

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Agrícola



Dissertação

Expressão heteróloga da lectina de
***Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e**
efeito sobre linhagens celulares tumorais

Natália Neutzling Camacho

Pelotas, 2007

NATÁLIA NEUTZLING CAMACHO

**Expressão heteróloga da lectina de
Bauhinia forficata Link em *Escherichia coli* e
efeito sobre linhagens celulares tumorais**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Agrícola da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências (área do conhecimento:
Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Pelotas, 2007

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia – UFPel

C172e Camacho, Natália Neutzling

Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais / Natália Neutzling Camacho ; orientador Odir Antônio Dellagostin. – Pelotas, 2007. – 69f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2007.

1.Biotecnologia. 2.Lectina. 3.*Bauhinia forficata*.
4.Expressão heteróloga. 5.*Escherichia coli*. 6.Linhagens celulares tumorais. I.Dellagostin, Odir Antônio. II.Título.

CDD: 574.88

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (Orientador), Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi, Universidade Federal de Pelotas.

Prof^a. Dr^a. Fátima Tereza Alves Beira, Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Gilberto Dolejal Zanetti, Universidade Federal de Santa Maria.

Dedicatória

A Deus

À minha Mãe

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar um Curso de Pós-Graduação de qualidade.

Ao Prof. Odir Antônio Dellagostin, pela orientação e exemplo profissional.

Aos meus pais, pelos ensinamentos de uma vida toda, especialmente à minha mãe, pelo apoio às minhas decisões, amor, amizade e incentivo; aos meus irmãos pela amizade e alegria.

Ao meu namorado Rafael, pelo amor, pelo apoio, e por me fazer acreditar que posso ir além.

Ao colega Luciano da Silva Pinto, pela amizade e grande suporte a este trabalho, cuja realização não seria possível sem sua ajuda.

À Prof^a Fátima Tereza Alves Beira, e ao pessoal do Laboratório de Cultivo Celular, pela atenção e ajuda na realização dos ensaios com as células tumorais.

A todos os colegas do Centro de Biotecnologia, pelo auxílio e pelos esclarecimentos nos momentos de dúvida, pelo convívio e amizade no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal.

A todos os colegas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e pela colaboração ao trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Resumo

CAMACHO, Natália Neutzling. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais.** 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com propriedade de ligação específica a carboidratos, capazes de interagir com glicocomponentes presentes em células de plantas, animais, bactérias e vírus. Essa propriedade faz das lectinas notáveis marcadores utilizados em estudos histoquímicos, bioquímicos e na caracterização e diferenciação de células. Plantas leguminosas constituem-se na maior fonte de lectinas, que possuem atividades biológicas importantes, como atividade inseticida e antiproliferativa sobre células tumorais. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de expressão heteróloga para uma lectina de *Bauhinia forficata* (rBFL), popularmente conhecida como “pata-de-vaca”, em *E. coli*, com o intuito de elucidar suas características e atividades biológicas. O gene *bfl* da lectina foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico, e clonado nos vetores de expressão pQE30 e pET32a(+). A lectina rBFL foi expressa em larga escala pelo vetor pET32a(+)/*bfl* em *E. coli*, na forma insolúvel. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni⁺²-Sepharose, com rendimento de 40 mg.L⁻¹. A seqüência da lectina rBFL e sua especificidade por carboidrato é similar a de lectinas relacionadas. A lectina rBFL apresenta-se na forma de monômeros e dímeros, com massa molecular aparente de 44 e 94 kDa, respectivamente, possui atividade biológica em ensaio de hemaglutinação na presença de cátions divalentes (Ca⁺² and Mn⁺²) e demonstra efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais humanas MCF-7 (câncer de mama), HT-29 (câncer de cólon) e HL-60 (leucêmica), dependendo da concentração utilizada. A rBFL demonstrou efeito inibitório dose-dependente sobre HT-29, e efeito estimulatório sobre a proliferação da linhagem MCF-7 em altas concentrações, não induzindo morte celular em nenhuma das linhagens. Os resultados obtidos neste trabalho acerca da rBFL, nunca antes isolada ou produzida em sistema heterólogo, motivam a realização de novos ensaios de caracterização visando possíveis aplicações.

Palavras-chave: lectina; *Bauhinia forficata*; expressão heteróloga; *Escherichia coli*; linhagens celulares tumorais.

Abstract

CAMACHO, Natália Neutzling. **Heterologous expression of a lectin from *Bauhinia forficata* Link in *Escherichia coli* and effect on cancer cell lines.** 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin with binding specificities for carbohydrates, that interact with glycocomponents present in plant and animal cells, bacteria and viruses. This property makes lectins remarkable markers used in histochemical and biochemical studies, and for characterization and differentiation of cells. Leguminous plants are the major source of lectins, proteins that possess important biological activities, like insecticidal and antiproliferative against cancer cell lines. Thus, the aim of this work was to develop a heterologous expression system for a recombinant lectin from *Bauhinia forficata*, a leguminous plant popularly known as “pata-de-vaca”, in *E. coli*, to study its characteristics and biological activities. The lectin gene *bfl* was amplified by PCR from genomic DNA, and cloned to expression vectors pQE30 e pET32a(+). Recombinant BFL was expressed in *E. coli* in insoluble form by using the vector pET32a(+)/*bfl*. The lectin was purified by Ni⁺²-Sepharose affinity chromatography, with a yield of 40 mg.L⁻¹. The sequence and carbohydrate specificity of rBFL is similar to other related lectins. The rBFL lectin presents in monomer and dimer forms, with aparent molecular mass of 44 and 94 kDa, respectively, shows biological activity in hemagglutination assay in the presence of divalent metal cations (Ca⁺² and Mn⁺²) and antiproliferative effect on human cancer cell lines MCF-7 (breast cancer), HT-29 (colon cancer) and HL-60 (leukemia) according as the concentration used. The rBFL lectin showed dose-dependent inhibition in HT-29 cells, stimulatory effect on proliferation of MCF-7 cells in higher concentrations, and no induction of cell death was observed in any cancer cell line. The results obtained in this work, about rBFL lectin, never before isolated or produced in heterologous system, motivates the performance of new characterization assays to elucidate possible applications.

Keywords: lectin; *Bauhinia forficata*; heterologous expression; *Escherichia coli*; cancer cell lines.

Lista de Figuras

Figura 1 - Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos obtidos por seqüenciamento dos clones pCR2.1/ <i>bfl</i> contendo o gene <i>bfl</i>	39
Figura 2 - Alinhamento das seqüências gênicas de <i>B. forficata</i> (BFL) e de outras duas lectinas de espécies da tribo Cercideae, <i>B. purpurea</i> (BAULEC) e <i>G. simplicifolia</i> (GSI-B4).....	40
Figura 3 - Mapa do vetor de expressão pQE30/ <i>bfl</i>	42
Figura 4 - Mapa do vetor de expressão pET32a(+)/ <i>bfl</i>	43
Figura 5 - SDS-PAGE 12% da purificação da rBFL por cromatografia de afinidade utilizando 8 M de uréia para solubilização da proteína.....	44
Figura 6 - SDS-PAGE 12% da purificação da rBFL por cromatografia de afinidade utilizando 0,2% de lauril-sarcosine para solubilização da proteína.	44
Figura 7 - SDS-PAGE 12% de frações da purificação com uréia e lauril-sarcosine, tratadas com e sem β -mercaptoetanol (β -ME).	45
Figura 8 - Massa molecular das bandas das frações dimérica (A – pico 2) e monomérica (B – pico 4) da proteína, estimado pelo software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences)	46
Figura 9 - Painel A: SDS-PAGE 12% da lectina rBFL demonstrando as bandas correspondentes as frações dimérica e monomérica da proteína. Painel B: reação das bandas correspondentes às frações dimérica e monomérica da proteína em <i>Western blotting</i> com anticorpos monoclonais anti-cauda poli-histidina conjugados com peroxidase (Sigma).	46
Figura 10 - Expressão da lectina rBFL em diferentes cepas de <i>E. coli</i> em gel SDS-PAGE 12%. Painel A: amostras não induzidas das culturas; Painel B: amostras induzidas das culturas.....	47
Figura 11 - Quantificação da lectina rBFL em curva de BSA em SDS-PAGE 12%. .	48
Figura 12 - Efeito da rBFL sobre a proliferação das células da linhagem HL-60.....	50
Figura 13 - Efeito da rBFL sobre a proliferação das células da linhagem MCF-7.....	51
Figura 14 - Efeito da rBFL sobre a proliferação das células da linhagem HT-29.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Cepas utilizadas nos testes de expressão da rBFL, que foram submetidas à transformação com o vetor pET32a(+)/*bfl*, e suas respectivas marcas de seleção.

.....32

Tabela 2 - Principais características deduzidas da cadeia madura da lectina BFL utilizando o programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.).

.....41

Lista de Símbolos e Abreviações

µg – micrograma

°C – graus Celsius

µL – microlitro

µm – micrômetro

BSA – albumina sérica bovina

CIP – enzima fosfatase alcalina

cm – centímetro

DMEM – meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – 2' - desoxinucleotídeo 5' – trifosfatos

g – força da gravidade

HL-60 – linhagem celular de leucemia mielóide aguda humana

HT-29 – linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano

IPTG – isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo

kDa – kilodalton

kHz – kilohertz

kV – kilovolts

L – litros

LB – meio de cultivo Luria Bertani

M – molar

MCF-7 – linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano

MgCl₂ – cloreto de magnésio

min – minutos

mL – mililitro

mm - milímetro

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NaH₂PO₄ – dihidrogenofosfato de sódio

ng – nanograma

Ni⁺² – níquel

nm – nanômetro

OD – densidade óptica

PBS – tampão fosfato salino

PBST – tampão fosfato salino acrescido de Tween 20 a 0,1%

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial de hidrogênio

rBFL – lectina recombinante de *Bauhinia forficata*

rpm – rotações por minuto

RPMI 1640 – meio de cultivo RPMI 1640

s – segundos

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SFB – soro fetal bovino

SRB – corante Sulforrodamina B

TCA – ácido tricloroacético

x – vezes

Sumário

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Lectinas	12
1.2 Lectinas de leguminosas	14
1.3 Expressão heteróloga de lectinas	16
1.4 Aplicações gerais de lectinas	17
1.5 Propriedades biológicas de lectinas	18
1.5.1 Toxicidade a células eucarióticas	18
1.5.3 Atividade antitumoral	19
1.5.4 Atividade inseticida	20
1.6 <i>Bauhinia forficata</i> Link.	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Obtenção do material biológico	25
3.2 Extração do DNA genômico de <i>B. forficata</i>	25
3.3 Amplificação por PCR e clonagem do gene <i>bfl</i> no vetor pCR2.1-TOPO	25
3.4 Clonagem do gene <i>bfl</i> no vetor de expressão pQE30	26
3.5 Clonagem do gene <i>bfl</i> no vetor de expressão pET32a(+)	27
3.6 Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	28
3.7 Transformação de células competentes	29
3.8 Expressão da lectina rBFL	30
3.9 Expressão da lectina rBFL em diferentes cepas de <i>E. coli</i>	31
3.10 Purificação e quantificação da lectina rBFL	33
3.11 Determinação da atividade hemaglutinante da lectina rBFL	34
3.12 Clivagem da lectina rBFL com enzima enteroquinase	34
3.13 Atividade da lectina rBFL sobre a proliferação celular de linhagens tumorais	35
4 RESULTADOS	39
4.1 Clonagem do gene <i>bfl</i> no vetor pCR2.1-TOPO	39
4.2 Clonagem do gene <i>bfl</i> no vetor de expressão pQE30	41
4.3 Clonagem do gene <i>bfl</i> no vetor de expressão pET32a(+)	42
4.4 Expressão e purificação da lectina rBFL	43
4.5 Expressão da lectina rBFL em diferentes cepas de <i>E. coli</i>	47
4.6 Quantificação da lectina rBFL	47
4.7 Atividade hemaglutinante da lectina rBFL	48
4.8 Clivagem da lectina rBFL com enzima enteroquinase	48
4.9 Atividade da lectina rBFL sobre a proliferação celular de linhagens tumorais	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	60
7 REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

A ocorrência na natureza de proteínas com atividade hemaglutinante, que nos últimos anos foram caracterizadas como carboidrato-específicas e denominadas lectinas, é conhecida desde o final do século XIX, mas somente há aproximadamente duas décadas essas proteínas começaram a despertar maior interesse (SHARON, 2007). Lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que têm especificidade por resíduos terminais ou subterminais de carboidratos. A principal característica desta classe de proteínas é sua habilidade de interagir com carboidratos e desta forma combinar-se com glicocomponentes presentes na superfície de células e tecidos provenientes dos mais diversos seres vivos (GUZMÁN-PARTIDA et al., 2004). O principal critério para uma proteína ser considerada uma lectina é sua habilidade de se ligar a um carboidrato, mais freqüentemente um oligossacarídeo (LIS & SHARON, 1998).

Lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas variando em tamanho, estrutura, organização molecular e entre os sítios de ligação a carboidratos. Lectinas estão amplamente distribuídas em plantas, vírus, bactérias e animais (GERLACH et al., 2005). Dentre estes, as lectinas de plantas podem ser definidas como toda proteína que possui pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo de forma específica (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Lectinas são divididas em diferentes grupos de acordo com suas especificidades de ligação por monossacarídeos: (a) glicose e manose, (b) manose, (c) D-galactose, (d) N-acetilglicosamina e (e) ácido siálico (WONG & NG, 2005). A classificação das lectinas por afinidade de ligação a carboidratos varia bastante na literatura. Autores como Guzmán-Partida et al. (2004) definem esta especificidade relacionada também aos demais monossacarídeos como fucose e também aos oligossacarídeos complexos, além da especificidade por glicoproteínas. A classificação das lectinas de acordo com sua especificidade por carboidratos é baseada no monossacarídeo que causa a maior inibição da aglutinação de eritrócitos induzida pela lectina, ou na precipitação de polímeros que contêm carboidratos (HAJTÓ et al., 2005).

Peumans & Van Damme (1995) classificam as lectinas de acordo com sua estrutura geral, em três grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas são proteínas que contêm um único domínio de ligação a carboidrato. Em função de sua natureza monovalente, são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar células. As hololectinas são exclusivamente formadas por domínios de ligação a carboidratos, porém contêm dois ou mais desses domínios, idênticos ou homólogos. Este grupo compreende todas as lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação e que, portanto, são capazes de aglutinar células e precipitar carboidratos. A maioria das lectinas de plantas são hololectinas, uma vez que se comportam como hemaglutininas. Quimerolectinas são proteínas de fusão que possuem domínio(s) de ligação a carboidrato arranjado(s) com um domínio não relacionado, com atividade catalítica bem definida ou outra atividade biológica, atuando independentemente do domínio de ligação a carboidrato. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidrato, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas.

Apesar da grande quantidade de informação disponível sobre seqüência e especificidade de lectinas, relativamente pouco é conhecido sobre sua significância biológica (KAUR et al, 2006). O papel fisiológico das lectinas de plantas ainda é incerto. Muitos estudos são desenvolvidos com o intuito de revelar os possíveis papéis desempenhados por essas proteínas na planta, porém nenhum resultado é até então conclusivo. Lectinas encontradas em raízes de leguminosas podem estar envolvidas no reconhecimento e/ou ligação de bactérias fixadoras de nitrogênio, como *Rhizobium* spp., desempenhando papel no estabelecimento da simbiose (HIRSCH et al., 2001; LAUS et al., 2006). Além disso, interações lectina-carboidrato proporcionam o contato celular inicial indispensável para o estabelecimento de relações mutualísticas altamente específicas, como na simbiose entre larvas do coral *Fungia scutaria* e algas endossimbióticas dinoflageladas (WOOD-CHARLSON et al., 2006).

Várias evidências indicam que as lectinas podem desempenhar papel de defesa na planta. São as únicas proteínas da planta capazes de reconhecerem e se ligarem a glicoconjugados de outros organismos, presentes na superfície de microrganismos (bactérias e fungos) ou expostos no trato intestinal de insetos e mamíferos herbívoros. Além disso, as lectinas acumulam-se em partes da planta mais suscetíveis ao ataque de organismos e que também são imprescindíveis para a

sobrevivência individual e da espécie, como as sementes (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Uma importante propriedade característica das lectinas é sua habilidade de aglutinar eritrócitos *in vitro*. Em vista disso, essas proteínas são freqüentemente chamadas de “aglutininas” ou “fitohemaglutininas” (HAJTÓ et al., 2005). O ensaio de atividade hemaglutinante e a aglutinação de leucócitos são freqüentemente usados como um sistema de monitoramento durante os procedimentos de purificação das lectinas, indicando assim sua atividade biológica (DUBOIS et al., 1998).

