



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA
LECTINA TIPO-C LIGANTE DE D-GALACTOSE DA PEÇONHA DE
*BOTHROPOIDES PAULOENSIS (BOTHROPS PAULOENSIS)***

Aluna: Letícia Eulálio Castanheira

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Uberlândia, MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA
LECTINA TIPO-C LIGANTE DE D-GALACTOSE DA PEÇONHA DE
*BOTHROPOIDES PAULOENSIS (BOTHROPS PAULOENSIS)***

Aluna: Letícia Eulálio Castanheira

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica).**

Uberlândia, MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C346p Castanheira, Letícia Eulálio, 1987-
Purificação e caracterização química e funcional de uma lectina
tipo-C ligante de D-galactose da peçonha de Bothropoides pauloensis
(Bothrops pauloensis) [manuscrito] / Letícia Eulálio Castanheira. -
2011.
72 f. : il.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Serpente peçonhenta - Peçonha - Teses. 2. Bothrops - Teses. I.
Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
III. Título.

CDU: 615.919598.126



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FUNCIONAL DE UMA
LECTINA TIPO-C LIGANTE DE D-GALACTOSE DA PEÇONHA DE
*BOTHROPOIDES PAULOENSIS (BOTHROPS PAULOENSIS)***

ALUNO: Letícia Eulálio Castanheira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Profa Dra Maria Aparecida de Souza
Prof Dr Nilson Penha Silva

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PPGGB para o formato da dissertação foram contempladas

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dedicatória

Dedico esse trabalho a pessoas de inestimável importância em minha vida, que amo imensamente:

Aos meus pais, Ione e Neto, e à minha irmã, Bruna, pelo amor e apoio incondicionais em todos os momentos e fases da minha vida;

Ao Thomaz, por ter originado esse trabalho e com muito carinho ter concordado em me deixar assumi-lo. Mas sobretudo, pelas dicas e idéias, ensinamentos e correções, pelas longas “discussões” bioquímicas, pelos conselhos e palavras sábias, tanto no lado pessoal quanto na realização dessa dissertação; por sempre me ajudar a encarar os desafios, pela companhia inigualável, por cada singelo momento de alegria e aprendizado, e por todos os outros incontáveis motivos que me tornam uma pessoa sempre melhor.

Sem vocês nada disso seria possível!!!

Agradecimentos

A Deus por toda a sua luz, me guiando em cada momento difícil;

À professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, pela orientação impecável, por todo o apoio e incentivo, pelas considerações preciosas para a execução do projeto e escrita dos artigos e da dissertação, pela paciência com minhas dúvidas e erros, pela compreensão com minhas escolhas. Foi uma grande honra ser sua orientanda!;

Às professoras Dras. Amélia Hamaguchi e Maria Inês Homs Brandeburgo pela oportunidade em ingressar nessa linha de pesquisa, por cada ensinamento que, com certeza, contribuiu para a minha formação desde a graduação até o mestrado;

À professora Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini pelo auxílio nos experimentos com *Leishmania* e pela agradável convivência;

À doutora Maria Aparecida de Souza pelas dicas e valiosa ajuda na padronização da purificação e nos testes de hemaglutinação;

Aos funcionários, professores e alunos do Hospital Veterinário da UFU, em especial ao professor Dr. Antônio Vicente Mundim, pelo fornecimento das amostras de sangues animais para o teste de hemaglutinação;

Às amigas insubstituíveis Dayane, Débora, Isabela, Renata e Naiara, por cada riso e cada lágrima, pela paciência em sempre me ouvir contando as mesmas histórias, pelas conversas sinceras e desabafos, conselhos, incentivo e por terem tornado o ambiente de trabalho ainda mais prazeroso;

A cada amigo e familiar que indiretamente contribuiu para a minha formação, sempre me apoiando e mostrando que eu escolhi o caminho certo a trilhar;

Aos colegas de laboratório e funcionários do INGEB, mesmo aqueles que já estão em outras instituições, pelos ensinamentos, convivência e auxílio nos experimentos;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Maravilhar-se é o primeiro passo para o descobrimento.”

(Louis Pasteur, 1822-1895)

Índice

Apresentação	1
Capítulo 1	2
1.1. Lectinas: um breve histórico	3
1.2. Classificação das lectinas animais: características gerais	5
1.3. Estrutura e função de lectinas tipo C	7
1.4. Aplicações terapêuticas de lectinas tipo C	13
1.5. Peçonhas ofídicas: Epidemiologia, características do envenenamento ofídico e composição	17
Referências Bibliográficas	21
Capítulo 2	35
Resumo	36
2.1. Introduction	39
2.2. Material and Methods	40
2.2.1. Material	41
2.2.2. Isolation of type c lectin from <i>Bothropoides pauloensis</i> venom (BpLec)	41
2.2.3. Biochemical characterization	42
2.2.3.1. Conventional Electrophoresis in polyacrylamide gel (PAGE)	42
2.2.3.2. MALDI TOF mass spectrometry	42
2.2.3.3. Isoelectric focusing by 2D Electrophoresis	42
2.2.3.4. Theoretical isoelectric point and molecular mass	43
2.2.3.5. Sequence determination	43
2.2.4. Functional characterization	44
2.2.4.1. Haemagglutinating activity	44
2.2.4.2. Carbohydrate binding specificity	44
2.2.4.3. BpLec stability in different pH values and temperatures	45
2.2.4.4. BpLec stability upon some divalent cations	45
2.2.4.5. Antibacteria activity	45
2.2.4.6. Effects towards promastigote forms of <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>)	

<i>amazonensis</i>	46
2.3. Results	47
2.3.1. Lectin isolation and chemical characterization	47
2.3.2. Biological characterization	47
2.3.2.1. Haemagglutinating assays	47
2.3.2.2. Antibacteria activity	48
2.3.2.3. Agglutinating activity of <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	48
2.4. Discussion	48
2.5. Conclusions	52
2.6. Acknowledges	52
2.7. References	53
Figures	61
Tables	66

Apresentação:

Lectinas são proteínas presentes em vários organismos, incluindo microorganismos, plantas e animais. São caracterizadas por se ligarem de forma reversível e não-covalente a carboidratos, propriedade que lhes confere ampla gama de funções biológicas. Podem ser classificadas em lectinas tipo C, tipo S, tipo I, tipo P e pentraxinas, de acordo com informações estruturais, incluindo a análise das sequências de seu domínio de reconhecimento ao carboidrato. Muitas dessas proteínas já têm sido utilizadas terapeuticamente contra patógenos (fungos, bactérias, *Leishmania* sp., vírus, insetos, etc) e também como terapia adicional ao tratamento de diversos tipos de câncer.

As lectinas tipo C são encontradas ainda em peçonhas de serpentes, sendo divididas em lectinas ligantes de sacarídeos e lectinas tipo C-like. O primeiro grupo apresenta-se geralmente como homodímeros de cerca de 30 kDa e representa até 1% da composição total da peçonha. O segundo grupo é composto por heterodímeros de massa relativa variável, normalmente não é capaz de se ligar a carboidratos e, por conseguinte, não aglutina eritrócitos. Atualmente, a verdadeira contribuição das lectinas para o envenenamento ofídico permanece incerta, fato que ressalta a importância de estudos que relacionem a estrutura e função de lectinas dessa fonte.

Essa dissertação foi elaborada de acordo com as normas da pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sendo o capítulo 1 constituído de uma fundamentação teórica, ou seja, um breve levantamento bibliográfico sobre o assunto estudado. O capítulo 2 foi escrito em formato de artigo a ser enviado a uma revista internacional indexada ainda não definida, abordando sobretudo os métodos utilizados, os resultados e sua discussão. O trabalho descreve a purificação e caracterização química e biológica de uma lectina tipo C presente na peçonha de *Bothropoides pauloensis*.

Capítulo 1:

Fundamentação teórica

1.1. Lectinas: um breve histórico

As lectinas são proteínas que têm despertado grande interesse e fascínio da comunidade científica há muitos anos, devido a sua ocorrência em diversos organismos e, conseqüentemente, à sua variedade de funções. O nome lectina, proposto por Boyd e Shapleigh (1954) e originado do latim *legere*, significa escolher ou mudar. Essa nomenclatura foi então aceita e adotada mundialmente devido à principal característica apresentada por essa classe de proteínas, a aglutinação de diferentes tipos de eritrócitos *in vitro*. Atualmente, quando se sabe a especificidade de ligação da proteína, a mesma é denominada lectina; no entanto, quando é desconhecida a especificidade em relação a qual açúcar ocorre a ligação, a proteína é denominada por um termo mais geral, hemaglutinina (LAM; NG, 2011).

O marco inicial no estudo de purificação e caracterização de lectinas foi com o trabalho de Dixon em 1887 e a descoberta de uma proteína da mamona (*Ricinus communis*), posteriormente denominada ricina por Stillmark em 1988. Neste segundo estudo descobriu-se que tal lectina purificada das sementes de *R. communis* era capaz não apenas de aglutinar eritrócitos, como também de precipitar proteínas do soro.

Em seguida, os estudos pioneiros de Ehrlich (1891) com a ricina e a abrina (uma aglutinina de *Abrus precatorius*) contribuíram para a fundação da Imunologia básica. Baseado em relatos de agricultores, o autor descobriu que bezerros poderiam ser prevenidos da intoxicação por abrina ou ricina quando alimentados por pequenas concentrações das suas respectivas sementes de origem, sendo essa propriedade protetora transmitida ao longo das gerações. Vale ressaltar que tanto a ricina quanto a abrina apresentam duas subunidades, sendo a primeira constituída de uma subunidade tóxica com atividade N-glicosidásica (cadeia A) e a segunda composta pela fração ligante de carboidratos (cadeia B) (BARBIERI et al., 1993).

Outra lectina extensivamente estudada é a Concanavalina A, extraída de *Canavalia ensiformes*. Sumner e Howell (1936) verificaram que a Concanavalina A era capaz de aglutinar eritrócitos devido a sua interação com

açúcares presentes na superfície dessas células. Na década de 1940, tanto Boyd quanto Renkonen visualizaram a característica preferencial de lectinas por alguns tipos de eritrócitos, quando trabalharam com lectinas extraídas de *Phaseolus limensis* e *Vicia cracca*. Ambas aglutinavam eritrócitos humanos do tipo A, mas não possuíam nenhum efeito sobre os tipos O e B. Tais estudos foram bastante relevantes para o entendimento de como ocorre o processo de hemaglutinação e comprovaram a especificidade que lectinas apresentam em relação a diferentes tipos de eritrócitos.

Estudos com a lectina do feijão *Phaseolus vulgaris* (PHA), que apresenta atividade mitogênica sobre linfócitos (NOWELL, 1960) e a lectina de gérmen de trigo (WGA), que diferencia células normais e malignas (AUB et al., 1963), também tiveram grande importância para a consolidação da Imunologia. Hoje já é bem relatada na literatura a função de defesa que lectinas de plantas apresentam contra insetos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995a,b; MURDOCK; SHADE, 2002; VANDENBORRE, 2011). Assim, por serem proteínas tão extensivamente estudadas e descritas, lectinas de plantas são também denominadas como aglutininas.

Na década de 1970, iniciou-se a era da “lectinologia”, após o trabalho de Sharon e Lis (1972), listando as lectinas de plantas até então isoladas e caracterizadas e suas possíveis aplicações, especialmente no campo da histopatologia. Somente em 1974, Stockert e colaboradores descreveram a primeira lectina de origem animal, sendo esta denominada como uma “lectina hepática de mamíferos”. Mais especificamente, com respeito às lectinas ligantes de β -galactosídeos, os primeiros relatos foram com o estudo das eletrolectinas extraídas da enguia, também na mesma década. Tais proteínas são atualmente encontradas nos mais diversos vertebrados (TEICHBERG et al., 1975; HARRISON, 1991).

Provavelmente, a dificuldade em se iniciar os estudos com lectinas de origem animal se deve ao fato de apresentarem uma expressão tecidual bem inferior em relação às lectinas vegetais. Assim, para uma caracterização mais detalhada de lectinas animais, é necessário partir-se de uma quantidade de

material bruto muito grande, o que pode tornar o trabalho inviável (LAM; NG, 2011). Hoje sabemos que as lectinas estão amplamente descritas em vários organismos, abrangendo de microorganismos (bactérias, fungos) a animais (vertebrados e invertebrados) e plantas (LIS; SHARON, 1986; UTARABHAND et al., 2007). Em 1998, Peummans e Van Damme fizeram uma revisão e observaram que lectinas já haviam sido descritas em mais de 500 organismos, ressaltando a sua variada importância biológica.

Em relação às lectinas de peçonhas de serpentes, os estudos se iniciaram após a descoberta da thrombolectina presente na peçonha de *Bothrops atrox* (Gartner, 1980). Todavia, a indução de aglutinação de eritrócitos pela peçonha bruta da cascavel *Crotalus durissus* já havia sido evidenciada pela primeira vez por Mitchell (1860), sendo tal efeito atribuído à ação de lectinas presentes na peçonha (Olgivie; Gartner, 1984). A partir de então, muitos outros trabalhos envolvendo o isolamento e caracterização química, molecular e funcional foram publicados, sobretudo aqueles incluindo peçonhas de serpentes do gênero botrópico. Dentre os trabalhos brasileiros, destaca-se o trabalho pioneiro realizado por Carvalho e colaboradores em 1998, descrevendo a BjcuL, uma lectina isolada de *B. jararacussu*. BjcuL provavelmente é a lectina de peçonhas de serpentes melhor estudada no Brasil por vários grupos de pesquisa, visto que já foram determinados sua sequência, estrutura tridimensional resolvida por difração de raio X e até mesmo sua versão recombinante (CARVALHO et al., 2002; KASSAB et al. 2004a,b; SILVA et al., 2008). Os seus efeitos incluem edema, hipotensão, ação anti-tumoral, aumento na atividade de neutrófilos e retardamento de sua apoptose, dentre outros (CARVALHO et al., 2001; ELIFIO-ESPOSITO, 2011; KASSAB et al., 2004a,b; PANUNTO et al., 2006; PEREIRA-BITTENCOURT et al., 1999).

1.2. Classificação das lectinas animais: características gerais

Com o desenvolvimento de cromatografias de afinidade, iniciado por Agrawal e Goldstein (1965), para isolamento de lectinas e com o consequente sequenciamento das proteínas puras, muitas características comuns foram

sendo agrupadas, sobretudo com o objetivo de se classificar tais proteínas (GABIUS; WU, 2006). Atualmente, a classificação mais aceita para lectinas de origem animal é aquela determinada de acordo com a comparação de características estruturais, dividindo-as em lectinas tipo C, lectinas tipo P, lectinas tipo I (ou selectinas), lectinas tipo S (ou galectinas) e pentraxinas (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002).

