



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO - UFMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE - PPGSA

CAIO PAVÃO TAVARES

ESTUDO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA
DA ABELHA *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)

São Luís
2016

CAIO PAVÃO TAVARES

**ESTUDO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA
DA ABELHA *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de mestre em Saúde e Ambiente. Área de concentração: Saúde de populações. Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Garros Rosa

São Luís
2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo integrado de Bibliotecas/UFMA

Tavares, Caio.

ESTUDO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA DA ABELHA *Apis mellifera* L. Hymenoptera: Apidae / Caio Tavares. - 2016.
88 f.

Orientador(a): Ivone Rosa.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, UFMA - Campus São Luís, 2016.

1. *Apis mellifera* L. 2. Apitoxina. 3. Fração Lectínica. 4. Hemaglutinação. I. Rosa, Ivone. II. Título.

CAIO PAVÃO TAVARES

**ESTUDO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA
DA ABELHA *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de mestre em Saúde e Ambiente. Área de concentração: Saúde de populações. Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplica à saúde.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ivone Garros Rosa (Orientadora)
Doutora em Bioquímica
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares
Doutora em Biotecnologia
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Mayara Ingrid Sousa Lima
Doutora em Genética e Bioquímica
Universidade Federal do Maranhão

**“Aquele que se esforça seriamente por
melhorar assegura para si a felicidade já nesta
vida”**

Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Maranhão, pelo suporte institucional.

À FAPEMA (Fundo de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Maranhão) pelo financiamento da pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

À Profa Dra Ivone Garros Rosa pela orientação no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) – UFMA, pelo suporte físico para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Fármacos, Unifor, Forataleza, na pessoa do Prof Dr Renato de Azevedo Moreira e da Profa Dra Ana Cristina de Azevedo Moreira; ao Laboratório de Imunofisiologia – UFMA, na pessoa da Profa Dra Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e da Farmcêutica Carlene Reis Peixoto Portela; ao Laboratório de Bioquímica Vegetal, na pessoa da Profa Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares pelo suporte oferecido.

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente – PPGSA, UFMA.

DEDICATÓRIA

A Deus, nosso Pai, por sua misericórdia, amor e bondade infinita.

Aos meus pais, Zilfa e Mozart por todo amor que sentem por mim, em especial a minha amada mãe, pelos infinitos exemplos de como ser um homem de bem, por me inspirar com sua beleza e por possuir a “alma da mais bela flor.” Sou o filho mais feliz do mundo. Obrigado por estar sempre em minha vida. Te amo.

A minha linda namorada Andrea, por ser uma companheira amorosa e fiel aos mais nobres princípios. Muito obrigado por me ajudar a ser mais feliz ainda. Te amo.

A minha avó Aliete pelo seu amor e por ser meu maior exemplo de força, coragem e bondade.

Ao meu primo-irmão Pedro por ser um grande companheiro.

A minha grande irmã, amiga e orientadora Ivone Garros, pela maestria nos ensinamentos, pela sabedoria, pela luz que carrega em seu coração, enfim, não tenho palavras para agradecer a Deus, a benção de ter a senhora em nossas vidas.

A querida amiga Clícia, por ter sido uma grande companheira durante todos esses anos.

Ao professor Walbert Muniz, pela amizade e pelo apoio técnico-científico.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente.

Aos amigos do curso de Ciências Biológicas.

A grande família do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada – NIBA.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Vegetal.

A todos dedico este trabalho e os meus eternos agradecimentos.

“Não existe verdadeira inteligência sem bondade”

Ludwig Van Beethoven

RESUMO

As peçonhas e venenos animais apresentam grande importância para a biotecnologia, devido sua riqueza de componentes e aplicações biológicas. A apitoxina, peçonha da abelha *Apis mellifera* L. é um produto que pode ser utilizado como ferramenta farmacológica para o tratamento de doenças como artrite, câncer e combate ao vírus do HIV. As lectinas vêm sendo detectadas como componentes de diversas peçonhas. Lectina é uma classe de proteínas, de origem não imunológica, capaz de se ligar específica, reversível e não covalentemente a carboidratos ou glicoconjugados. O objetivo deste trabalho é Isolar e caracterizar bioquimicamente a fração lectínica da apitoxina da abelha *Apis mellifera* L. A apitoxina foi adquirida de abelhas criadas em apiários no município de São Bento, Maranhão, com uso de coletor elétrico. O isolamento da fração lectínica foi realizado por meio de cromatografia de bioafinidade em matriz de galactomananas. Em seguida as frações foram analisadas por eletroforese nativa e SDS-PAGE. As frações foram submetidas ao teste de hemaglutinação sobre os tipos sanguíneos A, B, AB e O seguido de teste de inibição por carboidratos (glicose, manose, galactose, sacarose e lactose). O teste de requerimento de cátions divalentes foi realizado utilizando-se EDTA no sistema de hemaglutinação. A fração foi submetida ao teste de estabilidade por aquecimento, onde amostras foram expostas às temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C por 30 minutos e subsequentemente foram submetidas à determinação da atividade hemaglutinante. Uma fração lectínica ligante de D-galactose e que reconhece α -galactosídeos foi isolada da apitoxina da abelha *Apis mellifera* L., representando a porcentagem de 3,2% do peso seco da apitoxina. A análise eletroforética sob condição desnaturante (SDS-PAGE) da fração lectínica revelou três bandas com pesos moleculares de aproximadamente 14, 17 e 19 kDa. Ao ser submetida a uma eletroforese nativa (ausência de SDS), a fração lectínica revelou apenas uma banda no topo do gel, sugerindo que estas bandas sejam subunidades de uma mesma proteína. A atividade hemaglutinante foi observada para os 4 tipos sanguíneos humanos, no entanto, apresentou maior sensibilidade para os eritrócitos do tipo A (2048 U.H./mL). A atividade foi inibida por lactose (150mM) e D-galactose (500mM), apresentando assim especificidade por estes dois carboidratos. O EDTA (MIC = 0,156 mM) também foi capaz de inibir a atividade hemaglutinante,

demonstrando que esta fração lectínica é dependente de cátions divalentes. A fração lectínica isolada demonstrou elevada termoestabilidade, sendo capaz de manter sua atividade mesmo após exposição a 70°C por 30 minutos. A apitoxina da abelha africanizada *Apis mellifera* L. não apresenta relatos anteriores da presença de lectinas.

