorpos

que inibiam, tanto sua atividade tóxica como hemaglutinante. Ehrlich também demonstrou a especificidade da resposta imune, pois soro anti-abrina neutralizava abrina mas não ricina e vice versa .

Ele mostrou que existia uma correlação quantitativa entre a quantidade de antisoro e de antígeno que poderia ser neutralizado, realizando a primeira determinação quantitativa de anticorpos "in vitro". Outra descoberta foi a transferência da imunidade da mãe para a prole, durante a gestação pelo sangue e através do aleitamento, após o nascimento.

A natureza proteica da ricina foi demonstrada por (OSBORNE et al, 1905). Atividade hemaglutinante em extratos de plantas comestíveis foi encontrada, pela primeira vez por Landsteiner & Raubitschek (1908), em sementes de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Lens culinares*, neste trabalho eles também demonstraram a seletividade das aglutininas em relação a eritrócitos de diferentes animais. Em 1909, Wienhaus observou que extratos de *Phaseolus vulgaris* aglutinavam leucócitos e células renais e epiteliais.

A primeira purificação foi feita por Summer em 1919, através de precipitação salina e cristalização do extrato de *Canavalia ensiformes* ele obteve a concanavalina A. Em 1936 Summer & Howell relataram que além de aglutinar hemácias, a concanavalina A, também precipitava glicogênio em solução e sua atividade hemaglutinante era inibida pelo açúcar de cana, sugerindo que a reação de hemaglutinação ocorria mediada por carboidratos da superfície das hemácias.

A especificidade das lectinas para os diferentes grupos

sanguíneos, foi relatada por Boyd (1947) que observou que extratos de *Phaseolus limensis* aglutinavam fortemente hemácias de alguns indivíduos, mas não a de outros. Boyd & Reguera (1949) relataram a atividade anti hemácias A do extrato de *Phaseolus lunatus*, quase ao mesmo tempo Renkonen (1948), mostrou a especificidade para hemácias do grupo A de extratos de *Vicia cracca* e para o grupo O de *Lotus tetragonolobus*. A atividade grupo específica é tão precisa que se pode distinguir entre subgrupos, como é o caso de lectinas de *Dolichos biflorus* (BIRD, 1951), que reagem mais fortemente com hemácias do tipo A1 do que com o tipo A2. Estas propriedades levaram Boyd & Shapleigh (1954), proporem o termo lectina, que veio do latim "legere" (escolher), para estas proteínas com atividade hemaglutinante.

A atividade grupo específica de algumas lectinas e sua inibição por açúcares contribuíram muito para o estabelecimento das bases químicas das substâncias que caracterizam os grupos sanguíneos do sistema ABO. Deste modo Morgan & Watkins (1953) mostraram que N-Acetil-D-galactosamina inibia a aglutinação de hemácias A pela lectina de *Phaseolus limensis* e que a aglutinação de hemácias tipo O pela lectina de *Lotus tetragonolobus* foi inibida pela L-fucose, sendo estes achados indicativos de que açúcares são determinantes de superfície e conferem especificidade as hemácias.

Uma importante descoberta foi feita por Nowel (1960) que encontrou propriedades mitogênicas na lectina de *Phaseolus vulgaris*, isto é esta fitohemaglutinina (PHA) era capaz de estimular a mitose de linfócitos. Este fato teve um impacto

revolucionário na imunologia uma vez que linfócitos eram considerados células terminais que não sofreriam divisão ou diferenciação.

Outras lectinas mostraram ser mitogênicas, como é o caso da concanavalina A (Con A), e esta atividade pode ser inibida por baixas concentrações de D-manose, demonstrando que a ligação das lectinas à açúcares da superfície da célula é que resulta na estimulação celular.

Grande interesse despertou o trabalho de Aub e seus colaboradores (1963, 1965), quando investigavam os efeitos de uma lipase contida no extrato de germe de trigo sobre o crescimento tumoral, descobriram que este extrato aglutinava preferencialmente células malignas. Mais tarde, Burger & Golderberg (1967) mostraram que esta propriedade era devida a contaminação com a lectina de germe de trigo (WGA). Estas observações atraíram a atenção de muitos cientistas para o uso de lectinas na pesquisa do câncer e foi descoberto que outras lectinas apresentavam propriedades similares, como ConA (INBAR & SACHS, 1969).

Os primeiros a utilizarem cromatografia de afinidade para purificação de lectinas foram Agrawal & Goldstein (1965), que isolaram Con A por adsorção específica numa coluna com dextran (Sephadex) e eluição com D-glucose. A primeira lectina usada em estudos de estrutura de carboidratos foi a Con A, assim como a primeira a ser sequenciada (EDELMAN et al, 1972) e a ter sua estrutura tridimensional estabelecida (HARDMAN & AINSWORTH, 1972).

A especificidade entre lectina e carboidrato é indicativa que

na interação com células estas lectinas reagem com carboidratos presentes na superfície celular, por isso as lectinas tem sido utilizadas para estudos da arquitetura da superfície de diversas células incluindo células malignas (BOURRILON, 1973) e para a purificação de glicoproteínas por cromatografia de afinidade (APSBURG *et al*, 1970; KAHANE *et al*, 1976). Elas são utilizadas também na separação de células de mamíferos por aglutinação seletiva (REISNER *et al*, 1981) e ainda no isolamento de estruturas polissacarídicas e como modelo para estudos das interações entre proteínas e carboidratos (SHARON & LIZ, 1972).

2.1.2 - LECTINAS NA NATUREZA

A princípio os pesquisadores pensavam que as lectinas eram encontradas somente em plantas, mas estudos demonstraram que elas estão presentes em uma grande variedade de fontes naturais tais como :

a - sementes, raiz e casca de plantas (principalmente nas leguminosas).

b - fungos, bactérias, protozoários e vírus.

c - esponja, algas marinhas, moluscos e ovos de peixes.

d - fluido corporal de invertebrados.

e - alguns vertebrados e membranas de células de mamíferos.

2.1.2.1 - LECTINAS EM ANIMAIS SUPERIORES

Animais produzem uma variedade de lectinas, tanto em forma

solúvel como ligada a membrana de células, muitas das quais participam no processo de reconhecimento celular.

Um marco no estudo da interação lectina-carboidrato e seu papel no reconhecimento celular veio do trabalho de Ashwell & Morell que em 1974 descobriram a primeira lectina de mamífero, uma proteína hepática específica para D-galactose que pode estar relacionada com a remoção de glicoproteínas da corrente circulatória. Outras lectinas de origem animal foram descobertas entre elas uma que pode estar envolvida no mecanismo de remoção de bactérias da corrente circulatória (PERRY & OFEK, 1984) e uma em humanos responsável pela remoção de fisiológica de hemácias velhas do sistema circulatório (ROOS et al, 1985).

Como os carboidratos de superfície celular, as lectinas estão sujeitas a mudanças de acordo com o estado fisiológico e patológico da célula, em 1981 Lotan & Raz demonstraram que células tumorais de ratos e humanos carregam em sua superfície lectinas não encontradas na célula normal, e estas lectinas parecem estar envolvidas no processo de metástase.

Outras funções relacionadas com lectinas em animais seriam a do controle da diferenciação e formação de órgãos (BARONDES, 1984), a do reconhecimento entre linfócitos e órgãos linfóide quando do processo de migração dos linfócitos da corrente circulatória para estes órgãos (SHARON & LIZ, 1989). Existem fortes evidências que sugerem que lectinas em superfícies de células metastáticas podem estar envolvidas na formação do embolo, seja pela agregação com outras células alteradas ou com células do hospedeiro, elas podem ainda facilitar a adesão de agregados à

células endoteliais dos capilares (RAZ & LOTAN, 1987).

2.1.2.2 - LECTINAS EM BACTÉRIAS

Várias bactérias apresentam em sua superfície lectinas específicas para diversos açúcares (SHARON & LIZ, 1987). Em enterobactérias como *Escherichia coli* e *Salmonellae*, e em outras espécies, as lectinas são encontradas normalmente na forma de submicroscópicos apêndices conhecidos como fímbrias ou pilís, que estão presentes na superfície da célula bacteriana. Estas fímbrias apresentam usualmente de 5 a 7 nm de diâmetro e de 100 a 200 nm de comprimento.

A que melhor foi caracterizada foi a fímbria tipo 1 (manose específica) de *E. coli*, que preferencialmente se liga a oligomanose e oligossacarídeos híbridos de glicoproteínas da superfície da célula animal. Sugerindo deste modo que estas lectinas podem funcionar como adesinas que ligam as bactérias a célula do hospedeiro, tendo um papel fundamental no início e desenvolvimento do processo infeccioso (OFEK et al, 1977).

Evidências diretas do envolvimento destas lectinas na iniciação de infecções foram obtidas quando se mostrou que, infecção do trato urinário em ratos, por *Escherichia coli* poderia ser prevenida por metil α -D-manosídeo (ARONSON et al, 1979). Este estudo demonstrou que é possível evitar o processo infeccioso utilizando terapias antiadesivas através de açúcares inibidores que irão impedir a adesão das bactérias mediada por lectinas.

Lectinas galactose específica produzidas por *actinomyces*

orais, como *Actinomyces naeslundii* e *A. viscosus*, facilitam o início da colonização das superfícies epiteliais da boca e dentes por mediar a adesão da bactéria a resíduos de galactose ou na superfície da célula epitelial, ou na superfície de outra bactéria, como *Streptococcus sanguis* por exemplo, que está aderido a película adquirida da superfície dental (MIRELMAN, 1987).

Bactérias portadoras de adesinas podem rapidamente ligar-se a açúcares em células fagocitárias como leucócitos ou macrófagos, resultando em ativação metabólica da célula, ingestão da bactéria e eventual morte bacteriana. Normalmente este processo é mediado por opsoninas (anticorpos e sistema complemento) e esta ativação da fagocitose por uma via não opsonínica, que é mediada por lectinas é conhecida como lectinofagocitose, e pode ser importante para a remoção de bactérias de pacientes imuno suprimidos e em regiões pobres em opsoninas (OFEK & SHARON, 1988).

2.1.2.3 - LECTINAS EM PLANTAS

Lectinas de plantas foram as primeiras a serem descobertas e devido a sua ampla distribuição e facilidade de isolamento são as mais estudadas, entretanto pouco se conhece sobre sua função. O seu papel preciso nas plantas é desconhecido, mas pelo menos duas hipóteses tem sido postuladas (LIENER, 1990) - a) seria mediadora de uma relação simbiótica entre microrganismos fixadores de nitrogênio, particularmente do gênero *Rhizobium*, e plantas leguminosas, e b) como parte de um mecanismo de defesa contra insetos e microrganismos patogênicos.

Estas lectinas podem também funcionar como uma importante reserva de proteínas (MIRELMAN *et al*, 1975). A sua grande distribuição em quase todas as famílias do reino vegetal podem indicar que estas proteínas sejam essenciais para a sobrevivência da espécie. O fato de não serem encontradas em algumas plantas tem que ser cuidadosamente estudado uma vez que pode ser uma falha no processo de extração de lectinas ou o uso de um receptor não adequado para o teste de sua atividade (MOREIRA *et al*, 1990).

2.1.3 - LECTINAS E RECONHECIMENTO CELULAR

Reconhecimento celular é um evento inicial para um grande número de processos biológicos, principalmente os que envolvem interações entre células, como fertilização, embriogênese, migração celular, formação dos órgãos, defesa imunológica e infecção microbiana (SHARON & LIZ, 1989).

Embora as lectinas sejam conhecidas a muito tempo, a idéia que elas poderiam agir como moléculas de reconhecimento celular é recente (HARRISON & CHESTERTON, 1980).

A descoberta que elas estão amplamente distribuídas pela natureza e são frequentemente encontradas na superfície celular e em partículas intracelulares, além do fato de que quase todas as células carregam em sua superfície carboidratos nas formas de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos (COOK, 1986), levaram a teoria de que lectinas na superfície celular poderiam mediar a interação entre células ao se combinar com carboidratos complementares na célula oposta. Exercendo deste modo um papel

fundamental no controle de processos normais e patológicos em organismos vivos (SHARON & LIZ, 1989).

Várias lectinas de membranas que participam do processo de introdução de glicoproteínas para o interior da célula e no tráfego intracelular destas glicoproteínas foram descobertas (ASHWELL & MORELL, 1974 ; KORNFIELD, 1987). Quanto a especificidade as lectinas podem distinguir não somente entre diferentes monossacarídeos como também entre oligossacarídeos, detectando diferenças sutis na estrutura dos carboidratos. Esta interação entre lectina e carboidrato satisfaz outros requisitos do sistema de reconhecimento celular como velocidade e reversibilidade (SHARON & LIZ, 1989).

Tipicamente as lectinas e os carboidratos complementares estão localizados na superfície de células opostas, que podem ser ou não do mesmo tipo. Estas células podem também interagir por meio de pontes formadas por glicoproteínas solúveis que se ligam a lectinas da superfície celular. Alternativamente, as lectinas podem se combinar com carboidratos de componentes insolúveis da matriz extracelular que promovem a adesão da célula ao substrato e ainda lectinas solúveis podem atuar como pontes ligando carboidratos em células opostas (SHARON & LIZ, 1989).

2.1.4 - TOXIDADE

A exposição dos homens e animais as lectinas é inevitável uma vez que estas estão presentes em quase todas plantas comestíveis (NACHBAR & OPPENHEIM, 1980). Lectina de germe de trigo (BRADY et

al, 1978) e *Phaseolus vulgaris* (PUSZTAI & GRANT, 1980) mostraram ser resistentes a digestão por enzimas digestivas e algumas permanecem ativas em fezes de homens e animais alimentados com fontes destas proteínas.