As lectinas tipo I são aquelas denominadas *imunoglobulinas-like*, pois pertencem estruturalmente à família das imunoglobulinas e, como consequência, desempenham funções no sistema imune (KASSAB, 1999; POWELL; VARKI, 1995). Lectinas tipo P são formadas por apenas dois membros (o receptor manose-6-fosfato dependente de cálcio e o fator II de crescimento semelhante à insulina/receptor manose-6-fosfato), sendo ambos caracterizados pela sua habilidade em reconhecer resíduos de manose fosforilados que os direcionam do complexo de Golgi para os lisossomos (DAHMS; HANCOCK, 2002). Pentraxinas formam pentâmeros, são ligantes de Ca^{2+} e incluem a proteína reativa C, desempenhando um papel crucial no sistema imune, visto que suas concentrações aumentam de forma significativa após uma infecção ou um trauma (GABIUS, 1997; BRINDA et al., 2005; GABIUS; WU, 2006).

As lectinas tipo S e tipo C possuem aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos altamente conservados em cada monômero, porém, em geral, as lectinas tipo S são tiol/sulfidril-dependentes, sendo a oxidação capaz de inibir sua atividade biológica; enquanto as lectinas tipo C são aquelas dependentes de pontes dissulfeto em sua estrutura e da presença de íons Ca^{2+} no meio para sua atividade. Ainda mais, lectinas tipo S frequentemente são específicas para β -galactosídeos e podem ser encontradas tanto intra quanto extracelularmente, ao passo que as lectinas tipo C possuem especificidade mais ampla e são, em sua grande maioria, extracelulares e solúveis. Entre as suas semelhanças, destaca-se a propriedade de ambas formarem oligômeros (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002).

1.3. Estrutura e função de lectinas tipo C

De modo geral, as lectinas participam e medeiam muitos processos fisiológicos, uma vez que a maioria das proteínas é glicosilada, constituindo sítios de ligação para lectinas. Assim, lectinas são frequentemente usadas como carreadores de drogas, pois muitas podem ser endocitadas, devido ao seu caráter de bioadesão, ou seja, de se ligarem a alvos específicos (BIES et al., 2004; JIMÉNEZ-CATELANOS, 1993). Dessa forma, as lectinas estariam envolvidas no reconhecimento celular de interações célula-célula e célula-molécula, em vários organismos biológicos (SHARON; LIS, 2004).

Ao interagirem com receptores glicídicos da membrana celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, causando aglutinação celular. (KOCOUREK; HOREJSI, 1983; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Quando esse evento ocorre entre lectinas e carboidratos de eritrócitos, há hemaglutinação (figura 1) (ALONSO et al., 2001; MOURA et al., 2007).

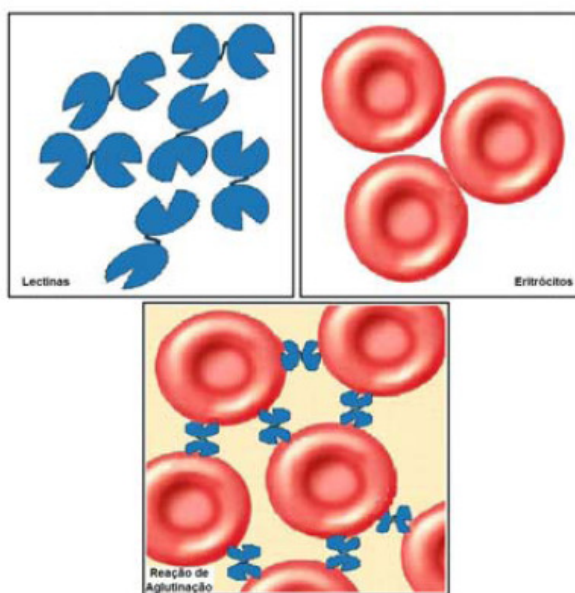


Figura 1: Mecanismo de hemaglutinação, evidenciando as ligações cruzadas formadas entre as lectinas e os eritrócitos. Retirado de MOURA (2007).

A membrana eritrocitária é repleta de carboidratos e glicoproteínas que constituem sítios de ligação para lectinas, de modo que já estão descritos mais de 500 antígenos expressos nessas membranas (MURADOR; DEFFUNE, 2007). Por isso, o ensaio de hemaglutinação tem sido bastante descrito na literatura para caracterização de tais proteínas ligantes de carboidratos. Dentre as várias proteínas que compõem a membrana do eritrócito e que poderiam contribuir para a ligação das lectinas, podemos citar aquelas classificadas como proteínas estruturais, que incluem glicoproteínas de membrana tipo I e glicoforinas C e D, todas apresentando alto grau de glicosilação que contribuiria para a carga negativa do glicocálice (SCHAWALDER et al., 2004; BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009). Ainda mais, o elevado conteúdo de ácido siálico em glicoforinas A e B previne a aglutinação espontânea dessas células, pois as cargas negativas do carboidrato de cada célula resulta em repulsão; além desse açúcar constituir um sítio ligante para vírus, bactérias e parasitos. Por exemplo, a glicoforina A apresenta em seu segmento N-terminal externo receptores de lectina, proteína existente nos vírus *influenza* e myxovirus. Assim, as variadas glicoproteínas presentes na superfície do eritrócito também desempenham função de receptoras, como já mencionado o caso das glicoforinas A e B, assim como a glicoproteína Duffy, receptora de citocinas nos eritrócitos (MURADOR; DEFFUNE, 2007; BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009).

Também é importante destacar que outras glicoproteínas presentes na membrana do eritrócito desempenham funções diferentes, tais como transporte e função enzimática. A participação de glicoproteínas em eritrócitos é tão expressiva que algumas, como a SEMA7A, da classe das semaforinas, ainda apresentam função incerta em tais células (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009). Por sua vez, a aglutinação dos eritrócitos ocorre quando as cargas negativas, originadas do alto teor de carboidratos presentes nas glicoproteínas da membrana eritrocitária, são neutralizadas pela ligação de algum anticorpo, diminuindo a propensão que tais cargas negativas presentes em cada célula teriam de se repelir (GIRELLO; KÜHN, 2002).

Como já mencionado, a principal característica de lectinas é a sua ligação de forma reversível e não covalente a carboidratos, sem degradá-los (KISHORE et al., 1997). Tal propriedade, altamente conservada entre os

diferentes tipos de lectinas, se deve a sua conservação estrutural, sobretudo à região designada domínio de reconhecimento ao carboidrato (ou CRD, originado da abreviatura em inglês) (DODD; DRICKAMER, 2001). Assim, esses domínios interagem com açúcares presentes nas células por meio de pontes de hidrogênio e interações de van der Waals, estabelecidas entre o sítio ativo da proteína e os carboidratos de superfície celular (WEIS; DRICKAMER, 1996). Esse domínio de reconhecimento ao carboidrato consiste em uma sequência de três aminoácidos (Gln96-Pro97-Asp98) que usualmente se apresentam na porção carboxi-terminal da proteína (DRICKAMER, 1988).

Por conseguinte, lectinas podem ser definidas como proteínas ou glicoproteínas que possuem um ou mais centros de ligação a carboidratos (KASSAB, 1999). Esse CRD então se liga aos carboidratos presentes na membrana eritrocitária, caracterizando a chamada hemaglutinação por lectinas, de modo que, por conterem mais de uma cadeia, o CRD de cada cadeia da lectina se liga a uma célula diferente, proporcionando a formação de ligações cruzadas, anteriormente evidenciadas na figura 1.

Apesar de o CRD, presente em cada subunidade, ser o sítio de ligação entre lectinas e carboidratos, a sua presença pode não ser um fator determinante para que proteínas que o possuam apresentem atividade ligante de carboidratos (DRICKAMER, 1993). Isso ocorre com as lectinas-like, proteínas abundantemente encontradas em peçonhas de serpentes, sendo que algumas até possuem o CRD conservado, porém podem não apresentar atividade hemaglutinante. Dessa forma, é necessário que ocorra a interação do CRD com domínios adicionais, a fim de se determinar a atividade de uma dada lectina (DRICKAMER; TAYLOR, 1993).

As lectinas tipo C foram as primeiras lectinas de origem animal a serem descobertas, porém mais de mil proteínas dessa classe já foram estudadas (ZELENSKY; GREASY, 2005). Uma das características principais da classe, que a diferencia das demais, é o fato de seu CRD apresentar uma estrutura globular compacta (WEIS et al., 1991). Outro fator estrutural bastante relevante

é o posicionamento da região ligante de cálcio em um super loop (ZELENSKY; GREASY, 2005).

Lectinas tipo C ligantes de sacarídeos, sobretudo de D-galactose são evidenciadas em diversas espécies animais e vegetais e caracterizam-se por apresentar subunidades de 12-16 kDa, sugerindo uma grande manutenção de características estruturais ao longo da evolução. Dentre estas conservações podem-se citar seu caráter hidrofóbico e a propensão de formarem folhas β -pregueadas. Além disso, sabe-se que essas lectinas também possuem geralmente a região N-terminal bloqueada, fato que dificulta seu sequenciamento (PATOUTAUD, 1897). O nível de conservação entre as diferentes lectinas tipo C é tão grande que se compara à conservação das histonas, de modo que as lectinas de vertebrados teriam sofrido poucas modificações durante sua evolução desde peixes até mamíferos (ZELENSKY; GREASY, 2004, 2005). Considerando todas essas características, acredita-se que lectinas ligantes de D-galactose teriam surgido de um ancestral comum. (PATOUTAUD, 1897).

Ainda acerca das lectinas tipo C, há uma característica muito interessante, em que algumas dessas proteínas apresentam o CRD incompleto ou ausente, mas a conservação estrutural é tão grande que as mantêm classificadas como lectinas tipo C. Essas proteínas, denominadas então de lectinas tipo *C-like*, em geral não teriam a propriedade de se ligarem a carboidratos e frequentemente são encontradas em peçonhas ofídicas (ZELENSKY; GREASY, 2005). Pelo fato de apresentarem características tão peculiares e também com o objetivo de se evitar confusões por nomenclatura na literatura, lectinas tipo *C-like* atualmente estão sendo designadas como *Snaclecs* (CLEMENTSON, 2010). Quanto às suas características funcionais, as lectinas tipo *C-like* agiriam nos fatores da cascata de coagulação das vítimas do envenenamento, podendo tanto os inibir quanto ativar. Estruturalmente, são compostas por um ou mais heterodímeros de massa variável (14-15 kDa para a cadeia A/subunidade α e 13-14 kDa para a cadeia B/subunidade β), ligados por pontes dissulfeto, além de apresentarem atividade independente de Ca^{2+} (MORITA, 2005a,b).

Lectinas ligantes de D-galactose, provenientes de peçonhas ofídicas, geralmente possuem 135 aminoácidos em cada cadeia, são ácidas (pI em torno de 5) e apresentam o CRD e o loop ligante de cálcio altamente conservados. Além disso, são homodiméricas, sendo suas subunidades conectadas por resíduos de cisteínas na posição 86 de cada cadeia que formam uma ponte dissulfeto (Figura 2). Acredita-se que não apenas as pontes dissulfeto estabilizam a proteína, porém pontes de hidrogênio intermoleculares e interações hidrofóbicas estariam envolvidas nessa estabilidade (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004).

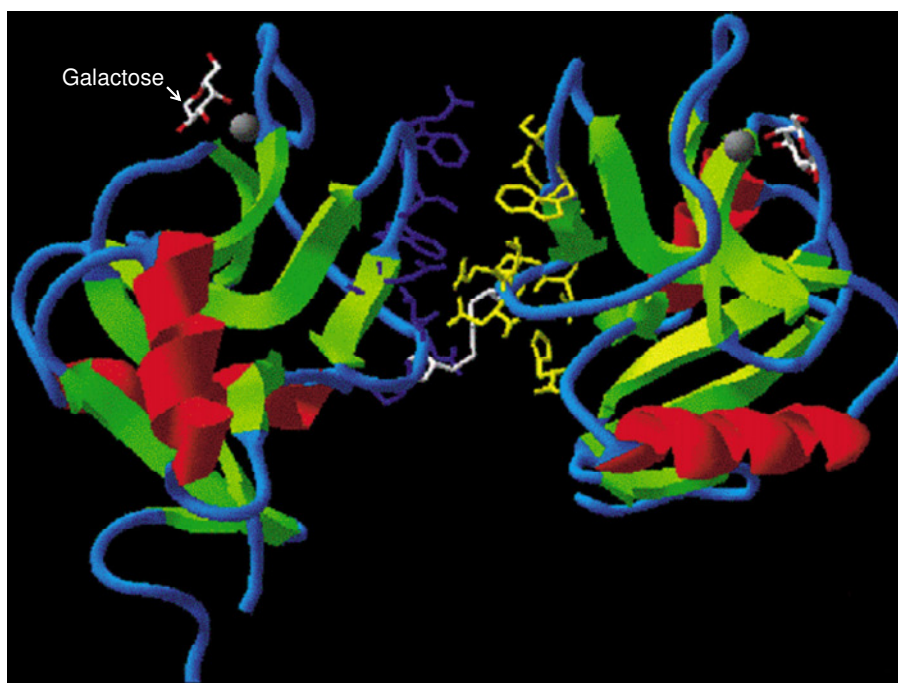


Figura 2: Estrutura secundária da BiL, uma lectina isolada da peçonha de *Bothrops insularis*, complexada com o Ca^{2+} (esfera cinza) e a galactose. A ponte dissulfeto que liga as 2 cadeias está representando em branco, ao centro da figura. Modificado de GUIMARÃES-GOMES et al. (2004).

De forma mais específica, a análise do modelo teórico acima proposto para a BiL, revelou que estruturalmente os ligantes de cálcio envolveriam a cadeia lateral de átomos de oxigênio dos aminoácidos Gln96, Asp98, Glu104, Asn119, assim como a cadeia principal do oxigênio da carbonila do Asp120. Ainda mais, oxigênios dos grupamentos 3- e 4-hidroxil presentes na galactose

complementariam a coordenação do cálcio e formariam pontes de hidrogênio com as cadeias laterais dos aminoácidos Gln96, Asp98, Glu104 e Asn119, de modo que Ca^{2+} e galactose se apresentam no mesmo loop da proteína. Uma molécula de água também interagiria entre o grupo 2-hidroxil da galactose e a Gln121 da lectina, contribuindo para sua estabilidade (Figura 3).

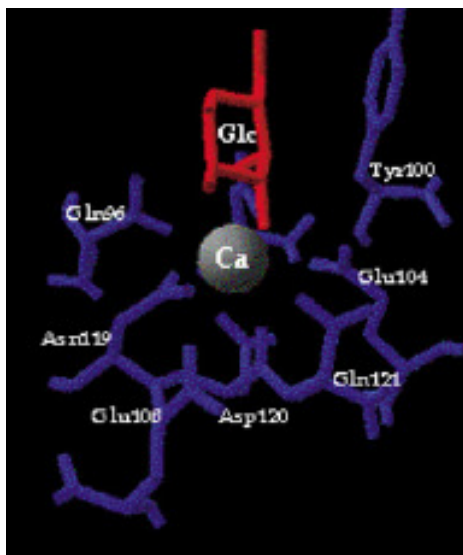


Figura 3: Domínio de reconhecimento ao carboidrato e loop ligante de cálcio. A galactose está representada em vermelho, o Ca^{2+} em cinza. Os aminoácidos envolvidos também estão destacados. Retirado de Guimarães-Gomes et al. (2004).