Palavras-chaves: Apitoxina. *Apis mellifera* L. Fração Lectínica. Hemaglutinação.

ABSTRACT

Animal venoms have great importance for biotechnology, due to its wealth of components and biological applications. The apitoxin, bee venom of *Apis mellifera* L., is used as a pharmacological tool for the treatment of diseases as arthritis, cancer and fight against HIV. Lectins have been identified as components of various venoms. Lectin is a class of proteins, non-immunological origin, able to bind specific, reversible and non-covalently to carbohydrates or glycoconjugates. In the present work, we demonstrate the isolation and partial biochemical characterization of lectinic fraction from bee venom of *Apis mellifera* L. The bee venom was derived from bees raised in apiaries in São Bento, Maranhão, with electric collector use. The isolation of lectin fraction was accomplished by bioaffinity chromatography (affinity matrices of galactomannans). The fractions were analyzed by native and SDS-PAGE electrophoresis. The same fractions were subjected to the hemagglutination test on blood types A, B, AB and O followed by haemagglutination inhibition test for carbohydrates (glucose, mannose, galactose, sucrose and lactose). The divalent cations requirement test was performed using EDTA in hemagglutination system. The fraction was subjected to heating stability test where the samples were exposed to temperatures of 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100° C for 30 minutes and subsequently subjected to the determination of hemagglutinating activity. One lectin fraction D-galactose-binding and recognize α -galactosides was isolated from bee venom. It is 3,2% of the dry weight of bee venom. The electrophoresis analysis under denaturing conditions indicated that this fraction showed three bands with molecular weights of approximately 14, 17 and 19 kDa. When subjected to electrophoresis native (no SDS), the lectin fraction revealed only one band at the top of the gel, suggesting that these bands are subunits of the same protein. The hemagglutination activity was observed for the four human blood types, however, it showed greater sensitivity to the red cells of type A (2048 U.H./mL). The hemagglutination activity of this fraction was inhibited by lactose (150mM) and D-galactose (500mM), thus providing specificity for these two carbohydrates. EDTA (MIC = 0,156 mM) was also capable of inhibiting the hemagglutination activity, indicating that this lectin fraction is dependent on divalent cations. The isolated lectin fraction showed high thermostability being able to maintain its activity even after exposure to 70° C for 30

minutes. The bee venom of africanized bee *Apis mellifera* L. has no previous reports of the presence of lectins.

Keywords: Bee venom. *Apis mellifera* L. Lectin fraction. Hemagglutination.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Representação esquemática de aglutinação por lectinas	32
FIGURA 2 – Componentes monossacarídicos	36
FIGURA 3 - Estrutura secundária de uma lectina (BiL) isolada de peçonha da serpente <i>Bothrops insularis</i> , complexada com o Ca^{2+} (esfera cinza) e a galactose.....	40
FIGURA 4 - Domínio de reconhecimento de carboidrato e loop ligante de cálcio. A galactose está representada em vermelho, o Ca^{2+} em cinza. Os aminoácidos envolvidos também estão destacados em azul.....	41
FIGURA 5 - Interações das lectinas com carboidratos de superfície: Lectinas promovem interações célula-célula e/ou célula matriz extracelular através do reconhecimento específico de glicoconjugados.....	43
FIGURA 6 - Perfil cromatográfico da fração lectínica da apitoxina da abelha <i>Apis mellifera</i> em matriz de galactomananas	55
FIGURA 7 - Teste da atividade hemaglutinante das frações obtidas a partir da cromatografia de bioafinidade da apitoxina de <i>Apis mellifera</i> sobre eritrócitos dos tipos A, B, AB e O	56
FIGURA 8 - Teste da atividade hemaglutinante das frações obtidas a partir da cromatografia de bioafinidade da apitoxina de <i>Apis mellifera</i> sobre eritrócitos do tipo A	58
FIGURA 9 - Teste de inibição da atividade hemaglutinante da fração lectínica isolada da apitoxina de <i>Apis mellifera</i> sobre eritrócitos do tipo A.	63
FIGURA 10 – SDS-PAGE 12% em condições não redutoras da fração lectínica isoladas da apitoxina da abelha <i>Apis mellifera</i> L	66

FIGURA 11 - ELETROFORESE NATIVA (AUSÊNCIA DE SDS) (12%) da fração lectínica isoladas da apitoxina da abelha <i>Apis mellifera</i> L	67
FIGURA 12 - Teste da inibição da atividade hemaglutinante por EDTA sobre eritrócitos dos tipos A.	68
FIGURA 13 - Teste da estabilidade da atividade lectínica por aquecimento. Os resultados foram expressos como Unidades Arbitrárias de Hemaglutinação (UAH) baseado na análise visual do nível de formação de aglutinação.	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Atividade hemaglutinante (U.H.) das frações obtidas a partir da apitoxina de *Apis mellifera* por meio do fracionamento por cromatografia de bioafinidade.....57