O processo de cozimento nem sempre destrói completamente a atividade de lectinas presentes na nossa dieta sendo possível encontrar esta atividade até em produtos processados industrialmente (LIENER, 1974 ; NACHBAR e OPPENHEIM, 1980).

Estes fatos tem repercussões nutritivas uma vez que os aminoácidos destas lectinas, não digeridas, não estarão disponíveis e ainda, estas lectinas intactas ou parcialmente digeridas podem se ligar a células epiteliais do intestino, diminuindo a absorção de nutrientes. Isto acontece com lectinas de germe de trigo (ETZLER & BRANSTRATOR, 1974) e *Phaseolus vulgaris* (KING et al, 1980).

2.1.5 - PURIFICAÇÃO

Purificação de lectinas é de importância fundamental para se determinar suas características gerais e estabelecimento de suas propriedades moleculares. A primeira técnica proposta foi cristalização utilizada para Concanavalina A (SUMMER, 1919). Lectina de *Phaseolus* foi purificada por precipitação com sulfato de amônio a vários pH. (RIGAS & OSGOOD, 1955 ; JAFFÉ & GAEDE, 1959).

Outra técnica proposta foi a de cromatografia de troca iônica em DEAE e CM celulose empregadas na purificação de lectinas de

germe de trigo (ALLEN et al, 1973) e *Phaseolus vulgaris* (TAKAHASHI et al, 1967 ; SELA et al, 1973).

Cromatografia de afinidade esta baseada na habilidade das lectinas se ligarem reversivelmente a carboidratos, deste modo conhecendo o açúcar específico da lectina é possível preparar uma matriz adequada para purificação por cromatografia de afinidade. Os primeiros a utilizarem esta metodologia foram Agrawal & Goldstein (1967) e Olson e Liener (1967) que utilizaram Sephadex, um polímero de dextrana para purificar concanavalina A.

O desenvolvimento de procedimentos que permitem a ativação de suportes insolúveis comercialmente disponíveis, como a Sepharose por exemplo, e o acoplamento de ligantes apropriados a estes suportes possibilitaram o amplo emprego da técnica de cromatografia de afinidade para purificação de diversos tipos de lectinas. Utilizando estes procedimentos Sela et al (1975) acoplaram fetuína à Sepharose para purificação de lectina de *Phaseolus vulgaris* e Vretblad (1976) acopou *N*-acetil-D-glicosamina a este suporte para a purificação de lectina de germe de trigo.

Alguns autores, utilizaram a propriedade das lectinas de interagirem com eritrócitos para preparar uma coluna com estroma de hemácias (OCHOA & KRISTIANSEN, 1978), outros imobilizaram tiroglobulina de porco em Sepharose para obtenção de lectina de *Phaseolus* (MATSUMOTO & OSAWA, 1972 ; FELSTED et al, 1975 ; CARVALHO, 1981). Lutsik (1984) fez uma fixação das proteínas da clara do ovo para purificar aglutinina de germe de trigo.

Freier et al em 1985 trabalharam com Sepharose, onde

acloplaram mucina gátrica ou ovomucóide em Sepharose para purificação de várias lectinas, entre elas a de *Phaseolus vulgaris* e *Triticum vulgaris*. Fleischmann et al, (1985) utilizaram esta coluna de ovomucóide ligado a Sepharose para purificação de isolectinas de *Phaseolus*.

2.1.6 - LECTINA DE PHASEOLUS VULGARIS L. (PHA)

Em 1959 Hungerford descobriu que o extrato do feijão era capaz de estimular a divisão celular de alguns leucócitos do sangue humano. Mais tarde foi descoberto que os linfócitos é que proliferavam (CARSTAIRS, 1961).

Extratos de *Phaseolus vulgaris* contêm glicoproteínas de forma tetramérica com PM 120.000 D e composta de duas subunidades não covalentemente ligadas com PM entre 29.000 e 35.000 D (CARVALHO, 1981). Estes extratos promovem a aglutinação de hemácias e estimulam a proliferação de linfócitos, propriedades estas devidas a uma série de isolectinas (MILLER et al, 1975).

Yachnin (1972) sugere que a atividade de eritroaglutinação e estimulação de linfócitos é o resultado da combinação de duas subunidades diferentes, chamadas E (eritroaglutinação) e L (estimulação de linfócitos), em cinco possíveis proteínas tetraméricas, E4, E3L1, E2L2, E1L3 e L4. Quanto maior a presença da subunidade E maior será a eritroaglutinação, e a estimulação de linfócitos prevalece na subunidade L.

As lectinas de *Phaseolus* (PHA) precipitam componentes do soro humano normal (MORSE, 1968). Estudos demonstram que as cinco

(PHA) isolectinas exibem diferentes precipitações de glicoproteínas séricas (YACHNIN, 1972 ; GLAD & BORREBAECK, 1984), sendo que PHA E4 exhibe afinidade para catorze destas glicoproteínas e PHA L4 para nove delas. As glicoproteínas que mostraram maior atividade para PHA E4 foram: IgM, IgA, IgG, α 2-macroglobulina, β -lipoproteína e haptoglobulina e entre as que melhores reagiram com PHA L4 estão: IgG, IgA e haptoglobulina.

Existe uma semelhança na composição de aminoácidos e de carboidratos das duas subunidades, assim como nas suas propriedades físico químicas, isto pode indicar que as diferenças nas propriedades biológicas das subunidades residam em pequenas variações na sua estrutura primária (GLAD & BORREBAECK, 1984).

Estas lectinas tem sido utilizadas para estudos da função de linfócitos "in vitro", isolamento de glicoproteínas por cromatografia de afinidade e estudos de glicoproteínas e constituintes da membrana celular (SHARON & LIS, 1972). Segundo Liener (1990) o açúcar específico da lectina é *N*-acetilgalactosamina e ela é capaz de reconhecer estruturas oligossacarídicas.

2.1.7 - LECTINA DE GERME DE TRIGO (*TRITICUM VULGARIS*)

A aglutinina de germe de trigo (WGA) é uma proteína simples (ALLEN et al, 1973) que em pH fisiológico é um dímero de subunidades com PM 18.000 D que estão ligadas por pontes dissulfídicas.

Em 1963 Aub et al demonstraram que preparações a partir de uma

lipase de germe de trigo causavam a aglutinação de algumas células malignas, mais tarde (BURGER & GOLDBERG, 1967) foi descoberto que células transformadas por vírus eram melhor aglutinadas do que células da mesma linhagem que não sofreram alterações e que esta aglutinação era promovida por um componente proteico encontrado como contaminante na lipase de germe de trigo. Esta seletividade de aglutinação para células que sofreram transformação reflete alterações que ocorreram na membrana celular durante o processo de transformação.

Num estudo de indução da aglutinação de *Streptococcus mutans* por saliva foi demonstrado que WGA, uma lectina com alta especificidade para *N*-acetilglicosamina é capaz de inibir a agregação induzida por saliva uma vez que pode se ligar reversivelmente a fatores agregantes da saliva que contem resíduos GlcNAc (MIRTH *et al*, 1979).

Gibbons & Dankers (1981) mostraram que WGA poderia inibir a adesão de *Streptococcus mutans* na superfície da hidroxiapatita pré tratada com saliva, num modelo de estudo das interações entre componentes da película adquirida e bactérias. Sugerindo deste modo, que a lectina diminuiu a adesão de *Streptococcus mutans* a superfície dental. Ela também se liga especificamente a células epiteliais da boca e esta ligação é inibida pela saliva, Gibbons & Dankers (1982) sugerem que uma das funções da saliva seria a de reduzir as interações das lectinas com as superfícies mucosas.

A lectina presente no germe de trigo reage com as seguintes proteínas plasmáticas: α -2macroglobulina, haptoglobulina, ceruplasmina, hemopexina e ácido α glicoproteico (GOLDSTEIN &

HAYES, 1978). Esta lectina é altamente estável e resiste a autoclavagem e processamento industrial (NACHBAR & OPPENHEIM, 1980), assim como à enzimas digestivas podendo ser encontradas intactas em fezes humanas após a sua ingestão (BRADY et al, 1978).

2.2 - PELÍCULA ADQUIRIDA

O esmalte dental é coberto por uma fina camada membranosa e amorfa chamada película adquirida, que se adere a ele e outras superfícies sólidas presentes na boca, como próteses, restaurações e aparelhos ortodônticos. Este filme orgânico e acelular é a base para adesão de microrganismos e o posterior desenvolvimento da placa dental. Ela é formada pela adsorção seletiva de componentes salivares e séricos ao mineral do esmalte que é principalmente a hidroxiapatita. Sua espessura e composição variam de acordo com sua localização e tempo de deposição, podendo ter de poucos micrometros até 10 μ m (MECKEL, 1965)

A superfície mineral do dente é anfótera, onde os vários grupos que fazem parte da hidroxiapatita estão arrançados com os grupos fosfatos e átomos de cálcio expostos na superfície, então proteínas ácidas e básicas podem se adsorver, sendo que proteínas ácidas podem se ligar ao fosfato e proteínas básicas ao cálcio (BERNARDI & KAWASAKI, 1968).

Os componentes salivares que se adsorvem seletivamente incluem proteínas ricas em prolina, tirosina, e histidina e mucinas salivares grupo sanguíneas reativas (GIBBONS & van HOUTE, 1980). Lisozima, IgA, IgG, albumina, amilase e glicosiltransferase

são encontradas (ÖSTAVIK & KRAUS, 1973). Seus principais componentes são glicoproteínas fosforiladas (THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1986).

Bactérias também podem adsorver a hidroxiapatita (HILLMAN et al, 1970), mas em vivo isto é pouco significativo porque o mineral do esmalte esta quase sempre coberto por componentes salivares adsorvidos. A adsorção das primeiras moléculas da película aderida na superfície do esmalte é instantânea, sendo que poucos segundos após uma limpeza rigorosa, o esmalte começa a ser recoberto.

A adesão bacteriana ao dente quase sempre envolverá interações entre componentes da superfície do microrganismo e componentes da película adquirida (GIBBONS & van HOUTE, 1980).

Importantes funções tem sido atribuídas a película, incluindo a inibição da precipitação de fosfato de cálcio da saliva (MORENO et al, 1979 ; AOBA et al, 1984), proteção da superfície dental dos produtos bacterianos, redução da fricção entre os dentes e modulação da colonização bacteriana que seletivamente vão colonizando as superfícies orais (GIBBONS & ETHERDEM, 1982) e ainda pode servir como substrato para a metabolização das bactérias aderidas (ARMSTRONG & HAYWARD, 1968) e reserva ions protetores como por exemplo, o flúor, cálcio e fosfato (SONJU, 1986).

2.3 - ADERÊNCIA BACTERIANA

Vários estudos sobre aderência bacteriana estabeleceram que a adesão de bactérias à célula animal é uma interação específica

entre macromoléculas na superfície bacteriana com estruturas complementares na superfície da célula animal (BEACHEY, 1981; GIBBONS, 1977; JONES, 1977). Os termos adesina e receptor são usados para descrever as moléculas correspondentes na superfície bacteriana e na célula animal respectivamente

Com excessão do grupo A e B de streptococos e talvez alguns cocos gram positivos, interações entre carboidratos e lectinas foram encontradas como sendo um dos mecanismos moleculares através dos quais as bactérias se aderem à superfície celular. Estas bactérias expressam em sua superfície proteínas, como lectinas, que se ligam a carboidratos e servem de adesinas ligando o microrganismo no glicoconjugado correspondente da célula animal (OFEK & PERRY, 1985).

Existem evidências que estas interações entre lectinas e carboidratos possam ocorrer de tres modos: (a) lectinas da superfície bacteriana se ligam à carboidratos na célula animal, (b) lectinas extracelulares formam pontes entre carboidratos na superfície das células animal e bacteriana, (c) lectinas integrantes da membrana celular ligariam-se à carboidratos na superfície da bactéria (OFEK & PERRY, 1985).

Estas interações também ocorrem entre as bactérias e a película adquirida na superfície dental sendo este um dos mecanismos envolvidos no processo de colonização bacteriana na placa.

2.4 - PLACA BACTERIANA

Colonização sobre ou na proximidade da superfície dental é conhecida como placa dental, esta placa não é uma entidade simples, mas sim uma massa bacteriana organizada onde bactérias específicas iniciam a colonização e através de um processo de sucessão bacteriana ocorre a formação da placa madura.

Existem vários tipos de placas que podem ser caracterizados de diversos modos, por exemplo, pela localização, pela composição microbiana, sua atividade metabólica, e seu potencial patogênico (FITZGERALD, 1968). Uma característica comum a todas placas microbianas é sua capacidade de aderir no seu substrato e isto a distingue de matéria alba que é um acúmulo frouxo de bactérias, restos de células e resíduos alimentares (RUTTER, 1979).

Embora as placas sejam constituídas principalmente de microrganismos, elas também contém produtos microbianos, proteínas da saliva e do fluido gengival e lectinas entre outros produtos da dieta (FITZGERALD, 1985). As placas existem nos dentes como um ecossistema coesivo, onde a produção ou não de doenças no seu sítio de formação depende não somente do tipo de microrganismo presente, mas também de como este ecossistema funciona como unidade.

Na cavidade oral a adesão dos microrganismos a superfície dental é um requisito básico para a formação da placa (ROGERS, 1979). Existem vários mecanismos específicos e não específicos pelos quais as bactérias podem se aderir ao dente, ou mais propriamente à camada orgânica que recobre os dentes. Entretanto,

um microrganismo na cavidade oral precisa primeiro ficar próximo o suficiente do substrato para estes mecanismos começarem a operar (FITZGERALD, 1985).