A análise estrutural da RSL, uma lectina isolada da peçonha da cascavel *Crotalus atrox* revelou que cada monômero da proteína é formado por quatro folhas β -pregueadas flanqueadas por duas α -hélices. Além do mais, os resíduos de cisteína de cada monômero, responsáveis por estabilizar a estrutura da proteína devido à formação de pontes dissulfeto, estão localizados nas posições C3-C14, C31-C131, C38-C133 e C106-C123, além da ponte intracadeia nas posições C86 de cada monômero. Diferentemente de outras lectinas de peçonhas ofídicas, RSL apresenta complexado a sua estrutura um íon sódio que parece contribuir para a estabilidade do domínio de reconhecimento ao carboidrato, posicionando-se no loop entre as folha β 4 e β 5 (WALKER et al., 2004).

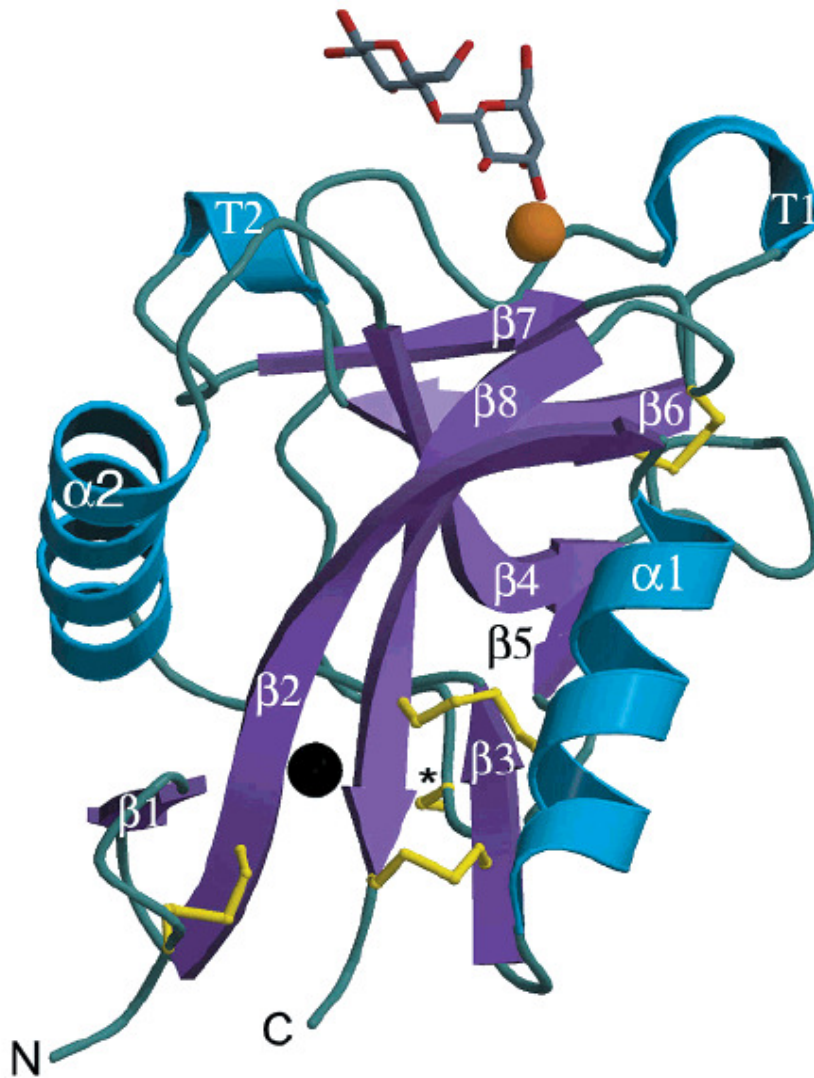


Figura 4: Diagrama de fitas da RSL. α -hélices estão representadas em azul, folhas β pregueadas em roxo, e pontes dissulfeto intracadeia em amarelo. O asterístico refere-se à Cys86 (envolvida na ponte dissulfeto intercadeias). Íons cálcio e sódio estão representados como esferas preta e laranja, respectivamente. Lactose está em cinza e vermelho. Retirado de WALKER et al. (2004).

Dessa forma, podemos então evidenciar que lectinas tipo C possuem estruturas altamente conservadas que influenciam diretamente nas suas respectivas funções.

1.4. Aplicações terapêuticas de lectinas tipo C

Devido a sua variedade de funções biológicas, as lectinas podem apresentar diversas aplicações biotecnológicas. Deve-se ressaltar que, por se ligar a carboidratos, em geral, qualquer lectina pode ser utilizada como uma forma de se purificar glicoproteínas. Este é o caso da jacalina, uma lectina purificada das sementes da jaca (*Artocarpus heterophyllus*), extensivamente usada na purificação de IgA, uma glicoproteína humana (KABIR, 1998).

Lectinas com características estruturais comuns geralmente apresentam atividades biológicas parecidas. Por exemplo, em relação ao grau de oligomerização, de forma que lectinas monoméricas são fungicidas, diméricas possuem efeito antagônico a insetos e lectinas tetraméricas apresentam propriedades anti-virais (BANERJEE et al., 2011).

Uma aplicação farmacológica de lectinas é a ação anti-tumoral, de modo que já foi relatada inclusive uma lectina isolada do visco branco (PS76A2) sendo terapeuticamente utilizada como uma forma de melhorar a qualidade de vida de pacientes com a câncer de mama (SEMIGLAZOV et al., 2006). Ainda mais, lectinas são comumente indicadas como uma terapia adicional à quimioterapia e radioterapia, a fim de se minimizar seus efeitos colaterais (SCHUMACHER et al., 2003; LIU et al., 2010). O principal mecanismo de ação de lectinas em relação a células cancerosas seria a indução de apoptose, num evento que envolve vários fatores apoptóticos, tais como caspases, citocromo C, fragmentação do DNA, despolarização da membrana mitocondrial, dentre outros. Dessa forma, várias vias de apoptose podem ser ativadas, porém sempre é comum a participação das caspases (LAM; NG, 2011). Também é bem relatada a ocorrência de autofagia induzida por lectinas anti-tumorais (LIU et al., 2010).

Essas lectinas anti-tumorais podem agir nos mais diversos tecidos. Por exemplo, recentemente, a Concanavalina A foi sugerida para o tratamento de hepatomas, a principal causa de morte na China e Taiwan, justificando a urgência de um tratamento eficaz. O mecanismo de ação dessa lectina seria a sua ligação à manose presente na superfície da célula cancerosa,

internalizando a proteína até a mitocôndria, onde ocorre autofagia e, conseqüentemente morte celular (CHANG et al., 2007; LEI; CHANG, 2009). Lectinas também podem ser utilizadas no tratamento de diversos outros tipos de câncer, como leucemia, linfoma, câncer de pâncreas, dentre outros (SCHWARZ et al., 1999; WANG et al., 2000; MIYOSHI et al., 2001; DALLA-PELLEGRINA et al., 2009, POLITO et al., 2009).

Outro efeito bem comum para lectina é o controle de patógenos, bastante aplicável para a agricultura, visto que algumas lectinas apresentam atividade inseticida e outras são fungicidas. A respeito das lectinas inseticidas, elas podem agir aumentando a mortalidade ou retardando o desenvolvimento do inseto. São muito comuns em vegetais, como trigo, arroz, tabaco e batatas. Acredita-se que o mecanismo de ação esteja relacionado ao fato de que, após o tratamento com lectina, as concentrações de esterase aumentam na larva, ao passo que a atividade das fosfatases ácida e alcalina diminui (LAM; NG, 2011).

Lectinas fungicidas também são bastante evidentes em plantas, sendo relacionadas ao sistema de defesa contra o ataque de fungos. Essas lectinas agiriam ligando-se a carboidratos presentes na superfície da parede celular do fungo, regulando a sua colonização principalmente em rizomas e sementes de plantas. Tal evento é bastante comum em merolectinas ligantes de quitina (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LAM; NG, 2011).

Proteínas ligantes de carboidratos também seriam um potente agente anti-HIV (vírus da imunodeficiência humana), uma vez que inibem a infecção celular por bloquearem a entrada do vírus na célula, além de previnirem a transmissão do vírus de células infectadas para células não-infectadas. Essas lectinas agiriam ligando-se às variadas glicoproteínas (por exemplo, gp120 e gp141), abundantes no envelope celular viral, e, portanto, mudariam a estrutura celular, de modo a impedir a ligação do vírus com seus alvos. Além disso, lectinas com ação anti-HIV teriam uma especificidade extensa, incluindo manose, N-acetilglicosamina e galactose (BALZARINI, 2006; SWANSON et al., 2010). Apesar de estudos já mostrarem a eficiência do uso de lectinas para se

melhorar a qualidade de vida de pacientes, é de suma importância a investigação de compostos naturais isolados que possam atuar como uma fonte alternativa aos tratamentos atuais da doença, em detrimento de tais terapias ainda apresentarem resistência à ação do vírus, assim como diversos efeitos colaterais (VO; KIM, 2010).

Ainda acerca da associação entre lectinas e patógenos, destacam-se os estudos com diferentes espécies de *Leishmania*. Alguns trabalhos já têm relatado a propriedade de lectinas em aglutinar formas promastigota de *Leishmania* sp., devido à ligação da lectinas com receptores de galactose presentes na superfície do parasito, muito importantes para a fixação da forma infectante (promastigota) ao epitélio intestinal do vetor (MOURA et al., 2006; MOURA, 2007; MEDEIROS et al., 2010). Por consequência, lectinas seriam uma ferramenta muito valiosa na detecção de formas promastigota de *Leishmania* sp., visto que a forma amastigota não apresenta receptores de galactose em sua superfície (WILSON; PEARSON, 1984).

Barral-Neto e colaboradores (1996) também demonstraram que a administração *in vivo* da lectina extraída de sementes de *Canavalia brasiliensis* tem efeito protetor na infecção de *L. amazonensis*, resultado detectado por mudanças na lesão cutânea característica desse tipo de leishmaniose, apesar da lectina não ter sido muito eficiente na cura total da doença. Foi sugerido que o efeito protetor ocorreria em detrimento da interação da lectina com glicoproteínas presentes na superfície do macrófago, que parecem ser essenciais no processo de infecção (BRAY, 1983). Recentemente, Afonso-Cardoso e colaboradores também visualizaram que uma lectina extraída do látex de *Synadenium carinatum* (ScLL) era capaz de reduzir em 65,5% a associação entre macrófagos e promastigotas de *L. amazonensis*, além de diminuir o crescimento da forma intracelular amastigota, considerando-se que tal lectina não apresentou caráter citotóxico *in vitro*. Portanto, o efeito de lectinas sobre diferentes formas de *Leishmania* sp. tem sido bastante relatado, de modo que mais estudos devem ser realizados com o intuito de se aprofundar os conhecimentos a respeito da ação terapêutica de lectinas sobre a doença.

Outra fonte de lectinas, talvez ainda pouco explorada, apesar de bastante promissora, são as peçonhas animais, sobretudo de serpentes. Lectinas isoladas dessas peçonhas já mostraram ter ações terapêuticas como ação anti-tumoral e ação bactericida (BARBOSA et al., 2010, KASSAB et al., 2004a; NUNES et al., 2011, PEREIRA-BITTENCOURT et al., 1999). Essa última, bastante descrita para lectinas ligantes de sacarose de peçonhas ofídicas parece ter grande importância para o aparato bucal da serpente, prevenindo que ocorra infecção durante o processo digestivo após o ataque à presa (DU; CLEMENTSON, 2010).

BmLec, uma lectina purificada da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, é um exemplo de lectina com atividade anti-bacteriana, atuando de modo a diminuir o crescimento das bactérias em até 15%, por meio de alterações estruturais na bactéria, que, por sua vez, incluem um elevado índice de vesiculação na membrana bacteriana, seguido de ruptura da mesma em alguns casos. Dessa forma, BmLec induz a agregação bacteriana, e, por conseguinte, leva à precipitação de estruturas dessa membrana bacteriana, o que diminuiu sua replicação (BARBOSA et al., 2010).

BIL, uma lectina ligante de galactose purificada da peçonha de *Bothrops leucurus*, também apresenta atividade anti-microbiana contra bactérias Gram-positivas, patogênicas ao homem. Os autores sugerem que a lectina interage com o peptidoglicano presente na parede celular dessas bactérias, mas que o mesmo não ocorre quando a proteína é testada em bactérias Gram-negativas. (NUNES et al., 2011). Apesar de o mecanismo de ação de lectinas originadas de peçonhas ofídicas sobre bactérias ainda não estar bem elucidado, já se pode inferir que as mesmas podem ser utilizadas como fármacos com ação bactericida.

1.5. Peçonhas ofídicas: Epidemiologia, características do envenenamento ofídico e composição

Os acidentes ofídicos representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais, sobretudo durante os meses quentes e chuvosos, devido à frequência com que ocorrem e a mortalidade que ocasionam, variando nas

diferentes regiões do planeta (PINHO; PEREIRA, 2001). Existem aproximadamente três mil espécies de serpentes em todo o mundo, das quais 10 a 14% são consideradas peçonhentas (PINHO et al., 2000). Por sua vez, um animal é dito peçonhento quando possui glândulas produtoras de toxinas, com ductos excretores, associadas ou não a um aparato inoculador (FREITAS, 1991).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (2007), o número de registros de ofidismo está aumentando anualmente, com notificações de 28.597 acidentes em 2005. A letalidade é de aproximadamente 0,4%, mais evidenciada no envenenamento crotálico com índice de 1,87%. A maioria desses acidentes deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* (jararaca, jaracuçu, caigara, urutu, combóia, etc), compreendendo 90,5% dos casos registrados com informação da espécie. Em seguida, estão as serpentes do gênero *Crotalus* (cascavéis), com 7,7% dos casos; *Lachesis* (surucucu, surucutinga), com 1,4% e *Micrurus* (corais), com 0,4% (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). No Triângulo Mineiro e sul do Estado de Goiás, cerca de 80% dos acidentes ofídicos são causados pelas jararacas, enquanto que 20% são causados pelas cascavéis, sendo raras as picadas pelas demais serpentes (FRANCO et al., 2001).