TABELA 2: Atividade hemaglutinante específica das frações (A.H.E.).....57

TABELA 3: Taxa de rendimento da fração lectínica obtida a partir da apitoxina de *Apis mellifera* por meio do fracionamento por cromatografia de bioafinidade.....62

TABELA 4: Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.....64

TABELA 5: Efeito de agentes quelantes de íons divalentes na inibição da atividade hemaglutinante induzida pela fração lectínica da apitoxina de *Apis mellifera*.....65

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	- Graus Celsius
μL	- Microlitro
μg/mL	- Micrograma por mililitro
<i>Api m 1</i>	- Fosfolipase A2
<i>Api m 2</i>	- Hialuronidase
<i>Api m 3</i>	- Fosfatase ácida
ApL	- Lectina de peçonha de <i>Agikstrodon piscivorus</i>
Asn	- Asparagina
Asp	- Aspartato
BaL	- Lectina de peçonha de <i>Bitis arientans</i>
BiLec	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops insularis</i>
BjcuL	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>
BjL	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops jararaca</i>
BleucL	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops leucurus</i>
BMooL	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops moojeni</i>
BpaL ou BpLec	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
BpL	- Lectina de peçonha de <i>Bothrops piarajai</i>
BSA	- Albumina Sérica Bovina
Ca ²⁺	- Íon Cálcio
CaL	- Lectina de peçonha de <i>Crotalus atrox</i>
cm	- Centímetro

ConA	- Concavalina A
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidrato
Da	- Dalton
ECA	- Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	- Espécies Reativas de Oxigênio
g	- Grama
GalNAc	- <i>N</i> -acetilgalactosamina
Gal β (1-3)GalNAc	- Galactose- β -1-3- <i>N</i> -acetilgalactosamina
GlcNAc	- <i>N</i> -acetilglucosamina
glicina-HCl	- Tampão glicina com ácido clorídrico
Gln	- Glutamina
Glu	- Glutamato
HCl	- Ácido Clorídrico
IL-1	- Interleucina 1
IL-6	- Interleucina 6
kDa	- Kilodalton
M	- Molar
mA	- Milimperes
MCD	- <i>Mast Cell Degranulation</i>
mg	- Miligrama
MIC	- Concentração Mínima Inibitória
mL	- Mililitro

mL/min	- Mililitro por minuto
mM	- Milimolar
Mn ⁺²	- Íon Manganês
MWCO	- <i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NaCl	- Cloreto de Sódio
NaOH	- Hidróxido de Sódio
NF-kB	- Via de fator nuclear kappa B
NO	- Óxido Nítrico
nm	- Nanômetro
OH	- Hidroxila
P.A.	- Pró-análise
P1	- Fração não-retida
P2	- Fração retida
PA-I	- Lectina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	- <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
pH	- Potencial Hidrogeniônico
Phe	- Fenilalanina
PLA2	- Phospholipase A2
Pro	- Prolina
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SHL-I	- Lectina da aranha <i>Selenocosmia huwena</i>
SVL	- Lectinas de venenos de cobra
TEMED	- N-N-N-N-tetrametildiamina

TNF α	- Fator de Necrose Tumoral
Trp	- Triptofano
Tyr	- Tirosina
U.H.	- Unidade Hemaglutinante
U.H./mgP	- Atividade Hemaglutinante Específica
UAH	- Unidades Arbitrárias de Hemaglutinação
V	- Volts
VCAM-1	- Molécula de Adesão Celular Vascular
VEGF	- Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
1.1 – VENENOS E PEÇONHAS ANIMAIS.....	19
1.2 – APITOXINA: A PEÇONHA DA ABELHA <i>Apis mellifera</i> L.....	21
1.2.1 – Os componentes bioquímicos da apitoxina	23
1.2.2 – Potencial farmacológico	27
1.3 – LECTINAS	31
1.3.1 – Considerações gerais.....	31
1.3.2 – Classificação das lectinas animais	35
1.3.3 – Especificidade por açúcares.....	37
1.3.4 – Sítios carboidratos ligantes e interações lectina-carboidrato	42
1.3.5 – Funções biológicas das lectinas.....	44
 2 – OBJETIVOS	 47
2.1 – Geral	47
2.2 – Específicos.....	47
 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	 48
3.1 – OBTENÇÃO DA APITOXINA DE <i>Apis mellifera</i> L	48
3.2 – ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA.....	48
3.2.1 – Preparação da amostra.....	48
3.2.2 – Cromatografia de bioafinidade em matriz de galactomananas	49
3.3 – DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS.....	49
3.4 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	50
3.4.1 – SDS-PAGE.....	50
3.4.2 – Gel nativo	51
3.5 – AVALIAÇÃO DO CARÁTER LECTÍNICO DAS FRAÇÕES.....	51
3.5.1 – Teste de hemaglutinação	51
3.5.1.1 – Determinação do Título de Hemaglutinação.....	52
3.5.1.2 – Cálculo da Atividade Hemaglutinante Específica.....	52
3.5.2 – Teste de inibição da hemaglutinação por carboidratos.....	53
3.5.3 – Teste de requerimento de cátions divalentes	53
3.5.4 – Teste da estabilidade da atividade lectínica por aquecimento	54

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. – ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA	55
4.2. – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FRAÇÃO LECTÍNICA	63
5 – CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 – VENENOS E PEÇONHAS ANIMAIS

Os venenos e peçonhas animais constituem uma mistura complexa de toxinas, em especial peptídeos e proteínas naturalmente adaptados pela seleção natural para agirem sobre os sistemas vitais da presa ou vítima (CALVETE, et al., 2009). A produção dessas substâncias ocorre por meio da bioacumulação de toxinas em seus tecidos através da alimentação ou pela produção por meio de glândulas secretoras de toxinas (OLIVEIRA & PIRES-JÚNIOR, 2011). Estas substâncias se caracterizam como inovações evolucionárias chave entre linhagens que se diferem filogeneticamente e são utilizadas não somente para defesa e predação, mas também como meio de afirmar domínio sobre membros de uma mesma espécie (WONG & BELOV, 2012).