Microrganismos presentes em grande número na saliva apresentam uma vantagem estatística em fazer o contato inicial. Uma vez que este contato inicial é feito, o organismo com mecanismos mais eficientes vão apresentar novamente vantagens, e aqueles que elaborarem adesivos extracelulares terão sua adesão aumentada (ROGERS, 1979).

Como resultado da multiplicação e desprendimento de microrganismos dentro da cavidade oral e o ingresso de outros organismos de fontes externas, existe um inacabável suprimento de colonizadores em potencial, que irão participar da formação da placa de vários modos, incluindo: adesão de novos organismos à sítios ainda não ocupados, ou à sítios não mascarados pelas interações dos colonizadores primários com o substrato, adesão à receptores em microrganismos já aderidos ou à materiais extracelulares produzidos pelos colonizadores pioneiros ou via lectinas de fontes exógenas ligadas nestes, assim como pela multiplicação das colônias primárias ou secundárias (MORHART et al, 1980).

A composição da comunidade clímax depende da multiplicidade dos meio ambientes disponíveis e interações intermicrobianas dos primeiros colonizadores, esta composição microbiana pode ainda variar quantitativamente e qualitativamente num mesmo sítio. Um fato interessante na formação da placa é a velocidade do processo, com poucos minutos um dente recém irrompido ou profissionalmente

limpo, adquire uma película orgânica em que as bactérias prontamente se aderem. Em poucas horas outros organismos se aderem e os colonizadores primários se multiplicam, no final do dia a superfície dental esta cheia de bactérias e em poucos dias a placa madura se estabelece (FITZGERALD, 1985).

A aderência bacteriana envolve mecanismos físico-químicos específicos e é influenciada não apenas pela interação entre as estruturas da superfície das bactérias e as superfícies colonizáveis, mas também pela atividade da saliva como líquido em suspensão.

As superfícies dos dentes e das bactérias possuem cargas elétricas negativas portanto elas se repelem, mas forças eletrodinâmicas ou de van der Waal exercem atração com maior intensidade que as forças eletroestáticas repulsivas. As forças atrativas e repulsivas irão fornecer uma separação da bactéria a distâncias específicas da superfície dentária, e agora podem ser estabelecida outras forças atrativas, tais como as pontes de hidrogênio, formação de pares iônicos e mecanismos altamente específicos como interação entre adesinas e glicoproteínas da película (MERGENHAGEM et al, 1987). No caso dos *Streptococcus mutans* ocorre a liberação da enzima Glicosiltransferase com produção de α 1,3-glucan. Este polissacarídeo extracelular produzido por algumas bactérias quando da metabolização de sacarose irá facilitar a adesão destas bactérias na superfície dental.

A importância fundamental da fase inicial do processo de adesão na formação da placa, faz com que se pense em controlar as

doenças mediadas pelas placas por bloqueios seletivos desse processo, deste modo agentes ou procedimento que bloqueiam ou destruam múltiplos sítios recptores na superfície da película orgânica do dente, ou que previna a deposição microbiana pode ter grande utilidade clínica (FITZGERALD, 1985).

2.5 - OVOMUCÓIDE

Ovomucóide é uma proteína presente na clara de ovo, que apresenta a propriedade de inibir a atividade enzimática de tripsina e quimotripsina (STEVENS & FEENEY, 1963; FEENEY et al, 1966). Esta glicoproteína é estável ao calor e não é precipitada pelo ácido tricloroacético perto do seu ponto isoeletrico, sendo esta propriedade utilizada para sua purificação (LINEWEAVER & MURRAY, 1947). Seus componentes apresentam uma variação no ponto isoeletrico de um pH de menos que 3,8 a um pH de 4,4 (BEELEY & JEVONS, 1965).

Ovomucóide é uma glicoproteína neutra, que na proporção relativa entre as frações glicídica e proteica apresenta poucos grupos glicídios por moléculas e uma cadeia peptídica simples com baixo teor de α -helix (WHITAKER, 1963). Apresenta peso molecular de aproximadamente 28.000 D (WHITAKER, 1963) e composição eletroforética heterogênea (BEELEY & JEVONS, 1965; FEENEY et al, 1967).

A composição de carboidratos do ovomucóide da clara de ovo de galinha pode ser dada apenas como uma media (MONTREUIL et al, 1965): D-galactose, 1 a 1,5% ; D-manose, 4,3 a 4,7% ;

N-acetil-hexosaminas (galactosaminas e glicosaminas), 12,5 a 15,4% e ácido siálico (N-acetilneuramínico), 0,4 a 4% com um total de hexoses de 6 a 9%. Segundo Villela et al (1976) o teor de N-acetilglicosamina pode chegar a 17,5% e a soma dos constituintes glicídicos a 25,2%.

Estas unidades glicídicas formam um ou mais oligossacarídios ligados covalentemente, à cadeia proteica (VILLELA et al, 1976). A composição do ovomucóide de outras aves apresentam uma composição um pouco diferente (STEVENS & FEENEY, 1963). É possível que variações biológicas devido a individualidades, idade da ave e o processo de envelhecimento que ocorre depois da sua formação, alterem a constituição do ovomucóide (VILLELA et al, 1976).

3.1 - MATERIAIS

Sementes de *Phaseolus vulgaris* L, variedade Goiano precoce, foram cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas. Germe de trigo crú (Macroforma) foi comprado no comércio local, assim como os ovos que utilizamos na purificação do ovomucóide. Os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 - PURIFICAÇÃO DO OVOMUCÓIDE

Ovomucóide foi purificado basicamente segundo uma metodologia proposta por Lineweaver & Murray em 1947, onde na clara de ovo foi adicionado lentamente um volume de solução ácido tricloroacético-acetona, na proporção de um volume de solução aquosa de ácido tricloroacético 0,5M para dois volumes da acetona. Este procedimento foi feito sob agitação constante, durante 20 minutos, e esta a mistura filtrada em filtro Melita, por 18 horas a 4°C.

O inibidor foi precipitado pela adição de dois volumes de acetona ao filtrado, este precipitado foi recolhido por filtração em filtro Melita e dissolvido em água num volume equivalente a 0,1 do volume do filtrado, o pH foi ajustado em 4,5 e visando a remoção do ácido tricloroacético o material dializado, em sacos de diálise (Sigma 2,50-7U), contra 10 volumes de água, por 24 horas a 4°C. Após a diálise o ovomucóide foi novamente precipitado, do dializado, com acetona e seco a temperatura ambiente.

3.3 - PREPARAÇÃO DA COLUNA

Este inibidor foi submetido a uma série de procedimentos com o objetivo de transforma-lo num gel insolúvel e estável, onde sua fração glicídica esteja exposta, permitindo seu reconhecimento por lectinas com afinidade por oligossacarídeos principalmente *N*-acetil glicosamina.

a) *insolubilização* - a glicoproteína foi insolubilizada numa solução a 20% em Tris-HCl 0,1M; pH 8,9 em banho de água fervente por 20 minutos, o gel resultante foi lavado 3 vezes com água destilada por centrifugação a 2.000 g, por 5 minutos. O material foi desidratado com acetona, triturado e peneirado e foram utilizadas apenas partículas entre 50 e 100 micrômetros.

b) *desialização* - a remoção do ácido siálico (derivados do ácido neuramínico) foi feita por tratamento do gel com ácido sulfúrico 0,05N por 1 hora a 90°C.

c) *fixação* - o material foi fixado numa solução de glutaraldeído a 1% por 10 minutos, lavado 3 vezes por centrifugação com água e fez-se uma inativação dos radicais aldeídos com uma solução de Glicina-HCl 0,02M (pH 2,8) a 4°C por 12 horas, a seguir, foi novamente lavado 3 vezes com água.

d) *desialização* - o mesmo procedimento foi realizado ou seja tratamento com ácido sulfúrico 0,05N por 1 hora a 90°C. Este ovomucóide foi lavado com água e equilibrado com uma solução salina de NaCl 0,15M, em tampão fosfato 0,01M, pH 7,2; contendo 0,01% de azida sódica (solução de PBS, que também foi utilizada

para os outros experimentos).

e) *montagem da coluna* - este material foi depositado em uma seringa de vidro de 3ml e aclopada a uma bomba de fluxo contínuo com o fluxo ajustado para 0,2 ml por minuto. Para determinação da capacidade da coluna foram utilizados 250 mg de ovomucóide insolubilizado que ocupavam 1 ml em uma seringa de vidro de 3 ml, que foi saturada com o extrato (*Phaseolus*), até o eluato apresentar a mesma concentração proteica da solução aplicada.

3.4 - PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS (EBs)

Os tegumentos e os eixos embrionários da semente de feijão foram removidas manualmente e os cotilédones triturados em liquidificador por 2 minutos em potência máxima, com uma solução de PBS, na proporção de 1 grama de semente (peso úmido) para 10 ml do tampão. Este material foi centrifugado a 15.000 g, por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante (designado EBF) foi submetido a dosagem proteica pelo método de Lowry et al, (1951) e conservado a -4°C até seu uso.

Na preparação do extrato bruto de germe de trigo (EBGt) utilizamos a proporção de 1 grama da farinha para 3 ml do tampão (PBS). Este material foi homogeneizado em liquidificador por 2 minutos, sendo a seguir centrifugado a 15.000 g, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aquecido por 15 minutos a 56°C, resfriado a 4°C e centrifugado como acima descrito. Este sobrenadante foi filtrado através de um tecido de linho para remoção da camada de gordura. Os outros procedimentos foram semelhantes ao utilizado

para o EB de feijão.

3.5 - FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

3.5.1 - APLICAÇÃO DO EXTRATO

Os EBs de feijão e germe de trigo foram fracionados em 1 ml da coluna descrita em 3.3., que continha 250 mg de ovomucóide insolubilizado. Os eluatos da aplicação que não ficaram aderidos e ainda não apresentavam hemaglutinação quando testados com uma solução de hemácias a 5%, foram designados Eluatos da aplicação feijão e germe de trigo.

Após a saturação da coluna as proteínas que não reconheceram e não se ligaram aos resíduos de oligossacarídeos presentes na coluna foram eluídas da coluna com solução de PBS, esta lavagem foi realizada até, o eluato submetido a leitura a 280 nm, não mais apresentar proteína ou atividade hemaglutinante quando submetido a testes de hemaglutinação.

3.5.2 - ELUIÇÃO DAS PROTEÍNAS ADERIDAS À COLUNA

Para a eluição das lectinas de germe de trigo (*Triticum vulgare*) utilizamos tampão formato 0,05M; pH 3,0. Foram coletadas aliquotas de 2 ml que foram submetidas a leitura a 280 nm em espectrofotômetro (Beckman DV 65). As aliquotas mais significativas, com densidade optica superior .2, foram reunidas

em sacos de diálise e dializadas contra solução salina 0,15M, contendo 0,01% de azida sódica, na proporção de 1 ml da solução para 10 ml de salina, por 24 horas, sob agitação constante a 4°C, com 3 trocas de salina. Esta fração denominada lectina de germe de trigo foi conservada a -4°C até seu uso.

Na eluição da lectina de feijão utilizamos três sistemas de eluições distintos. Uma eluição foi realizada com tampão formato 0,05M; pH 3,0, com as aliquotas de 1ml submetidas a dosagem proteica pelo método de Lowry, em algumas destas eluições foram coletadas aliquotas de 2ml e realizada a sua leitura a 280 nm. A lectina obtida foi denominada lectina de feijão eluição formato. e foi mantida congelada até sua utilização.

Em outra técnica para eluição total da lectina de feijão utilizamos o tampão tetraborato de sódio 250mM; pH 8,0. Esta fração lectina de feijão eluição tetraborato recebeu o mesmo tratamento das outras frações.

Visando a separação da isolectina L4, que é mitogênica para linfócitos, utilizamos uma eluição com tampão tetraborato 15mM; pH 8,0. Fração esta denominada isolectina L4.

Uma parte destas lectinas eluídas, lectina de feijão e lectina de germe de trigo, foram fervidas em banho de água fervente por 30 minutos, sendo estas frações denominadas lectina de feijão fervida e lectina de germe de trigo fervida.

3.6 - DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada a 280 nm, com as

lectinas isoladas apresentando uma leitura de 10 para uma solução a 1% (RÄSÄNEN, 1973). Também foi feita a dosagem pelo método de Lowry et al (1951).

3.7 - SALIVA

A de saliva de cinco indivíduos foi coletada sem estímulo, em banho de gelo. A seguir centrifugada a 10.000 g, durante 15 minutos, a 4°C. Esta saliva foi concentrada por liofilização e o teor de proteínas foi dosado pelo método de Lowry, uma parte desta saliva foi fervida por 30 minutos e denominada saliva fervida.

3.8 - SORO E SANGUE HUMANO

Foram utilizados um pool de soro e sangue (A, B e O) de 10 doadores do Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de Piracicaba. Foi dosado o teor proteico do soro e mantido a 10°C até seu uso. As hemácias foram lavadas com PBS 3 vezes, por centrifugação e ressuspensas na concentração de 2% em PBS.

3.9 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As frações proteicas dos extratos de feijão e germe de trigo (EBf e EBGt) e as respectivas lectinas que foram purificadas (lectina total de feijão eluição formato e tetraborato, isolectina L4 e lectina de germe de trigo), foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições ácidas, não desnaturante

(REISFELD et al, 1962), sendo o gel separador a 7,5% e usando Beta-alanina-ácido acético 0,35M; pH 4,5; como tampão de migração. A corrente aplicada foi de 20 mA por uma hora e 50 mA por cinco horas, o corante usado foi Comassie Blue a 0,05% e descorante ácido acético 7%.