O perfil epidemiológico desses acidentes revela predominância em pessoas do gênero masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos, atingidos principalmente nos membros inferiores e picados geralmente por jararacas (BOCHNER; STRUCHINER, 2003). Uma vez que as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pelo maior número de picadas no país, é de grande interesse o estudo de sua peçonha e os efeitos causados nas vítimas. O envenenamento botrópico é caracterizado por efeitos locais, tais como dor, edema, equimose, sangramento, bolha, abscesso e necrose na região da picada (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). A magnitude desses efeitos locais depende em suma da quantidade de peçonha inoculada, do tempo entre a picada e o início da soroterapia, além do eventual uso de torniquete (FRANÇA, 1997). Por sua vez, as complicações sistêmicas incluem alterações na hemostasia, distúrbios na coagulação sangüínea e na função

plaquetária, hemorragias e insuficiência renal aguda e, em casos mais graves, choque (OLIVEIRA et al., 2003; TOKARNIA E PEIXOTO, 2006; RIBEIRO et al., 2008). Os soros antibotrópicos neutralizam a maioria desses efeitos sistêmicos, mas não são muito eficazes na neutralização daqueles locais (BATELLINO et al., 2003).

Os efeitos tantos locais quanto sistêmicos se devem a ação dos componentes da peçonha ofídica, que na sua maioria compreendem proteínas (cerca de 94% da composição da peçonha bruta), podendo agir de forma sinérgica ou isolada (PHUI YEE et al., 2004). Muitas dessas já foram bem caracterizadas, como serino- e metaloproteases, fosfolipases A₂ e L-aminoácido oxidases, além daquelas que estão recebendo mais destaque atualmente, como hialuronidases, 5'nucleotidases e lectinas tipo C (RAMOS E SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; QUEIROZ et al., 2008).

A caracterização de proteínas menos expressas foi possível, após a revelação de sua presença e importância por técnicas mais recentes, que constituem a denominada venômica, ou seja, um estudo geral da composição de peçonhas por meio de transcriptoma (análise da expressão tecidual de genes que codificam toxinas) e proteoma (separação por eletroforese bidimensional ou por cromatografia de fase reversa das proteínas evidenciadas após tradução em determinado tecido). A venômica também tem permitido a descoberta de constituintes das peçonhas com aplicações em diagnóstico clínico e desenvolvimento de drogas para tratamento de enfermidades, além de contribuir para um melhor entendimento da evolução da peçonha e as características do envenenamento (CALVETE et al., 2007). Um desses componentes, que ainda apresenta um efeito incerto no envenenamento ofídico, são as lectinas tipo C. Geralmente, os trabalhos de venômica que relataram a sua presença enquadram as lectinas ligantes de sacarídeos e as lectinas tipo C-like na mesma classificação, o que torna o entendimento acerca de sua porcentagem na composição total da peçonha um pouco confuso.

A porcentagem de lectinas em relação à composição total da peçonha, revelada pelas técnicas de proteoma e transcriptoma, varia entre 14,5 a 1,5%, sendo mais evidente na peçonha de *Bothrops insularis*, em que dois clones referentes a lectinas ligantes de D-galactose foram encontrados, enquanto os

demais referem-se às lectinas tipo C-like (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002). Os autores sugerem que as lectinas seriam de fundamental importância para a coagulabilidade do sangue da vítima, após o envenenamento por essa serpente. Tais diferenças podem ser atribuídas ao fato de que a serpente *B. insularis* localiza-se em uma ilha, fato que justifica a sua diferenciada composição da peçonha (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004).

Por outro lado, as lectinas são menos representativas na peçonha de *Bothrops alternatus*, sugerindo que elas contribuiriam numa menor proporção para a coagulabilidade característica dessa peçonha, ao contrário das demais peçonhas botrópicas (CARDOSO et al., 2010). Também vale salientar que lectinas ligantes de D-galactose não foram encontradas no transcriptoma da peçonha de *Bothrops jararaca*, apesar de afirmações anteriores descreverem a sua presença por isolamento da proteína pura, mostrando que peçonhas ofídicas de diferentes indivíduos podem variar a sua composição, mesmo se tratando da mesma espécie (CIDADE et al., 2006).

Dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, originado na América Central e posteriormente espalhado para América do Sul (VALDUJO et al., 2002), a serpente *Bothrops pauloensis* tem sido foco de estudo de nosso grupo de pesquisa há algum tempo. Essa serpente tem grande importância, pois se distribui ao longo de todo o território brasileiro, excedendo apenas a Amazônia. Assim, essa é uma serpente localizada em regiões secas e semi-áridas, incluindo o Triângulo Mineiro, evidenciada principalmente em áreas de atividade agrícola de café e soja, durante o outono e inverno, fato provavelmente relacionado ao aspecto reprodutivo do animal (VALE; BRITTES, 2008). *B. pauloensis* também é encontrada em outros países sul-americanos, incluindo a Bolívia (JANSEN, 2006).

Entretanto, a nomenclatura dessa serpente vem mudando ao longo do tempo. Inicialmente, a mesma era incluída no complexo *Bothrops neuwiedi*, sendo denominada *Bothrops neuwiedi pauloensis* desde sua descrição por Amaral (1925), de modo que Silva (2004) viu a necessidade de dividir o complexo *Bothrops neuwiedi*, reclassificando-a em *Bothrops pauloensis*. Porém, Fenwick e colaboradores (2009), baseados em evidências morfológicas e moleculares, reclassificaram novamente *Bothrops pauloensis* em

Bothropoides pauloensis, apesar de essa nova denominação ainda não estar sendo utilizada nas publicações em Toxinologia.

O uso de toxinas naturais e seus derivados são amplamente relacionados à descoberta de fármacos que podem agir terapeuticamente (TEMPONE, 2001). Muitos dos componentes da peçonha de *Bothrops pauloensis* já foram isolados e caracterizados, incluindo fosfolipases, uma metaloprotease e uma serinoprotease semelhante à trombina (RODRIGUES et al., 1998, 2000; RODRIGUES et al., 2007, 2009; COSTA et al., 2009). Portanto, a descoberta de novos componentes dessa peçonha é de grande importância, uma vez que podem ser usados farmacologicamente no tratamento de doenças, além de representarem um enorme avanço para a compreensão do envenenamento ofídico, por meio da relação estrutura e função de proteínas e peptídeos.

Referências bibliográficas

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**. v. 96, nº 3, p. 23contd-5c, 1965.

AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**. v. 128, p. 61-7, 2011.

ALONSO, R.; RUBIO, L. A.; MUZQUIZ, M.; MARZO, F. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. **Animal Feed Science and Technology**. v. 94, p. 1-13, 2001.

AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations of Neotropical pitvipers. **Contribution to Harvard Institute of Tropical Biology**. v. 2, p. 1-64, 1925.

AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surface to enzymes: I. wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 50, p. 613-9, 1963.

BALZARINI, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. **Antiviral Research**. v. 71, p. 237-47, 2006.

- BANERJEE, N.; SENGUPTA, S.; ROY, A.; GHOSH, P.; DAS K.; DAS, S. Functional alteration of a dimeric insecticidal lectin to a monomeric antifungal protein correlated to its oligomeric status. **PLoS One**. v. 6, p. e18593, 2011.
- BARBIERI, L.; BATELLI, G. B.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1154, p. 237-282, 1993.
- BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 16, p. 493-504, 2010.
- BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; DOS SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; 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, nº 4, p. 237-50, 1996.
- BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; DA SILVA, A.M.; CURY, Y.; FARSKY, S.H. Assesment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**. v. 41, p. 583-593, 2003.
- BIES C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 425–435, 2004.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C.J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Caderno de Saúde Pública**. v. 19, nº 1, p. 7-16, 2003.
- BONIFACIO, S. L.; NOVARETTI, M. C. Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31, p. 104-111, 2009.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.
- BOYD, W. C.; REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances in various plants. **Journal of Immunol**. v. 62, p. 333-339, 1949.
- BRAY, R.S. *Leishmania mexicana mexicana*: Attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages in vitro. **Journal of Protozoology**. v. 30, p. 314-322, 1983.
- BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochemistry Journal**. v. 391, p. 1–15, 2005.

- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**. v. 42, nº 11, p. 1405-14, 2007.
- CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **Journal of Protein Chemistry**, v. 1, p. 43-50, 2002.
- CARDOSO, K.C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**. v. 11, p. 1-22, 2010.
- CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 44, p. 933-938, 1998.
- CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1471–1476, 2001
- CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; LEI, H. Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**. v. 45, nº2, p. 286-96, 2007.
- CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**. v. 3, nº 1, p. 1-9, 1991.
- CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; BON, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M: *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**. v. 48, p. 437-461, 2006.
- CLEMETSON, K.J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon** v. 56, p. 1236-1246, 2010.
- COSTA, F. L.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 54, nº 6, p. 725-35, 2009.
- DAHMS, N. M.; HANCOCK, M. K., P-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 317– 340, 2002.
- DALLA-PELLEGRINA, C.; PERBELLINI, O.; SCUPOLI, M. T.; TOMELLERI, C.; ZANETTI, C.; ZOCCATELLI, G.; FUSI, M.; PERUFFO, A.; RIZZI, C.;

CHIGNOLA, R. Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 237, nº 2, p. 146-53, 2009.

DIXSON, T. On the active principle of castor oil. **Medico-Chirurgical Transactions**. v. 70, p. 107–116, 1887.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**. v. 5 p. 71-79, 2001.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**.v. 45, p. 207-32, 1993.

DRICKAMER, K. Two Distinct Classes of Carbohydrate Recognition Domains in Animal Lectins. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 263, p. 9557-9560, 1988.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annual Review of Cell Biology**. v. 9 p. 237-64, 1993.

DU, X.; CLEMENTSON, K. J. Reptile C-type lectins. In: **Venoms and Toxins of reptiles**. MARCKESSY, S. P. New York, 2010.

EHRlich, R. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. **Dtsch. Med. Wschr.** nº. 44, p.1218-1219, 1891.

ELIFIO-ESPOSITO, S.; TOMAZELI, L.; SCHWARTZ, C.; GIMENEZ, A. P.; FUGII, G. M.; FERNANDES, L. C.; ZISHLER, L. F.; STUELP-CAMPELO, P. M.; MORENO, A. N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunology**. v. 12, p. 1-7, 2011.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. v. 156, p. 617–640, 2009.

FLEXNER, S.; NOGUCHI, H. Snake venom in relation to haemolysis, bacteriolysis, and toxicity. **The Journal of experimental medicine**, v. 6, p. 277-301, 1902.

FRANÇA, F. O. S. **Associação da venenemia e da gravidade em acidentes botrópicos no momento da admissão do Hospital Vital Brasil do Insituto Butantan/ SP, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais**. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1997.

FRANCO, R.L.; ROCHA, C.C.; JORGE, M.T; RIBEIRO, L.A. Snake bites in the southern Minas Gerais State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins**. v. 7, nº 1, p. 56-68, 2001.

FREITAS, J. C. Nomenclatura em toxinologia, relações com a comunicação química entre organismos e propriedades biológicas das toxinas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 53, p. 191-195, 1991.

FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. Ofidismo. In: **Manual de Diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 2001.

GABIUS, H. J. Animal lectins. **European Journal of Biochemistry** v. 243, p.543- 76, 1997.

GABIUS, H. J.; WU, A. M. The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. **Chang Gung Medical Journal**. v. 29 p. 37-62, 2006.

GARTNER, T.K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D.C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters**. 117, 13–16, 1980.

GIRELLO, A. L.; KÜHN, T. I. B. B. Bases imuno-hematológicas. In: **GIRELLO, A. L.; KÜHN, T. I. B. B. Fundamentos da Imunologia Eritocitária**. São Paulo, Editora Senac São Paulo, pp. 89, 2002.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; S DUTRA, D. L.; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H. C.; HO, P. L.; ZINGALI, R. B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 1-11, 2004.

HARRISON, L. Soluble β -galactoside binding lectins in vertebrates, In: **D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche, Lectin Reviews**, v. 1, Sigma, St Louis, MO, pp. 17–39, 1991.

JANSEN, M. First records of *Bothrops pauloensis* Amaral, 1925 (Serpentes: Viperidae) in Bolivia. **Kempffiana**. v. 2, nº 1, p. 66-71, 2006.

JIMÉNEZ-CATELANOS, M.R.; ZIA, H.; RHODES, C.T. Mucoadhesive drug delivery systems, **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 19, p. 143–194, 1993.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**. v. 299, nº. 1-2, p. 279-91, 2002.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**. v. 212, nº 2, p. 193-211, 1998.

KASSAB, B. H. **BJcuL, Lectina do Veneno de *Bothrops jararacussu*: Análise Estrutural do cDNA e Investigações Preliminares do Efeito *in vitro* da Proteína Nativa sobre Células Tumerais do Cólon**. Campinas, 2004, 93pp.

KASSAB, B. H. ; CARVALHO, D. D. ; OLIVEIRA, M. A. ; PEREIRA, G. A. G. ; NOVELLO, J. C. . Cloning, Expression and Structural Analysis of Recombinant BJcuL, a c-type lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Protein, Expression and Purification**, v. 35, p. 67-74, 2004.

KASSAB, B. H. **Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da serpente *Bothrops moojeni***. Campinas, 2004, 78pp

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. A note on the recent discussion on the definition of the term 8220 lectin 8221. In: **Lectins: Biology, Biochemistry, clinical Biochemistry**. v. 3, 1983.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 187– 197, 2002.

KISHORE, U.; EGGLETON, P.; REID, K. B. M. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **Matrix Biolology**, v.15, p. 583-592, 1997.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 89, p. 45–55, 2011.

LEI, H. Y.; CHANG, C. P. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**. v. 19, p. 16:10, 2009.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review in Biochemistry**. v. 55, p. 35-67, 1986.

LIU, B.; BIAN, H. J.; BAO, J. K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**. v. 287, nº 1, p. 1-12, 2010.

MEDEIROS, D. S.; MEDEIROS, T. L.; RIBEIRO, J. K.; MONTEIRO, N. K.; MIGLIOLO, L.; UCHOA, A. F.; VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, A. S.; DE SALES, M. P.; SANTOS, E. A. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology, PartB: Biochemistry and Molecular Biology**. v. 155, p. 211-216, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Atual - Ofidismo**. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao.pdf>. Acesso em 18/04/2011.

MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithsonian Contributions to Knowledge**. v. XII, p.89-90, 1860.

MIYOSHI, N.; KOYAMA, Y.; KATSUNO, Y.; HAYAKAWA, S.; MITA, T.; OHTA, T.; KAJI, K.; ISEMURA, M. Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. **Journal of Biochemistry**. v. 130, nº 6, p. 799-805, 2001.

MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon**. v. 45, nº8, p. 1099-114, 2005.

MORITA, T. Structure-function relationships of C-type lectin-related proteins. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**.v. 34, nº4-5, p. 156-9, 2005.

MOURA, G. E. D. D. **Avaliação do efeito citotóxico da lectina da esponja marinha *Cliona varians* contra células de leucemia mielóide crônica. Tese (doutorado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.; FOOK, J. M.; DIAS, A. S.; MONTEIRO, N. K.; RIBEIRO, J. K.; MOURA, G. E.; MACEDO, L. L.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology**. v. 145, p. 517-523, 2006.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 29, p. 168-178, 2007.