Importante que se faça uma distinção conceitual entre veneno e peçonha. O veneno caracteriza-se como a substância tóxica produzida e liberada por determinados animais sem a presença de um aparato inoculador, por outro lado a peçonha necessita do aparato inoculador para ser liberada (CALVETE, et al., 2009). Desta forma temos animais venenosos e animais peçonhentos. Como exemplo de animais venenosos existe a espécie de sapo *Bufo bufo* o qual libera o seu veneno por compressão de suas glândulas de veneno localizadas no dorso, assim com a espécie de baiacu, *Spherooides spengleri* que possui toxinas em vários tecidos do corpo, causando envenenamento caso seja ingerido. As serpentes, escorpiões, abelhas e aranhas são considerados animais peçonhentos, pois possuem aparelhos inoculadores como dentes ocos, agulhões ou ferrões.

Os organismos venenosos e peçonhentos estão distribuídos em todo o reino animal, com mais de 100.000 espécies encontradas praticamente em todos os ecossistemas. Além dos clados importantes do ponto de vista médico (cobras, escorpiões e aranhas) extensivamente estudados, dentro do grupo de animais peçonhentos incluem-se as águas-vivas, anêmonas, cefalópodes, centopeias, moluscos, insetos, peixes, equinodermos, lagartos, inclusive mamíferos (ornitorrinco e mussaranho) (FRY, et al., 2009).

Grande número de casos de acidentes com animais venenosos e peçonhentos tem sido relatado em todo o mundo. Os alvos de ação dos venenos e peçonhas incluem os efeitos locais e praticamente todas as vias fisiológicas e tipos de tecidos acessíveis pela corrente sanguínea, caracterizando a reação sistêmica (FRY, et al., 2009). Os compostos tóxicos presentes nos venenos animais são capazes de perturbar a atividade de enzimas, receptores, canais de íons, causar desarranjo do sistema nervoso central e periférico, do sistema cardiovascular e do neuromuscular, assim como, a coagulação sanguínea e a homeostase (CALVETE, et al., 2009).

Por outro lado, estas mesmas substâncias representam uma fonte rica de moléculas bioativas com um grande potencial para a produção de medicamentos, devido às importantes atividades farmacológicas que elas apresentam (KOH, et al., 2006).

O interesse pelo estudo da caracterização química e funcional dessas toxinas não se relaciona apenas com sua importância no envenenamento, mas também pela sua possível utilização como valiosas moléculas possíveis de aplicação em outras áreas do conhecimento (IZIDORO, 2007). O alto grau de especificidade que essas toxinas apresentam em relação à molécula ou célula-alvo faz com que elas sejam cada vez mais utilizadas como instrumentos farmacológicos e como protótipos para o desenvolvimento de drogas terapêuticas (CALVETE, et al., 2009).

Diversas toxinas de diferentes tipos de animais vêm sendo isoladas e muitas delas podem ser usadas no tratamento de dores, diabetes, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares, dentre outras (LEWIS & GARCIA, 2003).

O trabalho de Rocha e Silva, et al., (1949) é o primeiro relato científico do estudo de toxinas animais, onde descobriram um peptídeo usado para o controle da pressão arterial. Após injetar o veneno de *Bothrops jararaca* em mamíferos, observaram um acúmulo de bradicinina (agente vasodilatador) no organismo do animal devido à inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA), um agente vasoconstrictor.

No estudo da composição química e da aplicação médico-biológica dos venenos e peçonhas animais destacam-se o filo Arthropoda e o filo Cordata. Dentro do filo Cordata, vários experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* com as peçonhas de

serpentes das famílias Viperidae e Crotalidae, observaram que várias etapas de complexos processos fisiológicos, tais como: coagulação sanguínea, ativação plaquetária e fibrinólise podem ser afetados pela ação das proteínas que compõem o veneno destas serpentes (BRAUD, et al., 2000). Trabalhos relativos à estrutura molecular destas proteínas mostraram grande similaridade estrutural entre as diferentes famílias de proteínas que compõem estes venenos (serino proteases, metaloproteases, PLA2, lectinas tipo-C, desintegrinas) embora com diferentes alvos de ação (MARKLAND, 1997).

No filo Arthropoda, as classes Insecta e Aracnida são os principais representantes do grupo no estudo dos venenos e peçonhas. Há grande interesse sobre as peçonhas de artrópodes por elas apresentarem grande quantidade de substâncias bioativas (XU, et al., 2005). São ricas em neurotoxinas, com ação específica e seletiva sobre o sistema nervoso central de mamíferos, apresentam efeitos citotóxicos em células e atividade anti-tumoral (COHEN & QUISTAD, 1998; CAIRRÃO, 2002; HEINEN & VEIGA, 2011).

A grande diversidade farmacológica acumulada pela natureza sobre a evolução resultou em verdadeiras bibliotecas combinatórias de centenas de milhares de moléculas potencialmente ativas sintetizadas em venenos e peçonhas animais. Estas mesmas moléculas, uma vez purificadas e caracterizadas podem ter valor terapêutico. Mesmo com muitas já purificadas, ainda não possuem a sua atividade biológica e farmacológica determinada (CALVETE, et al., 2009; DOLEY & KINI, 2009).

