

164

ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DE LECTINAS ISOLADAS DA ESPONJA MARINHA *Axinella cf. corrugata*. Viviane Maria Toniazó¹, Fabiane Farias², Beatriz Mothes³, Clea Lerner³, Magdolna Maria Vozári-Hampe¹. (¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS; ² Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, UFRGS; ³Fundação Zoobotânica do RS)

Lectinas são um grupo especial de proteínas que possuem a habilidade de reconhecer e se ligar a açúcares livres ou glicoconjugados, podendo causar aglutinação de células, inclusive de microorganismos. Dentre suas propriedades estão a mediação de fagocitose de bactérias e fungos e a toxicidade em diferentes graus. Em animais são encontradas em diferentes espécies com distintas funções. Em invertebrados marinhos, supostamente, teriam a função de defesa contra a agressão de microorganismos, possuindo substâncias com atividade antimicrobiana. Recentemente, isolamos duas lectinas da esponja marinha, *Axinella cf. corrugata*, cujo habitat é o litoral da costa do Atlântico Sul. O isolamento das lectinas foi realizado por extração das proteínas das esponjas com solução tampão fosfato-salino, pH-7,2 (PBS), seguido de cromatografia de coluna de Ultrogel-AcA 44. Os dois picos obtidos correspondentes à lectina AL-I e a lectina AL-II, foram recromatografadas em colunas de N-acetil-D-glicosamina-Agarose, e a pureza das lectinas monitorada por SDS-PAGE. Ambas as lectinas aglutinaram hemácias de coelho e de cão, mas não hemácias humanas. A atividade hemaglutinante de ambas as lectinas foi inibida por N-acetil-D-glicosamina e por N-acetil-D-galactosamina, sendo que a da AL-II, também por D-galactose. Ambas as lectinas foram estáveis a aquecimento até 75°C, durante 10 min., e inativadas a 100°C. Mr de AL-I, estimada por gel filtração foi de 120.000, sendo o valor superior ao de AL-II. Os resultados mostram parcial semelhança das lectinas de *Axinella cf. corrugata* com as isoladas de *Halichondria okada*. (PROPESQ/UFRGS).

165

ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA PRODUZIDA POR SECREÇÕES DE *Lonomia obliqua*. Pinto, A.F.M., Marques, M.G.B., Guimarães, J.A.; (Centro de Biotecnologia-UFRGS, RS, CIT-RS).

Acidentes com lagartas *Lonomia obliqua*, caracterizados por desordens hemorrágicas, são um problema crescente no Sul do Brasil. O severo quadro clínico, predominantemente hemorrágica, resulta provavelmente da ação de vários princípios ativos presentes não somente no veneno mas também em outras secreções das lagartas envolvidas no contato. Em nosso trabalho, caracterizamos uma atividade fibrinogenolítica na secreção obtida pela exposição das lagartas a -20°C por 24 horas. O extrato (MSS-100) foi coletado em tampão Tris.HCl, pH7,4. Fibrinocoagulação induzida por Trombina assim como atividades fibrinogenolítica e amidolítica foram ensaiadas em um sistema tipo ELISA monitorados pelo equipamento SpectraMax (Molecular Devices). Os resultados indicam que: a) Incubação de fibrinogênio com MSS-100 por poucos minutos torna o fibrinogênio incoagulável quando da incubação adicional com trombina; b) SDS-PAGE mostra a formação de vários fragmentos de fibrinogênio produzidos após breve incubação com MSS-100; c) O padrão eletroforético encontrado para o fibrinogênio digerido por MSS-100 é diferente do produzido por plasmina ou trombina; d) Incubações mais prolongadas de fibrinogênio com MSS-100 não modificam significativamente o padrão eletroforético obtido. A degradação do fibrinogênio devido a essa potente ação proteolítica é coerente com o quadro clínico hemorrágico produzido pelo envenenamento com *Lonomia obliqua*. (CNPq, Fapergs)

166

UMA ENZIMA TIPO-TRIPSINA PROVENIENTE DE *Canavalia ensiformis*. *Wagner, CB; **Ramos, RCS e *Carlini, CR. (*Depto. Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS, ** Depto. de Educação Física e Saúde, UNISC).