1.2 Lectinas de leguminosas

Lectinas de leguminosas (família Leguminosae) constituem o grupo mais investigado e bem caracterizado de lectinas de plantas, sendo que centenas destas já foram isoladas e caracterizadas em relação às suas propriedades químicas, fisicoquímicas, estruturais e biológicas (CAVADA et al., 2001; CECCATTO et al., 2002). As espécies primeiramente caracterizadas e mais estudadas pertencem a gêneros da subfamília Papilinoideae e subtribo Diocleinae como *Canavalia*, *Cratylia* (OLIVEIRA et al., 2004) e *Dioclea*, constituindo um grande grupo de proteínas estreitamente relacionadas que possuem estruturas primária e terciária muito similares e compartilham especificidade por carboidratos (RAMOS et al., 1996; BRINDA et al., 2005), possuindo especificidade de ligação pelos monossacarídeos glicose/manose (RAMOS et al., 1996). Outro aspecto comum a essas lectinas é que exibem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE et al., 1999).

A lectina ConA, de *Canavalia ensiformis*, foi a primeira a ser isolada e ter sua estrutura primária e terciária determinada, sendo a lectina vegetal melhor caracterizada até o momento (CAVADA et al., 2001). Estudos realizados com essa lectina estabeleceram a estrutura terciária característica observada posteriormente na maioria das lectinas de leguminosas (*legume lectin fold* ou *jelly-roll fold*), e que as diferencia de outros grupos, como as galectinas, isoladas de animais (CHANDRA et al., 2001; BRINDA et al., 2005). Especificamente em relação à lectinas isoladas de membros da subfamília Caesalpinoideae, apenas as lectinas de *Griffonia simplicifolia* (ZHU et al., 1996), *Bauhinia purpurea* (KUSUI et al., 1991; YOUNG et al., 1985) e *Bauhinia pentandra* (SILVA et al., 2001) estão bem caracterizadas.

Quanto a membros da subfamília Mimosoideae, as lectinas mais estudadas pertencem ao gênero *Parkia* (RAMOS et al., 1999).

Lectinas de leguminosas são constituídas de 2 ou 4 subunidades com massa molecular relativa de 30 kDa e um sítio de ligação com carboidrato por subunidade (PANDO et al., 2004). Lectinas são particularmente abundantes em sementes de leguminosas, que são conhecidas como a maior fonte dessas proteínas. As lectinas constituem mais de 10% das proteínas solúveis nos extratos das sementes (CAVADA et al., 1996; ROOPASHREE et al., 2006). Lectinas estão presentes em grande quantidade em muitas espécies de legumes e cereais. Quando consumidas por humanos e animais, essas proteínas podem por vezes causar efeitos tóxicos ou antinutricionais, pela interferência em aspectos do metabolismo, por impedir o crescimento, e em casos extremos podendo levar animais a morte (RIOS et al., 1996).

Segundo SHARON (2007), lectinas de leguminosas são membros de uma única família protéica e os genes que as codificam têm ancestralidade comum. Em vista disso, essas proteínas mostram-se interessantes marcadores filogenéticos e constituem-se em boas ferramentas para a melhor definição de táxons a nível tribal, sendo também utilizadas como marcadores moleculares para o estabelecimento de uma nova espécie, ou ainda para esclarecer níveis de relacionamento entre táxons diferentes (ROUGÉ et al., 1987; RAMOS, 1997).

Lectinas de plantas leguminosas, embora pertençam a uma mesma família de proteínas, apresentam notável divergência de estrutura quaternária e em suas especificidades por carboidratos. A elucidação do mecanismo pelo qual essas lectinas possuem uma ampla gama de especificidades de ligação enquanto mantêm uma estrutura monomérica e tridimensional muito similar será a chave para o entendimento da essência das interações carboidrato-proteína (KANEDA et al., 2002; BRINDA et al., 2005). Essas lectinas exibem diferentes tipos de estruturas quaternárias não somente em termos de número de subunidades envolvidas na molécula oligomérica, mas também na natureza ou tipo de oligomerização, apesar de possuírem subunidades estruturalmente quase idênticas (CHANDRA et al., 2001), acarretando em propriedades biológicas diversas. Desta forma, a busca e a caracterização de lectinas inéditas possibilita a descoberta de novas propriedades funcionais e aplicações.

1.3 Expressão heteróloga de lectinas

A dificuldade de separação de diferentes isoformas de lectinas por técnicas convencionais tem levado a definição de propriedades funcionais e atividades biológicas para uma mistura de proteínas, e enquanto muitas das variantes que ocorrem naturalmente nas lectinas provavelmente diferem pouco em propriedades funcionais, as diferenças de sequência entre isoformas causam efeitos significantes sobre a atividade biológica das moléculas (ECK et al., 1999; RAEMAEKERS et al., 1999). Um estudo detalhado das propriedades de muitas lectinas é impedido por essas misturas heterogêneas. A expressão de lectinas de plantas em bactéria demonstra ser um meio de seleção satisfatório para o estudo isolado de cada isoforma (LUO et al., 2005).

A expressão de lectinas vegetais em sistemas heterólogos oferece um meio de se produzir proteínas de seqüências definidas de aminoácidos, e permite que se trace uma relação específica entre seqüência e função através de mutações sítio-dirigidas (RAEMAEKERS et al., 1999). Além disso, essa estratégia visa solucionar problemas em função da dificuldade de se obter essas proteínas diretamente da planta, uma vez que este processo inclui etapas laboriosas e onerosas de extração e purificação e não garante alto rendimento da proteína. A purificação das lectinas de sementes é uma etapa limitante para a utilização dessas em estudos de atividade biológica devido à dificuldade de purificação e dependência da disponibilidade de sementes. Nesse contexto, a clonagem dos genes que codificam para essas proteínas pode ser considerada uma etapa crucial para a obtenção e produção destas proteínas em larga escala (LUO et al., 2005).

Escherichia coli é o organismo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes em função de seu rápido crescimento, que alcança altas densidades celulares em substratos de baixo custo, por sua genética e proteômica bem caracterizadas e pela disponibilidade de numerosos vetores de clonagem (LUTOMSKI et al., 2004). No caso de lectinas recombinantes, *E. coli* também é o sistema heterólogo mais utilizado (BRANCO et al., 2004; WANG et al., 2004). Além da expressão em *E. coli*, muitas lectinas de planta têm sido produzidas com sucesso em leveduras, como as lectinas de leguminosas PHA (*Phaseolus vulgaris* agglutinin) e GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) (RAEMAEKERS et al., 1999) e a lectina da leguminosa *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em *Pichia pastoris* (BEZERRA et al., 2006).

1.4 Aplicações gerais de lectinas

A propriedade de ligação específica a carboidratos faz das lectinas notáveis marcadores utilizados em estudos histoquímicos, bioquímicos e em técnicas para caracterizar e diferenciar células cancerosas (SHERWANI et al., 2003). As interações lectina-carboidrato ocorrem nos eventos moleculares subjacentes à resposta imune. Lectinas são usadas como reagentes policlonais para investigar as bases moleculares e o controle da ativação e proliferação de linfócitos, para identificar e fracionar células do sistema imune, e como drogas (BAINS et al., 2005). Uma vez que a superfície externa da membrana celular e a matriz extracelular consistem principalmente de glicoconjugados, resíduos alterados de carboidratos das glicoproteínas ocasionados pela invasão neoplásica podem ser detectados por marcadores protéicos como as lectinas (SHERWANI et al., 2003). A lectina de *B. purpurea* (BPA) é muito utilizada como reagente na purificação de organismos em seus diferentes estágios morfológicos durante o ciclo de vida, como acontece com o parasito *Leishmania braziliensis* (PINTO-DA-SILVA et al., 2002).

Lectinas que podem ser usadas como ferramentas em glicobiologia são definidas por WU (2003) como “lectinas aplicadas”. Estas lectinas têm sido extensivamente usadas em estudos de glicobiologia e biomedicina. O autor explica ainda que os fatores envolvidos nas interações lectina-glicoforma vão além dos sítios de reconhecimento entre as lectinas e seus glicotopos, sendo que muitos fatores, como polivalência, solubilidade e carga afetam a ligação. Desta forma, muitos métodos vêm sendo usados para a elucidação das propriedades de ligação das lectinas. Estes incluem estudos dos papéis estruturais e funcionais dos carboidratos de superfície celular; isolamento de mutantes resistentes à ação citotóxica de algumas lectinas e investigação da distribuição e mobilidade de glicoproteínas de superfície em células normais e malignas. Lectinas também são usadas para tipagem sanguínea, determinação de status secretor e como reagentes para a caracterização de glicoproteínas.

Lectinas também provaram sua utilidade na separação de glicoproteínas purificadas em suas glicoformas, que são as diferentes formas glicosiladas da mesma proteína (SHARON, 2007). Na área microbiológica, lectinas são utilizadas na identificação laboratorial e classificação taxonômica de bactérias, protozoários, parasitas (identificação de fatores de virulência, caracterização de componentes

celulares, diferenciação entre cepas patogênicas e não patogênicas, etc.) (SLIFKIN & DOYLE, 1990).

Lectinas administradas por via oral têm o potencial de interagir com diferentes glicoproteínas do trato gastrointestinal exercendo efeitos poderosos na sua estrutura, função, capacidade digestiva, estado imune e flora bacteriana. Lectinas podem também influenciar o estado nutricional e a saúde de humanos e animais, sendo usadas como agente terapêutico contra tumores, apresentando resultados eficazes e desprovidos de efeitos colaterais (PRYME et al., 2004).

1.5 Propriedades biológicas de lectinas

As propriedades biológicas das lectinas, especialmente de lectinas vegetais, estão sendo amplamente estudadas. A propriedade que muitas lectinas possuem de aglutinar células talvez seja seu aspecto imunológico mais importante. Devido à multivalência de reconhecimento de carboidratos, muitas lectinas fazem ligações cruzadas entre células e seus receptores (DUBOIS et al., 1998).

Como exemplos importantes advindos dessa propriedade tem-se a indução da produção de interferon- γ em ratos normais e infectados com *Leishmania* pela lectina ConBr de *Canavalia brasiliensis* (BARRAL-NETTO et al., 1996); lectinas que induzem a produção de óxido nítrico (envolvido em efeitos antitumorais e antiparasitários) por macrófagos *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999); atividade antiinflamatória de lectinas de leguminosas (ASSREUY et al., 1997) e mitogenicidade, um dos mais importantes efeitos da interação das lectinas com as células, que proporciona a transformação de linfócitos quiescentes e não divisíveis em linfócitos em estado de crescimento e proliferação (BAINS et al., 2005).

1.5.1 Toxicidade a células eucarióticas

Muitas proteínas altamente tóxicas originadas de plantas são também lectinas por possuírem sítios de ligação com carboidratos. Essas lectinas são chamadas de *type II ribosome inactivating protein* (RIP), proteínas inativadoras de ribossomos, altamente tóxicas para células eucarióticas. *Type II RIPs* são proteínas formadas por duas subunidades, sendo a subunidade A tóxica e a subunidade B com especificidade por carboidrato (lectina). A subunidade B se liga a um receptor glicoconjugado na superfície da célula, promovendo a entrada da subunidade A no citoplasma. Esta subunidade inativa ribossomos eucarióticos pela clivagem da ponte

N-glicosídica, impossibilitando a ligação dos ribossomos a fatores de alongação e conseqüentemente a síntese protéica. Além disso, RIPs são também capazes de induzir apoptose (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; BAGARIA et al., 2006).

Dentre as mais estudadas estão a ricina (*Ricinus comunis*) e a abrina (*Abrus precatorius*), isoladas das sementes destas espécies. A abrina foi expressa em *E. coli* por Wang et al (2004). Outras RIP também têm sido expressas em sistemas heterólogos com sucesso, como a volkensina (CHAMBERY et al., 2007), a pulchelina (GOTO et al., 2003; SILVA et al., 2005) e a lectina de *Viscum album* (mistletoe lectin) (ECK et al., 1999; PEVZNER et al., 2005), todas expressas em *E. coli*. RIPs são conhecidas por apresentarem atividade antitumoral (WANG et al., 2004) e antiviral, inibindo a proliferação dos vírus.

1.5.2 Inibição do crescimento de microrganismos

Muitos trabalhos relatam a inibição do crescimento *in vitro* de fungos (YE & NG, 2001; YE et al., 2001; CHEN et al., 2005b), bactérias (PANDO et al., 2004) e parasitas por lectinas vegetais, por mecanismos ainda pouco esclarecidos. O mecanismo de ação pode ser a formação de canais iônicos nas membranas dos microrganismos ou a inibição competitiva da adesão das proteínas microbianas nos receptores polisacarídicos no hospedeiro. Em relação aos vírus, lectinas são inibidoras da proliferação viral, através da inibição da interação vírus-componentes celulares (COWAN, 1999). *In vivo*, nas interações de parasitismo e estabelecimento do processo infeccioso, a ligação entre os glicocomponentes dos microrganismos e as lectinas do hospedeiro desencadeia uma resposta imune inata no hospedeiro que leva a destruição do microrganismo (SLIFKIN & DOYLE, 1990; FUJITA, 2002).

1.5.3 Atividade antitumoral

Lectinas de planta têm demonstrado possuir atividade antitumoral (efeito inibitório sobre o crescimento de tumores) e atividade anticarcinogênica (efeito inibitório na indução de câncer por carcinógenos) (BAINS et al., 2005). Sabendo-se que cada lectina é única em sua especificidade fina por carboidratos, inúmeras lectinas provenientes de diferentes fontes devem ser checadas a respeito de seu potencial antitumor contra uma variedade de linhagens celulares (KAUR et al, 2006). Algumas lectinas têm mostrado induzir apoptose em vários tipos de células, o que pode ajudar a explicar sua toxicidade (HASEGAWA et al., 2000; PARK et al., 2000). Os

mecanismos pelos quais as lectinas podem induzir apoptose não estão bem esclarecidos, porém a ligação e internalização das lectinas são consideradas eventos cruciais para que ocorra a indução de apoptose (THIES et al., 2005).

As lectinas, por serem proteínas que se ligam a resíduos de carboidratos com certa especificidade, podem interagir com glicoproteínas de superfície celular que são expressas intensamente em determinadas células tumorais, podendo levar a mudanças significativas nas respostas relacionadas à transdução de sinais intracelulares (PARK et al., 2000). Foi demonstrado que lectinas da subtribo Diocleinae como ConBr (*Canavalia brasiliensis*), DGL (*Dioclea grandiflora*) e Dviol (*Dioclea violacea*), além de estimularem a ativação de linfócitos *in vivo*, induziram apoptose na mesma região dos linfonodos estimulados (BARBOSA et al., 2001). Lectinas da planta *Viscum album* têm sido utilizadas terapeuticamente como substância ativa contra células cancerígenas, com efeitos potentes sobre a proliferação celular, diferenciação e apoptose (KIM et al., 2001). Foi demonstrado que a lectina II de *Viscum album* induz apoptose em células mieloleucêmicas humanas U-937 (PARK et al., 2000).

Recentemente, outro trabalho demonstrou que a lectina II de *Viscum album* apresentou potente efeito na indução de substâncias pró-oxidantes intracelulares em células mieloleucêmicas humanas U-937, promovendo um aumento na geração de H_2O_2 intracelular e conseqüentemente podendo levar a produção de estresse oxidativo e morte celular apoptótica (KIM et al., 2003). Um estudo realizado por Thies e colaboradores (2005) enfatiza o efeito antiproliferativo direto dos extratos das três lectinas de *Viscum album* (Mistletoe Lectins I, II, III) em células de melanomas humanos *in vitro* pela indução de apoptose.

1.5.4 Atividade inseticida

Uma das áreas comuns à pesquisa de lectinas é seu uso na proteção de plantas ao ataque de insetos e fungos patogênicos (KAUR et al., 2006). As lectinas freqüentemente relatadas como inseticidas são lectinas de plantas monocotiledôneas com especificidade por manose (*monocot mannose-binding lectins*), que incluem espécies isoladas das famílias de angiospermas Amaryllidaceae, Araceae, Alliaceae, Orchidaceae, Liliaceae, Iridaceae e Bromeliaceae (BARRE et al., 1996; CHEN et al., 2005b; LIN et al., 2007), com destaque para a lectina da família Amaryllidaceae GNA (*Galanthus nivalis*

agglutinin). Apesar disso, lectinas pertencentes a outras famílias e que possuem a mesma especificidade por manose já foram caracterizadas como moléculas que possuem atividade inseticida (CHEN et al., 2005a).

Estudos recentes sobre a atividade inseticida de lectinas apresentam abordagens variadas. Lectinas com potencial inseticida são expressas em sistemas heterólogos com sucesso, como *E. coli*, e testadas diretamente na alimentação dos insetos, como parte de uma dieta artificial, e indiretamente, como um agente tópico (“*spray*”) sobre as folhas das plantas infestadas pelas pragas, como no trabalho desenvolvido por Luo e colaboradores (2005) com a lectina GNA, que demonstrou um efeito negativo direto sobre a fisiologia reprodutiva do afídio *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. Uma lectina presente nas folhas da leguminosa *Griffonia simplicifolia* (GS II) também foi expressa em *E. coli* e apresentou atividade inseticida contra *Callosobruchus maculatus* (ZHU et al., 1996).