1.2 – PEÇONHA DA ABELHA *Apis mellifera* L.: APITOXINA

O gênero *Apis* apresenta apenas quatro espécies: *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), *Apis florea* (Fabricius, 1787), *Apis dorsata* (Fabricius, 1793) e *Apis cerana* (Fabricius, 1793). A *Apis mellifera* sempre despertou interesse, devido a sua grande importância econômica (CAMARGO & STORT, 1973) e, sobretudo, pelas novas possibilidades de uso de seus produtos na área médica.

Essa abelha possui ampla distribuição, sendo encontrada desde locais de clima temperado frio até zonas tropicais, no entanto, apesar dessa sua ampla distribuição geográfica é considerada exótica no Brasil. Ela é originária da África,

Europa e Ásia Menor e, devido à intervenção do homem, tem sido transportada a diferentes regiões do planeta (PARDO, et al., 1988).

Atualmente, as abelhas encontradas no Brasil são animais poli-híbridos, devido ao cruzamento ocorrido com as várias subespécies europeias, e posteriormente entre os próprios híbridos, não constituindo assim uma nova subespécie, sendo designada apenas como abelha africanizada (NOCELLI, 2003).

A apicultura é uma atividade sustentável e de grande importância econômica, podendo se estabelecer em praticamente todo o espaço geográfico brasileiro, desde que possua condições climáticas favoráveis e vegetação rica em floradas de interesse às abelhas (LIMA, 2005). Esta espécie de abelha desperta grande interesse por conta da produção de mel, geleia real, própolis, cera e apitoxina, assim como sua grande importância polinizadora para a agricultura (GIORGINI & GUSMAN, 1972).

De todos os produtos da abelha, a apitoxina é uma das substâncias que mais vem despertando interesse da ciência, tornando-se assim um importante objeto de estudo por várias razões, tipo: a ampliação do conhecimento da composição bioquímica, e conseqüentemente, o mecanismo de ação das toxinas; a investigação de moléculas com potencial terapêutico no combate a doenças; o interesse no desenvolvimento de tratamento mais eficaz e específico para acidentes com envenenamento os quais desencadeiam reações alérgicas tóxicas (RESENDE, 2013).

A apitoxina é a peçonha produzida pelas abelhas *Apis mellifera* com o objetivo de proteger a colônia contra os predadores. É uma palavra originária do latim e significa: *apis* – abelha e *toxikon* – veneno (NOGUEIRA-COUTO & COUTO, 2002; DANTAS, et al., 2013).

A apitoxina é um líquido transparente, incolor e muito solúvel em água. Esta substância quando injetada em forma de ferroadinha contém aproximadamente 50µg de matéria seca (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002).

O veneno é produzido por uma glândula (glândula ácida ou de veneno) e armazenado na bolsa ou reservatório de veneno. A glândula de veneno localiza-se na região posterior do abdômen, entre o reto e os ovários. Histologicamente trata-se

de um túbulo excretor fino de comprimento variável, podendo ser bifurcado na região distal e na proximal apresenta uma dilatação em forma de saco denominado reservatório (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002).

Na colmeia apenas a rainha e as operárias possuem ferrão. O ferrão da rainha é usado na luta contra rivais. Quando nasce uma rainha, a primeira coisa que se faz é procurar outras realeiras (local onde se desenvolve a rainha), para destruí-las, evitando assim o nascimento de outras rainhas. Se nascerem duas rainhas simultaneamente, vão brigar até que só uma sobreviva. A rainha consegue usar seu ferrão várias vezes, pois ele não é farpado, não ficando preso à vítima (WINSTON, 2003).

1.2.1 – Os componentes bioquímicos da apitoxina

A composição bioquímica da apitoxina tem sido realizada há bastante tempo, ampliando as informações a cerca do conhecimento sobre venenos e peçonhas animais. Recentes estudos têm progredido e contribuído significativamente na identificação e caracterização de componentes da apitoxina (RESENDE, 2013).

De modo geral todo veneno é primariamente composto de proteínas, peptídeos e aminos. A apitoxina possui aproximadamente 50 compostos identificados sendo muito deles tóxicos para os animais. Consiste numa mistura de aminos biogênicas (histamina, serotonina, dopamina e epinefrina), fosfolipase A2, fosfolipase B, hialuronidase, melitina, peptídeo MCD (peptídeo degranulador de mastócitos), apamina, minimina, pequenos peptídeos, aminoácidos, lipídeos, carboidratos, água e outros compostos, que apresentam atividades farmacológicas e alergênicas. Também estão presentes muitos acetatos voláteis que, provavelmente, estimulam o comportamento defensivo de outras abelhas (CRUZ-LANDIM & ABDALLA, 2002; MÜLER, 2002; FERREIRA JÚNIOR, et al., 2010).

Os principais componentes protéicos da apitoxina são a Fosfolipase A2 (PLA₂), a hialuronidase e a fosfatase ácida. A PLA₂, também conhecida como *Api m 1*, representa cerca de 12% do peso seco de apitoxina, contém 134 aminoácidos

(ANNAND, et al. 1996) e possui três isoformas caracterizadas de pesos moleculares correspondentes a 16, 18 e 20 kDa, respectivamente (ALTMANN, et al., 1991).