3.10 - ELETROFORESE EM AGAROSE

As eletroforeses foram realizada em placas de eletroforese em agarose (CELM) onde foram aplicadas 1 μ l das amostras. A corrida foi feita à temperatura ambiente, durante uma hora em cuba eletroforética CORNING, usando 24 mA por placa e tampão barbital 0,05M pH 8,6. Após a corrida, as placas foram coradas em Comassie Blue 0,05% em metanol (7), ácido acético (25) e água (68), por duas horas. O excesso de corante foi retirado com a mesma solução sem o Comassie Blue. Todos os procedimentos de coloração foram realizados desta forma .

3.11 - DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

Em lâminas de microscopia, foram colocados 3,5 ml de agarose a 1% preparada em PBS, nos orifícios foram aplicados 20 μ l dos reagentes. A difusão ocorreu em câmara úmida por 24 horas, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em solução salina isotônica, NaCl a 0,15M, contendo 0,01% de azida sódica, por 24 horas, com agitação constante. Em seguida colocadas na estufa a 37. C, depois de secas foram coradas com Comassie Blue a 0,05% e descoradas.

4 - RESULTADOS

4.1 - FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.

4.1.1 - Fracionamento do extrato de feijão.

O padrão de eluição das proteínas do EB de feijão, aderidas a coluna e que foram eluídas com tampão formato 0,05M; pH 3,0 é mostrada na figura 1, onde se tem a dosagem proteica pelo método de Lowry das amostras de 1 ml eluídas. As aliquotas do 2.º ao 12.º ml foram as que apresentaram maior teor de proteínas e hemaglutinação positiva quando testada com um pool de hemácias a 2%, o pico da eluição foi no 5.º ml.

A eluição das proteínas aderidas com tampão tetraborato de sódio 250 mM; pH 8 está expressa na figura 2 com as frações eluídas de 2ml submetidas a leitura em 280 nm. Os eluatos que apresentaram maior leitura e hemaglutinação positiva foram do 4.º ao 14.º, com o pico de eluição no 9.º eluato. Para eluição da isolectina L4 foi utilizado tampão tetraborato de sódio 15 mM; pH 8, um perfil desta eluição é mostrado na figura 3, onde se pode observar que a maior concentração está entre o 5.º e 18.º eluatos e a 8.º aliquota apresenta a maior leitura.

DOSAGEM DE PROTEÍNAS método de Lowry

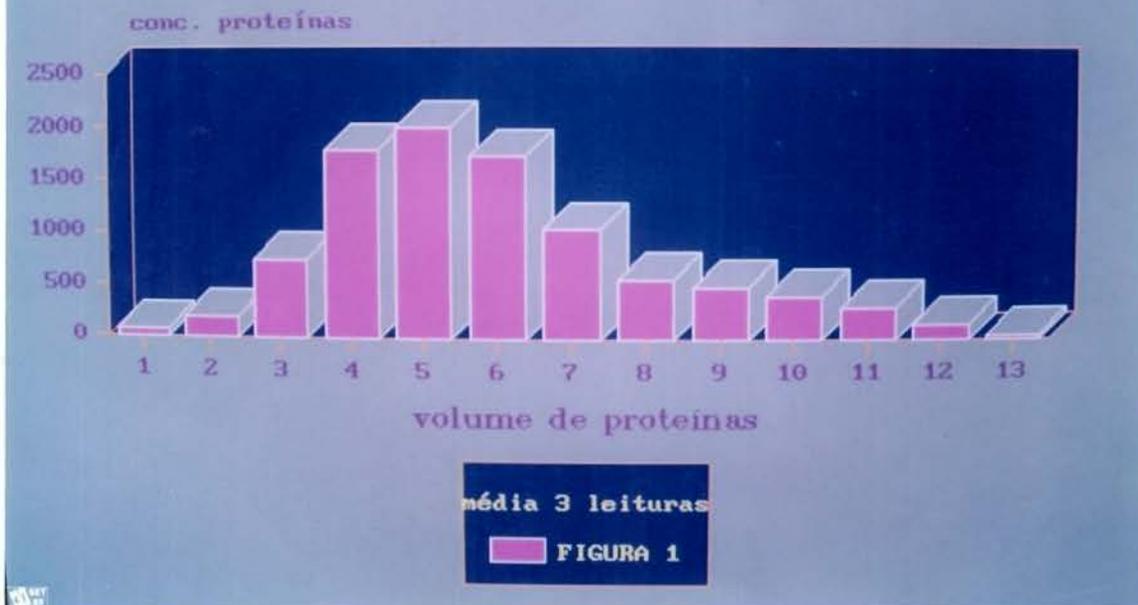


FIGURA 1 - Perfil de eluição de lectina de feijão (1 ml de coluna com 250 mg de ovomucóide), dosagem de proteínas pelo Lowry, aliquotas de 1 ml, eluição tampão formato 0,05M pH 3,0.

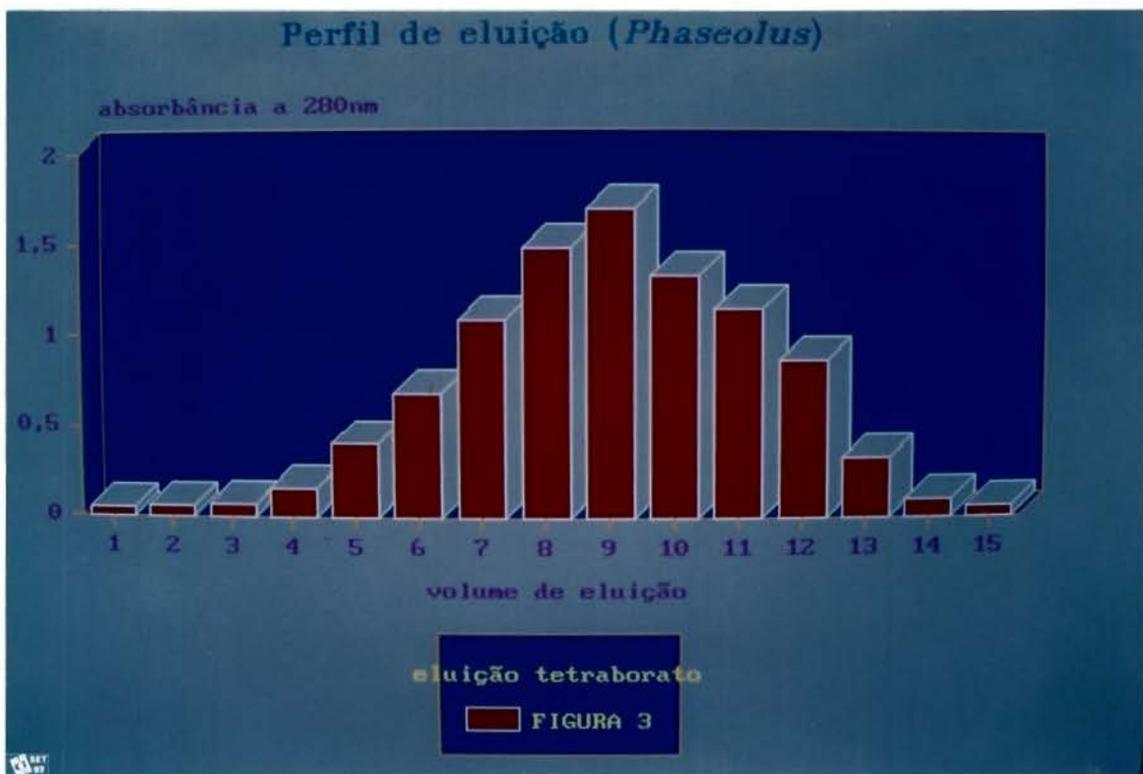


FIGURA 2 - Perfil de eluição de lectina de feijão (1ml de coluna com 250 mg de ovomucóide), aliquotas de 2 ml eluídas com tampão Tetraborato de sódio 250 mM pH 8,0; leitura a 280 nm.

4.1.2 - FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE GERME DE TRIGO.

A figura 4 representa o perfil de eluição das proteínas do extrato bruto de germe de trigo que se aderiram a coluna. Nela observamos que as aliquotas de 2 ml eluídas com tampão formato 0,05M; pH 3,0 que apresentaram uma maior concentração de proteínas estão entre o 2. e 11. eluato, o pico da eluição ocorreu no 4. eluato. Com relação a hemaglutinação estas aliquotas apresentaram hemaglutinação positiva.

4.2 - DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DA COLUNA

A capacidade da coluna para isolar lectina de *Phaseolus vulgaris* quando a dosagem de proteínas foi feita pelo método de Lowry a capacidade de purificação da coluna foi de 9,585 mg de lectina por ml de gel da coluna utilizado e quando a dosagem proteica foi determinada pela absorbância a 280 nm foi de 8,25 mg de lectina por ml de coluna.

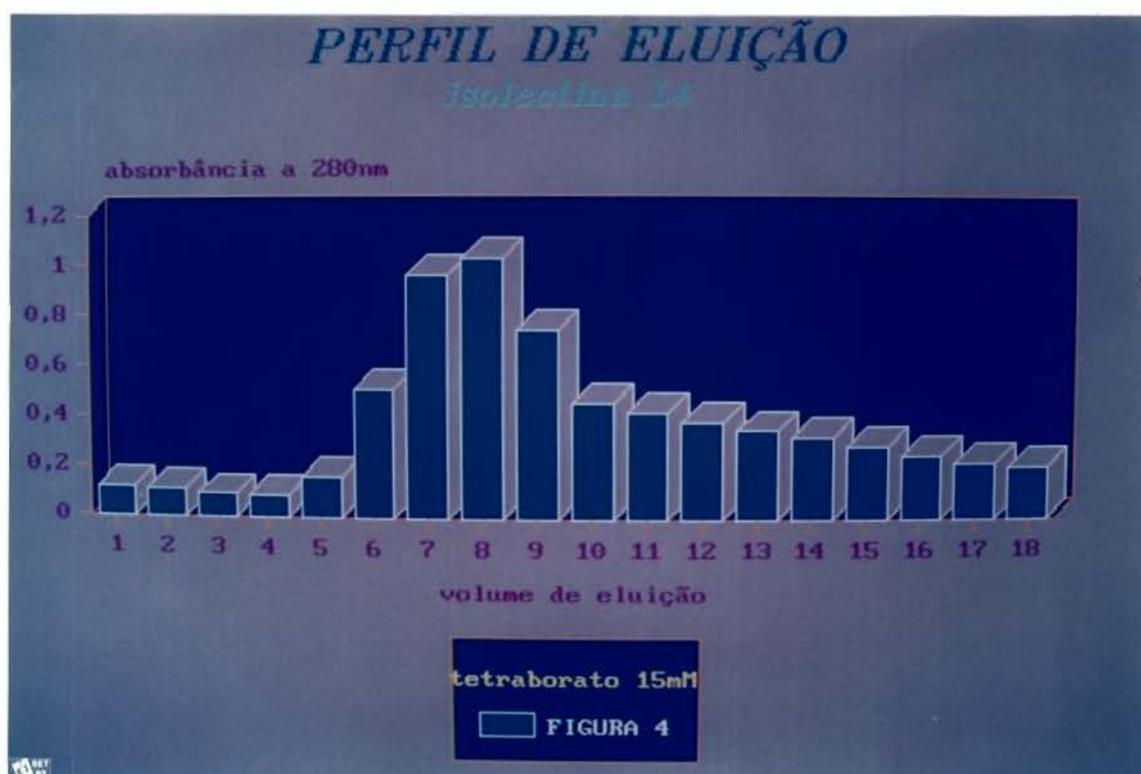


FIGURA 3 - Perfil de eluição da Isolectina L4 (1 ml de coluna com 250 mg de ovomucóide), alíquotas de 2ml eluídas com tampão tetraborato 15 mM pH 8,0; leitura a 280 nm.

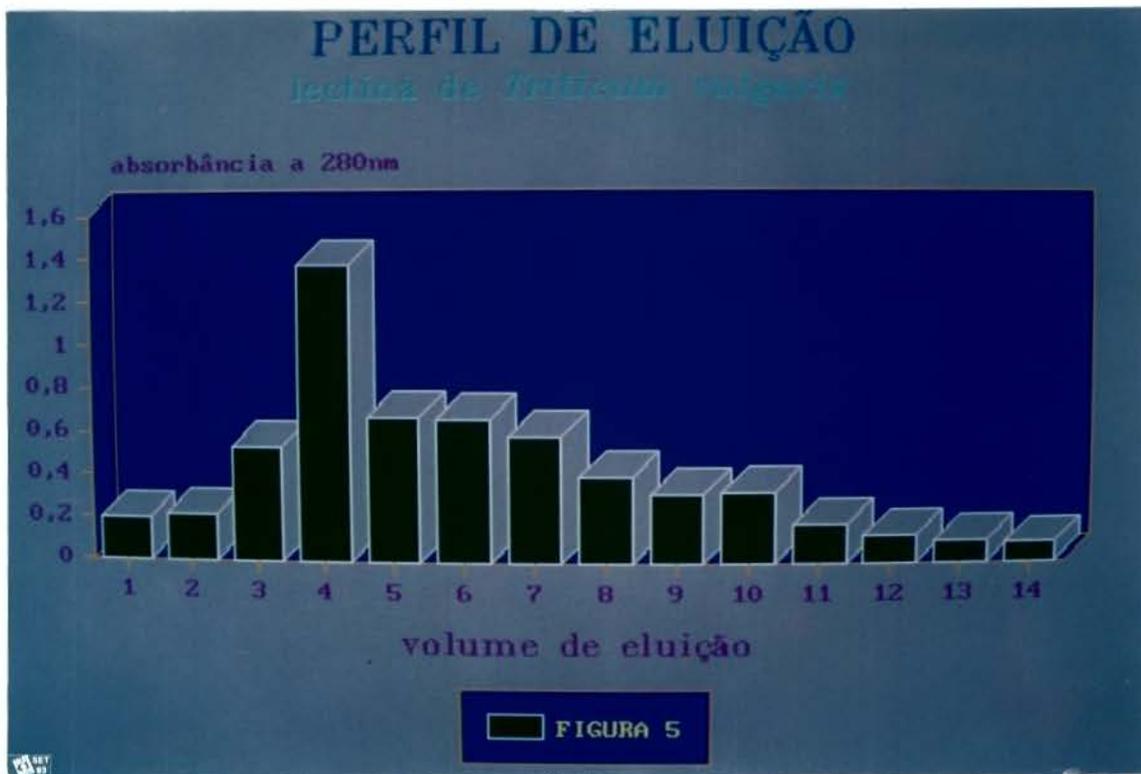


FIGURA 4 - Perfil de eluição da lectina de germe de trigo (1ml de coluna com 250 mg de ovomucóide), alíquotas de 2 ml eluídas com tampão formato, leitura a 280 nm.