A atividade tóxica das lectinas é baseada na ligação específica aos carboidratos presentes no trato digestório do inseto, sendo três tipos de interações possíveis: (a) ligação das lectinas à quitina na membrana peritrófica (para lectinas ligantes à quitina); (b) ligação das lectinas à glicoconjugados expostos nas células epiteliais ao longo do trato digestório e (c) ligação das lectinas a enzimas digestivas glicosiladas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Sabendo-se que uma dada lectina demonstra variação em seu potencial inseticida contra diferentes espécies de pragas, vários trabalhos vêm sendo realizados a fim de comparar as atividades biológicas entre lectinas e elucidar seus mecanismos de ação contra as pragas (SAUVION et al., 2004b; SHUKLA et al., 2005).

Estudos como o de Hogervorst e colaboradores (2006) demonstram o efeito diferencial da lectina de GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) sobre larvas de três espécies diferentes de afídios predadores. Além disso, novos genes que codificam lectinas com potencial inseticida (GIOVANINI et al., 2007) ou que expressam lectinas que demonstraram toxicidade em bioensaios baseados em dieta artificial (OLIVEIRA et al., 2004; KAUR et al., 2006) têm sido identificados, apontando alternativas na produção de plantas resistentes a pragas.

A engenharia genética oferece a possibilidade de incorporação de genes exógenos nos genomas de algumas espécies de plantas de importância econômica, como um gene que codifica uma lectina entomotóxica. Desta forma, a transgênese possibilitou grandes perspectivas para a produção de plantas em área suscetíveis a

doenças e para o controle de herbívoros (SAUVION et al., 2004a) em plantas como arroz (RAO et al., 1998; NAGADHARA et al., 2004), trigo (SHAH et al., 2005), batata (GATEHOUSE et al., 1996; COUTY et al., 2001) e tabaco (PANG et al., 2004).

Plantas transgênicas de arroz (*Oriza sativa* L.) que expressam o gene da lectina GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) foram produzidas por Rao et al (1998) e por Nagadhara et al (2004). Nos dois casos, a lectina expressa na planta diminuiu a sobrevivência e a fecundidade dos insetos das espécies *Nilaparvata lugens* (Homoptera) e *Sogatella furcifera* (Homoptera), respectivamente, que são importantes pragas do arroz. Plantas transgênicas de mostarda da Índia [*Brassica juncea* (L.) Czern.] foram desenvolvidas por Hossain e colaboradores (2006), expressando uma lectina de cebola (*Allium cepa* L. agglutinin, ACA) que conferiu proteção contra o afídio *Lipaphis erysimi*. No mesmo trabalho também foram produzidas plantas transgênicas expressando a lectina GNA, porém seu efeito é menos potente contra este inseto quando comparado ao efeito da ACA, o que demonstra a atividade inseticida espécie-específica.

1.6 *Bauhinia forficata* Link

Bauhinia forficata é conhecida popularmente como “pata-de-vaca” e é a espécie de *Bauhinia* mais utilizada no Brasil como planta medicinal antidiabética (JORGE et al., 2004). Esta espécie é uma planta arbórea, nativa do sul do Brasil, podendo ser encontrada do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (MIYAKE et al., 1986), na Argentina, Paraguai e Uruguai. Essa planta apresenta também potencial para uso em recuperação de áreas degradadas, plantios mistos e como ornamental (ATROCH et al., 2001).

Bauhinia forficata (Leguminosae), uma das cerca de 300 espécies do gênero *Bauhinia*, apresenta-se como uma árvore de porte médio, possuindo folhas uncinadas com formato semelhante a uma pata de vaca, flores brancas e frutos do tipo vagem linear. A infusão das folhas de *B. forficata* é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria (MARTINS et al., 1998).

Até o presente momento, não existem dados disponíveis a respeito da purificação de lectina de *B. forficata*, bem como de suas propriedades ou atividades biológicas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir e purificar a lectina recombinante de *B. forficata* a partir de sistema heterólogo em *E. coli* para sua

obtenção em larga escala, visando à caracterização de suas atividades biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um sistema de expressão heteróloga para a lectina recombinante de *Bauhinia forficata* Link (rBFL) em *E. coli* possibilitando estudos estruturais, funcionais e de aplicações biotecnológicas desta lectina.

2.2 Objetivos específicos

- Amplificação por PCR e clonagem do gene *bfl* em vetores de expressão de *E. coli*.
- Expressão do gene da lectina rBFL em *E. coli*.
- Purificação da lectina rBFL para a realização de ensaios biológicos.
- Avaliação da atividade antiproliferativa e/ou citotóxica da lectina rBFL em cultivos *in vitro* de linhagens tumorais humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de cólon (HT-29) e leucemia mielóide aguda (HL-60).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material biológico

Folhas jovens de *Bauhinia forficata* Link foram coletadas na cidade de Pelotas - Rio Grande do Sul, e levadas para processamento no Laboratório de Biologia Celular e Molecular Vegetal, localizado no Centro de Biotecnologia, Campus da Universidade Federal de Pelotas.

3.2 Extração do DNA genômico de *B. forficata*

O DNA genômico foi extraído e purificado de 0,5 g de folhas jovens de *B. forficata*. O protocolo para purificação foi baseado na utilização do reagente CTAB (cetil trietil amônia brometo). As proteínas foram removidas com clorofórmio:álcool isoamil (24:1) e a concentração e qualidade do DNA nas amostras foram determinadas pela razão entre as leituras de absorvância A_{260}/A_{280} nm. A qualidade da preparação do DNA também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.3 Amplificação por PCR e clonagem do gene *bfl* no vetor pCR2.1-TOPO

Primers complementares a seqüência da lectina BPA de *B. purpurea* (Genbank número de acesso D12481) foram desenhados com o auxílio do Programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.). Na extremidade 5' dos primers foram adicionados nucleotídeos correspondentes ao sítio de restrição para a enzima *KpnI*:

BFL Forward:

5' GGGGTACCATGCTTCTCTACAACTCAAA 3' (*KpnI*)

BFL Reverse:

5' GGGGTACCTAGAACACAACATAGTCCAT 3' (*KpnI*)

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo 300-600 ng de DNA genômico, $MgCl_2$ 2 mM, dNTP 0,2 mM, 6 ng. μ L⁻¹ de cada oligonucleotídeo e 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). A reação de PCR foi realizada em um termociclador programado para uma desnaturação inicial (5 min a 94°C) seguido de 34 ciclos de 1 min a 94°C, 40 s a

50°C e 2 min a 72°C. O ciclo final teve a duração de 8 min a 72°C. As amostras foram armazenadas a 4°C até a utilização. Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. O gene *bfl* foi clonado no vetor pCR 2.1 utilizando-se o sistema TOPO TA de clonagem (Invitrogen) segundo instruções do fabricante.

Após a confirmação da presença do inserto, três clones recombinantes foram selecionados e submetidos ao seqüenciamento utilizando-se 1 µL de plasmídeo juntamente com o kit de seqüenciamento DYEnamic™ ET termination (Amersham Biosciences) conforme protocolo do fabricante. As reações de seqüenciamento foram analisadas no seqüenciador MegaBACE 500 (Amersham Biosciences). A reação de seqüenciamento foi feita em triplicata e a qualidade das seqüências checada pela sobreposição dos fragmentos utilizando o programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.). A determinação da seqüência consenso foi obtida pelo alinhamento dos produtos obtidos utilizando o programa ClustalX.

3.4 Clonagem do gene *bfl* no vetor de expressão pQE30

Utilizando-se o DNA plasmideal do clone pCR2.1/*bfl* selecionado, amplificou-se o segmento de DNA correspondente ao gene da lectina de *B. forficata* (*bfl*), por PCR. Os primers utilizados foram desenhados no programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.), a partir das seqüências depositadas no GenBank:

BFL/pQE30 Forward:

5' CGGGATCCACAAGCTCAACCTTAAC 3' (*Bam*HI)

BFL/pQE30 Reverse:

5' CGGGGTACCTTACATACTGGAATAAGAG 3' (*Kpn*I)

A reação de amplificação (PCR) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo DNA plasmideal, 6 ng.µL⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM e 10% de tampão 10x da enzima Taq DNA polimerase. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (50°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Após os 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 7 min. O fragmento amplificado por PCR foi purificado utilizando o GFX™ PCR DNA and Gel Band

Purification Kit (Amersham Biosciences) e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O produto de PCR foi clonado no vetor pQE30. Para tal, o produto de PCR e o vetor pQE30 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I (Invitrogen). As reações foram incubadas a 37°C por 2 h, sendo acrescentado 2 µL da enzima fosfatase alcalina (CIP) ao vetor pQE30 nos últimos 30 min de reação. Após a incubação, o DNA e o vetor plasmidial digeridos foram purificados utilizando o GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. O fragmento genômico foi ligado ao vetor plasmidial utilizando T4 DNA Ligase (Invitrogen). Foram utilizadas quantidades equimolares de vetor e inserto, sendo a reação mantida em termociclador programado para um ciclo de 1h a 16°C e permanência a 4°C *overnight*. A reação de ligação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, e o produto da reação utilizado para a transformação em *E. coli* TOP10F.

3.5 Clonagem do gene *bfl* no vetor de expressão pET32a(+)

Utilizando-se o DNA plasmidial do clone pCR2.1/*bfl* selecionado, amplificou-se o segmento de DNA correspondente ao gene da lectina de *B. forficata* (*bfl*) por PCR, utilizando os seguintes primers:

BFL/pET32a(+) Forward:

5' GGGGATCCACAAAGCTCAACCTTAAC 3' (*Bam*HI)

BFL/pET32a(+) Reverse:

5' CGGAATTCTTACATACTGGAATAAGAG 3' (*Eco*RI)

A reação de amplificação (PCR) foi realizada em um volume final de 50 µL contendo DNA plasmidial, 6 ng.µL⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 1 unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM e 10% de tampão 10x da enzima Taq DNA polimerase. A reação foi submetida a um passo de desnaturação inicial (94°C, 5 min), seguido por 30 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (52°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Após os 30 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo final de extensão a 72°C por 7 min. O fragmento amplificado por PCR foi purificado utilizando o GFX™ PCR DNA and Gel Band

Purification Kit (Amersham Biosciences) e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O produto de PCR foi clonado no vetor pET32a(+). Para tal, o produto de PCR e o vetor pET32a(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (Invitrogen). As reações foram incubadas a 37°C por 2h, sendo acrescentado 2µL da enzima fosfatase alcalina (CIP) ao vetor pET32a(+) nos últimos 30 min de reação. Após a incubação, o DNA e o vetor plasmidial digeridos foram purificados utilizando o GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. O fragmento genômico foi ligado ao vetor plasmidial utilizando T4 DNA Ligase (Invitrogen). Foram utilizadas quantidades equimolares de vetor e inserto, sendo a reação mantida em termociclador programado para um ciclo de 1h a 16°C e permanência a 4°C *overnight*. A reação de ligação foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,7%, e o produto da reação utilizado para a transformação em *E. coli* TOP10F e *E. coli* BL21 Star (DE3).

3.6 Preparo de células competentes de *Escherichia coli*

Células competentes de *E. coli* TOP10F e *E. coli* BL21 Star (DE3) foram preparadas para eletroporação segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001) com algumas modificações. Cada frasco de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio LB foi inoculado com 5 mL de cultivo *overnight* a 37°C em meio LB de cada cepa de *E. coli*. Essas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação até atingirem densidade ótica (OD) entre 0,5-0,7 (OD₆₀₀=0,5-0,7). As culturas foram colocadas em tubos de centrifuga estéreis, resfriados em banho de gelo por 10 min, sendo o procedimento a seguir feito para cada cultura. Centrifugou-se a cultura a 4000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o pellet suspenso em 50 mL (mesmo volume inicial de meio de cultivo) de água a 4°C previamente esterilizada. Centrifugou-se a suspensão a 4000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o pellet dissolvido em 25 mL (metade do volume inicial de meio de cultivo) de glicerol a 10% a 4°C previamente esterilizado. Centrifugou-se novamente a suspensão a 4000 g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o pellet dissolvido em 0,5 mL de glicerol a 10%. Este volume foi distribuído em tubos de microcentrifuga estéreis (alíquotas de 50 µL). As células competentes utilizadas no

mesmo dia do preparo foram mantidas a 4°C, e as demais foram armazenadas a -70°C para utilização posterior.

3.7 Transformação de células competentes

Utilizou-se 1 µL da reação de ligação (vetor mais inserto) que foi homogeneizado com pipeta estéril em uma alíquota de célula competente previamente preparada de 50 µL. Esta mistura foi colocada em uma cuveta de eletroporação previamente resfriada em gelo, sendo a cuveta encaixada nos eletrodos do eletroporador (Bio-Rad Laboratories) ajustado para 2,5 kV de voltagem e realizado o choque elétrico. Após o processo de eletroporação adicionou-se imediatamente 450 µL de meio LB líquido e transferiu-se a mistura para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL de capacidade, que foi incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37°C por 1 h. O cultivo foi plaqueado em ágar LB sólido acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e a placa incubada a 37°C *overnight*.

As colônias que cresceram na placa, oriundas do processo de transformação e que supostamente possuem o plasmídeo recombinante pelo crescimento em meio contendo ampicilina, foram submetidas a um processo de triagem rápida pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2002). As colônias isoladas foram homogeneizadas em tubos de microcentrifuga contendo 15 µL de fenol clorofórmio (para a extração do DNA das colônias) e 15 µL de solução contendo água e tampão de amostra para gel de agarose. Os tubos de microcentrifuga foram agitados em vórtex e centrifugados a 14000 rpm por 2 min. A fase superior resultante nos tubos foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,7% juntamente com controle negativo (vetor sem inserto). A comparação foi feita através da migração no gel de agarose, ou seja, os clones que apresentavam o vetor mais o inserto *bfl*, migraram menos no gel de agarose em relação ao controle negativo (vetor sem inserto).

Os clones caracterizados como recombinantes nesta triagem foram selecionados e cultivados em 5 mL de LB líquido acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina a 37°C, *overnight*. Deste cultivo utilizou-se 3 mL para extração de DNA plasmideal através do GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences), sendo o DNA resultante desta extração submetido à digestão com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem, para checagem da presença do inserto através de eletroforese do produto da digestão em gel de agarose 0,8%. A presença e a correta inserção do

fragmento também foi analisada por seqüenciamento. A reação de seqüenciamento foi realizada em seqüenciador MegaBACE 500.

Após a confirmação dos recombinantes, os clones pET32a(+)/*bfl* foram cultivados em 5 mL de LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina a 37°C, *overnight*. Deste cultivo utilizou-se 3 mL para extração de DNA plasmideal através do GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences). O DNA resultante desta extração foi utilizado para a transformação por eletroporação na cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3), conforme descrito anteriormente. É importante ressaltar que esta cepa é apropriada para a expressão protéica dos clones pET32a(+)/*bfl*. Para os clones pQE30/*bfl*, a expressão foi realizada na cepa *E. coli* TOP10F. A presença do plasmídeo recombinante pET32a(+)/*bfl* foi novamente checada por digestão com as enzimas de restrição utilizadas na clonagem e eletroforese em gel de agarose 0,7%.

3.8 Expressão da lectina rBFL

Os clones recombinantes pQE30/*bfl* em *E. coli* TOP10F e pET32a(+)/*bfl* em *E. coli* BL21 Star (DE3) foram selecionados e submetidos a teste de expressão em pequena escala (10 mL). Foi colocado 1 mL de pré-inóculo de cada clone em 9 mL de LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, e a cultura incubada a 37°C até atingir a densidade ótica a 600 nm (OD_{600}) entre 0,5-0,7. Neste momento, foram recolhidas alíquotas de 1 mL de cada cultura, as quais foram centrifugadas a 14000 rpm por 1 min, eliminando-se o sobrenadante e guardando-se apenas as células, a -20°C. Realizou-se a indução com IPTG 0,3 mM, mantendo-se as culturas sob as mesmas condições por 3 h. Após este período foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada reação, em procedimento igual ao anterior. As alíquotas recolhidas antes e após a indução com IPTG foram preparadas e submetidas à SDS-PAGE 12% para verificar os clones que expressavam a proteína. O clone que expressou proteína em maior quantidade aparente foi escolhido para expressão em larga escala (500 mL), plaqueado por esgotamento em LB contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina, e incubado a 37°C, *overnight*.

A partir de uma colônia isolada da placa, um inóculo de 5 mL em LB líquido contendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina cultivado *overnight* a 37°C foi preparado e acrescentado em erlenmeyer contendo 500 mL de LB líquido com ampicilina 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A cultura foi mantida em agitador orbital a 200 rpm a 28°C até atingir OD_{600} entre 0,5-0,7. Neste momento, uma alíquota de 1 mL da cultura foi coletada como

controle não induzido. Em seguida foi adicionado IPTG 0,3 mM à cultura, que permaneceu incubada *overnight* sob as mesmas condições. Após esse período foi coletada outra alíquota como controle induzido da expressão. As alíquotas recolhidas foram processadas e submetidas à SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Blue, como controle da expressão. A expressão da proteína recombinante descrita acima foi realizada também na temperatura de crescimento de 15°C por 24 h.