A PLA₂ tem a capacidade de hidrolisar fosfolipídeos de membrana plasmática, formando poros e causando a morte celular. Esta enzima tem natureza glicoproteica, com uma unidade de carboidrato ligada a asparagina-13, sendo este o único sítio de glicosilação desta proteína. Esta molécula apresenta diversas atividades, incluindo neurotoxicidade pré-sináptica e atividade de agregação de plaquetas. A PLA₂ é um dos principais componentes imunogênicos da apitoxina, apresenta atividade hemolítica e pode contribuir para a toxicidade generalizada no envenenamento, por uma interação sinérgica com a melitina. Uma combinação de melitina e PLA₂ lisaram eritrócitos sob condições nas quais nenhum deles atuou isoladamente (DOTIMAS & HIDER, 1987; HUANG & CHIANG, 1994; OWNBNY, 1997; KING & SPANGFORT, 2000).

A hialuronidase, conhecida como *Api m 2* ou “fator de difusão”, representa de 1 a 2% do peso seco da apitoxina, com peso molecular de 43 kDa e 350 resíduos de aminoácidos. Esta enzima hidrolisa o ácido hialurônico, o qual possui propriedades adesivas, promovendo a união das células. A hidrólise deste ácido aumenta a fluidez no interstício e facilita a difusão dos componentes da apitoxina (KEMENY, et al., 1984; CARDOSO, et al., 2009).

A fosfatase ácida, ou *Api m 3*, é uma enzima de peso molecular de 49 kDa e representa 1% da apitoxina seca. É também um composto alérgeno, capaz de liberar histamina de basófilos humanos e induzir formação de pústulas na pele de pessoas sensíveis (BARBONI, et al., 1987).

Com relação aos peptídeos a apitoxina apresenta em sua composição, a melitina, apamina, peptídeo degranulador de mastócitos (MCD – “Mast Cell Degranulation”) e o “cardiopep”.

A melitina é constituída de 26 resíduos de aminoácidos, apresenta um peso molecular de 3 kDa e representa cerca de 50% do peso seco da apitoxina. Tem pH altamente básico e constitui um tipo de peptídeo anfipático e hidrossolúvel. Na apitoxina nativa a melitina apresenta-se como dímero e é responsável pela dor provocada durante a ferroada. É um alérgeno fraco de importância clínica apenas em poucos casos (KEITH, et al., 2011; ORSOLIC, 2011; YANG, et al., 2011).

Este componente provoca constrição ou dilatação dos vasos sanguíneos e despolarização da musculatura cardíaca, dependendo da concentração e do tecido. Atua como fator de dispersão, facilitando a entrada dos demais componentes e possui atividade hemolítica (BROCHETTO-BRAGA, 2006; DE GRAAF, et al., 2009).

A apamina é um peptídeo formado por 18 resíduos de aminoácidos que contém 4 cisteínas com duas ligações dissulfeto, apresentando o peso molecular de 2 kDa, representando 1 a 2% do peso seco da apitoxina. Consiste em um peptídeo alcalino e polar (SPOERRI, et al., 1975; FREEMANN, et al., 1986). Este composto atua bloqueando os canais de cálcio e potássio impedindo a transmissão dos impulsos nervosos nos sistemas nervosos central (SNC) e periférico (SNP), e apresenta efeito citotóxico no nervo nociceptivo (MOURRE, et al., 1997). A injeção de apamina demonstrou que esta afeta especificamente as estruturas motoras e auditivas (VÉLEZ, 2010).

O peptídeo MCD é constituído de 22 resíduos de aminoácidos e representa de 2 a 3% do peso seco da apitoxina (DE LIMA & BROCHETTO-BRAGA, 2003). Este peptídeo promove a liberação dos mediadores de mastócitos e basófilos (histamina, serotonina, derivados do ácido araquidônico) e fatores que atuam sobre plaquetas e eosinófilos. Desempenha papel no quadro de intoxicação histamínica observada nas fases iniciais da ferroadada (CARDOSO, et al., 2009).

Este peptídeo difere da melitina por apresentar duas pontes dissulfídicas, assemelhando-se à apamina. Enquanto a melitina é forte hemolisante e libera serotonina de trombócitos, o MCD é capaz de degranular mastócitos mesmo quando presentes em baixa concentração (DOTIMAS & HIDER, 1987).

O peptídeo “cardiopep” tem peso molecular de 1,8 kDa e causa diminuição da frequência cardíaca (VICK, et al., 1974).

Alguns outros componentes como a secapina, a tertiapina e a procamina também foram identificados na apitoxina e apresentam baixa toxicidade para mamíferos. A secapina possui 25 aminoácidos e constitui cerca de 2% do peso da apitoxina seca. Este componente contribui para a inflamação e a dor (MOURELLE, 2011). A tertiapina contém 20 resíduos de aminoácidos e seu modo de ação parece estar relacionada com a atividade pré-sináptica (MIROSHNIKOV, et al., 1983). De

outro modo, a procamina é um peptídeo que contém histamina incorporada na posição C-terminal (BANKS & SHIPOLINI, 1986).

A composição da apitoxina pode ser alterada por vários fatores como a subespécie, a fase de desenvolvimento das abelhas, além da época do ano e o tipo de alimentação. Esse conhecimento promove importantes contribuições para a coleta de apitoxina e isolamento de componentes com fins terapêuticos, na compreensão do mecanismo de atuação desses componentes no organismo, além do desenvolvimento de tratamento para os envenenamentos (LOMELE, 2014).

Alguns componentes se encontram em concentração constante durante toda a vida das abelhas, como a hialuronidase. A melitina aparece em maior quantidade nas abelhas mais velhas, a hapamina nas mais jovens. A maior quantidade de histamina e serotonina é observada no final da vida destes insetos (OWEN & SLOLEY, 1988; BARACCHI & TURILLAZZI, 2010).