MURDOCK, L. L., SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 6605-11, 2002.

NUNES, E. DOS S.; DE SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SANTANA, G. M.; GOMES, F. S., COELHO, L. C., PAIVA, P. M.; DA SILVA, R. M.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M.T.. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom, **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 159, p. 57-63, 2011.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**. v. 20, p. 37-41, 1960.

OGILVIE, M. L.; GARTNER, T. K. Identification of lectins in snake venoms. **Journal of Herpetology**. v. 18, p. 285-90, 1984.

OLIVEIRA, R. B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE, M. T. Fatores associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero

Bothrops. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 36, n^o 6, p. 657-663, 2003.

PANUNTO, P. C., DA SILVA, M. A., LINARDI, A., BUZIN, M. P., MELO, S. E., MELLO, S. M., PRADO-FRANCESCHI, J., HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**. v. 47, p. 21-31, 2006

PAROUTAUD, P.; LEVI, G.; TEICHBERG, V. I.; STROSBURG, A. D. Extensive amino acid sequence homologies between animal lectins. **Proceeding of National Academic Sciences of United States of America**. v. 84, p. 6345-8, 1987.

PEREIRA-BITTENCOURT, M. CARVALHO, D. D.; GAGLIARDI, A. R.; COLLINS, D. C. The effect of a lectin from the venom of the snake. *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. **Anticancer Reserch**. v. 19, p. 4023-4025, 1999.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. v. 10, p. 347-52, 1995.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. The role of lectins in plant defence. **Histochemistry Journal**. v. 27, p. 253-71, 1995.

PHUI YEE, J.S.; NANLING, G.; AFIFYAN, F.; DONGHUI, M.; SIEW LAY, P.; ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K.. Snake postsynaptic neurotoxins: Gene structure, phylogeny and applications in research therapy. **Biochimie**. v. 86, p. 137-149, 2004.

PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. **Ofidismo**. Revista da Associação médica Brasileira. v. 47, n^o 1, p. 24-29, 2001.

PINHO, F.O.; VIDAL, E.C.; BURDMANN, E. A. Atualização em insuficiência renal aguda após acidente crotálico. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v. 22, n^o 3, p. 162-168, 2000.

POLITO, L.; BORTOLOTTI, M.; FARINI, V.; BATTELLI, M. G.; BARBIERI, L.; BOLOGNESI, A. Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 41, n^o 5, p. 1055-61, 2009.

POWELL, L. D.; VARKI, A. I-type lectins. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 16; p. 14243-6, 1995.

QUEIROZ, G.P.; PESSOA, L.A.; PORTARO, F.C.; FURTADO, M.D.E.F.; TAMBOURGI D.V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. **Toxicon**. p. 52, nº 8, p. 842-851, 2008.

RAMOS, O.H.P., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry Physiology. Part C**, v. 142, p. 328–346, 2006 .

RENKONEN, K. O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of leguminosae. **Ann. Med. Exp. Fenn. (Helsinki)**, v. 26: p. 66-72, 1948.

RIBEIRO, L. A.; GADIA, R.; JORGE, M. T. Comparação entre a epidemiologia do acidente e a clínica do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*, em adultos idosos e não idosos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, nº1, p. 46-49, 2008

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANÇA, J.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**. v. 91, nº4, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L., SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 50, nº1, p. 153-65, 2007.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of newwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops newwiedi* snake venom. **Archives in Biochemistry and Biophysics**. v. 381 nº 2, p. 213-24, 2000.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M., MANCIN, A. C.; FONTES, M. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops newwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology A**. v. 121, nº 3, p. 215-22, 1998.

SCHWARZ, R. E.; WOJCIECHOWICZ, D. C.; PICON, A. I., SCHWARZ, M. A.; PATY, P. B. Wheatgerm agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. **British Journal of Cancer**. v. 80, nº 11, p. 1754-62, 1999.

SCHUMACHER, K.; SCHNEIDER, B.; REICH, G.; STIEFEL, T.; STOLL, G.; BOCK, P. R.; HANISCH, J.; BEUTH, J. Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast

cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrospective cohort study. **Anticancer Research**. v. 23, p. 5081-7, 2003.

SEMIGLAZOV, V. F.; STEPULA, V. V.; DUDOV, A.; SCHNITKER, J.; MENGES, U. Quality of life is improved in breast cancer patients by Standardised Mistletoe Extract PS76A2 during chemotherapy and follow-up: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial. **Anticancer Research**. v. 26, p. 1519–1529, 2006.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, p.177, v. 949–959, 1972.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, nº. 11, p. 53–62, 2004.

SCHAWALDER, A.; REID, M. E.; YAZDANBAKHSH, K. Recombinant glycoporphins C and D as tools for studying Gerbich blood group antigens. **Transfusion**. v. 4, p. 567-74, 2004.

SILVA, F. P. JR.; ALEXANDRE, G. M.; RAMOS, C. H.; DE-SIMONE, S. G. On the quaternary structure of a C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom--BJ-32 (BjcuL). **Toxicon**, v. 15, p. 944-953, 2008.

SILVA, V.X. The *Bothrops neuwiedi* complex. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**, vol. 2, pp. 410–422. Ithaca, New York., 2004.

STILLMARK, H., 1888. **Über Ricin, eines giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und anderen Euphorbiacen**. Inaugural Dissertation, University of Dorpat, Estonia.

STOCKERT, R. J.; MORELL, A. G.; SCHEINBERG, I. H. Mammalian hepatic lectin, **Science**, v. 186, p. 365– 366, 1974.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, p. 227-237, 1936.

SWANSON, M. D.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J.; MARKOVITZ, D. M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **Journal of Biological Chemistry**. v. 285, nº 12, p. 8646-55, 2010.

TEICHBERG, V. I. Electrolectins: beta-D-galactoside-binding proteins. **Methods in Enzymology**. v. 50, p. 291-302, 1978.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; JR; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 280, nº3, p. 620-4, 2001.

TOKARNIA, C.H.; PEIXOTO, P.V. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, nº 2, p. 55-68, 2006.

UTARABHAND, P.; RIITIDACH, W.; PAIJIT, N. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. **Science Asia**, v. 33, p. 41- 46, 2007.

VALDUJO, P. H.; NOGUEIRA, C.; MARTINS, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. **Journal of Herpetology**. v. 36, nº 2, p. 169-176, 2002

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Zoociências**. v. 10, nº 2, p. 155-161 2008.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**. 2011 Mar 21. [Epub ahead of print]

VO, T. S.; KIM, S. K. Potential Anti-HIV Agents from Marine Resources: An Overview. **Marine Drugs**. v. 8, nº 12, p. 2871-92, 2010.

WALKER, J. R.; NAGAR, B.; YOUNG, N. M.; HIRAMA, T.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of a galactose-specific C-type lectin possessing a novel decameric quaternary structure. **Biochemistry**. v. ;43, nº. 13, p. 3783-92, 2004.

WANG, H.; NG, T. B.; OOI, V. E.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **Internacional Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 32, nº 3, p. 365-72, 2000.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Reviews in Biochemistry**. v. 65, p. 441-73, 1996.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Stage-specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**. v. 46, p. 128-34, 1984.

WEIS, W. I.; KAHN, R.; FOURME, R.; DRICKAMER, K.; HENDRICKSON, W. A. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. **Science**. v. 13, p. 1608-15, 1991.

ZELENSKY, A. N.; GREARY, J. E. C-type lectin-like domains in *Fugu rubripes*. **BMC Genomics**. v. 5, p. 1-22, 2004.

ZELENSKY, A. N.; GREARY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS Journal**. v. 272, nº 24, p. 6179-217, 2005.

Capítulo 2:

Purificação e caracterização química e funcional de uma lectina tipo-C ligante de D-galactose da peçonha de *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*)

Resumo: Lectinas tipo C são proteínas caracterizadas por se ligarem a carboidratos de forma não-covalente. Estão descritas em diversos organismos, incluindo peçonhas ofídicas. Esse trabalho teve como objetivo isolar e a caracterizar bioquimicamente uma lectina tipo C da peçonha de *Bothropoides pauloensis*. A proteína denominada BpLec é específica para D-galactose e aglutinou eritrócitos de sangue de cachorro e gato. BpLec também apresentou-se estável em qualquer valor de pH e na presença de cátions divalentes, apesar de sua atividade hemaglutinante ter sido abolida por temperaturas a partir de 50 °C. É uma proteína homodimérica, com duas cadeias de massa molecular relativa de 16,8 kDa cada, como estimado por MALDI TOF. Esta proteína ácida apresenta um ponto isoelétrico de 5,36. Sua estrutura primária de 132 aminoácidos em cada subunidade, determinada por degradação de Edman, confirmou que BpLec pretence à família das lectinas tipo-C, além de ter revelado uma alta identidade (entre 86% e 95%) quando comparada com sequências de proteínas da mesma classe pelo banco de dados SWISS-PROT/TREMBLs, utilizando os programas BLAST e ClustalW. Em relação às aplicações farmacológicas, a proteína inibiu a proliferação da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, enquanto não teve nenhum efeito sobre a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Ainda mais, BpLec é um potente agente aglutinante de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A purificação e a caracterização de novas lectinas contribuem para uma melhor compreensão sobre a estrutura e função dessas lectinas e a sua participação no envenenamento ofídico.

Palavras-chave: Bactéria, *Bothropoides pauloensis*, lectina tipo C, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Purification and biochemical characterization of an agglutinating C-type lectin (BpLec) from *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) snake venom

Letícia Eulálio Castanheira^{a,e}, Débora Cristina de Oliveira Nunes^{a,e}; Thomaz Monteiro Cardoso^{b,e}; Renata Santos Rodrigues^{c,e}; Michael Richardson^d; Márcia Helena Borges^d; Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama^a; Veridiana M. Rodrigues^{a,e*}.

Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia-MG, Brazil^a; Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre-RS, Brazil^b; Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil^c; Fundação Ezequiel Dias, FUNED, Belo Horizonte-MG, Brazil^d; INCT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica^e.

***Corresponding author:** veridiana@ingeb.ufu.br

E-mail: Phone: +55 34-32182203 r 22 Fax: +55 34-32182203 r 24.

Laboratory address: Pará Avenue, 1720. CEP: 38400-902. Uberlândia-MG, Brazil.

Abstract: C-type lectins are carbohydrate binding-proteins, which have been described in many organisms, including snake venoms. In the present work, we demonstrate the isolation and biochemical characterization of a C-type lectin from *Bothropoides pauloensis* venom. The protein named BpLec is D-galactose specific and agglutinates erythrocytes of blood from dog and cat. BpLec was also shown to be stable in any pH range of 2-11 and in the presence of some cationic ions, although its haemmagglutinating activity was abolished at temperatures above 50 °C. BpLec is homodimeric, exhibiting two chains of relative molecular mass of 16.8 kDa each, as estimated by MALDI TOF analysis. The acid protein presents an isoelectric point of 5.36. The primary structure of 132 amino acids for each subunit of BpLec, determined by Edman degradation, revealed a high identity (between 95% and 86%) when compared with the sequences of other related proteins. Regarding to pharmacological applications, the protein was effective in inhibiting Gram-positive bacteria, but not Gram-negative bacteria. In addition, BpLec was a potent agglutinating factor of promastigote forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. This data suggests an interaction between BpLec and galactose present in parasite surface, which could alter some biological functions from the parasite.

Keywords: Bacteria, *Bothropoides pauloensis*, C-type lectin, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

2.1. Introduction

Lectins are non-enzymatic proteins characterized by binding to carbohydrates in a non-covalent, but reversible manner, without degrading them (Kishore et al., 1997). The region within the protein responsible for this binding is called carbohydrate recognition domain (CRD), a sequence usually found in the C-terminal region of the protein (Drickamer, 1988). According to structural informations, including those related to the CRD sequence, animal lectins may be divided into five classes: C-type lectins, S-type lectins or galectins, I-type lectins, P-type lectins and pentraxins (Barondes et al., 1994; Drickamer, 1988).

C-Type lectins are calcium dependent proteins, existent in different organisms, from microorganisms, to plants and animals (Lis and Sharon, 1986; Utarabhand et al., 2007). They have been extensively characterized specially in plants, where their major feature of agglutinating erythrocytes was first identified by Stillmark in 1888, after the discovery of ricin by Dixon in 1887. This agglutinating property, described so far by Sumner and Howell in 1936, occurs due to the interaction between the sugar existing in the surface of erythrocytes and the carbohydrate recognition domain present in some lectins.

In animal venoms, particularly in snake venoms, C-type lectins are grouped into those capable of agglutinating erythrocytes (true lectins or CTLs) and C-type lectins-like (CLPs). The second group is a variant capable of acting on platelet activation or inactivation and in the coagulation of the blood of the prey (Morita, 2005). Once being very common in snake venoms, CLPs are also known as Snaclecs (Clementson, 2010). In general, despite their agglutinating property, the actual contribution of CTLs in envenoming remains under investigation. However, it is known that galactose-binding lectins may induce paw edema and increase vascular permeability in mice (Lomonte et al., 1990; Panunto, 2006). Other effects may include activation and migration of neutrophils, induction of platelet aggregation, increase in insulin secretion and changes in perfusion pressure, in renal vascular resistance and in urinary flow (Barbosa et al., 2010, Braga et al., 2006, Elifio-Esposito et al., 2011; Havt et al., 2005).

In regard to biotechnological applications, D-galactose-binding lectins may be usefully tools for treating cancer and infections by pathogenic Gram-

positive bacteria (Kassab et al., 2004; Nunes et al., 2011, Pereira-Bittencourt et al., 1999). Furthermore, by identifying the galactose present in glycoproteins on the surface of promastigotes from different *Leishmania* species, lectins may also be used as diagnostic agents for differentiating the infective form from the others (Wilson and Pearson, 1984; Medeiros et al., 2011).

Although snake venom lectins usually correspond to 1% of the crude venom or less, they have been isolated since the description of a thrombolectin from *Bothrops atrox* venom, the first lectin isolated from snake venom, by Gartner and colleagues (1980). Ever since, various works of isolation, characterization and even molecular cloning have been published, mostly on members of the former *Bothrops* genus (Gartner & Ogilvie, 1984; Hirabayashi et al., 1991; Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 2002; Kassab et al., 2004; Havt et al., 2005; Barbosa et al., 2010; Mendonça-Franqueiro, 2011; Nunes et al., 2011).