A expressão da lectina recombinante foi confirmada por *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma). A lectina recombinante foi transferida para uma membrana de nitrocelulose após migração em SDS-PAGE 12%, a 150 kV por 2 h. A membrana de nitrocelulose foi então bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em PBST e incubada a 4°C *overnight*. A membrana foi lavada 5x com PBST e incubada com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:10.000 em PBST, sob agitação a 150 rpm durante 90 min. A membrana foi lavada 5x com PBST e a revelação das bandas foi realizada com o substrato diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂: misturou-se 0,006 g de DAB em 10 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), 0,1 mL de H₂O₂ a 30% e 1 mL de NiSO₄, sendo essa mistura homogeneizada e colocada sobre a membrana.

3.9 Expressão da lectina rBFL em diferentes cepas de *E. coli*

Este teste foi realizado com o objetivo de acompanhar a expressão do plasmídeo recombinante pET32a(+)/*bfl* em outras cepas de *E. coli* para verificar se há um aumento de expressão da proteína recombinante nas demais cepas utilizadas (Tabela 1) em comparação à cepa padrão (*E. coli* BL21 Star (DE3)).

As cepas foram plaqueadas em LB com antibiótico apropriado (Tabela 1) pela técnica de esgotamento, para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas à 37°C, *overnight*, para o crescimento das colônias. Após o tempo de incubação, verificou-se a presença de colônias isoladas de todas as cepas. Uma colônia isolada de cada cepa foi utilizada para a transformação por choque térmico. Este procedimento foi realizado em tubos de microcentrifuga, sendo feita uma reação para cada cepa em teste. Colocaram-se em cada reação 200 µL de CaCl₂ 0,1 M, uma colônia isolada da cepa em teste, homogeneizando-a com a pipeta, e 1 µL do DNA plasmideal em cada tubo. As reações foram mantidas em gelo por 15

min e após submetidas a 42°C em banho-maria por 1 min (choque térmico). As reações foram novamente colocadas em gelo por 2 min, acrescentou-se 0,5 mL de LB líquido e incubou-se a 37°C em agitador orbital por 1 h. Após este período, todo o conteúdo de cada reação foi colocado em 2 mL de LB acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina (marca de seleção para o plasmídeo recombinante pET32a(+)/*bfl* 5), e 50 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol, quando foi o caso, sendo estes inóculos incubados a 37°C em agitador orbital, *overnight*.

Após o período de incubação, os inóculos foram expandidos com LB líquido acrescido do antibiótico apropriado para um volume de 15 mL, e mantidos a 37°C em agitador até atingirem a OD₆₀₀ entre 0,5-0,7. Neste momento, foram recolhidas alíquotas de 1 mL de cada reação, as quais foram centrifugadas a 14000 rpm por 1 min, eliminando-se o sobrenadante e guardando-se apenas as células, a -20°C. Realizou-se a indução com IPTG 0,3 mM, mantendo-se as culturas sob as mesmas condições por 3 h. Após este período foram coletadas alíquotas de 1 mL de cada reação, em procedimento igual ao anterior. As alíquotas recolhidas antes e após a indução foram preparadas e submetidas à SDS-PAGE 12%.

Tabela 1 – Cepas utilizadas nos testes de expressão da rBFL, submetidas à transformação com o vetor pET32a(+)/*bfl*, e suas respectivas marcas de seleção.

Cepa	Marca de Seleção
<i>E. coli</i> (DE3) C41	Ampicilina (100 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> (DE3) C43	Ampicilina (100 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> (DE3) origami	Cloranfenicol (50 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> origami pLysS	Cloranfenicol (50 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RP	Cloranfenicol (50 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) RIL	Cloranfenicol (50 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Groel	Cloranfenicol (50 µg.mL ⁻¹)
<i>E. coli</i> (DE3) CY pLysS	Cloranfenicol (50 µg.mL ⁻¹)

3.10 Purificação e quantificação da lectina rBFL

As culturas submetidas à expressão foram centrifugadas por 20 min a 7000 g a 4°C, e o pellet suspenso e tratado com tampão de lavagem (uréia 8 M; NaH₂PO₄ 200 mM; NaCl 0,5 M; imidazole 5 mM; pH 8,0) acrescido de Triton X-100 a 0,05% para promover a lise celular, sob agitação por 1 h. As células foram lisadas por sonicação (2 ciclos sucessivos de 10 s a 20 kHz) e centrifugadas por 1 h a 7000 g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado para análise em SDS-PAGE 12%; o pellet foi homogeneizado e tratado com tampão de solubilização acrescido de uréia 8 M e Triton X-100 a 0,05%, a temperatura ambiente sob agitação, *overnight*. A amostra foi centrifugada por 1 h a 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro 0,8 µm (Millipore) e submetido à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Ni⁺²-Sepharose (Amersham Biosciences). As proteínas foram eluídas através de um gradiente de imidazole, em tampão de eluição (uréia 8 M; NaH₂PO₄ 200 mM; NaCl 0,5 M; imidazole 200 mM; pH 8,0). Os eluatos foram coletados em frações de 1mL e submetidos à SDS-PAGE 12%. O tratamento do pellet para solubilização dos corpúsculos de inclusão foi também realizado com lauril-sarcosine a 0,2% substituindo a uréia 8 M, em procedimento idêntico ao descrito acima.

As alíquotas coletadas contendo a proteína recombinante foram dialisadas utilizando-se sacos de celulose para diálise (Sigma). Os sacos de diálise, contendo as proteínas, foram acondicionados em becker com capacidade para 1 L. A proteína foi dialisada de forma lenta, contra 1 L de tampão PBS contendo Triton X-100 a 0,05% a 4°C sob agitação durante 72 h, com trocas periódicas de 500 mL do tampão de diálise. A concentração da proteína após a diálise foi feita colocando-se os sacos de diálise em contato com sacarose. O volume de proteína resultante foi separado em alíquotas, sendo parte destas conservadas sob congelamento (-20°C) com glicerol a 10% e a outra parte liofilizada. A lectina recombinante purificada foi submetida à SDS-PAGE 12% na ausência e na presença de β-mercaptoetanol para a verificação da formação de dímeros, e à *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma).

As amostras obtidas da purificação foram quantificadas pelo método de curva padrão com albumina sérica bovina (BSA) em SDS-PAGE 12%. A BSA foi previamente preparada na concentração 1 µg.µL⁻¹. Foi preparada uma solução contendo 25 µL de BSA (1 µg.µL⁻¹), com 10 µL de tampão de amostra para SDS-

PAGE e 15 μL de água purificada em sistema Milli-Q, resultando em 50 μL de uma solução com BSA na concentração $0,5 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$. Foram aplicadas quantidades de 1 μL , 2 μL , 4 μL , 6 μL e 8 μL desta solução em SDS-PAGE 12% (concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$, respectivamente) juntamente com as amostras a serem quantificadas. As bandas nos géis SDS-PAGE 12% foram quantificadas por análise macroscópica e análise pelo software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences), que também estimou a massa molecular aparente das bandas.

3.11 Determinação da atividade hemaglutinante da lectina rBFL

Primeiramente foram adicionados a cada tubo de ensaio 150 μL de solução contendo Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,6 e 50 μL de solução contendo CaCl_2 e MnCl_2 200 mM. Foram feitos um controle positivo, adicionando-se a estes reagentes 50 μL da lectina nativa de *Bauhinia variegata* L., e um controle negativo, sem lectina. Adicionou-se 50 μL da amostra da lectina recombinante purificada em um tubo e foram feitas diluições seriadas da amostra nos demais tubos (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc.). Após foram adicionados 100 μL de hemácias de coelho a 2% (previamente tratadas com heparina sódica e lavadas 7x com NaCl 0,15 M) em cada reação, inclusive nos controles. As reações foram incubadas a 37°C por 30 min. Após repouso por 30 min à temperatura ambiente, a leitura dos ensaios foi realizada por inspeção macroscópica da ocorrência de aglutinação, e o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH) e cálculo da concentração mínima para aglutinar hemácias.

3.12 Clivagem da lectina rBFL com enzima enteroquinase

Foram digeridas 160 μg de proteína rBFL diluída em 450 μL de água purificada em sistema Milli-Q, com 8 μL de enteroquinase e 50 μL de tampão da enzima. A lectina usada neste ensaio apresentava-se ativa em ensaio de atividade hemaglutinante. A reação foi armazenada à temperatura ambiente, *overnight*. O cálculo da quantidade de proteína a ser utilizada foi feito com base na informação de que cada 1 μL da enzima enteroquinase cliva aproximadamente 20 μg de proteína. Após o período de ação da enzima, a proteína clivada foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de Agarose α -Lactose (Sigma). As frações correspondentes à proteína rBFL foram eluídas da coluna com solução contendo glicina 0,1 M e NaCl 0,15 M pH 2,6, e testadas quanto à atividade hemaglutinante.

As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram submetidas à SDS-PAGE 12% e à diálise, como descrito anteriormente.

3.13 Atividade da lectina rBFL sobre a proliferação celular de linhagens tumorais

Os ensaios relatados a seguir foram realizados no Laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia da UFPel. As linhagens celulares tumorais testadas foram adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e leucemia mielóide aguda (HL-60).

As linhagens celulares MCF-7 e HL-60 foram cultivadas em frascos de poliestireno de 25 cm² TPP de superfície com 10 mL de meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF) a 10%, a temperatura de 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%; a linhagem celular HT-29 foi cultivada sob as mesmas condições, porém em meio de cultivo DMEM suplementado com SBF a 10%. As linhagens foram mantidas através de repiques celulares e do acompanhamento do crescimento celular a cada 24 h através do cálculo da densidade celular em microscópio óptico invertido, por técnicos do Laboratório de Biologia Celular, sendo os cultivos congelados e descongelados quando necessário.

O número de células de cada linhagem foi estabelecido em função do tempo de duplicação de cada linhagem celular (td) e do tempo previsto para a utilização das células (t). O trabalho foi realizado com cultivos celulares que estavam em fase exponencial de crescimento. Em um eppendorf, foram colocados 20 µL da suspensão e 20 µL de corante Azul de Trypan a 0,4%, totalizando 40 µL. Essa mistura foi colocada em uma Câmara de Neubauer e levada ao microscópio invertido para a contagem das células e inferência da viabilidade celular. Foram contadas as células dos quatro quadrantes da câmara. A seguinte fórmula foi utilizada:

$$NC = \frac{(NCV) \times 2 \times 5 \times 10^4}{4}$$

NC – número de células presentes em 1 mL

NCV – número de células vivas contadas nos 4 quadrantes (média)

2 – diluição do corante

5 – fator de diluição

10^4 – conversão para 1 mL

As células foram semeadas em placas de poliestireno de 96 cavidades, suspensas em 100 μ L de meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%. As linhagens celulares MCF-7, HT-29 e HL-60 foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células/poço. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h, para permitir a aderência das células à placa de cultivo. O tempo de aderência (T_0) pode variar segundo a linhagem celular, por isso determinou-se 24 h. Após, foram adicionadas ao cultivo as diferentes concentrações da lectina recombinante preparadas, resultando num volume total de 2 μ L/cavidade.

Foram testadas 3 réplicas para cada concentração da lectina (T). Na mesma placa foram preparados “controles” (C), cultivos paralelos que continham células e o diluente ou excipiente da lectina (glicerol a 10%), e “brancos”, cavidades que não continham células, apenas meio de cultivo e as concentrações da lectina. Em outra placa, a suspensão celular foi distribuída em cavidades que serviram para medir, uma vez corada, a densidade óptica correspondente ao número de células de partida (T_0), ou seja, as células aderidas na placa após 24 h de incubação. Esta placa, chamada de “placa ao tempo zero”, também continha réplicas de cavidades que serviram de reativo branco para os valores de T_0 .

Após a incubação das placas a 37°C por 48 h, as células foram fixadas pela adição de 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 50% a 4°C, para MCF-7 e HT-29, e TCA a 80% a 4°C para HL-60, em cada cavidade, sendo as placas incubadas a 4°C por 1 h. O sobrenadante foi descartado e foram realizadas 5 lavagens com água destilada. As placas foram invertidas e secas a temperatura ambiente. A placa ao tempo zero (T_0) foi fixada com TCA a 50% após 24 h de cultivo (neste tempo foram adicionadas as concentrações teste), lavada e armazenada a 4°C até a coloração, realizada juntamente com as placas teste.

A coloração foi realizada pela adição de 100 μ L de solução de Sulforrodamina B (SRB), preparada com 0,4 g em ácido acético a 1%, em cada cavidade dos testes e dos controles. As placas foram incubadas durante 30 min a temperatura ambiente,

sendo a solução não fixada eliminada através de 5 lavagens com ácido acético 1%. As placas foram invertidas para secagem a temperatura ambiente. O corante foi ressolubilizado e fixado nas proteínas celulares pela adição de 100 µL de Tris Hidroximetil Amino Metano. As placas foram colocadas em agitador orbital a 200 rpm por 5 min e a leitura da OD foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm.

Os resultados da avaliação de atividade sobre as linhagens tumorais foram obtidos através da leitura no espectrofotômetro e analisados no software estatístico GraphPad Prism versão 4.0 para Windows. Com base nos resultados, foi avaliada a taxa de proliferação celular ao longo dos dias de teste.

Com base nos valores de OD₄₉₂ obtidos, foram calculadas as médias dos testes, dos controles e da placa ao tempo zero das réplicas. Desta forma foram obtidos três valores: **T₀**, referindo-se à OD correspondente ao número de células em cultivo a tempo zero; **C**, referindo-se à OD correspondente aos cultivos controle que cresceram apenas na presença do excipiente, sem a lectina, e **T**, referindo-se à OD correspondente às cavidades teste, que continham as diferentes concentrações da lectina.

A medida da viabilidade e sobrevivência celular após o cultivo foi expressa como %T/C [(OD de células tratadas)/(OD do controle celular) x 100]. Utilizando estas medidas, a resposta celular foi calculada nos termos de: estimulação do crescimento, ausência do efeito da lectina, inibição do crescimento e morte celular. Com base nisso, foram originados gráficos para a obtenção de curvas dose/resposta.

Se $T \geq T_0$, os resultados foram calculados segundo a seguinte fórmula:

$$[(T - T_0) / (C - T_0)] \times 100$$

Se $T < T_0$, o qual significa que o produto causa morte celular, os resultados foram calculados com a fórmula:

$$[(T - T_0) / T_0] \times 100$$

Desta forma, objetivou-se a construção de curvas dose/resposta e a partir delas foram calculados 3 níveis de efeito, quando possível:

CI₅₀: concentração inibitória do produto capaz de reduzir 50% o crescimento celular nos cultivos teste durante o período de incubação.

$$CI_{50}=100*[(T-T_0)/(C-T_0)]=50$$

CIT: concentração da lectina que causa inibição total do crescimento celular, quando a quantidade de proteína presente na cavidade ao final do período de incubação for igual aquela presente no tempo de adição da lectina rBFL.

$$CIT=T=T_0$$

CL₅₀: concentração do produto que causa 50% de redução da quantidade de proteína medida a tempo zero. Este valor indica que se tem reduzido o número de células presentes nas cavidades correspondentes.

$$CL_{50}=100*[(T-T_0)/T_0]=-50$$

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem do gene *bfl* no vetor pCR2.1-TOPO

O gene *bfl* foi clonado com sucesso no vetor de clonagem pCR2.1-TOPO. Três clones recombinantes foram selecionados visualmente pela coloração branca das colônias recombinantes, em meio de cultura contendo X-gal. As colônias foram cultivadas, tendo seu DNA plasmideal extraído, purificado e utilizado para o sequenciamento de DNA. Os resultados obtidos no sequenciamento não demonstraram diferenças nas seqüências de DNA entre os três clones selecionados, revelando uma seqüência codificante de 873 pb, incluindo o peptídeo sinal. A seqüência obtida, denominada gene *bfl*, está ilustrada na figura 1. O gene *bfl*, sem peptídeo sinal, resulta em uma seqüência de 780 pb.

```

*
atgcttctctacaactcaaaaccttatgttcttcaagtcattcttcataactttgtttctcaccctaactttcc
M L L Y N S K P Y V L Q V I F I T L F L T Q L S
aaggtgcagtcacaacttttaacaagcttcacgttccccaatttctgttcaaattccctagaaaatggtact
K V Q S T T L T S F T F P N F W S N S L E N G T
gaaataagcttcctaggcggagccacttatactcctggtgctctacatcttaccaggattgctgaagatggt
E I S F L G G A T Y T P G A L H L T R I A E D G
ttccctatgaaaagtgaacgcaggccaagcttcatttctcaccctgtgttcctttggaatagcacaggccat
F P M K S D A G Q A S Y S H P V F L W N S T G H
gaagcaagcttttacacttccttctccttcttataaaaaattctgatgttccaaaagttacagctgatggc
E A S F Y T S F S F L I K N S D V P K V T A D G
tttgccctctttcttgcacctccggtattctagcgtcaaaaattatggaggatgccttggaacttggtcacatca
F A L F L A P P D S S V K N Y G G C L G L V T S
tatgcaactgcggtgacctatcaaagaatcaatttgttgctgttggaatttgacacttggtccaaatgtagag
Y A T A A D P S K N Q F V A V E F D T W P N V E
tttcctgacccacctatccacataattggaattgatgttaactctactgtctccgttgcaactaagagatgg
F P D P P Y P H I G I D V N S T V S V A T K R W
gaaaacgctgatgcctatggtaacagaatcgccacagcccacataacctatgacgcctcatccaaatcata
E N A D A Y G N R I A T A H I T Y D A S S K I I
aatgttcttttaacttatgataatggtagaccttatgtactatctcatgttggtgattttccaaagatttctt
N V L L T Y D N G R P Y V L S H V V D F P K I L
ccaacatgggttcgtattggcttctctgcgggcactgggtataatgaacaacatatattctctcttggagc
P T W V R I G F S A G T G Y N E T T Y I L S W S
ttcacttcaacattggatagctccaaaatcagagccttgactcaaaacttaaggtccttcggcctcttattcc
F T S T L D S S K I R A L T Q N L R S S A S Y S
agtatgtaa
S M *
```

Figura 1 - Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos obtidos por sequenciamento dos clones pCR2.1/*bfl* contendo o gene *bfl*. O códon de iniciação e o sítio de terminação estão indicados por um asterisco. A seqüência sinal está indicada pela região sombreada (aminoácidos 1-31).