A variabilidade na quantidade de fosfolipase e melitina foi verificada por Schumacher e colaboradores (1992) na apitoxina de abelhas europeias e africanizadas. Diferenças quantitativas e qualitativas foram encontradas na composição da apitoxina de *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera adansonii* e abelhas africanizadas (PALMA & BROCHETTO-BRAGA, 1993). Em estudo recente foram identificados o total de 51 proteínas, sendo 42 compostos a todos os grupo, 4 proteínas exclusivas das africanizadas e 1 exclusiva de *Apis mellifera ligustica* (RESENDE, et al., 2013).

A composição dos venenos e peçonhas podem sofrer variações em sua composição, dentro de uma mesma espécie, como resultado dos seus hábitos alimentares. Lomele (2014) identificou o efeito de diferentes recursos florais na composição quantitativa e qualitativa de apitoxina de *Apis mellifera* instalada em culturas de laranja, eucalipto, vegetação silvestre e vegetação silvestre associada a alimentação artificial.

A descoberta de novos componentes de apitoxina tem sido contínua, graças ao desenvolvimento de instrumentos e estratégias analíticos. No entanto, o estudo do perfil protéico da apitoxina da abelha africanizada, a qual é predominante no Brasil, não está bem esclarecida e determinada (RESENDE, 2013). A apitoxina das abelhas nativas do hemisfério norte tem sido muito estudada, e grande parte de seus

componentes moleculares já foram isolados e identificados, no entanto, os componentes da apitoxina das espécies de abelhas neotropicais, apresentam poucos relatos de estudos científicos (SANTOS, 2008; DIAS, 2009).

O primeiro proteoma de apitoxina usando espectrometria de massas combinando eletroforese bidimensional e análise por espectrofotometria de massas em um equipamento do tipo MALDI-TOF/TOF foi realizado em 2005 (PEIREN, et al, 2005). Neste estudo foram identificadas 9 proteínas em abelhas europeias, sendo que 3 foram identificadas pela primeira vez. Desde então outros estudos focaram na investigação de novos componentes, principalmente moléculas pouco abundantes e, também na caracterização estrutural e funcional das mesmas (RESENDE, 2013).

Além disso, uma área que vem sendo explorada é a investigação do possível uso dos componentes individuais da apitoxina, ao invés do uso dessa substância em sua forma bruta. Esta alternativa pode promover uma administração mais segura e específica das propriedades médicas e farmacêuticas da apitoxina, por conta da remoção de componentes alérgicos (LEITE & ROCHA, 2005).

Diferentes métodos, assim como o método de fracionamento por cromatografia de bioafinidade, podem ser aplicados ao estudo da investigação de componentes biologicamente ativos constituintes de produtos naturais oriundos de diversos organismos para possíveis aplicações farmacêuticas e médico-biológicas (COLLINS, et al, 1997; HEINEN & VEIGA, 2011). Os estudos envolvendo separação, purificação e caracterização de compostos de origem natural, especialmente venenos e peçonhas animais, são de extrema importância para numerosas aplicações em bioquímica e em química de produtos naturais (MENDES, et al., 2004).

1.2.2 – Potencial farmacológico

Os indivíduos que recebem múltiplas ferroadas de abelhas africanizadas, desenvolvem intensa acompanhada de insuficiência renal e insuficiência respiratória, causada principalmente pela ação da melitina, fosfolipase A2 e apamina sobre a membrana dos eritrócitos. O local atingido apresenta inchaço, coloração

avermelhada e coceira. Os sintomas iniciais incluem edema difuso, inflamação da pele, dor de cabeça, fadiga e tontura (SHEEHY, 2002; SIMICS, 2000).

Alguns indivíduos apresentam lesão subendocárdica com presença de necrose muscular cardíaca e hipotensão pelo efeito vasoativo da histamina e outros mediadores químicos (OLIVEIRA, et al., 2000). Pode ocorrer falência de diversos órgãos, tais como coração, fígado e rim, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, hipercalemia e hiperglicemia (GRISOTTO, et al., 2006).

Embora uma reação tóxica sistêmica possa ocorrer após 50 ferroadas simultâneas (SHERMAN, 1995; SCHUMACHER, et al., 1990), a dose letal considerada é de 500 ferroadas em crianças (SHERMAN, 1995) e 1100 (90 mg) em adultos. A fatalidade está associada à quantidade de apitoxina, em miligramas, injetada na vítima, por quilograma de massa corpórea (SCHUMACHER & EGEN, 1995), sendo a quantidade de apitoxina injetada em 19 ferroadas por quilograma de massa corpórea considerada como a dose média letal (WINSTON, 1994; KOLECKI, 1999).

A grande quantidade de apitoxina pode até ser letal para seres humanos, no entanto se administrada em pequenas doses pode apresentar propriedades promissoras. As propriedades curativas da apitoxina têm uma tradição muito antiga. Hipócrates empregou ferroadas de abelhas nele próprio, além de Galen (130 D.C) e Charlemagne terem recebido tratamento semelhante em articulações com artrite. Likomskiy em 1864 e Tere em 1888 publicaram os primeiros estudos clínicos à respeito da influência de picadura de abelha em reumatismo (BECK, 1997). Os apicultores relatam que as dores nas articulações parecem melhorar depois de terem sido picadas repetidamente por abelhas (BROADMAN, 1997).