4.3 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A análise da eletroforese em gel de agarose do ovomucóide preparado segundo Lineweaver (figura 5) revela a presença de duas bandas de proteínas com migração anódica comparativamente a clara de ovo que é constituída por seis bandas de proteínas, uma de migração catódica e cinco de migração anódica.

A figura 6 mostra uma eletroforese corrida em agarose, o extrato bruto de feijão apresenta como pelo menos duas faixas de proteínas com migração anódica, a fração eluato formato (lectina de feijão) é composta de apenas uma banda proteica de migração anódica e comparativamente a fração eluato PBS contem uma banda anódica distinta da apresentada pela lectina de feijão.

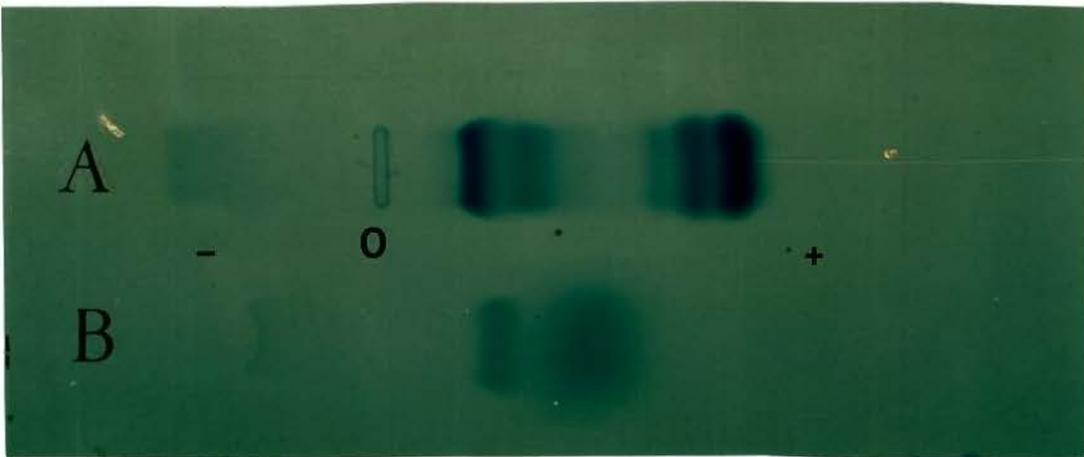


FIGURA 5 - Eletroforese em placa de Agarose.

A - clara de ovo

B - ovomucóide

O - Ponto de aplicação/ +. Anodo/ -.Catodo

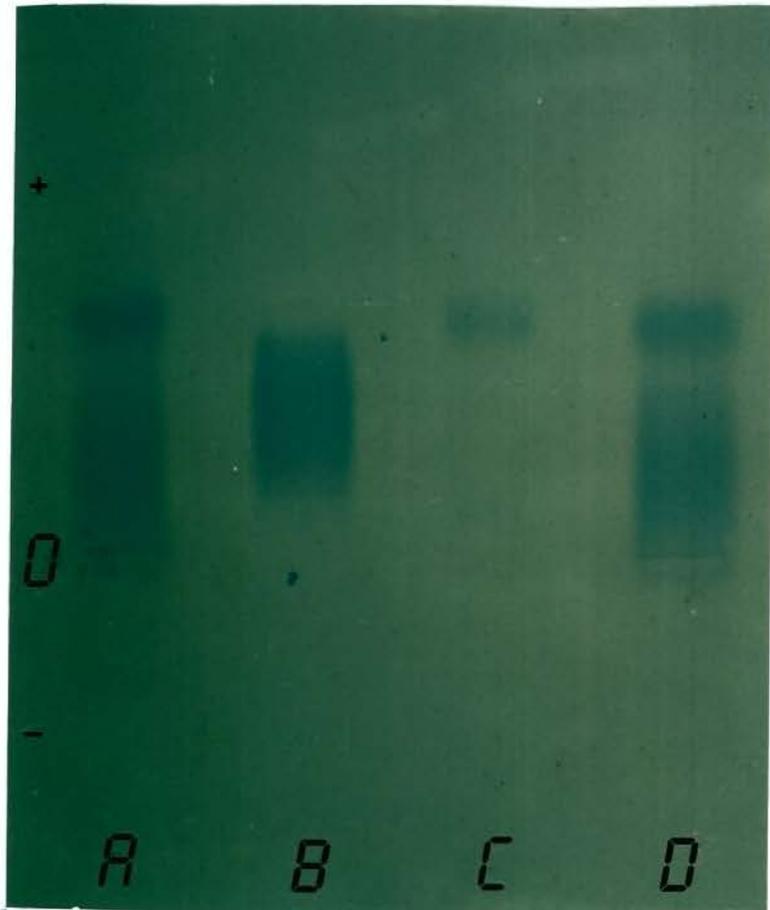


FIGURA 6 - Eletroforese em placa de Agarose.

A - Extrato Bruto de feijão

B - Lect. de feijão (eluato formato)

C - Eluato da aplicação

D - EB de feijão

0 - Ponto de aplicação/ +.Anodo/ -.Catodo

Na figura 7 observamos o comportamento do EB de feijão e das proteínas eluídas com tampão tetraborato de sódio 15mM; pH 8,0 (isolectina L4), notamos apenas uma banda proteica que é distinta da apresentada pela eluição com formato. Os padrões apresentados na figura 8 mostram bandas proteicas de migração anódica distintas entre si e para os eluatos PBS e tetraborato 250 mM e 15 mM.

4.4 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

O perfil eletroforético do EB de feijão, eluato formato (lectina de feijão) e eluato tetraborato 15mM (isolectina L4) é mostrado na figura 9, nela observamos que a fração proteica do extrato bruto é heterogênea e constituída de pelo menos 11 bandas proteicas, neste gel houve a presença de uma banda muito intensa com R_m 0,02 e um outro grupo de cinco bandas com R_{ms} entre 0,21 e 0,27 foram também proeminentes na fração correspondente ao EB. Das cinco bandas observadas na fração proteica lectina de feijão, as duas menos móveis (R_{ms} 0,21 e 0,22) foram mais intensas que as outras (R_{ms} 0,23, 0,25 e 0,27). Apenas uma banda com R_m 0,21 foi encontrada na fração isolectina L4.

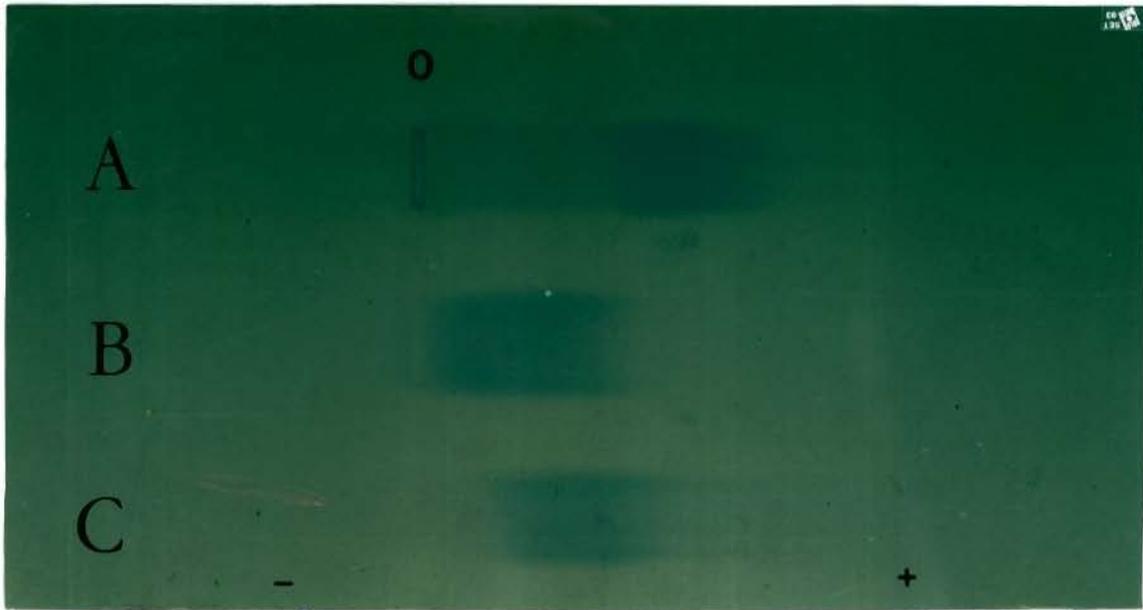


FIGURA 7 - Eletroforese em placa de Agarose.

A - Extrato Bruto de feijão

B - Lect. de feijão (eluato formato)

C - Isolectina L4 (tetraborato 15 mM)

0 - Pto de aplicação / +. Anodo/ -. Catodo

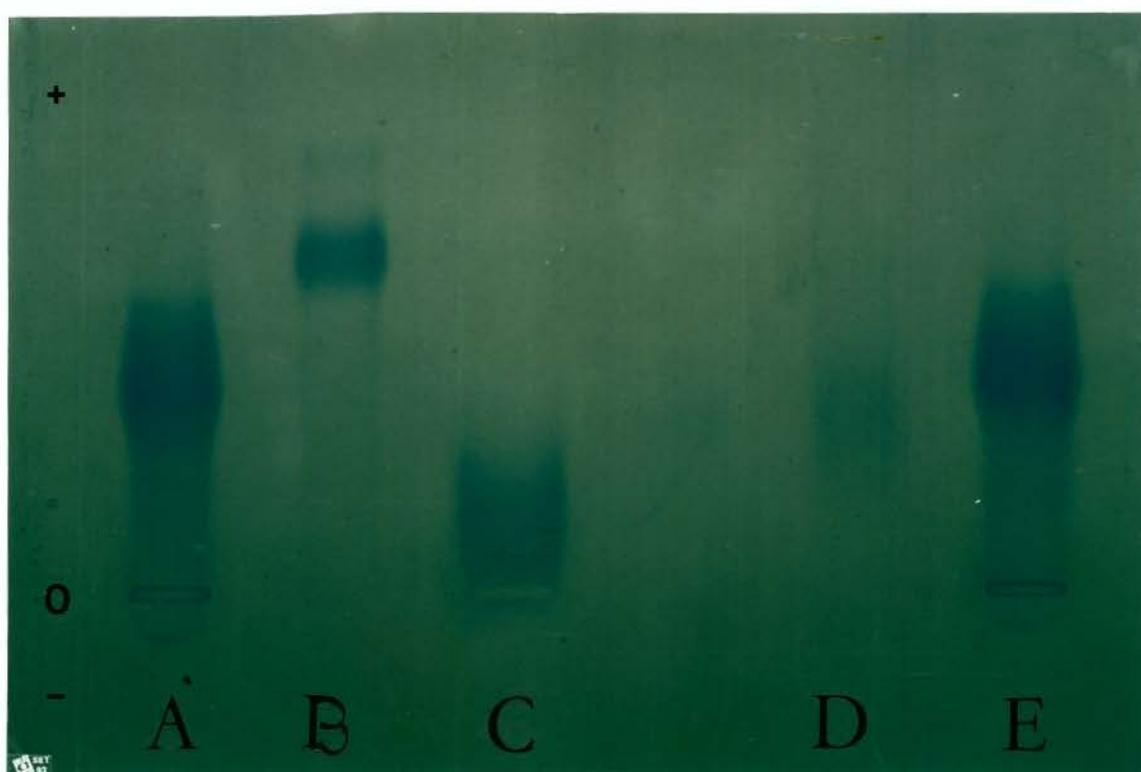


FIGURA 8 - Eletroforese em placa de Agarose.

A/E - Extrato de feijão

B - Eluato da aplicação

C - Lectina de feijão

D - Isolectina L4

0 - Pto de aplicação/ +. Anodo/ -. Catodo

Na figura 10 temos uma eletroforese em condições ácidas do extrato de feijão e dos eluatos tetraborato 250mM (lectina de feijão), tetraborato 15mM (isolectina L4) e eluato formato. Esta figura inclui uma fotografia do gel na qual podem ser vistas 10 bandas, sendo uma banda mais intensa com R_m 0.3, cinco bandas com R_m s entre 0.28 e 0.41 e ainda mais quatro bandas (R_m s 0.57, 0.61, 0.77 e 0.8). As frações correspondentes as lectina de feijão eluições formato e tetraborato apresentam uma faixa proteica composta de cinco componentes proteicos (R_m s entre 0.28 e 0.41). A isolectina L4 aparece como uma banda proteica muito intensa com R_m 0.28.