A análise da seqüência utilizando ferramentas de bioinformática como o programa BioEdit, revelou que a seqüência de *bfl* apresenta um conteúdo de G+C

de 41,58% e de A+T de 58,42% e elevada similaridade com as seqüências gênicas das lectinas de *B. purpurea* (BAULEC - D12481.1) e *G. simplicifolia* (GSI-B4 - AF428148.1) com 87% e 67% de similaridade, respectivamente, como pode ser observado na figura 2.



Figura 2 - Alinhamento das seqüências gênicas de *B. forficata* (BFL) e de outras duas lectinas de espécies da tribo Cercideae, *B. purpurea* (BAULEC) e *G. simplicifolia* (GSI-B4). As setas indicam as inserções de nucleotídeos no gene *bfl* em relação ao gene da lectina BAULEC, com a qual possui maior similaridade.

O alinhamento das seqüências *baulec* com a seqüência gênica *bfl* possibilita a verificação da existência de 12 gaps e 99 modificações entre os fragmentos correspondentes enquanto que *gsi-b4* possui 20 gaps e 172 modificações. Quando

comparamos o gene que codifica para a lectina BAULEC, verifica-se que as principais modificações entre estes genes podem ser observadas no final do peptídeo sinal entre as posições 100 e 110, com seis gaps em relação à sequência de *bfl* (Figura 2). Além disso, também é possível verificar que *bfl* possui seis inserções sendo três nas posições 56, 57 e 58 e as outras nas posições 622, 634 e 635. Assim, a sequência de aminoácidos da pró-proteína, com o peptídeo sinal é de 290 aminoácidos, igual à de BAULEC. As principais características da proteína madura são demonstradas na tabela 2.

Tabela 2 - Principais características deduzidas da cadeia madura da lectina BFL utilizando o programa Vector NTI 8.0 (Informax inc.).

Análise	Resultado
Comprimento do fragmento	259 aa
Massa molecular	28325,95 Daltons
1 microgram =	35,303 pMoles
Coeficiente de Extinção Molar	50900
A _[280] de 1 mg/mL	1,80 AU
Ponto Isoelétrico	5,43
Carga em pH 7,0	-5,71

4.2 Clonagem do gene *bfl* no vetor de expressão pQE30

Para a clonagem do gene *bfl*, foi realizada amplificação através de PCR utilizando o plasmídeo recombinante pCR2.1/*bfl* como molde. O produto de PCR purificado e o plasmídeo pQE30 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*II e ligados pela ação da enzima T4 DNA ligase. O produto da ligação foi utilizado para a transformação em *E. coli* TOP10F. A triagem dos clones recombinantes foi feita através de microprep das colônias que cresceram na placa resultante da transformação. Das 30 colônias isoladas selecionadas para o microprep, 4 foram classificadas como aparentemente recombinantes por apresentarem plasmídeos com maior massa molecular aparente em gel de agarose quando comparada à migração do vetor sem inserto. As colônias foram cultivadas e o DNA plasmideal extraído, purificado e digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose para confirmação da liberação do inserto. Apenas um desses

clones demonstrou a presença do gene *bfl* no gel de agarose e foi denominado pQE30/*bfl* (Figura 3). Foi feito estoque da cultura do clone em glicerol a 20%, mantido a -20°C. O seqüenciamento do clone também confirmou a presença do inserto.

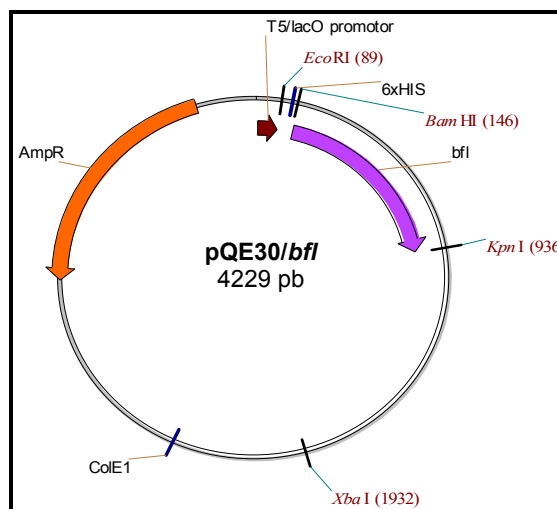


Figura 3 – Mapa do vetor de expressão pQE30/*bfl*.

4.3 Clonagem do gene *bfl* no vetor de expressão pET32a(+)

Para a clonagem do gene *bfl*, foi realizada amplificação através de PCR utilizando o plasmídeo recombinante pCR2.1/*bfl* como molde. O produto de PCR purificado e o plasmídeo pET32a(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e ligados pela T4 DNA ligase. O produto da ligação foi utilizado para a transformação em *E. coli* TOP10F. A triagem dos clones recombinantes foi feita através de microprep das colônias que cresceram na placa resultante da transformação. Das 30 colônias isoladas selecionadas para o microprep, 6 foram classificadas como aparentemente recombinantes por apresentarem plasmídeos com maior massa molecular aparente em gel de agarose quando comparada à migração do vetor sem inserto. As colônias foram cultivadas e o DNA plasmideal extraído, purificado e digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose para confirmação da liberação do inserto. Dois desses clones demonstraram a presença do gene *bfl* no gel de agarose, clones 5 e 16, conforme a numeração das colônias na placa da transformação. Foram feitos estoques das culturas desses dois clones em glicerol a 20%, mantidos a -20°C. O seqüenciamento de DNA do clone 5

confirmou a presença do inserto, e este clone, denominado pET32a(+)/*bfl* (Figura 4) foi selecionado para estudos de expressão em *E. coli*.

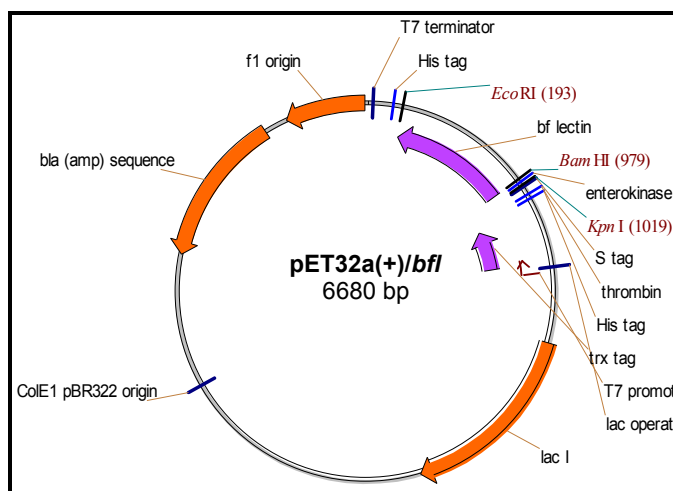


Figura 4 – Mapa do vetor de expressão pET32a(+)/*bfl*.

4.4 Expressão e purificação da lectina rBFL

Para obter a expressão da lectina rBFL em *E. coli*, a cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) foi transformada com os clones pET32a(+)/*bfl* 5 e 16, sendo que uma colônia de cada transformação foi selecionada e submetida a teste de expressão em pequena escala. Ambas expressaram a lectina, porém o clone pET32a(+)/*bfl* 5 apresentou uma banda mais intensa correspondente a lectina em SDS-PAGE (dado não mostrado). Em função disso, a expressão e a purificação da lectina recombinante em larga escala foi sempre realizada com o clone pET32a(+)/*bfl* 5. Durante a expressão da proteína em larga escala, verificou-se a presença da lectina recombinante apenas na forma insolúvel, em corpúsculos de inclusão, sendo sempre necessário o tratamento com agente desnaturante, uréia 8 M ou lauril-sarcosine a 0,2%. Nem a expressão a 15°C por 24 h possibilitou a expressão da lectina de forma solúvel, ou seja, presente no sobrenadante da cultura.

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando coluna de Ni²⁺-Sepharose, através do sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (Amersham Biosciences). As frações coletadas do ÄKTAPrime foram submetidas a um SDS-PAGE 12% para avaliar a purificação das proteínas recombinantes e a possível presença de proteínas inespecíficas.

Foram obtidos altos níveis de expressão e purificação da lectina recombinante BFL codificada pelo vetor pET32a(+)/*bfl* produzida em *E. coli*, através dos dois métodos de solubilização dos corpúsculos de inclusão, como demonstrado nas figuras 5 e 6. A lectina rBFL denota uma massa molecular aparente de 44 kDa em SDS-PAGE 12% e através de análise no software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences), compatível com o esperado pela expressão da lectina no vetor pET32a(+). A expressão da proteína foi confirmada por *Western blotting* com anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma).

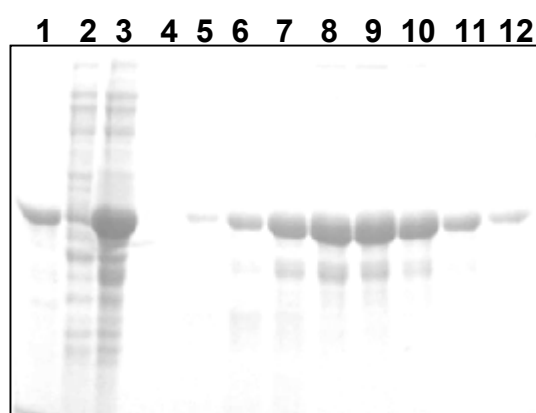


Figura 5 – SDS-PAGE 12% da purificação da rBFL por cromatografia de afinidade utilizando uréia 8 M para solubilização da proteína. 1, rBFL purificada; 2, amostra da cultura não induzida; 2, amostra da cultura induzida; 4 a 12, frações coletadas na purificação da lectina recombinante.

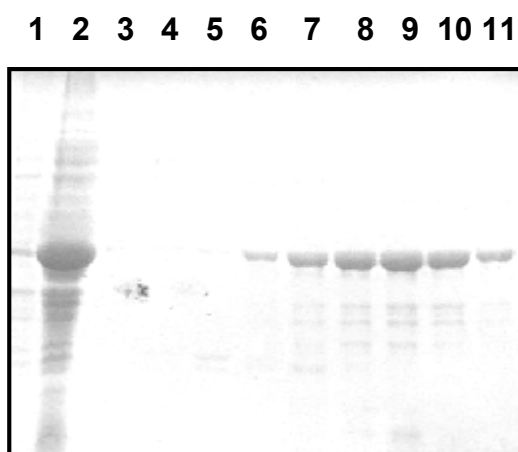


Figura 6 – SDS-PAGE 12% da purificação da rBFL por cromatografia de afinidade utilizando lauril-sarcosine a 0,2% para solubilização da proteína. 1, amostra da cultura não induzida; 2, amostra da cultura induzida; 3 a 11, frações coletadas na purificação da lectina recombinante.

A lectina purificada foi também analisada em SDS-PAGE 12% na ausência e na presença do agente redutor β -mercaptoetanol (Figura 7). Na ausência deste, constatou-se que parte da lectina recombinante apresenta-se na forma de dímeros possuindo massa molecular de 94 kDa (Figura 7), o que condiz com a massa molecular esperada considerando-se a fração monomérica da lectina rBFL fusionada e pela análise no software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences) (Figura 8). Ambas as bandas, correspondentes às frações monomérica e dimérica da proteína, respectivamente, reagiram em *Western blotting* com os anticorpos monoclonais anti-cauda poli-histidina conjugados com peroxidase (Sigma), como demonstrado na figura 9. O maior rendimento obtido da lectina recombinante foi de 40 mg.L⁻¹ de cultura, resultante do tratamento com uréia 8 M. Durante a diálise, observou-se pequena precipitação da lectina rBFL. Mudanças de pH foram realizadas na solução de diálise e observou-se que a lectina precipitou em função do pH, sendo que não houve precipitação da lectina em valores de pH entre 2,5 e 3,5.

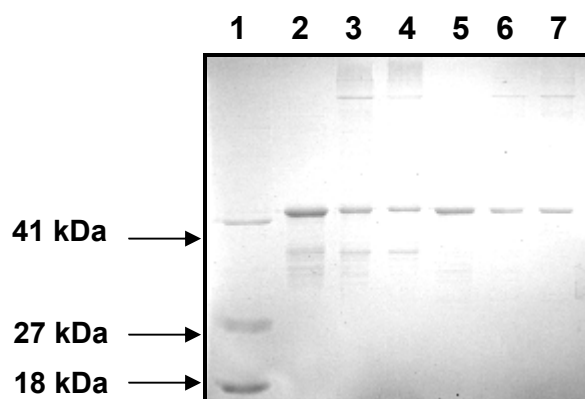


Figura 7 – SDS-PAGE 12% de frações da purificação da rBFL com uréia e lauril-sarcosine, tratadas com e sem β -mercaptoetanol (β -ME). 1, marcador molecular; 2, purificação com uréia, tratada com β -ME; 3, purificação com uréia, não tratada com β -ME; 4, purificação com uréia, não tratada com β -ME e não fervida; 5, purificação com lauril-sarcosine, tratada com β -ME; 6, purificação com lauril-sarcosine, não tratada com β -ME; 7, purificação com lauril-sarcosine, não tratada com β -ME e não fervida.

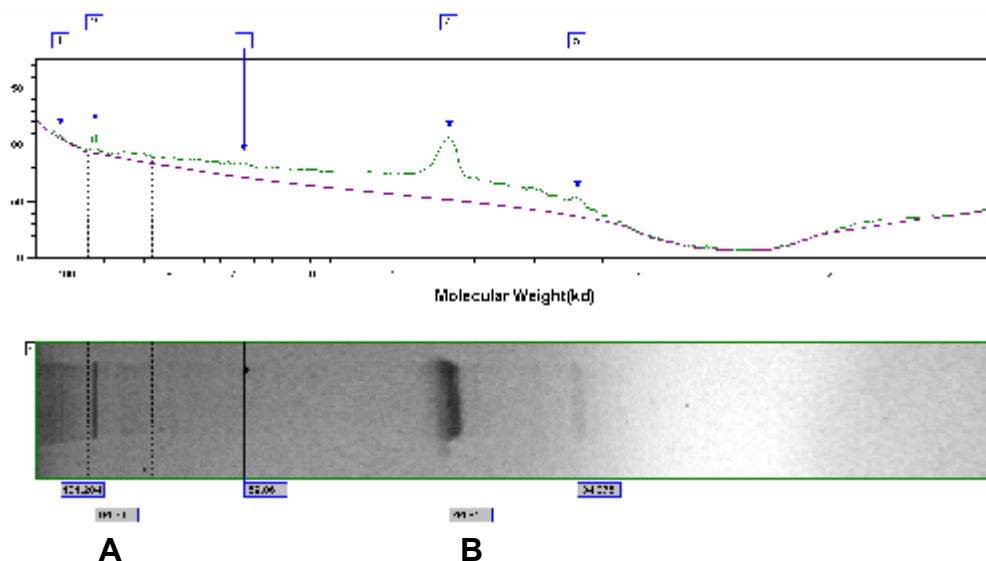


Figura 8 – Massa molecular das bandas das frações dimérica (A – pico 2) e monomérica (B – pico 4) da rBFL, estimado pelo software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences).

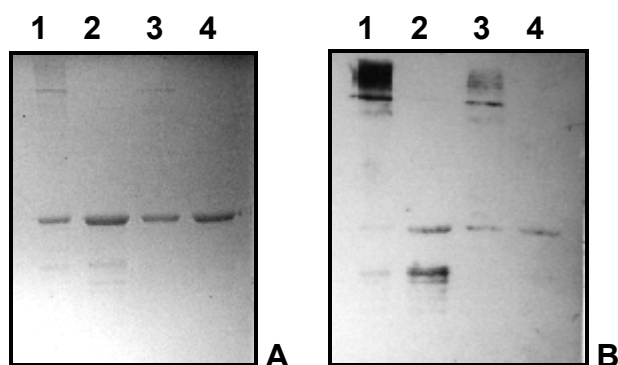


Figura 9 – Painel A: SDS PAGE 12% da lectina rBFL demonstrando as bandas correspondentes as frações dimérica e monomérica da proteína. Painel B: reação das bandas correspondentes às frações dimérica e monomérica da proteína em *Western blotting* com anticorpos monoclonais anti-cauda poli-histidina conjugados com peroxidase (Sigma). 1, purificação com uréia, não tratada com β -ME; 2, purificação com uréia, tratada com β -ME; 3, purificação com lauril-sarcosine, não tratada com β -ME; 4, purificação com lauril-sarcosine, tratada com β -ME.