Bothropoides pauloensis is a snake initially found in Central America, but which has now spread to the south of the continent. This snake is also evident in all Brazilian territory, except Amazonia (Valdujo et al., 2002; Vale e Brittes, 2008). Formely, following the description of Amaral (1925), it was denominated as *Bothrops neuwiedi pauloensis*, then reclassified as *B. pauloensis* by Silva (2004), and now is denominated as *Bothropoides pauloensis* because of morphological and molecular evidence (Fenwick et al., 2009). Since *B. pauloensis* is common in the Triangulo Mineiro region, in the State of Minas Gerais, Brazil, the constituents of its venom have been characterized by our research group also in order to screen for some further pharmacological applications. In this work, we demonstrate the purification, chemical and biological characterizations of BpLec, a C-type lectin D-galactose-ligand from *Bothropoides pauloensis* (*Bothrops pauloensis*) snake venom, which may be used as a diagnostic agent for promastigotes forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

2.2. Material and methods

2.2.1. Material

Bothropoides pauloensis dried crude venoms were purchased from the Bioagents Serpentarium (Batatais, SP, Brazil) and kept at 4 °C. Blood from cat, dog, horse and ox were kindly supplied by Clinical Analysis Laboratory of Veterinary Hospital of Federal University of Uberlândia (Minas Gerais, Brazil).

All reagents used were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA) or Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil) and all the other chemicals were also of analytical grade.

2.2.2. Isolation of type c lectin from *Bothropoides pauloensis* venom (BpLec)

Crude dried venom from *Bothropoides pauloensis* was dissolved in Tris saline buffer containing calcium chloride (CTBS: 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) and centrifuged twice at 2450 x g during 10 minutes each, at 4°C, for excluding insoluble material. The sample was applied to an affinity agarose column immobilized with D-galactose (0.5 x 4 cm, Pierce, USA) and incubated for approximately one hour. The column, which was previously equilibrated with CTBS, was initially eluted with the same buffer, as suggested by Carvalho et al. (1998). For lectin elution, 0.4 M D-galactose was added to the solution. Subsequently, in order to removing the carbohydrate, BpLec was subjected to an exclusion chromatography on two coupled desalting G-25 columns (1.5 x 2.5 each, GE HealthCare, Sweden), equilibrated and eluted with 0.1 ammonium bicarbonate, at a flow rate of 0.5 mL/min, collecting 500 µL in each tube.

Finally, BpLec was dissolved in 500 µL of solvent A (0.1% trifluoroacetic acid and 5% acetonitrile) and applied to a HPLC system, using a reverse phase column C2C18 (2.0 x 2.5 cm, GE HealthCare, Sweden), which was equilibrated with the same solvent A and eluted with a concentration gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100% at a flow rate of

0.5 mL/ min at room temperature. Protein fractions were monitored at 280 nm and the protein quantification was performed according to Bradford (1976).

2.2.3. Biochemical characterization

2.2.3.1. Conventional Electrophoresis in polyacrylamide gel (PAGE)

Polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) under denaturant conditions (SDS) was performed according to Laemmli (1970). Samples containing 10 µg of protein were heated at 100 °C for 5 min and then run in Tris-glycine buffer pH 8.3 for approximately 45 min at 25 mA and 600 V. The gel was stained with 0,2% Coomassie brilliant blue R-250.

2.2.3.2. MALDI TOF mass spectrometry

A sample of BpLec was also submitted to mass spectrometric analyses, using an AutoFlex III MALDI-TOF-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) controlled by the FlexControl 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The sample was mixed with sinapinic acid matrix solution (1:1, v/v) directly onto a target plate (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and dried at room temperature. The mean mass of the protein was obtained in linear mode with external calibration, using the Protein Calibration Standard (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The Flex Analysis 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) was used for the analysis of mass spectrometric data.

2.2.3.3. Isoelectric focusing by 2D Electrophoresis

The isoelectric point of the isolated protein was determined as described by the manufacturer, when 25 µg of BpLec was precipitated using the 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare). After 5 minutes of drying, the sample was resuspended in 200 µL rehydration buffer (6M urea, 2M thiourea, 2% ASB-14

(w/v), 15 mM DTT, 0.002% blue bromophenol 1%), containing also 0,5% (v/v) IPG Buffer, pH 3-10 (GE Healthcare). The rehydration was performed in the IPGPhor III system (GE Healthcare), under 40 volts, during 14 hours. Polyacrylamide strips with immobilized pH gradient (pH from 3 to 10, 11 cm in length) were submitted, after rehydration, to isoelectric focusing in the same system, totalizing 34636 V/h.

Strips were focused in two phases in 10 mL of the equilibrium solution (1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 6M Urea, 30% glycerol, 2% w / v SDS, 0.002% bromophenol blue 1% w / v) for 15 minutes. In the first phase, 10 mg/mL of dithiothreitol (DTT) were added to the equilibrium solution. In the second, it was added 25 mg/mL of iodoacetamide. Then, strips were submitted to SDS-PAGE 8-18% in the Multiphor II system, as described by the manufacturer and the gel was stained with 2% (w/v) Coomassie G-250. After 2D electrophoresis, the gel was scanned in Image Scanner (GE Healthcare), using Image Master LabScan™ v 5.0 program, with a resolution of 300 dpi. The analysis was performed by Image Master 2D Platinum v 6.0 program (GE Healthcare).

2.2.3.4. Theoretical isoelectric point and molecular mass

Theoretical isoelectric point and molecular mass were computed with ProtParam tool, by using an in silico analysis available in (http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html) (Gasteiger et al., 2005).

2.2.3.5. Sequence determination

The lectin (1.0 mg) was reduced and alkylated with 4-vinyl pyridine, as described by Wilson and Yuan (1989). BpLec was dissolved in 1 ml of 0.1 M Tris-HCl (pH 8.6), 6 M guanidine-HCl. After addition of 30 µL β-mercaptoethanol under nitrogen, the sample were incubated first at 50 °C for 4 h, then with 40 µL of 4-vinyl pyridine in the dark at 37°C for 2 hours and subsequently desalted on a P10 column (GE, healthcare). The S-pyridylethylated proteins were cleaved with trypsin (2%. w/w, enzyme:substrate

in 1 mL of 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 7.9) for 4.5 h at 37 °C. The cleavage products were separated on a Vydac C18 small pore column (4.6 x 250 mm) in a linear gradient of 0–50% acetonitrile in 0.1% aqueous TFA and sequenced using a Shimadzu PPSQ-21A protein sequencer. The primary structure of BpLec was compared with the sequences of other related proteins in the SWISS-PROT/ TREMBL data bases using the FASTA 3 and BLAST programs. BpLec sequence was deposited in SwissProt database (P86970).

2.2.4. Functional characterization

2.2.4.1. Haemagglutinating activity

Haemagglutination assay was performed as described by Carvalho and colleagues (1998) by serial twofold dilution on a 96-well microtiter U-shaped plate. Different animal bloods (cat, dog, horse, mouse and ox) were washed three times (centrifugated at 950 g, during 10 minutes at 25 °C) in CTBS in order to separate platelets and erythrocytes. In each well, 25 µL of erythrocytes (2% v/v suspension) and 50 µL of BpLec (800µg/mL) were added. The suspension was incubated for at least two hours at 4 °C and subsequently the haemagglutination was visually observed.

Lectin activity was defined, in units of haemmagglutinating, as described by Kilpatrick and Yeoman (1978), considering that the activity is reciprocal of the titre. Nevertheless, for 50 µL of BpLec, for instance, in a dilution of 1/16, the activity was expressed as 16 units/50 µL. The specific activity was also expressed in units per mg of protein.

2.2.4.2. Carbohydrate binding specificity

A similar procedure was accomplished for testing the carbohydrate specificity of BpLec. In this assay, the lectin was incubated with TBS buffer containing different sugars in a maximum concentration of 64 mM, which were formerly twofold serially diluted in the 96 microwell-plate. The concentration of BpLec was adjusted for 0.5 µg of protein in each well. The solution was incubated during 30 minutes before adding 25 µL of erythrocytes from dog

blood (2% v/v suspension) and the inhibition of haemagglutination was analyzed as described in item 2.4. Results were expressed as the minimal concentration of carbohydrate required to inhibit haemagglutinating doses of the lectin.

2.2.4.3. BpLec stability at different pH values and temperatures

This assay was carried out as described by Moura and colleagues (2006). First, in order to evaluate the effect of temperature on haemagglutinating activity, 0.5 µg of lectin (10 µg/mL) were incubated at 4, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 °C for 1 h at each temperature and the haemagglutinating activity was subsequently analyzed.

The effect of pH on the lectin activity was observed by haemagglutinating assay of the lectin after incubation of the same protein concentration (10 µg/mL) with buffers of different pH ranging from pH 2.0 to pH 11.0: 50 mM glycine–HCl buffer (pH 2.0 and 3.0), 50 mM acetate buffer (pH 5.0), 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.5, 8.0, 8.75 and 10.0), and 50 mM glycine–NaOH buffer (pH 11.0) over one hour.

2.2.4.4. The effects of some divalent cations on BpLec stability

As described by Hamako and colleagues (2007), the effects of BpLec upon some cationic ions was evaluated by incubating the protein (80 µg/mL) with TBS containing 10 mM of metal ion solutions (BaCl₂, CaCl₂, HgCl₂, MgCl₂ and ZnCl₂) at pH 7.5, for 1 h at 25 °C. Subsequently, the haemagglutinating assay was performed and the titre of activity, measured as a percentage, was scored after two hours.

2.2.4.5. Antibacterial activity

To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of BpLec upon bacteria growth, Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) and Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC25922) bacterial strains were cultivated in 10 mL of Mueller-Hinton broth (Himedia, India) at 37 °C under continuous shaking, until the optic density reached 1.0 by the reading at 600 nm. Then, each initial bacterial suspension was diluted in fresh Mueller-Hinton broth, in

ratios of 1:50 for Gram-negative and Gram-positive to 1:100, corresponding to 2 to 5×10^5 colony forming units (CFU)/mL. In a 96-well plate, 50 μ L of each bacterial suspension were added, followed by the addition of 50 μ L of BpLec (in a maximum concentration of 0.5 mg/mL). MILLI-Q water was considered as the positive control of maximum bacteria growth and 0.4% (v/v) formaldehyde was the negative control of absence of bacterial proliferation. All samples were incubated at 37°C during 22 hours and finally analyzed at 595 nm in EL800 reader (Biotek, USA). MIC was defined as the lowest lectin concentration capable of inhibiting the growth of 50% or more of microorganisms relative to the positive control (Amsterdam, 1996).

2.2.4.6. Effects of BpLec on promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Promastigote forms of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) were maintained in a biochemical oxygen demand chamber (B.O.D.) at 23 ± 0.5 °C, growth in Schneider medium (LGC Biotechnologia, Brazil) containing penicillin (100 UI/mL) and streptomycin (100 μ g/mL). This medium was also supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and inactivated by heating. For assessing the action of BpLec in *L. amazonensis*, the activity was performed according to Moura et al. (2006) and Medeiros et al. (2010). Briefly, parasites were washed three times in PBS, followed by treatment with 0.4% trypsin, during 45 minutes at 37 °C. Then, the solution was washed in phosphate buffered saline (PSB) and fixed for 20 hours at 4 °C with PBS 2% formaldehyde. Later, promastigotes were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue for 90 min and the concentration adjusted to a suspension of 5×10^7 cells/mL, in a solution of 0.4% formaldehyde. The agglutination activity was assayed in a microtiter 96-well plate, where 25 μ L of *L. amazonensis* promastigotes solution were added and 25 μ L of lectin in different concentrations (25 μ g, 5 μ g or 1 μ g) with and without 0,4M D-galactose. This new solution was incubated during 24 hours at 5 °C and finally analyzed and photographed in a microscope (Instrutherm, Brazil).

2.3. Results

2.3.1. Lectin isolation and chemical characterization

BpLec was shown to be a C-type lectin D-galactose ligand, which was efficiently purified from *Bothropoides pauloensis* snake venom by using an affinity chromatography, with a reliable percentage of purity (Figure 1). The yield of lectin obtained of 65 mg from crude venom was 370 µg of BpLec, representing 0.5% of total crude snake venom (Table 1). The homodimeric protein showed relative molecular mass of 33.65 kDa, in which each subunit presents 16.8 kDa, determined by MALDI-TOF analysis (data not shown). The putative molecular mass of each subunit computed in silico was 16.2. Its isoelectric point determined by 2D is 5.36, whereas the theoretical pI was found to be 5.17.

The amino acid sequence of the protein was determined by automated Edman degradation of the native molecule and smaller peptides obtained from a digest of the S-reduced and alkylated protein with trypsin. The sequence of BpLec of 132 amino acids for each monomer was subjected to BLAST and ClustalW programs, revealing a high identity when compared with C-type lectins from other snake venoms (Figure 2). Relevant conserved amino acids, such as Cys residues and the carbohydrate recognition domain are marked in red and in green, respectively.

2.3.2. Biological characterization

2.3.2.1. Haemagglutinating assays

Table 2 points out that BpLec presents specificity for agglutinating erythrocytes from dog and cat blood at minimum concentrations of 5 µg/mL and 80 µg/mL, respectively. Otherwise, it has no effects in agglutinating erythrocytes from horse, ox and mice (BALB/c) bloods. Since the blood from dog was the most effective for utilizing low protein doses, it was chosen for the further haemagglutinating procedures.

Table 3 exhibits the inhibition of BpLec by some carbohydrates, revealing that this lectin is specific for lactose and D-galactose, since other carbohydrates did not inhibit the protein in concentrations up to 64 mM.

BpLec showed a strong stability at different pH values (2.0; 3.0; 5.0; 7.5; 8.0; 8.75; 10 and 11.0) and in the presence of divalent ions (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+}). BpLec was found to be relatively thermostable, as only temperatures above 50 °C abolished lectin activity (Figure 3).

2.3.2.2. Antibacterial activity

BpLec was capable of inhibiting Gram-positive bacteria at the minimum concentration of 31.25 µg/mL, whereas no effect was noticed for Gram-negative bacteria, after 22 hours of incubation.

2.3.2.3. Agglutinating activity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

BpLec was not cytotoxic to promastigote forms of *Leishmania (L.) amazonensis* cells (data not shown), but was capable of agglutinating these cells after 24 hours of incubation (Figure 4). BpLec in a concentration of 25 µg demonstrated a stronger capability of agglutinating parasites than other doses (5 µg and 1 µg), since a large agglomerate was detected. All lectin samples incubated with 0.4 M D-galactose did not agglutinate *L. (L.) amazonensis* cells in the same proportion as positive controls. In the negative control with only the parasites and PBS, rosettes were not visualized.