Neste gel ácido, fizemos também a corrida do extrato bruto de germe de trigo e da respectiva lectina purificada. O padrão do EB é formado por diferentes bandas proteicas com maior ou menor mobilidade eletroforética, na fotografia estas bandas não aparecem perfeitamente separadas umas das outras. A lectina purificada se apresenta uma faixa proteica difusa com R_m s entre 0.19 e 0.42.

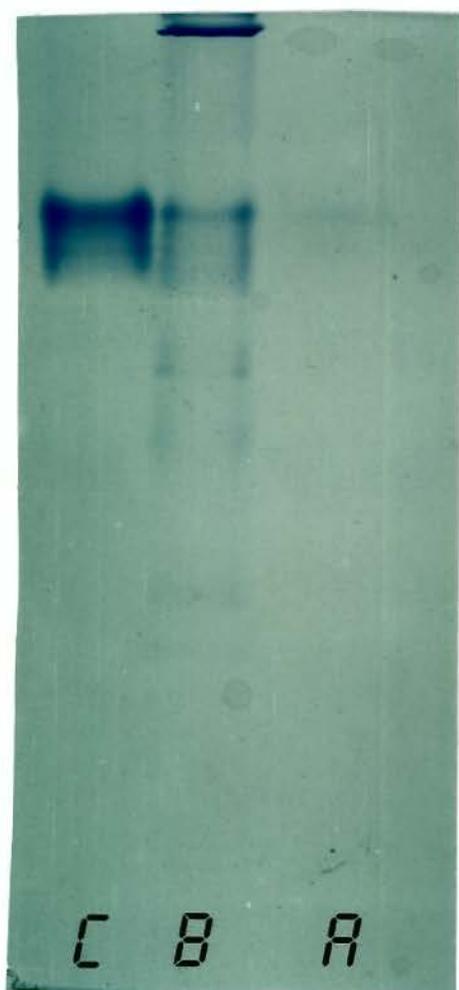


FIGURA 9 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida em condições ácidas. * Diagrama do gel mostrando as mobilidades relativas (R_m) das bandas proteicas.

A - Isolectina L4 (eluato tetraborato)

B - Extrato de feijão

C - Lectina de Feijão (eluato formato)

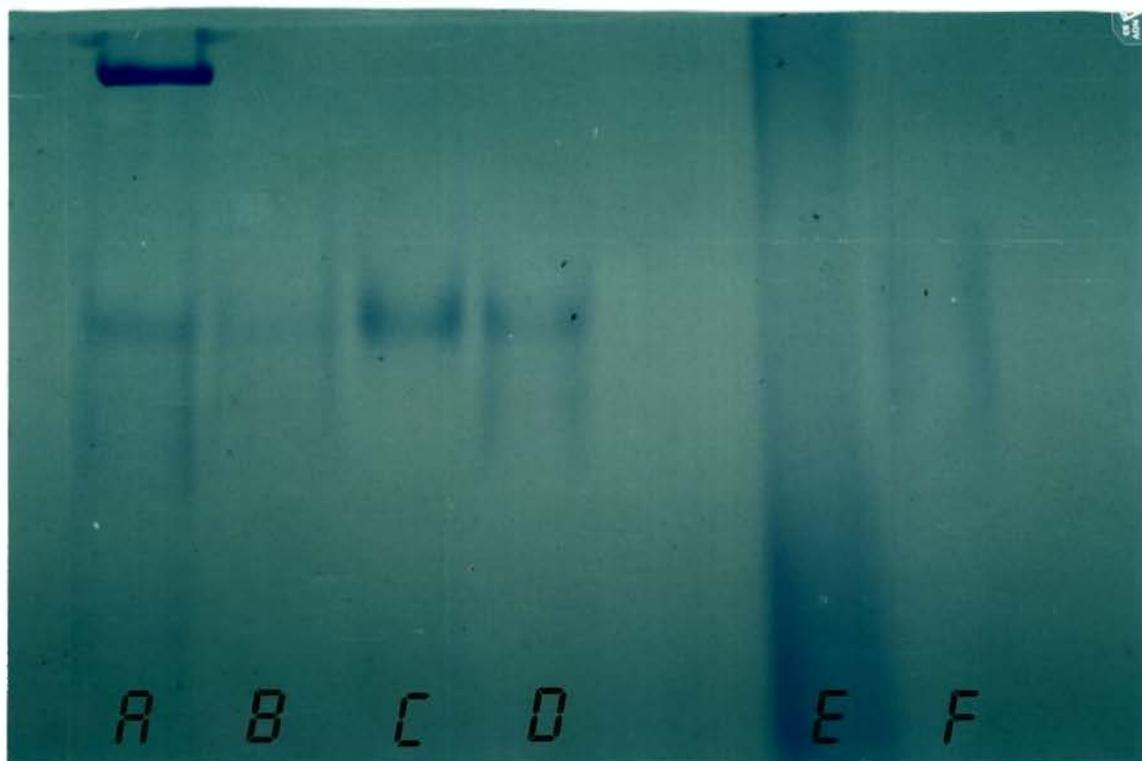


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida em condições ácidas. * Diagrama do gel mostrando as mobilidades relativas (R_m) das bandas proteicas.

- A - Extrato de feijão
- B - Lect. de feijão (tetraborato)
- C - Isolectina L4
- D - Lectina de feijão (formato)
- E - Extrato bruto de germe de trigo
- F - Lectina de germe de trigo

4.5 - REAÇÃO DE DUPLA DIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE

Uma linha de precipitação foi encontrada ao colocar para reagir saliva, com EB de feijão e com lectina de feijão como mostra a figura 11, onde também se observa linha de precipitação entre EB de feijão e lectina de feijão com soro humano de proteínas.

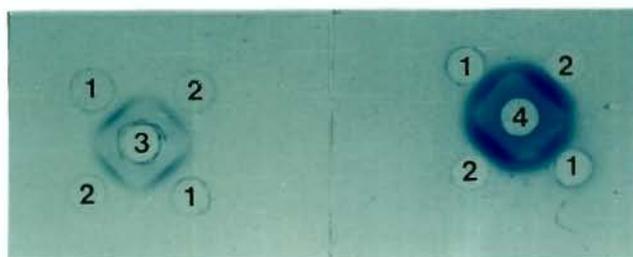


FIGURA 11 - Reação de dupla difusão em gel de Agarose.

- 1 - Extrato bruto de feijão.
- 2 - Lectina de feijão.
- 3 - Saliva.
- 4 - Soro.

Na figura 12 mostramos as linhas de precipitações formadas pelas interações do EB de germe de trigo e lectina de germe de trigo com saliva humana e soro humano.



FIGURA 12 - DUPLA DIFUSÃO EM AGAROSE.

1/3 - Extrato de germe de trigo.

2/4 - Lectina de germe de trigo.

5 - Saliva.

6 - Soro.

Quando foi utilizado as frações lectinas de feijão e germe de trigo fervidas contra saliva e soro continuamos a notar linha de precipitação, como observamos na figura 13. Assim como esta linha de precipitação é formada pela difusão de lectina de feijão e de germe de trigo e isolectina L4 contra saliva fervida (figura 14).

Por dupla difusão encontramos reação de precipitação de proteínas entre isolectina L4 com saliva e com soro (figura 15).



FIGURA 13 - Reação de dupla difusão.

- 1 - Lectina de feijão fervida
- 2 - Lectina de germe de trigo fervida
- 3 - Saliva
- 4 - Soro

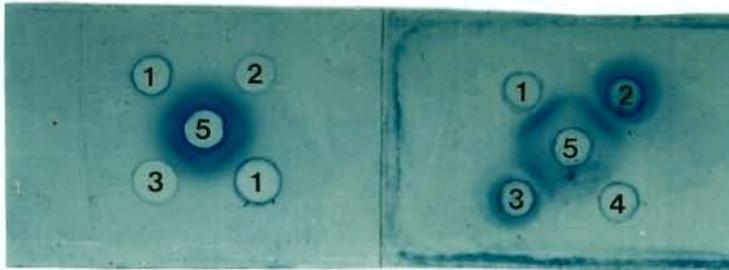


FIGURA 14 - Reação de dupla difusão.

- 1 - Lectina de feijão
- 2 - Lectina de germe de trigo
- 3 - Isolectina L4
- 5 - Saliva fervida

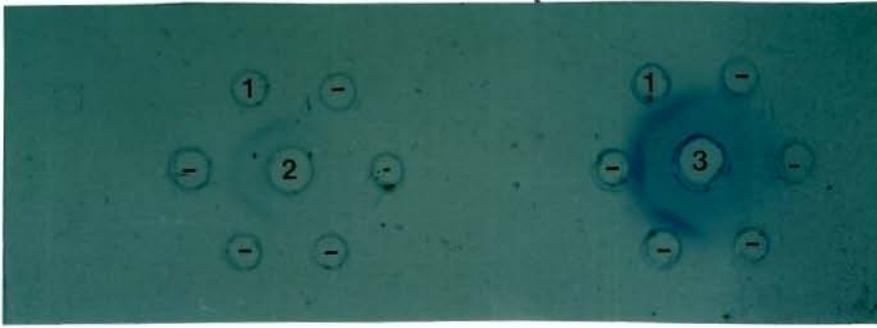


FIGURA 15 - Reação de dupla difusão.

1 - Isolectina L4

2 - Saliva

3 - Soro

5 - DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados sugerem que cromatografia de afinidade tendo ovomucóide como substrato pode ser utilizada para purificação de algumas lectinas que apresentem afinidade por uma estrutura oligossacarídica, o que está de acordo com trabalhos prévios (Lutsik, 1984 e Freier et al, 1985). No presente trabalho descrevemos uma técnica onde transformamos o ovomucóide em um gel insolúvel e estável e o utilizamos para o isolamento de lectinas de *Phaseolus vulgaris* L. e Germe de trigo.

Lutsik purificou lectina de germe de trigo a partir do tratamento da clara de ovo com glutaraldeído a 1%, naquele trabalho ele também sugere ser possível a purificação de outras lectinas, mas não relata a capacidade da coluna.

Freier e colaboradores utilizaram uma coluna com ovomucóide ligado quimicamente com Sepharose 4B, para a purificação de algumas lectinas entre elas a de *Phaseolus vulgaris*, sendo a capacidade desta coluna de 7 mg/ml. Nas condições aqui propostas, quando o teor de proteínas foi determinado pelo método de Lowry a coluna foi capaz de reter 9,5 mg de lectina por ml de gel depositado na coluna e quando a dosagem proteica foi baseada na absorbância a 280 nm foi de 8,2 mg/ml. Estes valores são superiores aos relatados por Freier.

A eluição da lectina de feijão foi possível com a utilização dos dois sistemas propostos, tampão formato 0,05M; pH 3,0 que é um eluente universal devido a alteração no pH levar a separação da

lectina, retida na colunae com tampão tetraborato de sódio 250 mM; pH 8,0 que elui ao interagir com carboidratos e competir com as lectinas pelos oligossacarídeos da coluna. A capacidade da coluna foi semelhante nas duas técnicas de eluições utilizadas, assim como as frações obtidas apresentaram o mesmo perfil eletroforético.

A eluição da isolectina L4 com tampão tetraborato 15mM; pH 8,0 esta de acordo com a realizada por Fleischmann et al (1985). No caso da lectina de germe de trigo a eluição realizada com tampão formato também foi efetiva, para as lectinas que conseguimos isolar, não houve a necessidade da utilização de açúcares específicos para a realização das eluições, o que facilitou este procedimento.

No perfil eletroforético do ovomucóide que foi purificado segundo Lineweaver (1947) notamos a presença de duas bandas de migração anódica, a banda de maior mobilidade eletroforética não apresenta correspondência na eletroforese da clara de ovo podendo assim se tratar de proteína desnaturada ou ainda uma proteína que foi concentrada durante os procedimentos realizados para a purificação do ovomucóide. Isto esta de acordo com Tomimatsu et al (1966) que relata a presença de um outro inibidor enzimático, ovoidinibitor, como impureza no ovomucóide preparado por Lineweaver, sendo que este outro inibidor apresenta uma mobilidade eletroforética maior que a do ovomucóide.

As curvas e as dosagens proteicas das eluições apresentadas quando das cromatografias tanto para a purificação de lectina de feijão com formato ou tetraborato nas concentrações preconizadas

(15 e 250 mM) são compatíveis com o processo uma vez que no começo da eluição obtivemos uma baixa concentração proteica, aparecendo a seguir uma região de pico e ao final os eluatos apresentam níveis mínimos de proteínas. Este fato foi verdadeiro também para a cromatografia do EB de germe de trigo.

Nas eletroforeses em agarose notamos a presença de faixas proteicas distintas entre as frações que não aderiram à coluna (eluato da aplicação) e lectinas eluídas, demonstrando que as proteínas não aderidas à coluna são diferentes daquelas que reconhecem os resíduos oligossacarídicos presentes na coluna. Apenas uma banda proteica aparece na fração correspondente a isolectina L4, apresentando mobilidade eletroforética ligeiramente maior que a da lectina total.

O fato destas lectinas se aderirem à coluna revela a afinidade das lectinas de feijão e germe de trigo pelas frações glicídicas do ovomucóide, isto é coerente com os dados da literatura que dizem ser oligossacarídeos os inibidores específicos das lectinas de feijão (Freier et al, 1985) e germe de trigo, nesta última principalmente *N*-acetil glicosamina (Allen et al, 1973 ; Mirth et al, 1979).

O método proposto para o fracionamento do EB de *Triticum vulgare*, permitiu a obtenção de uma faixa proteica, eluída com tampão formato, quando analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições ácidas. Esta fração submetida a dupla difusão em gel de agarose, formou linha de precipitação, tanto com saliva como também com soro. Isto confirma trabalhos prévios (Gibbons & Dankers, 1981 e Mirth et al, 1979) que relatam a

interação desta lectina com glicoproteínas salivares.