4.5 Teste de expressão da lectina rBFL em diferentes cepas de *E. coli*

Testes de expressão com cepas variadas de *E. coli* (*E. coli* (DE3) C41, *E. coli* (DE3) C43, *E. coli* (DE3) origami, *E. coli* origami pLysS, *E. coli* BL21 (DE3) RP, *E. coli* BL21 (DE3) RIL, *E. coli* BL21 (DE3) Groel, *E. coli* (DE3) CY pLysS) transformadas por choque térmico foram realizados. Apenas três das oito cepas (*E. coli* BL21 (DE3) RP, *E. coli* BL21 (DE3) RIL e *E. coli* origami pLysS) foram transformadas com plasmídeo pET32a(+)/*bfl* 5 e expressaram a lectina (Figura 10), porém não foi verificado aumento aparente da expressão através de SDS-PAGE 12% quando comparado com a cepa padrão utilizada (dado não mostrado). Desta forma, manteve-se a expressão da lectina em larga escala na cepa *E. coli* BL21 Star (DE3).

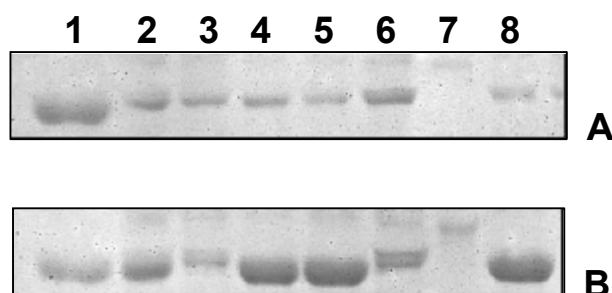


Figura 10 – Expressão da lectina rBFL em diferentes cepas de *E. coli* em gel SDS-PAGE 12%. Painel A: amostras não induzidas das culturas; Paine B: amostras induzidas das culturas. 1, rBFL purificada; 2, *E. coli* (DE3) C41; 3, *E. coli* (DE3) C43; 4, *E. coli* BL21 (DE3) RP; 5, *E. coli* BL21 (DE3) RIL; 6, *E. coli* BL21 (DE3) Groel; 7, *E. coli* (DE3) CY pLysS; 8, *E. coli* origami pLysS.

4.6 Quantificação da lectina rBFL

A quantificação das proteínas, após a diálise, através da curva de BSA em SDS-PAGE 12% e do software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences) demonstrou resultados compatíveis, sendo que a proteína tratada com uréia teve concentração de 0,25 mg.mL⁻¹, e a proteína tratada com lauril-sarcosine, 0,19 mg.mL⁻¹ (Figura 11). A banda de proteína dimerizada resultante do tratamento com uréia 8 M também foi quantificada pelo software TotalLab 2.0 (Amersham Biosciences), apresentando concentração estimada de 5 µg.mL⁻¹.

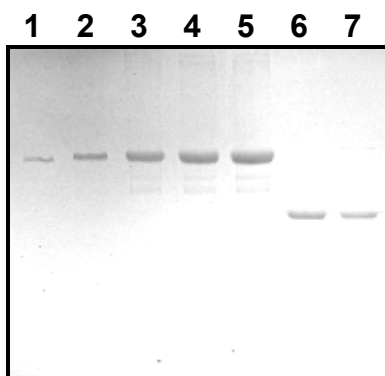


Figura 11 - Quantificação da lectina rBFL com curva de BSA em SDS-PAGE 12%. 1, BSA 0,5 µg/µL; 2, BSA 1 µg/µL; 3, BSA 2 µg/µL; 4, BSA 3 µg/µL; 5, BSA 4 µg/µL; 6, lectina rBFL (purificação com uréia 8 M); 7, lectina rBFL (purificação com lauril-sarcosine a 0,2%).

4.7 Atividade hemaglutinante da lectina rBFL

A lectina recombinante obtida da fração tratada com lauril-sarcosine a 0,2% não apresentou qualquer atividade hemaglutinante. As frações de proteína purificada que foram liofilizadas não apresentaram atividade hemaglutinante após sua recuperação. Portanto, apenas a proteína proveniente do tratamento com uréia 8 M, expressa nas temperaturas de 15°C e 28°C, apresentou atividade hemaglutinante, na presença de íons Ca^{+2} e Mn^{+2} . A lectina não apresentou atividade hemaglutinante em nenhum momento na ausência desses íons na reação. Quando comparada à lectina nativa de *Bauhinia variegata* L. (usada como controle positivo nas reações), a lectina rBFL apresenta menor atividade hemaglutinante.

A maior atividade hemaglutinante foi demonstrada pela lectina expressa a 15°C e tratada com uréia 8 M para solubilização dos corpúsculos de inclusão. A unidade hemaglutinante (UH) foi expressa como o inverso da maior diluição capaz de aglutinar eritrócitos de coelho por visualização macroscópica, sendo que $\text{UH}=16$, uma vez que a maior diluição que apresentou aglutinação foi 1/16. A menor concentração desta lectina capaz de aglutinar eritrócitos de coelho foi $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

4.8 Clivagem da lectina rBFL com enzima enteroquinase

No ensaio de clivagem com a enzima enteroquinase, após o período de incubação, a fração da proteína tratada foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna de Agarose α -Lactose (Sigma), a fim de purificar a proteína. As frações

de 1 mL eluídas da coluna com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 foram submetidas a ensaio de atividade hemaglutinante em tubos de ensaio contendo tampão Tris HCl 0,1 M pH 7,6 para evitar a hemólise celular, sendo as frações ativas reunidas para confirmação em SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese nenhuma banda foi observada no gel, impossibilitando a quantificação da lectina tratada com enteroquinase. Apesar disso, foi verificado, por visualização macroscópica, que esta lectina apresentou maior atividade hemaglutinante quando comparada à atividade da lectina não tratada com enteroquinase. As amostras foram submetidas à diálise, concentração e ensaio de atividade hemaglutinante, não sendo constatada qualquer atividade.

Apesar da não realização de testes de inibição da atividade hemaglutinante com diversos carboidratos, a lectina recombinante demonstrou especificidade por lactose, pois foi purificada através de cromatografia de afinidade em coluna de Agarose α -Lactose (Sigma).

4.9 Atividade da lectina rBFL sobre a proliferação celular de linhagens tumorais

A atividade da lectina rBFL sobre a proliferação celular foi determinada por ensaio colorimétrico com SRB, onde as linhagens citadas anteriormente ficaram expostas 72 h ao efeito da lectina rBFL, com o objetivo de construir curvas dose-resposta para cada linhagem celular testada.

Para as linhagens HL-60 e MCF-7, as concentrações da lectina rBFL utilizadas foram 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a linhagem HT-29, as concentrações da lectina recombinante utilizadas foram 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. É importante ressaltar que a preparação de concentrações diferentes para cada linhagem é resultante de ensaios realizados em períodos distintos, pela indisponibilidade de todas as linhagens celulares no mesmo período.

Conforme ilustrado na figura 12, observou-se que todas as concentrações da lectina rBFL (300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiram a proliferação celular da linhagem leucêmica HL-60 quando comparadas ao controle (100%). No entanto, a inibição não foi proporcional à concentração, pois as concentrações maiores da lectina rBFL (200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiram a proliferação em relação ao controle, porém aumentaram a proliferação

celular quando comparadas as concentrações menores ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Estas apresentaram maior efeito inibitório em relação ao controle. Nenhuma das concentrações utilizadas da lectina rBFL induziu morte celular. Portanto, a lectina rBFL apresentou efeito antiproliferativo em todas as concentrações testadas sobre a linhagem HL-60, quando comparada ao controle, não demonstrando efeito dose dependente.

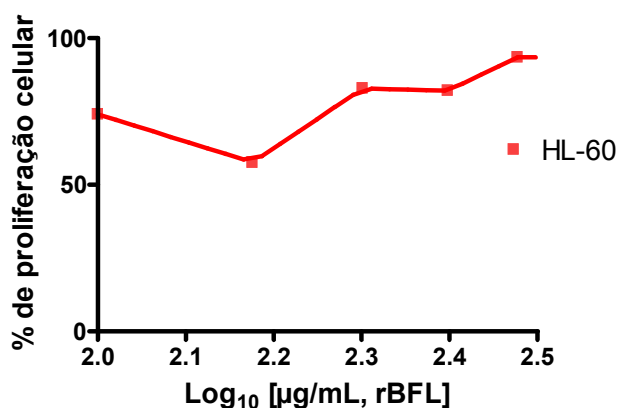


Figura 12 – Efeito da rBFL sobre a proliferação das células da linhagem HL-60.

Conforme ilustrado na figura 13, observou-se que as menores concentrações da lectina rBFL ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiram a proliferação celular da linhagem MCF-7 quando comparadas as concentrações maiores, e também quando comparadas ao controle. As concentrações maiores da lectina rBFL ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a proliferação celular quando comparadas as três concentrações menores utilizadas, e também em relação ao controle. Nenhuma das concentrações utilizadas da lectina rBFL induziu morte celular. Portanto, a lectina rBFL apresentou efeito antiproliferativo nas concentrações $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sobre a linhagem MCF-7, porém não demonstrou efeito dose dependente. Em contrapartida, nas concentrações de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a lectina rBFL apresentou efeito estimulante da proliferação celular.

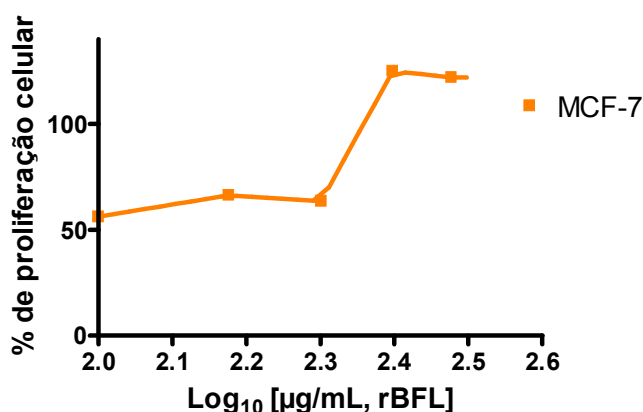


Figura 13 - Efeito da rBFL sobre a proliferação das células da linhagem MCF-7.

Conforme ilustrado na figura 14, observou-se que todas as concentrações da lectina rBFL ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$) inibiram a proliferação celular da linhagem HT-29 quando comparadas ao controle. O efeito inibitório apresentou-se maior nas concentrações $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A maior concentração utilizada, de $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$, inibiu a proliferação celular em aproximadamente 70% quando comparada ao controle. Nenhuma das concentrações utilizadas da lectina rBFL induziu morte celular. Portanto, observou-se um efeito dose dependente da lectina rBFL sobre a linhagem HT-29, pois houve inibição da proliferação conforme o aumento da concentração da lectina rBFL. A partir deste resultado, foi possível fazer o cálculo de CI_{50} , ou seja, da concentração inibitória da lectina rBFL capaz de reduzir 50% o crescimento celular nos cultivos teste durante o período de incubação, que foi $429,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\text{CI}_{50}=2.633$).

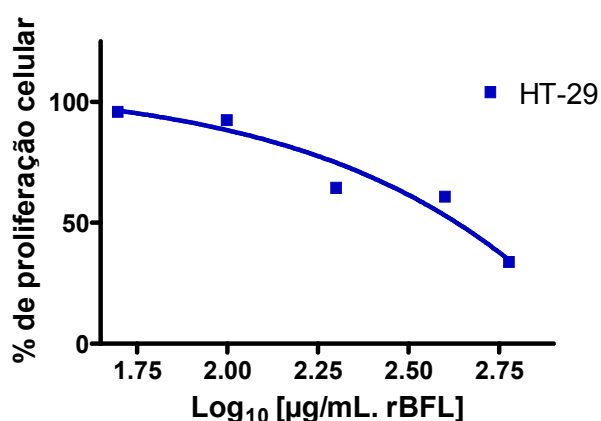


Figura 14 - Efeito da rBFL sobre a proliferação das células da linhagem HT-29.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, o objetivo foi desenvolver um sistema de expressão para a lectina de *B. forficata* (BFL) visando possibilitar estudos comparativos e de aplicações biológicas. Usando uma estratégia de amplificação direta por PCR do DNA genômico, similar àquela empregada para a lectina de *Erythrina cristagalli* (ECL) (STANCOMBE et al., 2003), *Myrabilis expansa* (VEPACHEDU et al., 2005) e *Bauhinia purpurea* (BPA) (KUSUI et al., 1991), foi possível obter a seqüência completa do gene que codifica para a lectina BFL.

A seqüência do gene *bfl* foi comparada a de outras lectinas de Caesalpinoideae e apresentou elevada identidade com estas lectinas, levando-nos a propor que a lectina BFL pode também apresentar características similares, sendo então passível de utilização em ensaios de aplicações biológicas. Além disso, a comparação entre o gene *bfl* e o gene *baulec* de *B. purpurea*, revela deleções e inserções que podem resultar numa diferença na afinidade fina a carboidratos e glicoconjugados de rBFL propiciando, dessa forma, mudanças marcantes nas atividades biológicas, tais como reconhecimento de células tumorais, inibição do crescimento de fungos e bactérias, entre outras.

É importante ressaltar que lectinas são encontradas em seu tecido original como uma mistura complexa de isoformas (VAN DAMME et al., 1998). A dificuldade de separação destas isoformas leva a propriedades funcionais e atividades biológicas definidas para uma mistura de proteínas. A expressão de lectinas de plantas fusionadas a um peptídeo sinal procariótico em bactéria demonstra ser um meio de seleção adequado (LUO et al., 2005), para o estudo isolado de cada isoforma. Este fato é relevante já que, mais recentemente, após o sequenciamento de outros clones isolados do vetor pCR2.1, foi possível confirmar que *B. forficata* possui isoformas de genes que codificam para lectinas, assim como já demonstrado para *G. simplicifolia* e *B. purpurea*, sendo a clonagem e expressão desses genes uma etapa importante na elucidação do papel fisiológico dessas proteínas na planta ou na sua utilização em estudos de atividade biológica.

Os vetores de expressão utilizados neste estudo, pQE30 e pET32a(+), codificam seqüências úteis como a cauda de 6 histidinas, necessária para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. Além disso, a escolha do vetor pET32a(+) se justifica por apresentar vantagens como a codificação da tiorredoxina (*Trx*), um

pequeno monômero protéico que auxilia na expressão solúvel de proteínas recombinantes, e um sítio de clivagem para a enzima enteroquinase, que permite a liberação da proteína de interesse sem resíduos da fusão. Embora muitas proteínas que são produzidas na forma insolúvel em *E. coli* tendem a se tornarem mais solúveis quando expressas em fusão com a tiorredoxina, como no trabalho desenvolvido por Wang e colaboradores (2004), onde obteve-se a cadeia A da abrina na forma solúvel em *E. coli*, resultado semelhante a este não foi alcançado no presente trabalho, nem mesmo aliado a baixas temperaturas de indução. Porém, a construção do vetor pET32a(+)/bfl possibilitou a expressão da lectina rBFL em níveis mais elevados, o que foi incrementado pela temperatura de indução de 15°C.

A estratégia de purificação da lectina rBFL de corpúsculos de inclusão e seu rendimento são compatíveis com os resultados obtidos para outras lectinas de leguminosas. O maior rendimento obtido da lectina rBFL foi de 40 mg.L⁻¹ de meio de cultivo. Este rendimento foi considerado alto e compatível com resultados relatados da expressão heteróloga de lectinas de plantas em *E. coli*, como a lectina inseticida de *Galanthus nivalis* (GNA), com rendimento de 42 mg.L⁻¹ (LUO et al., 2005), a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), com rendimento de 30 mg.L⁻¹ (NOGUEIRA et al., 2002) e a lectina antitumoral de *Viscum album* (Mistletoe III), com rendimento de 15 mg.L⁻¹ (PEVZNER et al., 2005). No trabalho desenvolvido por Chambery et al (2007), onde foi realizada a clonagem e expressão da cadeia β da lectina de *Adenia volkensii*, uma proteína inativadora de ribossomo (RIP), em *E. coli*, foram obtidos aproximadamente 5 mg.L⁻¹ da cadeia β recombinante após recuperação dos corpúsculos de inclusão insolúveis. O maior rendimento de lectina de leguminosa expressa em *E. coli* até o momento foi relatado em trabalho realizado por Stancombe e colaboradores (2003) com a lectina de *Erythrina cristagalli*, onde foram produzidos 870 mg.L⁻¹ de cultura, utilizando fermentador.

A expressão de lectinas em bactéria geralmente forma corpúsculos de inclusão, que consistem de proteínas recombinantes desnaturadas agregadas por pontes dissulfeto intra e intermoleculares incorretas. Segundo Vohra et al (2007), é imprescindível a utilização de métodos durante a purificação que promovam a formação de pontes dissulfeto para a recuperação de uma lectina com dobramento (*folding*) correto e biologicamente ativa. Outro aspecto relevante é a dificuldade de renovar a proteína após a purificação em condições desnaturantes. Houve pequena precipitação da lectina rBFL durante a diálise, em função do pH, o qual

deve também ser observado para a obtenção de lectina em suas formas associadas, biologicamente ativas.