2.4. Discussion

C type lectins are proteins in highlight since the isolation of thrombolectin from *Bothropoides atrox* snake venom by Gautner (1980), a work which set off perspectives about new discoveries in regard to the structure and function of lectins in envenoming and their potential therapeutic applications as well. In snake venoms, lectins are divided into the ones which are a saccharide ligands and C-type lectins-like. This first group which is usually composed of homodimers of about 30 kDa, requires calcium ions for being active and corresponds to 1% or less of the total composition of crude venom, although it

was related a yield of 2.5% for the lectin *Bothrops neuwiedi* snake venom (Komoris et al., 1999; De-Simone et al., 2006). BpLec, the lectin here characterized, was purified from de *B. pauloensis* snake venom by using an agarose affinity resin immobilized with D-galactose. This protein presents a relative molecular mass of 33.65 kDa (16.8 kDa for each subunit) and an isoelectric point of 5.36 (Figure 1). The theoretical pI and molecular mass were 5.17 and 16.2 kDa, respectively. Although both in silico data showed a slight difference when compared with two-dimensional and MALDI-TOF analysis, all results confirmed that BpLec is an acid protein with around 32 kDa. These results are totally consistent with the D-galactose-binding lectins from snake venoms which have been previously described (Carvalho et al, 1998, Havt et al., 2005, Hamako et al., 2007, Barbosa et al, 2011, Mendonça-Franqueiro, 2011). As shown by table I, BpLec corresponds to 0.5% of the *B. pauloensis* crude venom, corroborating the low expression of lectins when compared with other proteins from snake venoms. The same percentage of yield was found for BiL, a lectin isolated from *B. insularis* snake venom (Guimarães-Gomes et al., 2004).

The primary structure determination by Edman degradation and subsequent alignment confirmed that BpLec, a protein composed of 132 amino acids for each subunit, belongs to the class of proteins named C type lectins, presenting a high identity (between 95% and 86%) when compared with the sequences of other related proteins. The nine cysteine residues, evident in all aligned sequences, were marked in red. These residues are of great importance for the stability of the protein, due to the formation of disulfide bridges between them. It also seems likely that this relatively high content of disulphide bridges may be involved in making the snake venom lectins more resistant to the proteolytic enzymes from the blood and tissue fluids of the envenomed victim and those also present in the venom itself (Guimarães-Gomes et al., 2004). According to Hirabayashi and colleagues (1991), snake venom lectins contain eight intrasubunit disulfide bridges in positions (Cys3-Cys14, Cys31-Cys131, Cys38-Cys133, and Cys106-Cys123), whereas the Cys86 from each subunit would be involved in the linkage of the chains. In

addition, the carbohydrate recognition domain, common to galactose-binding proteins from snake venoms, is consisted of three amino acids (Gln96-Pro97-Asp98) and is normally present in the C-terminal portion of the protein (Drickamer, 1988; Abreu et al., 2006). BpLec shows all the residues mentioned above, demonstrating the high conservation among these proteins in diverse snake venoms over the world.

In relation to functional characteristics, the lectin here described was capable of agglutinating erythrocytes from dog and cat in concentrations of 5 µg/mL and 80 µg/mL, respectively (Table II). Erythrocytes from horse, ox and mouse (Balb/c) were not agglutinated by lectin concentrations up to 800 µg/mL. BpLec is a D-galactose and lactose ligand (Table III), as established by the inhibition of haemagglutination with diverse carbohydrates, an assay very used in the lecture to set the specificity of lectins (Marques and Barraco, 2000). Different pH values and divalent cations were not capable of altering the haemagglutinating activity of BpLec, whilst temperatures above 50 °C abolished completely the protein activity (Figure 3). Some works had described this loss in protein stability in consequence of heating (Dresch et al., 2008; Franqueiro-Mendonça et al., 2011; Yan et al., 2005). On the other hand, unlike BpLec, other C-type lectins may also lose their activity when tested in pH values more acid and basic (Dresch et al., 2008; Kabir et al., 2011; Yang et al., 2007), but the BpLec stability upon any pH value here assayed was related by Moura and colleagues (2006). The loss of activity of BpLec at temperatures higher than 50 °C might be related to the oxidation of some disulfide bridges, resulting in the loss of protein stability. Otherwise, the different pH would not be able to cause the same effect in cysteines linkages. It is known that C type lectins require Ca^{2+} for activity, but other divalent cations may have the same effect (Hamako et al., 2007). BpLec showed a considerable activity towards some divalent ions (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+}), considering that none of them were capable of completely abolish lectin activity.

BpLec was effective in inhibiting Gram-positive bacteria growth (*Staphylococcus aureus*) at a minimum concentration of 31.25 µg/mL, while no inhibition was visualized for Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*) (Table

IV). The same effect was described for BIL, a lectin isolated from *Bothrops leucurus* snake venom (Nunes et al., 2011). The authors suggest that lectins are not capable of crossing the outer membrane of Gram-negative bacteria to reach the periplasmatic space, so that they have no effects. Meanwhile, lectins could interact with the peptidoglycan present in Gram-positive bacteria cell wall, justifying their inhibitory activity towards *Staphylococcus aureus* and other pathogenic Gram-positive bacteria. This bactericidal activity seems to be also important in the oral apparatus of the snake, preventing the animal from infection during the ingestion of its prey (Du and Clementson, 2010).

Figure 4 shows the effect of BpLec upon promastigotes from *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, so that, the protein (1 µg, 5 µg and 25 µg) induced the parasite agglutination. In addition, when the different concentrations of lectin were incubated with 0.4 M D-galactose, its haemagglutinating effect upon *L. (L.) amazonensis* promastigotes was partially abolished, indicating a probable interaction between the carbohydrate recognition domain, present in the lectin, and the surface of the parasite. The same action was described for lectins from the *Cinachyrella apion* and *Cliona varians* sponges (Moura et al., 2006; Medeiros et al., 2010), although nothing has been published yet about this agglutinating property of snake venoms upon *Leishmania* sp. It is believed that lectins agglutinate the promastigotes due to the presence of glycoproteins containing galactose in the surface of the parasite in this stage, which are responsible for adhering the parasite to the host. Therefore, it is possible to suggest that lectins could be used as biological tools in the diagnostics of *Leishmania* sp. promastigotes, once the agglutinating capability might enable the differentiation among promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania* sp., as proposed by Wilson and Pearson (1984). Finally, Chang (1981) related the importance of carbohydrate ligand proteins in the interaction between macrophage and parasite, showing that such proteins indeed interfere in the infectant form of *Leishmania* sp.

The precise role of D-galactose ligand lectins in the envenoming is still uncertain. At the moment it is known that they display a cytotoxic character, edematous and are capable of increasing the vascular permeability of the victim

(Lomonte et al., 1990; Panunto, 2006; Mendonça-Franqueiro, 2011). Such characteristics are related to the bothropic envenoming effects in the prey, indicating a probable functional contribution of lectins. Moreover, another activities have been described for this class of proteins from snake venoms, such as activation and migration of neutrophils, induction of platelet aggregation, increase in insulin secretion and changes in perfusion pressure, in renal vascular resistance and in urinary flow, among many other actions (Barbosa et al., 2010, Braga et al., 2006, Elifio-Esposito et al., 2011; Havt et al., 2005). With respect to possible therapeutic applications, some works had suggested the use of lectins as potential anti-tumor and anti-bacterial drugs (Barbosa et al., 2010, Kassab et al., 2004; Nunes et al., 2011, Pereira-Bittencourt et al., 1999).

2.5. Conclusions

In summary, we have isolated a C-type lectin D-galactose ligand from *Bothropoides pauloensis* snake venom, very similar to others previously described in the literature, which shows agglutinating property against promastigote forms of *Leshmania (L.) amazonensis* and inhibits Gram-positive bacteria growth. These findings, put out together with all lectin data from snake venoms might enable some better comprehension about protein structure and its function in the envenoming, which is still very obscure. Also, by screening the regions responsible for its activity against bacteria and promastigotes, it will be possible to design pharmacological drugs with structural similarity.

2.6. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Universidade Federal de Uberlândia (UFU) and Fundação de Amparo à Pesquisa dos Estados de Minas Gerais (FAPEMIG); and the technical support of Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). We also thank the Dr. Maria Aparecida de Souza for assessing in the haemagglutinating activities and providing some carbohydrates and Clinical Analysis Laboratory of Veterinary

Hospital of Federal University of Uberlandia for donating animal bloods. We thank Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho and Msc Paula de Souza Santos (UFU, Brazil) for technical support in bidimensional electrophoresis analysis. Finally, we specially thank the professors Dr. Amélia Hamaguchi and Dr. Maria Inês Homs Brandeburgo, for all support in the experiments, reagents and equipments from our laboratory, as well as all immeasurable teachings.

No potential conflict of interest.

2.7. References

Abreu, P. A.; Albuquerque, M. G.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. *Toxicon*. 48, p. 690-701, 2006.

Amaral, A., 1925. A general consideration of snake poisoning and observations of Neotropical pitvipers. *Contr Harvard Inst Trop Biol*. 2, 1–64.

Amsterdam, D., 1996. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Loman, V. (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 52-111.

Barbosa, P. S. F., Martins, A. M. C., Toyama, M. H., Joazeiro, P.P., Beriam, L. O. S., Fonteles, M. C., Monteiro, H. S. A., 2010. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. *J Venom Anim Toxins* 16, 493-504.

Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N. W., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K-I, Leffler, H., Liu F-T, Lotan, R., Mercúrio, A. M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P. W.J., Rini, J. M., Wang, J. L., 1994. Galectins: a Family of Animal β -Galactoside Binding Lectins. *Cell* 79, 597-598.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 7, 248-254.

Braga, M. D., Martins, A. M., Amora, D. N., de Menezes, D. B., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Marangoni, S., Barbosa, P. S, de Sousa-Alves, R., Fonteles, M. C., Monteiro, H.S., 2006. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon.* 7, 859–867

Carvalho, D. D., Marangoni, S., Novello, J. C., 2002. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. *J Protein Chem.* 21, 43-50.

Carvalho, D. D.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Novello, J. C., 1998. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. *Biochem Mol Biol Intern* 44, 933-938.

Chang, K., 1981. *Leishmania donovani*-macrophage binding mediated by surface glycoproteins:antigens: characterization in vitro by a radioisotopic assay. *Mol. Biochem. Parasitol.* 4, 67–76.

Clemetson, K.J., 2010. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. *Toxicon* 56, 1236-1246.

De-Simone, S.G., Netto, C. C., Silva, F.P., Jr., 2006. Simple affinity chromatographic procedure to purify beta-galactoside binding lectins. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 838, 135–138.

Dixon, T., 1887. On the active principle of castor oil. *Med Chir Trans* 70, 107–116.

Dresch, R. R., Zanetti, G. D., Lerner, C. B., Mothes, B., Trindade, V. M., Henriques, A. T., Vozári-Hampe, M. M., 2008. ACL-I, a lectin from the marine sponge *Axinella corrugata*: isolation, characterization and chemotactic activity. *Comp Biochem Physiol C* 148, 23–30.

Drickamer, K., 1988. Two Distinct Classes of Carbohydrate Recognition Domains in Animal Lectins. *J. Biol. Chem.* 263, 9557-9560.

Du, X., Clementson, K. J. Reptile C-type lectins., 2010. In: *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*. Marckessy, S. P (Ed.). New York, pp.528.

Elifio-Esposito, S., Tomazeli, L., Schwartz, C., Gimenez, A. P., Fugii, G. M., Fernandes, L. C., Zishler, L. F., Stuelp-Campelo, P. M., Moreno, A. N., 2011. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. *BMC Immunology*. 12, 1-7.

Fenwick, A. M., Gutberlet JR, R. L., Evans, J. A., Parkinson, C. L., 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool J Lin Soc.* 156, 617–640.

Gartner, T. K.; Ogilvie, M. L., 1984. Isolation and characterization of three Ca^{2+} -dependent beta-galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem J.* 224, 301–307.

Gartner, T.K., Stocker, K., Williams, D.C., 1980. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS Lett.* 117, 13–16.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, In: John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. 571-607.

Guimarães-Gomes, V., Oliveira-Carvalho, A.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., S Dutra, D.L., Pujol-Luz, M., Castro, H.C., Ho, P.L., Zingali, R.B., 2004 Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Arch Biochem Biophys.* 432, 1-11.

Hamako, J., Suzuki, Y., Hayashi, N., Kimura, M., Ozeki, Y., Hashimoto, K., Matsui, T., 2007. Amino acid sequence and characterization of C-type lectin

purified from the snake venom of *Crotalus ruber*. Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol. 146, 299-306.

Havt, A., Toyama, M. H., do Nascimento, N. R., Toyama, D.O., Nobre, A. C., Martins, A. M., Barbosa, P. S., Novello, J. C., Boschero, A. C., Carneiro, E. M., Fonteles, M. C., Monteiro, H. S., 2005. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. Int J Biochem Cell Biol 37, 130-41.

Hirabayashi, J., Kusunoki, T., Kasai, K., 1991. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox* Homologies with Ca²⁽⁺⁾-dependent-type lectins. J Biol Chem. 266, 2320-6.

Kabir, S.R., Zubair, M.A., Nurujjaman, M., Haque, M.A., Hasan, I., Islam, M.F., Hossain, M.T., Hossain, M.A., Rakib, M.A., Alam, M.T., Shaha, R.K., Hossain, M.T., Kimura, Y., Absar, N., 2011. Purification and characterization of a Ca²⁺-dependent novel lectin from *Nymphaea nouchali tuber* with antiproliferative activities. Biosci Rep. Accepted manuscript.

Kassab, B. H., Carvalho, D. D., Oliveira, M. A., Pereira, G. A. G., Novello, J. C., 2004. Cloning, Expression and Structural Analysis of Recombinant BJcuL, a c-type lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. Protein, Expr Purif. 35, 67-7.

Kilpatrick, D. C., Yeoman, M. M., 1978. Purification of the lectin of *Datura stramonium*. Biochemical Journal. 175, 1151-1153.

Kishore, U.; Eggleton, P.; Reid, K. B. M 1997. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. Matrix Biol. 15, 583-592.

Komoris, Y., Nikai, T., Tohkai, T., and Sugihara, R., 1999. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus* (eastern cottonmouth). Toxicon, 37, 1053-1064.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins, during the annemby of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-289.

Lis, H., Sharon, N., 1986. Lectins as molecules and as tools. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 35-67.

Lomonte, B., Rojas, G., Gutiérrez, J.M., Ramirez, G., 1990. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godman's pit viper). *Toxicon* 28, 75–81.

Marques, M. R. F., Barraco, M. A., 2000. Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture*. 191, 23-44.

Medeiros, D. S., Medeiros, T. L., Ribeiro, J. K., Monteiro, N. K., Migliolo, L., Uchoa, A. F., Vasconcelos, I. M., Oliveira, A. S., de Sales, M. P., Santos, E. A., 2010. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 155, 211-216.

Mendonça-Franqueiro, E. P, Alves-Paiva, R. M., Sartim, M. A., Callejon, D. R., Paiva, H. H., Antonucci, G. A., Rosa, J. C., Cintra, A. C., Franco, J. J., Arantes, E.C., Dias-Baruffi, M., Sampaio, S. V., 2011. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from *Bothrops atrox* snake venom. *Acta Biochim Biophys Sin (Shangai)* 43, 181-192.

Morita, T., 2005. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon* 45, 1099-1114.

Moura, R. M.; Queiroz, A. F.; Fook, J. M.; Dias, A. S.; Monteiro, N. K.; Ribeiro, J. K.; Moura, G. E.; Macedo, L. L.; Santos, E. A.; Sales, M. P., 2006. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 145, 517-523.