As lectinas de feijão eluídas com tampão formato e tampão tetraborato 250mM se comportaram na eletroforese em gel de poliacrilamida em pH ácido como uma faixa proteica formada por cinco bandas, correspondentes as suas isolectinas. Trabalhos anteriores encontraram este padrão para a lectina de feijão (Felsted et al, 1975 ; Ochoa e Kristiansen, 1978 ; Carvalho, 1981).

Na fração correspondente ao eluato tetraborato 15mM, isolectina L4, aparece apenas uma banda proteica com a menor mobilidade eletroforética comparativamente às isolectinas presentes na fração lectina total, Leavitt et al em 1977, também encontraram este perfil eletroforético para esta isolectina.

A interação de lectinas de origem vegetal e glicoproteínas salivares e séricas tem sido demonstrada por vários autores (Paulino da Costa, 1989 ; Moral, 1993 ; Mirth et al, 1979 ; Gibbons & Dankers, 1981).

No caso da lectina de *Phaseolus vulgaris*, Glad e Borrebaeck em 1984, pesquisando estas interações encontraram afinidades com várias glicoproteínas séricas, entre elas IgA. A isolectina L4 também apresentou linha de precipitação com a IgA sérica naquele experimento.

Nas condições do experimento realizado, encontramos uma linha de precipitação entre as lectinas eluídas com os tampões formato e tetraborato 15 e 250 mM e saliva assim como com soro humano. Esta interação também foi positiva quando foi utilizado saliva fervida, demonstrando que ela não ocorre pela presença de anticorpos

anti-lectinas na saliva.

Por dupla difusão demonstramos a ocorrência de linha de precipitação de saliva e soro com as lectinas de feijão e germe de trigo, mesmo quando estas últimas passaram por um processo de fervura, o que concorda com trabalhos prévios, onde se demonstrou que estas lectinas são altamente estáveis, sendo a lectina de germe de trigo resistente ao processo de autoclavagem (Nachbar & Oppenheim, 1980) e a digestão por enzimas digestivas (Brady et al, 1978). Dados semelhantes foram encontrados com lectina de *Phaseolus vulgaris* (Pusztai & Grant, 1980).

6 - RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de ligação reversível a carboidratos e compostos contendo açúcares e de aglutinar células ou glicoconjugados sem induzir mudanças químicas nos mesmos. Estão presentes em plantas, bactérias, fungos, vírus, algumas células de mamíferos e outras fontes naturais. São úteis em estudos de superfície celular, imunohistoquímica de condições normais e patológicas e estão envolvidas no mecanismo de adesão bacteriana.

Uma propriedade importante nas lectinas de *Phaseolus vulgaris* é a estimulação da proliferação de linfócitos e esta propriedade prevalece na isolectina rica em subunidade L (L4). A lectina de germe de trigo aglutina preferencialmente células tumorais, reage e neutraliza aglutininas não imunes presentes na saliva e aglutinam *S. mutans*.

Neste trabalho desenvolvemos uma técnica de cromatografia de afinidade, para o isolamento de lectinas que apresentem especificidade por uma estrutura oligossacarídica. Para isto transformamos uma proteína rica em oligossacárideos, o ovomucóide, em um gel insolúvel e estável e o depositamos numa coluna.

Com esta técnica foi possível o isolamento purificação das lectina de germe de trigo, lectina de *Phaseolus* e sua isolectina L4. Após eluídas da coluna estas proteínas foram submetidas a eletroforeses em gel de poliacrilamida e em agarose, que demonstraram sua pureza.

Com finalidade de estudar as possíveis interações entre estas lectinas purificadas e glicoproteínas salivares, realizamos dupla difusão em gel de agarose, onde encontramos precipitações proteicas entre as lectinas testadas e as glicoproteínas salivares e séricas.

7 - SUMMARY

Isolation of lectin of beans and wheat germ and theirs precipitations with salivary and serum glycoproteins.

Lectins are proteins or glycoproteins capable of reversible linking to carbohydrate and sugars compounds, and of celular or glycoconjugated agglutination without inducing chemistry changes. They are present in plants, bacteria, fungus, virus, some mammalian cells and others nature sources. They are useful on the study of celular surface, imunohistochemistry of normal and pathologycal condition, studies of stimulation of lymphocyte proliferation and are involved in bacteria adherence.

One important property of *Phaseolus vulgaris* lectins is lymphocyte proliferation and this property dominate in the isolectin rich in L subunit (L4). Lectin of wheat germ causes tumor cell agglutination, react and neutralize agglutinins of non imune origin that are present in saliva and promote *S. mutans* agglutination.

In this work a technique of affinity chromatography, for the isolation of lectins with oligosaccharide specificity was developed. A protein rich in oligosaccharide, the ovomucoid, was transformed in a insoluble and stable gel that was deposited in a column.

With this technique lectin isolation of wheat germ and *Phaseolus vulgaris* and L4 isolectin was possible. After eluted from the ovomucoid column, these proteins were submitted to

polyacrylamide gel, and agarose electrophoresis, and demonstrated being pure.

To study the possible interaction of these lectins with salivary and serum glycoproteins, we used double diffusion on agarose gel, and we found precipitations.

8 - CONCLUSÃO

A análise dos resultados deste trabalho permitiu serem formuladas as seguintes conclusões:

1 - A técnica de cromatografia de afinidade proposta foi capaz de isolar lectina de *Phaseolus vulgaris* e a isolectina mitogênica para linfócitos L4 e os dados ainda sugerem ser possível o isolamento de lectina de germe de trigo.

2 - As lectinas de *Phaseolus* e *Triticum*, assim como a isolectina L4 reconhecem glicoproteínas salivares e séricas.

3 - As lectinas de *Phaseolus* e *Triticum* fervidas reagiram com glicoproteínas salivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B. B. L. and GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. *Biochem.J.*, 96:230-50, 1965.
- AGRAWAL, B. B. L. and GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. *Biochem. Biophys. Acta*, 147:226-71, 1967.
- ALLEN, A. K. ; NEUBERG, A. and SHARON, N. The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin. *Biochem.J.*, 131:152-62, 1973.
- AOBA, T. ; MORENO, E. C. and HAY, D. I. Initiation of apatite crystal growth by the amino-terminal segment of human salivary acidic proline-rich proteins. *Calcif. Tiss. Int.*, 36:651-58, 1984.
- APSBURG et al., 1970. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOZ, I. L. Plant Lectins. *Proceed. Conbrap*, 71-96, 1990.90.
- ARONSON, M. ; MEDALIA, O. ; SCHORY, L. ; MIIRELMAN, D. ; SHARON, N. and OFEK, I. Prevention of colonization the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with α -D-mannopyranoside. *Infect. Dis.* 139:329-32, 1979.
- ARMSTRONG, W. G. and HAYWARD, A. F. Acquired organic integuments of human enamel. A comparison of analytical studies with

optical phase contrast and electron microscope examinations.
Caries Res., 2:294-305, 1968.

ASHWELL, G. and MORELL, A. G. The role of surface carbohydrate in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. *Adv.Enzymol.*, 41:99-128, 1974.

AUB, J. C. ; TIESLAU, C. and LANKESTER, A. Reactions of normal and tumoral cell surfaces to enzymes. I. wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 50:613-9, 1963.

AUB, J. C. ; SANFORD, B. H. and COTE, M. N. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 54:396, 1965. Apud NOREIRA, R. A. CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOUZ, I. L. Plant Lectin. *Proceed.Combrap*, 71-96, 1990.

BARONDES, S. H. *Ann.Rev.Biochem.*, 50:207, 1984.

BEACHEY, E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J.Infect.Dis.*, 143:325-45, 1981.81.

BEELEY, J. G. and JEVONS, F. R. *Biochim.Biophys.Acta*, 101:133, 1965. Apud PIGMAN, W. and HORTON, D. *The carbohydrates*. New York, Academic Press, Vol.IIB, cap.43, p.655, 1970.

BERNARDI, G. and KAWASAKI, T. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns. *Biochim.Biophys.Acta*, 160:301-10, 1968.

BIRD, G. W. *Curr.Sci.*, 20:298, 1951. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOUZ, I. L. Plant Lectin. *Proceed.Combrap*, 71-96, 1990.

BOURRILON, R. Interactions des phytohémagglutinines avec les sites

récepteurs glucidiques des membranes de surface des cellules normales et transformées. *Expo. Ann. Biochim. Med.*, 32:59-91, 1973.

BOYD, W. C. *Fundamentals of Immunology*, Interscience, New York, 1947. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOZ, I. L. Plant Lectin. *Proceed. Combrap*, 71-96, 1990.

BOYD, W. C. and REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. *J. Immunol.*, 62:333-9, 1949.

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

BRADY, P. G. ; VANNIER, A. M. and BANWELL, J. G. Identification of the dietary lectins, wheat germ agglutinin, in human intestinal contents. *Gastroenterol.*, 75:236, 1978.

BURGER, M. M. and GOLBERG, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 50:359-66, 1967. Apud ALLEN, A. K. ; NEUBERGER, A. and SHARON, N. The purification, composition and specificity of wheat germ agglutinin. *Biochem. J.*, 131:155-62, 1973.

CARSTAIRS, K. *Lancet* ü, 984, 1961.

CARVALHO, M. T. V. Investigações bioquímicas sobre hemaglutininas e outras proteínas de semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L). *Tese de doutoramento USP*, 1981.

COOK, G. M. W. *J. Cell Sci. Suppl.* 4:45, 1986. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as recognition molecules. *Science*, 246:227-34, 1989.

EDELMAN, G. M. ; CUNNINGHAM, B. A. ; REEKE, G. N. ; BECKER, J. W. ; WAXDAL, M. J. and WANG, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

69:3580-85, 1972.

- EHRlich, P. Experimentelle untersuchungen über immunität I. über ricin. *Deut.med.wochschr.*, 17:976, 1891a. Apud SHARON, N. and LIZ, H. A century of lectin research. *TIBBS*, 12:488-91, 1987.
- EHRlich, P. Experimentelle untersuchungen über immunität II. über ricin. *Deut.med.wochschr.*, 17:1218, 1891b. Apud SHARON, N. and LIZ, H. A century of lectin research. *TIBBS*, 12:488-91, 1987.
- ETZLER, M. E. and BRANSTRATOR, M. L. *J.Cell.Biol.*, 62:329, 1974.
- FEENEY, R. E. ; OSUGA, D. T. ; LIND, S. B. and MILLER, H. T. *Comp.biochem.Physiol.*, 18:121, 1966. Apud PIGMAN, W. and HORTON, D. *The carbohydrates*. New York, Academic Press, vol IIB, cap. 43, p.655, 1970.
- FEENEY, R. E. : OSUGA, D. T. and MAEDA, H. *Arch.Biochem.Biophys.*, 119:124, 1967.
- FELSTED, R. L. ; LEAVITT, R. D. and BACHUR, N. R. Purification of the phytohemagglutinin family of proteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) by affinity chromatography. *Biochim.Biophys.Acta*, 406:72-81, 1975.
- FITZGERALD, R. J. Plaque microbiology and caries. *Ala.J.Med.Sci.*, 78:239-46, 1968.
- FITZGERALD, R. J. Introduction: Ecology, adhesion, and the indigenous microflora. In *Molecular basis of oral microbial adhesion*. MERGENHAGEN, S. E. and BURTON, R. p.1-4, American Society for microbiology, Washington,D.C., 1985.
- FLEISCHMANN, G. ; MAUDER, I. ; ILLERT, W. and RÜDIGER, H. A one-step procedure for isolation and resolution of *Phaseolus*

vulgaris isolectins by affinity chromatography.
Biol.Chem.Hoppe-Seyler, 366:1029-32, 1985.

FREIER, T. ; FLEISCHMANN, G. and RÜDIGER, H. Affinity chromatography on immobilized hog gastric mucin and ovomucoid. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler*, 366:1023-28, 1985.

GLAD, C. and BORREBAECK, C. A. K. Affinity of phytohemagglutinin (PHA) isolectins for serum proteins and regulation of the lectin-induced lymphocyte transformation. *J.Immun.*, 133:2126-32, 1984.

GIBBONS, R. J. Adherence of bacteria to host tissue, p.395-406. In D. Schlessinger. *Microbiology*, 1977. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

GIBBONS, R. J. and HOUTE, J. van Bacterial adherence. In: *Receptors and recognition* (edited by Beachey, C.H.) Series B, 6:60, 1980.

GIBBONS, R. J. and DANKERS, I. Lectin-like constituents of foods which react with components of serum, saliva and *Streptococcus mutans*. *Appl.Environ.Microbiol.*, 41(4):880-88, 1981.

GIBBONS, R. J. and DANKERS, I. Inhibition of lectin-binding to saliva-treated hydroxyapatite, to buccal epithelial cells, and to erythrocytes by salivary components. *Amer.J.Clin.Nutr.*, 36:276-83, 1982.

GIBBONS, R. J. and ETHERDEN, I. Enzymatic modification of bacterial receptors on saliva-treated hydroxyapatite surfaces. *Infect.Immun.*, 36:52-8, 1982.

GOLDSTEIN, I. J. and HAYES, C. E. The lectins:

carbohydrate-binding proteins of plants and animals.
Adv. Carbohyd. Chem. Biochem., 35:127-340, 1978.

HARDMAM, K. D. and AINSWORTH, C. F. *Biochemistry*, 11:4910-19, 1972. Apud SHARON, N. and LIZ, H. A century of lectin research. *TIBBS*, 12:488-91, 1987.