Testes para verificar um possível aumento da expressão da lectina em outra cepa foram realizados, já que um dos principais objetivos do trabalho foi obter o maior rendimento possível da lectina para a realização dos testes de atividade biológica. Três das oito cepas utilizadas foram transformadas com o plasmídeo recombinante pET32a(+)/*bfl* 5 e expressaram a lectina rBFL, sendo que não houve aumento aparente da expressão nestas cepas quando comparadas à cepa padrão utilizada primeiramente. Desta forma, optou-se por manter a produção da lectina na cepa *E. coli* BL21 Star (DE3).

Na produção de lectinas recombinantes de leguminosas, o sistema de expressão em *E. coli* tem sido o mais empregado. Utilizando diferentes estratégias, as lectinas de *Bauhinia purpurea* (KUSUI et al., 1991), *Griffonia simplicifolia* (ZHU et al., 1996) e *Canavalia brasiliensis* (NOGUEIRA et al., 2002) têm sido expressas com sucesso. Outros sistemas heterólogos como *Pichia pastoris* são usados com eficiência para a produção de lectinas recombinantes, que são purificadas apresentando atividade hemaglutinante e demais propriedades funcionais (RAEMAEKERS et al., 1999; AMANO et al., 2003).

A lectina rBFL demonstrou especificidade por lactose através de cromatografia de afinidade em coluna de Agarose α -Lactose (Sigma). Este padrão de especificidade condiz com o esperado, uma vez que demais lectinas já isoladas de espécies do gênero *Bauhinia* possuem especificidade por galactose e/ou por açúcares que contenham galactose (como a lactose) ou seus derivados (como a *N*-acetilgalactosamina). Esse comportamento é igualmente observado nas lectinas nativas de *B. pentandra* (SILVA et al., 2001) e *B. purpurea* (YOUNG et al., 1985), e na lectina recombinante de *B. purpurea* (KUSUI et al., 1991). O último autor explica ainda que o grau de homologia entre seqüências de aminoácidos em lectinas de leguminosas é bastante alto, ou seja, essas lectinas possuem estrutura primária altamente conservada, o que está relacionado com a especificidade comum a carboidratos. Apesar disso, testes de inibição da atividade hemaglutinante com diversos carboidratos devem ser realizados com a lectina recombinante de *B. forficata* a fim de caracterizar um quadro geral de especificidade a mono e oligossacarídeos. Lectinas recombinantes de *Erythrina cristagalli* (STANCOMBE et

al., 2003) e *Griffonia simplicifolia* (ZHU et al., 1996) possuem a mesma especificidade por açúcares.

A atividade hemaglutinante, propriedade comum as lectinas, que foram primeiramente chamadas de hemaglutininas pela capacidade de aglutinar hemácias *in vitro*, também foi testada. O teste, que denota a atividade biológica dessas proteínas, mostrou resultados positivos, pois a lectina recombinante de *Bauhinia forficata* foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho, quando foi adicionada solução contendo os íons Ca^{+2} e Mn^{+2} à reação, igualmente a demais lectinas já isoladas (CECCATO et al., 2002; RAMOS et al., 1999; WONG & NG, 2005), inclusive a lectina de *Bauhinia pentandra* (SILVA et al., 2001).

Geralmente as lectinas são metaloproteínas e requerem íons divalentes como Ca^{+2} e Mn^{+2} para exibirem atividade biológica total. Os íons não interagem diretamente com o carboidrato, mas auxiliam na disposição adequada dos aminoácidos para a conformação do sítio de ligação do carboidrato (CAVADA et al., 2001). Muitas lectinas isoladas, como uma lectina da planta leguminosa *Crotalaria paulina* (PANDO et al., 2004) e uma lectina recombinante do caracol *Cepaea hortensis*, expressa em *E. coli* (GERLACH et al., 2005) independem da presença de íons divalentes para apresentarem atividade hemaglutinante. Muitas lectinas recombinantes produzidas em sistemas heterólogos possuem atividade hemaglutinante equivalente a lectina nativa, como ocorreu no trabalho desenvolvido por Amano et al. (2003), o que não aconteceu neste trabalho, apesar de ser verificada a hemaglutinação. A lectina isolada por Amano et al. (2003), porém, foi expressa em *Pichia pastoris*, o que pode ter contribuído para a maior atividade biológica da lectina recombinante em relação à nativa por possíveis modificações pós-traducionais na proteína por se tratar de expressão em organismo eucarioto. *E. coli* também é incapaz de glicosilar proteínas eucarióticas expressas por ela. Muitas lectinas são glicosiladas, e a presença ou ausência das cadeias laterais de carboidratos pode acarretar em efeitos significativos sobre as propriedades funcionais e/ou físicas das proteínas recombinantes (RAEMAEKERS et al., 1999).

Em ensaio de hemaglutinação, determinou-se que a menor concentração da lectina rBFL capaz de aglutinar eritrócitos de coelho foi de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A lectina rBFL possui menor capacidade hemaglutinante quando comparada a outras lectinas, como uma lectina recombinante da monocotiledônea *Zingiber officinale*, que apresentou concentração mínima de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para aglutinar eritrócitos de coelho

(CHEN et al., 2005a); uma lectina nativa de *B. pentandra*, com concentração mínima hemaglutinante de 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em eritrócitos de coelho (SILVA et al., 2001), e a lectina da leguminosa *Crotalaria paulina*, com concentração mínima hemaglutinante de 9,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em eritrócitos humanos (PANDO et al., 2004). O resultado demonstrado pela lectina rBFL é justificado pela pequena quantidade desta proteína na forma dimérica.

A formação de dímeros ou tetrâmeros é considerada um requisito essencial para a atividade biológica da proteína. Apesar disso, a lectina isolada da monocotiledônea *Allium tuberosum* por Lam & Ng (2001), apresentou atividade hemaglutinante mesmo existindo na planta na forma monomérica, diferentemente da grande maioria das lectinas já isoladas, relacionadas ou não a esta. A lectina demonstrou ainda atividade mitogênica e ação inibitória sobre a transcriptase reversa do HIV-1. Outra lectina monomérica foi isolada por Absar e colaboradores (2005). Os autores argumentam que esta lectina deve possuir 2 sítios de ligação em cada monômero, uma vez que demonstrou atividade biológica em ensaios de hemaglutinação e toxicidade. Comumente admite-se que cada fração monomérica da lectina possua apenas um sítio de ligação a carboidrato, havendo a necessidade, portanto, de oligomerização, ou seja, de associações quaternárias, para apresentar atividade biológica (BRINDA et al., 2005).

Uma vez que lectinas geralmente apresentam reações complexas de associação-dissociação (JIMÉNEZ et al., 2006; SHARON, 2007), é de extrema importância que se verifique a formação de dímeros/tetrâmeros e quais os fatores limitantes para a oligomerização da proteína. No presente trabalho, verificou-se que apenas uma pequena porção da proteína apresentou-se na forma dimerizada, sendo necessária maior observação dos parâmetros que influenciam na reação para que esta seja otimizada, como a utilização de tampões e protocolos mais adequados. A razão entre as espécies divalentes e tetravalentes, junto com mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação de carboidratos nas estruturas quaternárias das lectinas homólogas, são sugeridas como explicação para as diferentes atividades e potências biológicas em lectinas da subtribo Diocleinae, como ConA (*Canavalia ensiformes*) e ConBr (*Canavalia brasiliensis*) (CALVETE et al., 1999). Portanto, pode-se sugerir que a obtenção de grande quantidade da lectina rBFL na forma de dímeros acarretaria em maior atividade em ensaios de hemaglutinação e em ensaios biológicos.

A purificação de proteínas recombinantes em cromatografia de afinidade frequentemente inclui passos extras para remover a fusão da proteína alvo através de clivagens enzimáticas. A tentativa de retirada da fusão na lectina rBFL, realizada devido à presença de sítio de clivagem para a enzima enteroquinase (codificado pelo vetor pET32a(+)), resultou em maior atividade hemaglutinante por visualização macroscópica, porém não houve detecção da lectina em SDS-PAGE. Após a diálise, houve proteólise inespecífica, dissociação ou inativação da proteína, pois a lectina rBFL não demonstrou atividade hemaglutinante e não foi detectada em SDS PAGE.

O potencial antiproliferativo e antitumoral da lectina rBFL foi determinado através da avaliação da proliferação celular em ensaios colorimétricos *in vitro* utilizando as linhagens celulares tumorais MCF-7, HT-29 e HL-60. Tendo em vista os diversos efeitos provocados por lectinas em diferentes tipos de células, e a importância da descoberta de novos e eficientes agentes antitumorais, é de extrema importância tentar estabelecer os mecanismos envolvidos nas ações de lectinas sobre células tumorais e não tumorais (HAJTÓ et al., 2005; THIES et al., 2005).

A lectina rBFL apresentou efeito antiproliferativo frente as linhagens celulares MCF-7, HT-29 e HL-60 em determinadas concentrações testadas, quando comparada ao controle. Além disso, demonstrou efeito estimulatório da proliferação celular quando em concentrações maiores na linhagem MCF-7. Como se pode verificar através dos resultados obtidos, as concentrações menores da lectina rBFL demonstraram inibição da proliferação quando comparadas com concentrações maiores, nas linhagens HL-60 e MCF-7. Com isso, uma alternativa a ser testada para a confirmação desses resultados seria a utilização da lectina rBFL em concentrações mais diluídas nos ensaios de atividade. Portanto, a lectina recombinante de *B. forficata* apresentou nesses casos um comportamento inibitório da proliferação celular quando em baixas concentrações, e estimulante da proliferação celular quando em altas concentrações. Efeito estimulatório sobre a proliferação celular é demonstrado por lectinas como a Concanavalina A (ConA). Esta lectina, além da propriedade mitogênica pela estimulação de linfócitos e células do sistema imune, também possui atividade estimulatória sobre a proliferação de demais células (FITZGERALD et al., 2001), inclusive tumorais (KISS et al., 1997).

O comportamento da lectina rBFL sobre a proliferação da linhagem HT-29 apresentou efeitos diferenciados dos encontrados para as demais linhagens. Com base nos resultados obtidos, a inibição da proliferação celular apresentou-se

proporcional ao aumento da concentração da lectina rBFL, apresentando um efeito inibitório dose-dependente.

A lectina rBFL, nas concentrações utilizadas, não induziu morte celular em nenhuma das linhagens testadas, não demonstrando, portanto, atividade citotóxica.

Uma lectina isolada de *Arisaema jacquemontii* Blume por Kaur e colaboradores (2006a) possui atividade antiproliferativa contra algumas das linhagens tumorais testadas. Esta lectina teve efeito inibitório de 70% sobre a linhagem HT-29 na concentração testada de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, porém falhou para restringir a proliferação da linhagem MCF-7. Em outro trabalho desenvolvido por Kaur e colaboradores (2006b), uma lectina isolada de espécie do mesmo gênero anterior, *Arisaema helleborifolium* Schott, apresentou os mesmos efeitos relativos às linhagens HT-29 e MCF-7 em ensaio colorimétrico com SRB, podendo-se sugerir que lectinas semelhantes possuem atividade específica sobre determinada linhagem celular. No presente trabalho, a lectina rBFL também apresentou efeito inibitório de mesma proporção sobre a linhagem HT-29, porém em concentração maior ($600 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e igualmente não foi capaz de inibir a proliferação da linhagem MCF-7.

A lectina isolada do cogumelo *Agaricus bisporus* por Yu e colaboradores (1993) também possui atividade antiproliferativa sobre as linhagens HT-29 e MCF-7. Uma lectina do cogumelo *Agrocybe aegerita* (ZHAO et al., 2003) inibiu a proliferação de várias linhagens tumorais humanas, inclusive HL-60, na concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No trabalho realizado por Bains e colaboradores (2005), a lectina da monocotiledônea *Sauromatum venosum* demonstrou efeito antiproliferativo sobre a linhagem HT-29 equivalente ao da droga anticancerígena adriamicina.

Embora os exatos mecanismos moleculares causadores dos efeitos antiproliferativos das lectinas de plantas não estejam esclarecidos até o momento, hipóteses sugerem que este efeito está associado com a habilidade das lectinas para modular o crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose de células *in vitro* e *in vivo* (BAINS et al., 2005). Com isso, os resultados obtidos nesse estudo, apesar de não conclusivos, são de grande relevância para se conhecer o comportamento desta lectina sobre a proliferação das células tumorais testadas.

A padronização é requisito essencial para a realização dos ensaios com as linhagens tumorais, devendo ser levado em consideração para a obtenção de resultados confiáveis e na interpretação destes. Novos ensaios serão realizados

com concentrações padronizadas desta lectina para todas as linhagens celulares, e mais repetições dos ensaios serão feitas para confirmar os resultados.

Sabendo-se do crescente interesse no isolamento de lectinas vegetais e na produção de suas formas recombinantes com o objetivo de desvendar possíveis aplicações, os resultados obtidos no presente estudo mostram-se como uma colaboração à pesquisa de lectinas inéditas, motivando a realização de novos testes para a caracterização das atividades biológicas da lectina recombinante de *Bauhinia forficata*.

6 CONCLUSÕES

- O gene *bfl* de *Bauhinia forficata* foi clonado e seqüenciado neste estudo, e possui homologia com os genes que codificam as lectinas BAULEC e GSI-B4, das leguminosas *B. purpurea* e *G. simplicifolia*, respectivamente, além de similar especificidade a carboidrato, conforme esperado.

- *E. coli* expressa o gene *bfl* em altos níveis, permitindo a purificação de uma lectina inédita (rBFL) por cromatografia de afinidade, utilizando matriz de Ni⁺²-Sepharese.

- A lectina rBFL foi encontrada na forma de monômeros e dímeros, apresentando massa molecular relativa de 44 e 94 kDa, respectivamente. A produção da rBFL na temperatura de 15°C possibilitou maior expressão e atividade hemaglutinante.

- A lectina rBFL apresenta atividade hemaglutinante na presença de íons Ca⁺² e Mn⁺², sendo portanto biologicamente ativa e com potencial para uso em demais ensaios biológicos.

- A lectina rBFL possui efeito antiproliferativo sobre as linhagens tumorais humanas MCF-7, HT-29 e HL-60, dependente da concentração utilizada.

- A lectina rBFL, quando em altas concentrações, possui atividade estimulante da proliferação celular sobre a linhagem celular MCF-7.

- A lectina rBFL não induz morte celular nas linhagens celulares tumorais MCF-7, HT-29 e HL-60 em nenhuma das concentrações utilizadas, portanto não demonstrando efeito citotóxico nas condições testadas.

7 REFERÊNCIAS

- ABSAR, N.; YEASMIN, T.; RAZA, M. S.; SARKAR, S. K.; ARISAKA, F. Single step purification, characterization and N-terminal sequences of a mannose specific lectin from mulberry seeds. **The Protein Journal**, v. 24, n. 6, p.369-376, 2005.
- AMANO, K.; TAKASE, M.; ANDO, A.; NAGATA, Y. Production of functional lectin in *Pichia pastoris* directed by cloned cDNA from *Aleuria aurantia*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 10, p. 2277-2279, 2003.
- ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, P.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98–102, 1999.
- ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G. J.; SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.
- ATROCH, E. M. A. C.; SOARES, A. M.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* Link submetidas à diferentes condições de sombreamento. **Ciência Agrotécnica**, v. 25, n. 4, p.853-862, 2001.
- BAGARIA, A.; SURENDRANATH, K.; RAMAGOPAL, U. A.; RAMAKUMAR, S.; KARANDE, A. A. Structure-function analysis and insights into the reduced toxicity of *Abrus precatorius* agglutinin I in relation to abrin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34465-34474, 2006.
- BAINS, J. S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; NIJJAR, K. K.; AGREWALA, J. N.; KUMAR, V.; KUMAR, A.; SAXENA, A. K. Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 163-174, 2005.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.
- BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; SANTOS, W. L. C.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta tropica**, v. 60, p. 237-250, 1996.
- BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P. Structure-function relationship of monocot mannose-binding lectins. **Plant Physiology**, v. 112, p. 1531-1540, 1996.

BEZERRA, W. M.; CARVALHO, C. P. S.; MOREIRA, R. A.; GRANGEIRO, T. B. Establishment of a heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 216-223, 2006.

BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, M. V. V.; GARCIA, A. B.; FILHO, G. A. S. Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oriza sativa* L.). **Protein Expression and Purification**, v. 33, p. 34-38, 2004.

BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Review Article: Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochemical Journal**, v. 391, p. 1-15, 2005.

CAVADA, B. S.; MOREIRA-SILVA, L. I. M.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; PINTO, V. P. T.; BARRAL-NETTO, M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GOMES, J. C.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R.A. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 11, p. 74-80, 1996.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, v. 2, p. 123-135, 2001.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAID, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; ROCHA, I. M. A.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, n. 2, p. 367-375, 1999.