Nunes, E. dos S., de Souza, M. A., Vaz, A. F., Santana, G. M., Gomes, F. S., Coelho, L. C., Paiva, P. M., da Silva, R. M., Silva-Lucca, R. A., Oliva, M. L., Guarnieri, M. C., Correia, M.T., 2011. Purification of a lectin with antibacterial

activity from *Bothrops leucurus* snake venom, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 159, 57-63.

Panunto, P. C., da Silva, M. A., Linardi, A., Buzin, M. P., Melo, S. E., Mello, S. M., Prado-Franceschi, J., Hyslop, S., 2006. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. Toxicon, 47, 21-31.

Pereira-Bittencourt, M. Carvalho, D. D.; Gagliardi, A. R., Collins, D. C., 1999. The effect of a lectin from the venom of the snake. *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. Anticancer Reserch. 19, 4023–4025.

Silva, V.X. The *Bothrops neuwiedi* complex, 2004. In: Campbell, J.A., Lamar, W.W. (Eds.), The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere, vol. 2, Ithaca, New York, pp. 410–422.

Stillmark, H., 1888. Über Ricin, eines gifiges Ferment aus den Samen von *Rtcinus communis* L. und anderen Euphorbiacen. Inaugural Dissertation, University of Dorpat, Estonia.

Sumner, J. B.; Howell, S. F., 1936. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. J Bacteriol. 32, 227-237.

Utarabhand, P., Riitidach, W., Paijit, N., 2007. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp, *Penaeus (Fenneropenaeus) merguiensis*. Sci. Asia 33, 41- 46.

Valdujo, P. H., Nogueira, C., Martins, M., 2002. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. J Herpetol. 36, 169-176.

Valle, A. L., Brites, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triangulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais, 2008. Zoociências10, 155-161.

Wilson, K.J. , Yuan, P.M. Protein and peptide purification, in: J.B.C. Findlay, M.J. Geisow (Eds.), Protein Sequencing a Practical Approach, IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 1989, pp. 3–41.

Wilson, M. E., Pearson, R.D., 1984. Stage-specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 46, 128-34.

Yan, Q., Jiang, Z., Yang, S., Deng, W., Han, L., 2005. A novel homodimeric lectin from *Astragalus ongholicus* with antifungal activity. *Arch Biochem Biophys.* 442, 72–81

Yang, H., Luo, T., Li, F., Li, S., Xu, X., 2007. Purification and characterisation of a calcium-independent lectin (PjLec) from the haemolymph of the shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 88-97.

Legends for Figures:

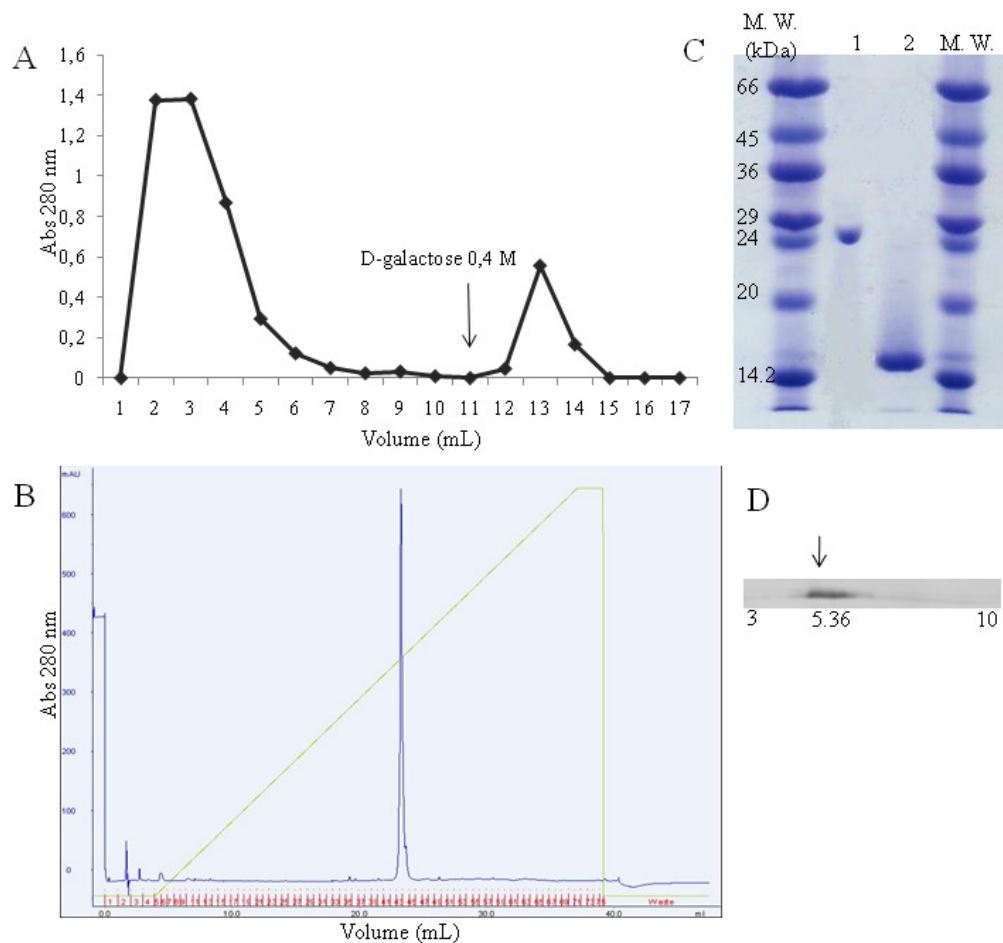


Figure 1: Purification steps of BpLec and its biochemical characterization. (A) Purification of type c lectin from *Bothropoides pauloensis* snake venom in an affinity column of agarose immobilized with D-galactose (0.5 x 4 cm, Pierce, USA), equilibrated and initially eluted with tris saline buffer containing calcium chloride (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.4), followed by addition of 0,4 M D-galactose to BpLec elution. (B) Reverse phase chromatography on a C2C18 column (2.0x2.5 cm, GE Health Care, Sweden), equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid and 5% acetonitrile) and eluted with a concentration gradient of solvent B (80% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid) from 0 to 100% at a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature. (C) SDS-PAGE at 12%. M.W.: molecular weight markers MW-SDS-70 (Sigma, St Louis, MO, USA), 1: native BpLec; 2: BpLec treated with β -mercaptoethanol. (D) Isoelectric point of BpLec.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Bothrops_pauloensis      NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYPKGCHLASIHLYGES 50      Identity
Bothrops_insularis_Q6QX33 NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYPKGCHLASFHLYGES 50      94.7%
Bothrops_jararacussu_P83519 NNCPQDWLPMNGLCYKIFDELKAWKDAEMFCRKYPKGCHLASIHLYGES 50      93.2%
Lachesis_muta_Q9PSM4      NNCPQDWLPMNGLCYKIFDEQKAWDAEMFCRKYPKGCHLASFHRYGES 50      89.4%
Bitis_arietans_AAB36170.1 NNCPDWLPMNGLCYKIFDELKAWDAERFCRKYPKGCHLASFHQYGES 50      88.6%
Crotalus_ruber_P84987     NNCPDWLPMNGLCYKIFNQLKTWEDAEMFCRKYPKGCHLASFHLYGES 50      85.6%
*****
EIAEYISDYHKS--EVWIGLWDEKKDFSWEWTDRCSTDYLSWDKNQPDHY 98
EIAEYISDYHKGQSEVWIGLWDKKKDFSWEWTDRCSTDYLSWDKNQPDHY 100
EIAEYISDYHKGQAEVWIGLQDKKKDFSWEWTDRCSTDYLSWDKNQPDHY 100
EIAEYISDYHKGQAEVWIGLWDKKKDFSWEWTDRCSTDYLTWDKNQPDHY 100
EIAEYISDYHKGQAEVWIGLWDKKKDFSWEWTDRCSTDYLTWDKNQPDHY 100
EIAEYISDYHKGQDNVWIGLWDKKKDFSWEWTDRCIDYLNWNKNQPDHY 100
*****
KNKEFCVELVSYTGRLWNDQVCESKNAFLCQCK- 132
QNKEFCVELVSDTGRLWNDQVCESKNAFLCQCKF 135
QNKEFCVELVSLTGRLWEDQVCESKNAFLCQCKF 135
EGKEFCVELVSLTGRLWNDQVCESKNAFLCQCKF 135
QNKEFCVELVSLTGRLWNDQVCESKNAFLCQCKF 135
KNKEFCVELVSLSGYRLWNDQVCESKDAFLCQCKF 135
*****

```

Figure 2: Alignment of amino acid sequence of BpLec (P86970) with other C-type lectins from snake venoms: *Bitis arietans* (Q9PSNO), *Bothrops insularis* (Q6QX33) (sequence from cDNA corresponding for the mature protein); *Bothrops jararacussu* (P83519), *Crotalus ruber* (P84987), *Crotalus atrox* (P21963), *Lachesis muta* (Q9PSM4). Cys residues are highlighted in red; carbohydrate recognition domains residues are marked in green. (*) Identical residues; (:) strongly similar residues; (.) weakly similar residues; (–) indicate gaps corresponding to residues unidentified.

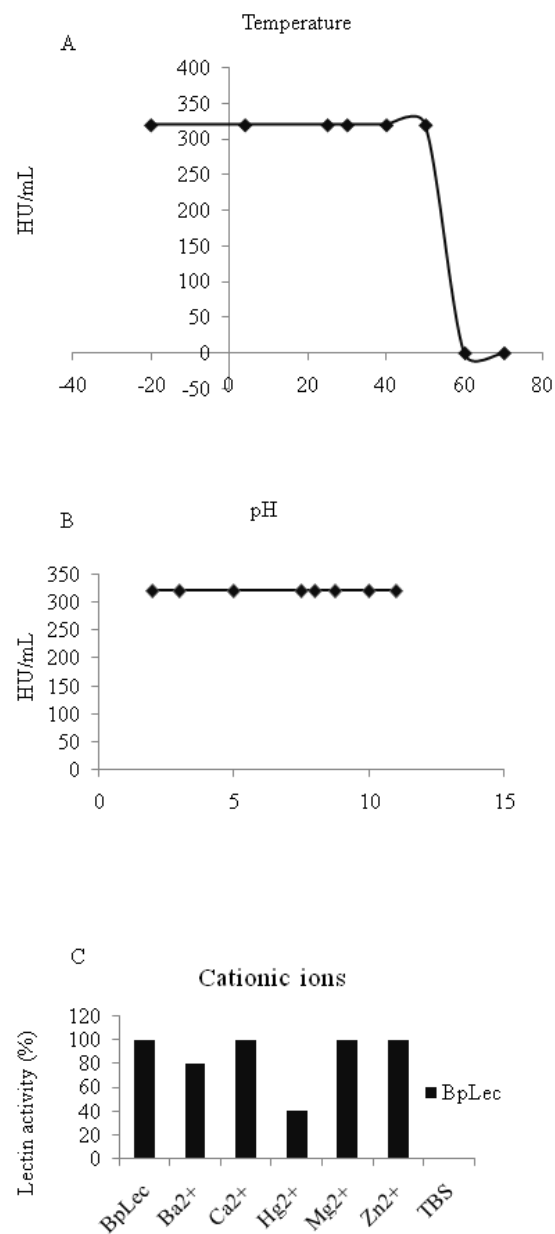


Figure 3: Stability of BpLec in diverse conditions. Effects of (A) temperature, (B) pH and (C) divalent cations on its haemagglutinating activity, using erythrocytes from blood of dog.

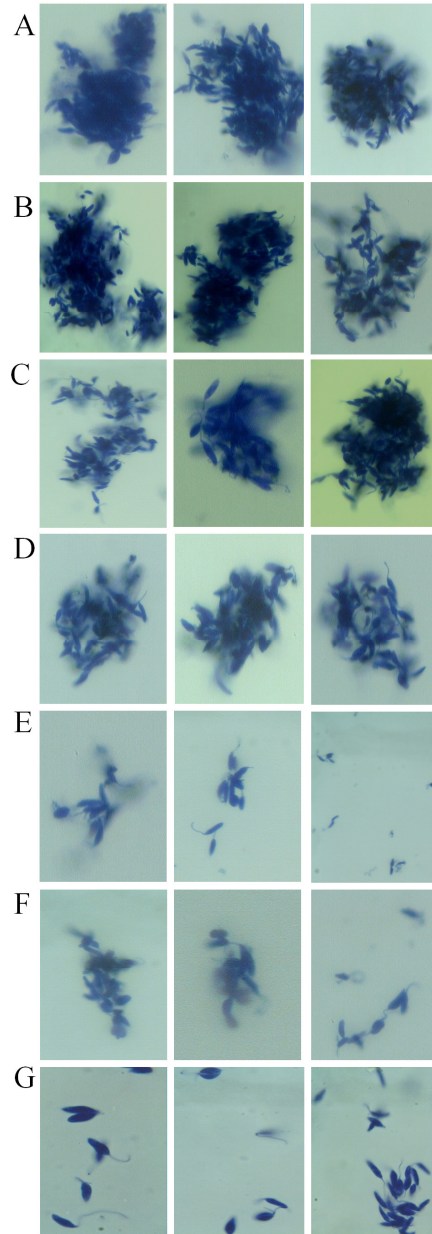


Figure 4: Agglutinating properties of BpLec upon *Leishmania amazonensis* promastigotes. (A) 25 µg of BpLec; (B) 5 µg of BpLec, (C) 1 µg of BpLec; (D) 25 µg of BpLec incubated with 0.4 M D-galactose, (E) 5 µg of BpLec incubated with 0.4 M D-galactose, (F) 1 µg of BpLec incubated with 0.4 M D-galactose; Negative control of promastigotes with phosphated buffer saline.

Tables:**Table I:** Recovery profile of BpLec purification and specific activities

Fraction	Total protein (mg)	Recovery (%)	Total activity (HU/mL)	Specific activity (HU/mg)	Purification fold
Crude venom	65.0	100	10400000	8000	1
BpLec	0.366	0.5	936960	128000	16

Table II: Minimum hemagglutinating concentration of BpLec on different animal erythrocytes.

Intact erythrocytes	Minimum hemagglutinating concentration
Cat	80 µg/mL
Dog	5 µg/mL
Horse	-
Mice	-
Ox	-

Table III: Carbohydrates effects on haemmagglutination induced by BpLec from *Bothrops pauloensis* snake venom. Minimum concentration which inhibits the activity (MIC).

Carbohydrate	MIC (mM)
D-galactose	8
Fructose	> 64
Lactose	1
Maltose	> 64
Mannose	> 64
Sucrose	> 64

Table IV: Minimum inhibitory concentrations (MIC)* of BpLec upon bacteria

Bacteria	MIC
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	31.25

*MIC was defined as the minimum concentration of BpLec capable of inhibiting 50% of bacteria proliferation