HARRISON, F. L. and CHESTERTON, C. J. *FEBES Lett.*, 122:157, 1980. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-34, 1989.

HELLIN, H. Der Giftig Eiweisskorper Abrin und Dessen Wirkung auf das Blut. *Thesis, Dorpat*, 1891. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOZ, I. L. Plant lectins. *Proceed. Conbrap.*, 71-91, 1990.

HILLMAN, J. D. ; van HOUTE, J. and GIBBONS, R. J. Sorption of bacteria to human enamel powder. *Arch. Oral Biol.*, 15:899-903, 1970.

INBAR, M. and SACHS, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 63:1418, 1969.

JAFFÉ, W. G and GAEDE, K. Purification of toxic phytohaemagglutini from black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Nature*, 183:1329-30, 1959.

JONES, G. W. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In *Microbial interactions (Receptors and recognition, series B, vol.3)*. REISSING, J. L. p.136-176, Chapman and Hall, London, 1977.

KAHANE, I. ; FURTHMAYR, H. and MARCCHESI, V. T. Isolation of membrane glycoprotein by affinity chromatography in the presence of detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 426-64, 1976.

KING, T. P. ; PUSZTAI, A. and CLARKE, E. M. W. *Histochem. J.*,

12:201, 1980.

- KOBERT, R. *Landwirtsch. Veruchsstat.*, 79/80:97, 1913. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOZ, I. L. Plant lectins. *Proceed. Combrap.*, 71-91, 1990.
- KORNFELD, S. *FASEB. J.*, 1:462, 1987. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-32, 1989.
- LANDSTEINER, K. and RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hemagglutination. *Zentralbl. Bakteriol.*, 45:660-67, 1908. Apud SHARON, N. and LIS, H. A century of lectin research. *Tibbs.*, 12:4888-91, 1987.
- LEAVITT, R. D. ; FELSTED, L. R. and BACHUR, N. R. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. *J. Biol. Chem.*, 252:2961-66, 1977.
- LIENER, I. E. Phytohemagglutinins: their nutritional significance. *J. Agric. Food Chem.*, 22:17, 1974.
- LIENER, I. E. Lectins and protein inhibitors of proteolytic enzymes (an overview). *Proceed. Conbrap*, 1-10, 1990.
- LINWEAVER, H. and MURRAY, C. W. Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. *J. Biol. Chem.*, 171:565-81, 1947.
- LOTAN and RAZ ; 1981. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Carbohydrate in cell recognition. *Scientific American*, 268:74-81, 1993.
- LOWRY, O. H. ; RISENBROUG, N. J. ; FAAR, A. L. and RANDAL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
- LUTSIK, M. D. A new affinity sorbent for purification of lectins

and used for isolation of wheat germ agglutinin.
Ukr.Biokhim.Zh., 56:432-36, 1984.

MATSUMOTO, I. and OSAWA, T. The specific purification of various carbohydrate-binding hemagglutinins. *Bioch. Bioph.Rs. Commun.*, 46:1810-15, 1972.

MECKEL, A. H. The formation and properties of organic films on teeth. *Arch.Oral Biol.* 10:585-97, 1965.

MENDEL, L. B. *Abstr.Arch.Physiol.*, 7:168, 1909. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOUIZ, I. L. Plant lectin. *Proceed.Combrap*, 71-96, 1990.

MERGENHAGEN, S. E. ; SANDBERG, A. L. ; BRENNAN, M. J. ; YEUNG, M. R. ; DONDELSLOOT & CIZAR, J. O. Molecular basis of bacterial adhesion in oral cavity. *Reviews of infectious disiases, Supplement 5,9:467-474*, 1987.

MILLER, J. B. ; HSU, and R. YACHININ, S. Extesive homology between the subunits of the phytohemagglutinin mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*, 72:1388-91, 1975.

MIRELMAN, D. ; GALLUN, E. ; SHARON, N. and LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by WGA. *Nature*, 256:414-16, 1975. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. and AINOUIZ, I. L. Plant lectin. *Proceed.Combrap*, 71-96, 1990.

MIRELMAN, D. Microbial lectins and agglutinins: properties and biological activity. John Wiley & Sons, New York, 1987.

MIRTH, D. B. ; MILLER, C. J. ; KINGMAN, A. and BOWEN, W. H. Inhibition of saliva induced aggregation of *Streptococcus mutans* by wheat germ agglutinin. *Caries Res.*, 15;121-31, 1979.

- MONTREUIL, J. ; CASTIGLIONI, B. ADAM-CHOSSON, A. and QUEVAL, J.
J.Biochem. (Toquio), 57:514, 1965. Apud PIGMAN, W. and HORTON,
 D. *The carbohydrates*. New York, Academic Press, Vol.IIB,
 cap.43. p. 656, 1970.
- MORAL, N. Comunicação pessoal (1993).
- MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. A. and AINOUZ, I.
 L. Plant lectin. *Proceed.Conbrap*, 71-96, 1990.
- MORENO, E. C. ; VARUGHESE, K. and HAY, D. I. Effect of human
 salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium
 phosphate. *Calcif.Tiss.Int.*, 28:7-16, 1979.
- MORGAN, W. T. J. and WATKINS, W. M. *Br.J.Exp.Pathol.* 34:94,1953.
 Apud GOLDSTEIN, I. J. and HAYES, C. E. The lectins:
 carbohydrate-binding proteins of plants and animals.
Adv.Carbohyd.Chem.Biochem., 35:127-340, 1978.
- MORHART, R. E. ; COWMAN, R. A. and FITZGERALD, R. J. Ecologic
 determinants to oral microbiota, p.278-296. In MENAKER, L.
The biologic basis of dental caries . Harper and Row, New
 York, 1980.
- MORSE, J. H. Immunological studies of phytohemagglutinin. I.,
 Reaction between phytohemagglutinin and normal sera.
Immunology, 14:713, 1968.
- NACHBAR, W. T. J. and OPPENHEIM, J. D. Lectins in United States
 diet: a survey of lectins in commonly consumed foods and a
 review of the literature. *Am.J.Clin.Nutr.*, 33:2338-45, 1980.
- NOWELL, P. C. Phitohemagglutinin: an initiator of mitosis in
 cultures of normal human leucocytes. *CancerRes.*, 20:462-6,
 1960.

- OCHOA, J. L. and KRISTIANSEN, T. Stroma: as an affinity adsorbent for non-inhibitable lectins. *FEBBS LETT.*, 40(1):145-48, 1978.
- OFEK, I. ; MIRELMAN, D. and SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by manose receptor. *Nature*, 265:623-5, 1977.
- OFEK, I. and PERRY, A. Molecular basis of bacterial adherence to tissues. In *Microbial basis of oral microbial adhesion*. MERGENHAGEM, S. E. and ROSAN, B. p.7-13, American Society for microbiology, Washington,D.C., 1985.
- OFEK, I. and SHARON, N. *Infect.Immun.*, 56:539, 1988. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-34, 1989.
- OLSON, M. O. J. and LIENER, I. E. Some physical and chemical properties of concanavalin A, the phytohemagglutinin from jack bean. *Biochemistry*, 6:105-11, 1967.
- ÖRSTAVIK, D. and KRAUS, F. W. The acquired pellicle: Immunofluorescent demonstration of specific proteins. *J.Oral Pathfol.* 2:68-76, 1973.
- OSBORNE, T. B. ; MENDEL, L. B. and HARRIS, I. F. A Study of proteins of castor bean with special references to the isolation of ricin. *Am.J.Physiol.*, 14:259-86, 1905. Apud PAULINO DA COSTA, C. *Tese de doutoramento Unicamp*, 1989.
- PAULINO da COSTA, C. Interação de lectinas de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) com glicoproteínas da saliva e soro humano. *Tese de doutoramento Unicamp*, 1989.
- PERRY, A. and OFEK, I. *Infect.Immun.*, 43:227-62, 1984. Apud SHARON, N. and LIZ, H. A century of lectin reserch. *TIBBS*,

12:488-91, 1987.

- PUSZTAI, A. and GRANT, G. The isolation and properties of lectins of different carbohydrate specificity from the roots of a *Phaseolus vulgaris* variety lacking conventional seed lectins. 13th. FEBS meeting, Jerusalém. Resumo 52-p41, pág. 44, 1980. Apud MOREIRA, R.A ; CAVADA, B. ; OLIVEIRA, J.T. and AINOUZ, I.L. Plant lectin. *Proceed. Combrap*, 71-96, 1990.
- RÄSÄNEN, V.; WEBER, T.T. and GRASBECKM, R. Crystalline kidney bean leucoagglutinin. *Eur. J. Biochem.*, 38:193-200, 1973.
- RAZ, A. and LOTAN, R. *Cancer Metasis Rev.*, 6:433, 1987. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 146:227-34, 1989.
- REISFELD, R. A. ; LEWIS, U. J. and WILLIAMS, D. E. Disk electroforesis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195:281-83, 1962.
- REISNER, Y. ; KAPPOR, N. ; KIRKPATRICK, D. ; DUPOND, B. ; GOOD, R. A. and O-REILLY, R. J. *Lancet*, 2:237, 1981.
- RENKONEN, K. O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of family of leguminosae. *Ann. Med. Exp. Fenn.*, 26:66-72, 1948.
- RIGAS, D. A. and OSGOOD, E. E. Purification and properties of the phytohemagglutini of *Phaseolus vulgaris*. *J. Biol. Chem.*, 212:607-15, 1955.
- ROGERS, H. J. Adhesion of microorganisms to surfaces: some general consideration of the role of envelope. p.29-55. In *Adhesion of microorganism to surfaces*. ELWOOD, D. C. ; MELLING, J. and RUTTER, P. p.29-55, Academic Press. Inc., New York, 1979.

- ROOS, P. H. ; HARTMAN, J. and SCHLEPPER-SCHÄFER, H. *Biochim.Biophys.Acta*, 847:15, 1985. Apud SHARON, N. LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-34, 1989.
- RUTTER, P. The accumulation of organisms on teeth, In *Adhesion of microorganism to surfaces*. ELWOOD, D.C. ; MELLING, J. and RUTTER, P. p.139-164, Academic Press, Inc. New York, 1979.
- SELA, B-A. ; LIZ, H. ; SHARON, N. and SACHS, L. Isolectins from wax bean with differential agglutination of normal and transformed cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 310:273-77, 1973.
- SELA, B-A. ; WANG, J. L. and EDELMAN, G. M. Isolation of lectins of different specificities on a single affinity adsorbent. *J.Biol.Chem.*, 250:7335-38, 1975.
- SHARON, N. and LIZ, H. Lectins: cell agglutinating and sugar specificit proteins. *Science*, 177:949-59, 1972.
- SHARON, N. LIZ, H. *Trends Biochem.Sci.*, 12:488, 1987. Apud SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-34, 1989.
- SHARON, N. and LIZ, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246:227-34, 1989.
- SHARON, N. and LIZ, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, 268:74-81, 1993.
- SONJU, T. Pellicle. Formation, composition e possible role. In: THYLSTRUP, A. and FEJERSKOV, O. *Textbook of cariology*. Copenhagen, Müksgaard, cap.4, p.46-53, 1986.
- STEVENS, F. C. and FEENEY, R. E. *Biochemistry*, 2:1346, 1963. Apud PIGMAN, W. and HORTON, D. *The carbohydrates*. New York,

Academic Press, vol.IIB, cap 43, p.655, 1970

STILLMARK, H. Über rizin, ein giftiges ferment aus dem samen von *Ricinus communis* L und einigen anderen Euphorbiaceae *Inaug.Diss.*, DOPART, 1888. Apud SHARON, N. and LIZ, H. A century of lectin research. *TIBBS*, 12:488-91, 1987.

SUMMER, J. B. The globulins of the jack bean *Canavalia ensiformis*. *J.Biol.Chem.* 37:137-42, 1919.

SUMMER, J. B. and HOWELL, S. F. The identification of hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. *J.Bacteriol.*, 32(2:227-37, 1936.

TAKAHAASHI, T. ; RAMACHANDRA-MURTHY, P. and LIENER, I. E. Some physical and chemical properties of phytohemagglutinin isolated from *Phaseolus vulgaris*. *Biochim.Biophys.Acta*, 133:123-33, 1967.

THYLSTRUP, A. and FEJERSKOV, O. Pellicle. Formation, composition and possible role. *Textbook of cariology*, Munksgaard, cap.4, pag.46-55, 1986.

TOMIMATSU, Y. ; CLARY, J. J. and BARTULOVICH, J. J. Physical characterization of ovoidinhibitor, a trypsin and chymotrypsin inhibitor from chicken egg white. *Arch.Biochem.Biophys.* 115, 536-44, 1966.

VILLELA, G. G. ; BAILA, M. and TRASTALDI. *BIOQUÍMICA*, Guanabara, Koogan, cap.3, p.144, 1976.

VRETBLAD, P. Purification of lectin by bio-specific affinity chromatography. *Biochem.Biophys.Acta*, 434:169-76, 1976. Apud CARVALHO, M.T.V. *Tese de doutoramento USP*, 1981.

WHITAKER, J. R. *Anal.Chem.*, 35:1950,1963. Apud PIGMAN, W. and HORTON, D. *The carbohydrates*. New York, Academic Press, Vol.IIB, cap. 43, p.656, 1970.

WIENHAUS, O. *Biochem.Z.*, 18:228, 1909. Apud MOREIRA, R. A. ; CAVADA, B. S. ; OLIVEIRA, J. T. and AINOZ, I. L. Plant lectin. *Proceed.Combrap*, 71-96, 1990.

YACHNIN, S. and SVENSON, R. The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology*, 22:871, 1972.