CECCATO, V. M.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; NOGUEIRA, N. A. P.; GRANGEIRO, M. B.; TEIXEIRA, E. H.; SAMPAIO, A. H.; ALVES, M. A. O.; RAMOS, M. V.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B. Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* Benth. seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 67-73, 2002.

CHAMBERY, A.; SEVERINO, V.; STIRPE, F.; PARENTE, A. Cloning and expression of the B chain of volkensin, type 2 ribosome inactivating protein from *Adenia volkensii* harms: co-folding with the A chain for heterodimer reconstruction. **Protein Expression and Purification**, v. 51, p. 209-215, 2007.

CHANDRA, N. R.; PRABU, M. M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering**, v. 14, n. 11, p. 857-866, 2001.

CHEN, Z.; KAI, G.; LIU, X.; LIN, J.; SUN, X.; TANG, K. cDNA cloning and characterization of a mannose-binding lectin from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Journal of Biosciences**, v. 30, n. 2, p. 101-108, 2005a.

CHEN, Z.; SUN, X.; TANG, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from *Dendrobium officinale*. **Toxicon**, v. 45, p. 535-540, 2005b.

COUTY, A.; DOWN, R. E.; GATEHOUSE, A. M. R.; KAISER, L.; PHAM-DELÈGHE, M. H.; POPPY, G. M. Effects of artificial diet containing GNA and GNA-expressing potatoes on the development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 1357-1366, 2001.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DUBOIS, B.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; VAN DAMME, J.; OPDENAKKER, G. Regulation of gelatinase B (MMP-9) in leucocytes by plant lectins. **FEBS Letters**, v. 427, p. 275-278, 1998.

ECK, J.; LANGER, M.; MÖCKEL, B.; BAUR, A.; ROTHE, M.; ZINKE, H.; LENTZEN, H. Cloning of the mistletoe lectin gene and characterization of the recombinant A-chain. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, p. 775-784, 1999.

FITZGERALD, A. J.; JORDINSON, M.; RHODES, J. M.; SINGH, R.; CALAM, J.; GOODLAD, R. A. Comparison of the effects of concanavalin-A and epidermal growth factor on epithelial cell proliferation in the rat intestine. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 15, p. 1077-1084, 2001.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature**, v. 2, p. 346-353, 2002.

GATEHOUSE, A. M. R.; DOWN, R. E.; POWELL, K. S.; SAUVION, N.; RAHBÉ, Y.; NEWELL, C. A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W. D. O.; GATEHOUSE, J. A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, n. 3, p. 295-307, 1996.

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

GIOVANINI, M. P.; SALTZMANN, K. D.; PUTHOFF, D. P.; GONZALO, M.; OHM, H. W.; WILLIAMS, C. E. A novel wheat gene encoding a putative chitin-binding lectin is associated with resistance against Hessian fly. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 1, p. 69-82, 2007.

GOTO, L. S.; BELTRAMINI, L. M.; MORAES, D. I.; MOREIRA, R. A.; ARAÚJO, A. P. U. *Abrus pulchellus* type-2 RIP, pulchellin: heterologous expression and refolding of the sugar-binding B chain. **Protein Expression and Purification**, v. 31, p. 12-18, 2003.

GUZMÁN-PARTIDA, A. M.; ROBLES-BURGUEÑO, M. R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, v. 86, p. 335-342, 2004.

HAJTÓ, T.; HOSTANSKA, K.; BERKI, T.; PÁLINKAS, L.; BOLDIZSÁR, F.; NÉMETH, P. Oncopharmacological perspectives of a plant lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): overview of recent results from *in vitro* experiments and *in vivo* animal models, and their possible relevance for clinical applications. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 59-67, 2005.

HASEGAWA, N.; KIMURA, Y.; ODA, T.; KOMATSU, N.; MURAMATSU, T. Isolated ricin B-chain mediated apoptosis in U937 cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 1422-1429, 2000.

HIRSCH, A. M.; LUM, M. R.; DOWNIE, J. A. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1484-1492, 2001.

HOGERVORST, P. A. M.; FERRY, N.; GATEHOUSE, A. M. R.; WÄCKERS, F. L.; ROMEIS, J. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, p. 614-624, 2006.

HOSSAIN, M. A.; MAITI, M. K.; BASU, A.; SEN, S.; GHOSH, A. K.; SEM, S. K. Transgenic expression of onion leaf lectin gene in indian mustard offers protection against aphid colonization. **Crop Science**, v. 46, p. 2022-2032, 2006.

JIMÉNEZ, M.; ANDRÉ, S.; SIEBERT, H. C.; GABIUS, H. J.; SOLÍS, D. AB-type lectin (toxin/agglutinin) from mistletoe: differences in affinity of the two galactose-binding Trp/Tyr-sites and regulation of their functionality by monomer/dimer equilibrium. **Glycobiology**, v. 16, n. 10, p. 926-937, 2006.

JORGE, A. P.; HORST, H.; SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B.; Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 89-96, 2004.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**. H 71, 234, 2002.

KANEDA, Y.; WHITTIER, R. F.; YAMANAKA, H.; CARREDANO, E.; GOTOH, M.; SOTA, H.; HASEGAWA, Y.; SHINOHARA, Y. The high specificities of *Phaseolus vulgaris* erythro- and leucoagglutinating lectins for bisecting GlcNAc or β 1-6-linked branch structures, respectively, are attributable to loop B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16928-16935, 2002.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; KAMBOJ, S. S.; SAXENA, A. K.; SHARMA, M.; BHAGAT, M.; SOOD, S. K.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 432-440, 2006a.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; SAXENA, A. K.; KHAN, R. H.; ASHRAF, M. T.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156–165, 2006b.

KIM, S. K.; LEE, J.; LEE, S. H. S.; JUNG, B. H.; CHUNG, S. Y.; MOON, S. R.; KIM, N. S.; KO, C. B.; KIM, H. J.; KIM, Y. K.; PARK, R. Gamma-Interferon (IFN-gamma) augments apoptotic response to mistletoe lectin-II via upregulation of Fas/Fas L expression and caspase activation in human myeloid U937 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23, p. 55-66, 2001.

KIM, S.K.; LEE, J.; LEE, K.M.; YANG, S.H.; CHOI, S.; CHUNG, S.Y.; KIM, T.Y.; JEONG, W.H.; PARK, R. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. **Life Sciences**, v. 73, p. 1231-1243, 2003.

KISS, R.; CAMBY, I.; DUCKWORTH, C.; DECKER, R. D.; SALMON, I.; PASTEELS, J. L.; DANGUY, A.; YEATON, P. In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. **Gut**, v. 40, p. 253-261, 1997.

KUSUI, K.; YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T. cDNA cloning and expression of *Bauhinia purpurea* lectin. **Journal of Biochemistry**, v. 109, p. 899-903, 1991.

LAM, Y. W.; NG, T. B. A monomeric mannose-binding lectin from inner shoots of the Edible Chive (*Allium tuberosum*). **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 361-366, 2001.

LAUS, M. C.; LOGMAN, T. J.; LAMERS, G. E.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; CARLSON, R. W.; KIJNE, J. W. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1704-1713, 2006.

LIN, J.; ZHOU, X.; GAO, S.; LIU, X.; WU, W.; SUN, X.; TANG, K. cDNA cloning and expression analysis of a mannose-binding lectin from *Pinellia pedatisecta*. **Journal of Biosciences**, v. 32, n. 2, 2007.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. **Applied Genetics and Molecular Biotechnology**, v. 69, p. 184-191, 2005.

LUTOMSKI, D.; IMAM-SGHIOUAR, N.; BLONDEAU, K.; CARON, M.; JOUBERT-CARON, R. Purification of human galectin-1 produced in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*: a comparison with classic shake flask cultivation. **Journal of Chromatography B**, v. 808, p. 105-109, 2004.

MARTINS, R. E.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E.; **Plantas Medicinais**, Ed. UFV: Viçosa, p. 155, 1998.

MIYAKE, E. T.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Pharmacognostic characterization of Pata-de-Vaca (*Bauhinia forficata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n. 1, p. 56-68, 1986.

NAGADHARA, D.; RAMESH, S.; PASALU, I. C.; RAO, Y. K.; SARMA, N. P.; REDDY V. D.; RAO, K. V. Transgenic rice plants expressing the snowdrop lectin gene (GNA) exhibit high-level resistance to the whitebacked planthopper (*Sogatella furcifera*). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 109, p. 1399-1405, 2004.

NOGUEIRA, N. A. P.; GRANGEIRO, M. B.; CUNHA, R. M. S.; RAMOS, M. V.; ALVES, M. A. O.; TEIXEIRA, E. H.; BARRAL-NETTO, M.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B. Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells. **Protein and Peptide Letters**, v. 9, n. 1, p. 59-66, 2002.

OLIVEIRA, J. T. A.; RIOS, F. J. B.; VASCONCELOS, I. M.; FERREIRA, F. V. A.; NOJOSA, G. B. A.; MEDEIROS, D. A. *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, n. 42, p. 1737-1747, 2004.

PANG, Y.; SHEN, G.; QI, H.; TAN, F.; SUN, X.; TANG, K. Transgenic tobacco expressing *Zephyranthes candida* agglutinin showing enhanced resistance to aphids. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, p. 155-159, 2004.

PANDO, L. A.; CARVALHO, D. D.; TOYAMA, M. H.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; PASCHOLATTI, S. F.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **The Protein Journal**, v. 23, n. 7, p. 437-444, 2004.

PARK, R.; KIM, M. S.; SO, H. S.; JUNG, B. H.; MOON, S. R.; CHUNG, S. Y.; KO, C. B.; KIM, B. R.; CHUNG, H. T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK 1) in mistletoe lectin II induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1685-1691, 2000.

PEVZNER, I. B.; AGAPOV, I. I.; PFUELLER, U.; PFUELLER, K.; MALUCHENKO, N. V.; MOISENOVICH, M. M.; TONEVITSKY, A. G.; KIRPICHNIKOV, M. P. Cloning and expression of mistletoe lectin III B-Subunit. **Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 306-315, 2005.

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

PINTO-DA-SILVA, L. H.; CAMURATE, M.; COSTA, K. A.; OLIVEIRA, S. M. P.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SARAIVA, E. M. B. *Leishmania* (Viannia) *brasiliensis* metacyclic promastigotes purified using *Bauhinia purpurea* lectin are complement resistant and highly infective for macrophages in vitro and hamsters in vivo. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1371-1377, 2002.

PRYME, I. F.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A.; EWEN, S. W.; PFÜLLER, U. A mistletoe lectin (ML-1)-containing diet reduces the viability of a murine non-Hodgkin lymphoma tumor. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, p. 52-56, 2004.

RAEMAEKERS, J. M. R.; MURO, L.; GATEHOUSE, J. A.; FORDHAM-SKELTON, A. P. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris*. Correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, p. 394-403, 1999.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; ROUGÉ, P. Structural similarities among Diocleinae lectins. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 11, p. 44-49, 1996.

RAMOS, M.V. Biosynthesis and structural lectin features of the *Phaseoleae*, *Diocleinae* and the *Vicieae* (*Leguminosae* = *Fabaceae*) under a phylogenetic perspective. **Journal of Comparative Biology**, v. 2, p. 129-136, 1997.

RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BOMFIM, L. R.; DEBRAY, H.; MAZARD, A.; CALVETE, J. J.; GRANGEIRO, T. B.; ROUGÉ, P. Interaction of the seed lectin from *Parkia platycephala* (Mimosoideae) with carbohydrates and complex glycans. **Protein and Peptide Letters**, v. 6, n. 4, p. 215-222, 1999.

RAO, K. V.; RATHORE, K. S.; HODGES, T. K.; FU, X.; STOGER, E.; SUDHAKAR, D.; WILLIAMS, S.; CHRISTOU, P.; BHARATHI, M.; BOWN, D. P.; POWELL, K. S.; SPENCE, J.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. **The Plant Journal**, v. 15, n. 4, p. 469-477, 1998.

RIOS, F. J. B.; CAVADA, B. S.; MEDEIROS, D. A.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Digestibility of plant lectins from *Canavalia*, *Cratylia*, *Dioclea* and *Artocarpus* genera. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 11, p. 277-284, 1996.

ROOPASHREE, S.; SINGH, S. A.; GOWDA, L. R.; RAO, A. G. A. Dual-function protein in plant defence: seed lectin from *Dolichos biflorus* (horse gram) exhibits lipooxygenase activity. **Biochemical Journal**, v. 395, p. 629-639, 2006.

ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A.; CAVADA, B. S. Single- and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15, n. 3, p. 341-348, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

SAUVION, N.; CHARLES, H.; FEBVAY, G.; RAHBÉ, Y. Effects of jackbean lectin (ConA) on the feeding behaviour and kinetics of intoxication of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 110, p. 31-44, 2004a.

SAUVION, N.; NARDON, C.; FEBVAY, G.; GATEHOUSE, A. M. R.; RAHBÉ, Y. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 1137-1150, 2004b.

SHAH, P. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; CLARK, S. J.; PELL, J. K. Wheat containing snowdrop lectin (GNA) does not affect infection of the cereal aphid *Metopolophium dirhodum* by the fungal natural enemy *Pandora neoaphidis*. **Transgenic Research**, v. 14, n. 4, p. 473-476, 2005.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.

SHERWANI, A. F.; MOHMOOD, S.; KHAN, F.; KHAN, R. H.; AZFER, A. Characterization of lectins and their specificity in carcinomas - an appraisal. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 18, n. 2, p. 169-180, 2003.

SHUKLA, S.; ARORA, R.; SHARMA, H. C. Biological activity of soybean trypsin inhibitor and plant lectins against cotton bollworm/legume pod borer, *Helicoverpa armigera*. **Plant Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1-6, 2005.

SILVA, A. L. C.; HORTA, A. C. G.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Bauhinia pentandra* (Bong) Vog. ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 262-269, 2001.

SILVA, A. L. C.; GOTO, L. S.; DINARTE, A. R.; HANSEN, D.; MOREIRA, R. A.; BELTRAMINI, L. M.; ARAÚJO, A. P. U. Pulchellin, a highly toxic type 2 ribosome-inactivating protein from *Abrus pulchellus*. Cloning, heterologous expression of A-chain and structural studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 272, p. 1201-1210, 2005.

SLIFKIN, M.; DOYLE, R. J. Lectins and Their Application to Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 3, p. 197-218, 1990.

STANCOMBE, P. R.; ALEXANDER, F. C.G.; LING, R.; MATHENSON, M. A.; SHONE, C. C.; CHADDOCK, J. A.. Isolation of the gene and large-scale expression and purification of recombinant *Erythrina cristagalli* lectin. **Protein Expression and Purification**, v. 30, p. 283-292, 2003.

THIES, A.; NUGEL, D.; PFÜLLER, U.; MOLL, I.; SCHUMACHER, U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. **Toxicology**, v. 207, p. 105-116, 2005.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W.; PUSTZAI, A.; BARDOCZ, S. **Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications**. Wiley, Chichester, UK. 1998.

VEPACHEDU, R.; PARK, S. W.; SHARMA, N.; VIVANCO, J. M. Bacterial expression and enzymatic activity analysis of ME1, a ribosome-inactivating protein from *Mirabilis expansa*. **Protein Expression and Purification**. v. 40, p. 142-151, 2005.

VOHRA, R. S.; MURPHY, J. E.; WALKER, J. H.; HOMER-VANNIASINKAM, S.; PONNAMBALAM, S. Functional refolding of a recombinant C-type lectin-like domain containing intramolecular disulfide bonds. **Protein Expression and Purification**, v. 52, p. 415-421, 2007.

WANG, L. C.; KANG, L.; HU, T. M.; WANG, J. L. Abrin-a A chain expressed as soluble form in *Escherichia coli* from a PCR-synthesized gene is catalytically and functionally active. **Biochimie**, v. 86, p. 327-333, 2004.

WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 439, p. 91-98, 2005.

WOOD-CHARLSON, E. M.; HOLLINGSWORTH, L. L.; KRUPP, D. A.; WEIS, V. M. Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1985-1993, 2006.

WU, A. Carbohydrate structural units in glycoproteins and polysaccharides as important ligands for Gal and GalNAc reactive lectins. **Journal of Biomedical Science**, v. 10, p. 676-688, 2003.

YE, X. Y.; NG, T. B.; TSANG, P. W. K.; WANG, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 367-374, 2001.

YE, X. Y.; NG, T. B. Isolation of Unguillin, a cyclophilin-like protein with anti-mitogenic, antiviral, and antifungal activities, from black-eyed pea. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 353-358, 2001.

YOUNG, N. M.; WATSON, D. C.; WILLIAMS, R. E. Lectins and legume chemotaxonomy: Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Bauhinia purpurea*. **FEBS Letters**, v. 182, n. 2, p. 403-406, 1985.

YU, L.; FERNIG, D. G.; SMITH, J. A.; MILTON, J. D.; RHODES, J. M. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. **Cancer Research**, v. 53, n. 19, p. 4627-4632, 1993.

ZHAO, C.; SUN, H.; TONG, X.; QI, Y. An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **Biochemical Journal**, v. 374, p. 321-327, 2003.

ZHU, K.; HUESING, J.E.; SHARE, R.E.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M.; MURDOCK, L. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). **Plant Physiology**, v. 110, p. 195-202, 1996.