Enzimas proteolíticas de sementes estão relacionadas com a degradação de proteínas durante o processo de germinação. O objetivo deste trabalho foi isolamento e a caracterização cinética de uma enzima do tipo tripsina existente nas sementes de *Canavalia ensiformis*. Após extração a partir da farinha das sementes, a enzima foi purificada por precipitação com sulfato de amônio (35-55%) e cromatografia de troca iônica convencional DEAE-celulose pH 7.5 (eluição step-wise), seguida de cromatografia de alta performance em coluna MonoQ – FPLC com eluição com gradiente de NaCl (0.15-0.5M). A atividade enzimática foi monitorada por hidrólise de N- α -benzoi-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) em tampão Tris.HCl (20mM) pH 7.5; usando ensaio otimizado em placas de ELISA com leituras a cada 5 minutos no aparelho SpectraMAX equipado com software para estudos cinéticos. Todos os ensaios foram feitos comparando a atividade da enzima vegetal com tripsina bovina comercial. A tripsina de *Canavalia ensiformis* caracteriza-se por sua inibição em presença de PMSF (4mM) e Benzamidina, ambos inibidores específicos para serino-proteinasas, e pelo seu pH ótimo de ~10,0, bem mais elevado do que a enzima de referência em mamíferos. Em SDS-PAGE a 10%, a enzima apresentou um peso molecular de ca. 35KDa. A continuidade destes estudos posteriores visam identificar a atuação desta enzima tipo tripsina no crescimento da plântula e a participação na hidrólise da canatoxina e das proteínas relacionadas a esta. Apoio: CNPq ; PRONEX 76.97.10.70.00.

167

LECTINAS EM PLANTAS MEDICINAIS DO RIO GRANDE DO SUL. Adriana Steffens, Denissen Fossati da Silva e Magdolna Maria Vozári-Hampe (Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam, reversivelmente, a carboidratos simples ou complexos, livres ou conjugados, podendo causar a aglutinação de células, dentre elas, os eritrócitos. As lectinas apresentam uma série de propriedades como, estimuladores da blastogênese de linfócitos, indutoras de migração de neutrófilos, etc. Muitas lectinas são tóxicas, com efeitos nefastos para o homem e animais, quando ingeridas *in natura*. Elas se encontram, largamente, distribuídas na natureza, principalmente, no reino vegetal onde são encontradas em sementes, caules, raízes, bulbos e folhas das plantas. Folhas de plantas nativas do Rio Grande do Sul, usados como plantas medicinais, foram analisadas para fins de se verificar a presença de atividade lectínica nas mesmas e, futuramente, estudar a possível toxidez. As proteínas das folhas trituradas foram extraídas com tampão fosfato salino, pH-7,2 (PBS). A atividade aglutinante dos extratos foi testada com hemácias humanas, lavadas e não tratadas, pertencentes aos grupos sanguíneos A, B e O e, dentre o de animais, com as de ovelha, cavalo, boi e coelho. Apenas o extrato de *Hypericum connatum* apresentou atividade hemaglutinante detectável com hemácias de animais. Nenhum dos açúcares e glicoproteínas testadas conseguiu inibir a hemaglutinação. Quando o extrato foi submetido a aquecimento em temperaturas superiores a 70°C, por 10 min, houve diminuição da atividade hemaglutinante, cessando a mesma a 100°C. Os resultados indicam que plantas utilizadas para fins medicinais podem conter lectinas e, portanto, não devem ser usadas indiscriminadamente. (BIC-FAPERGS).

168

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA PROTEÍNA DE ALTO PESO MOLECULAR PRESENTE EM SEMENTES DE SOJA, RELACIONADA À CANATOXINA. Mulinari, F.; Becker-Ritt, A. B.; Carlini, C. R.; (Depto de Biofísica, Instituto de Biociências, UFRGS).

O conteúdo protéico de sementes de leguminosas pode ser de até 40% do seu peso seco. De acordo com as funções que desempenham, as proteínas podem ser divididas em duas classes: proteínas de reserva e as proteínas essenciais para o metabolismo celular. Uma leguminosa importante, tanto do ponto de vista econômico quanto nutricional, é a soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Apesar de seu alto conteúdo protéico, as sementes apresentam vários fatores antinutricionais e toxinas vegetais, como a aglutinina da soja (SBA), uma lectina específica para N-Acetilgalactosamina e inibidores de proteinases (tipo Kunitz, inibidor de tripsina; tipo Bowman-Birk, inibidor de tripsina/quimotripsina). Duas outras proteína tóxicas de sementes de soja foram isoladas e caracterizadas; a soyatoxina (SYTX, 21 kDa) e a soybeantoxin (SBTX, 14 kDa). Essas duas proteínas são imunologicamente relacionadas à canatoxina (CNTX, 95 kDa), isolada da leguminosa *Canavalia ensiformis*. Neste trabalho, descrevemos a presença de uma terceira proteína tipo canatoxina em sementes de soja. Essa proteína reage com anticorpos anti-CNTX em dot-blot e em testes de imunodifusão dupla (identidade parcial), sendo tóxica por via intraperitoneal em camundongos.