Este é um produto que vem ganhando grande destaque nos estudos científicos e é utilizado como ferramentas farmacológicas para o tratamento de diversos tipos de doenças como citado por Leite e Rocha (2005), que descrevem a apitoxina como uma substância utilizada para o tratamento de doenças de pele (eczema e úlceras tópicas), inflamações (laringite e mastites), viral (herpes simples do tipo 1 e 2), reumatológica (artrite reumática, osteoartrite e artrite traumática, bursites), cardiovascular (hipertensão, arritmias e arteriosclerose), pulmonar (enfisema e asma), contra esclerose múltipla, e combate ao câncer.

A apitoxina tem sido relatada como eficaz no tratamento de enfermidades, devido suas propriedades antiinflamatórias, principalmente sobre doenças reumáticas. Estudos relataram que houve diminuição da expressão de COX-2 e fosfolipase A2 e dos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL-1 e IL-6), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ERO), no combate à artrite reumatoide (PARK, et al., 2004; SON, et al., 2007).

O tratamento com apitoxina ou seus compostos isolados apresentaram resultados favoráveis inclusive diante de condições ateroscleróticas, doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de ateromas nos vasos sanguíneos (LEE, et al., 2010; KIM, et al., 2011; KIM, et al., 2012).

Administrado via intraperitoneal, a apitoxina reduziu a formação de placas ateroscleróticas e o nível de lipídios séricos em camundongos (LEE, et al., 2010).

A administração isolada da apamina também demonstrou propriedades antiinflamatórias em estudo experimental com redução da expressão do TNF- α , molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 e molécula de adesão intercelular (ICAM)-1, bem como a via de fator nuclear kappa B (NF- κ B), demonstrando potencial atividade preventiva mediante condições ateroscleróticas (KIM et al., 2012).

Um estudo, onde camundongos receberam apitoxina no local da ferida, foi observado acelerado processo de contração e re-epitelização tecidual, aumento da produção de colágeno e redução do tamanho da ferida, além de aumento da expressão do TGF- β 1, fibronectina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e colágeno I na área de cura da ferida por meio da coloração de imunohistoquímica (HAN, et al., 2011).

Estudos apontam resultados positivos da peçonha de abelhas quando utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, entre eles os de ovário, bexiga, fígado, mama, próstata e pulmão (JANG, et al., 2003; ORŠOLIĆ, et al., 2003; RUSSEL, et al., 2004; HU, et al., 2006; JO, et al., 2012). Segundo a pesquisa, a destruição das células cancerígenas ocorre principalmente pela ação dos componentes como melitina, fosfolipase A2 e apamina, elementos que agem contra as células tumorais (PARK, et al., 2010; ORŠOLIĆ, 2011).

Estudos recentes relataram vários efeitos da peçonha de abelha como a indução de apoptose e necrose e efeitos na proliferação, citotoxicidade e inibição do crescimento em diferentes tipos de células cancerosas (LIU, et al., 2002; JANG, et al., 2003; MOON, et al., 2006; HU, et al., 2006; HAN, et al., 2007).

Pesquisas apontam que a melitina isolada pode induzir a parada do ciclo celular e inibir o crescimento e apoptose em várias células tumorais (LI, et al., 2006; LIU, et al., 2008).

No que se refere à ação da apitoxina no Sistema Nervoso Central (SNC), estudos tem apontado potencial efeito neuroprotetor sobre determinadas doenças como a esclerose múltipla (EM) (CASTRO, et al., 2005; NAMAKA, et al., 2008), a esclerose lateral amiotrófica (ELA) (YANG, et al., 2010; YANG, et al., 2011), a doença de Alzheimer (LEE, et al., 2012) e a doença de Parkinson (DOO, et al., 2010; KIM, et al., 2011b; LEE, et al., 2012; CHUNG, et al., 2012).

A apitoxina bruta, assim como alguns componentes isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra vírus e bactérias (BOGAART, et al., 2008; CHEN, et al., 2010; WANG, et al., 2011). Boutrin e colaboradores (2008) demonstraram o efeito da fosfolipase A2 sobre o *Trypanosoma brucei brucei* e enterobactérias.

Observa-se dessa forma que a apitoxina, por meio da sinergia dos compostos, bem como seus componentes de forma isolada, apresentam uma extensa aplicabilidade terapêutica em virtude das inúmeras propriedades biológicas. Faz-se necessário um maior conhecimento acerca deste produto o que possibilita o desenvolvimento de novas pesquisas na área para elucidar as aplicabilidades da apitoxina, uma vez que a utilização de recursos naturais configura-se como uma importante alternativa para a indústria farmacêutica que vem produzindo drogas mais eficazes, dotadas de maior seletividade contra várias condições patológicas e com menor incidência de efeitos não desejados.

1.3 – LECTINAS

1.3.1 – Considerações gerais

Lectina é uma classe de proteínas, de origem não imunológica, capaz de se ligar específica, reversível e não covalentemente a carboidratos ou glicoconjugados, podendo ser encontrados em quase todas as formas de organismos vivos, incluindo plantas, vertebrados, invertebrados e microorganismos (PEUMMANS & VAN DAMME, 1995; LORIS, 2002). Ela é capaz de ligar-se a carboidratos livres ou a carboidratos de superfície celular sem modificar a estrutura dos mesmos (NISHIMURA, et al., 2000).

Acredita-se que o primeiro relato científico das lectinas ocorreu em 1888 com a publicação de Stillmark intitulada “Über Ricin ein giftiges fermenta us den samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen”. Foi descoberto que o extrato de semente de mamona (*Ricinus communis*) proporcionava a aglutinação de eritrócitos e mostrou que a fração ativa desse extrato era uma proteína que denominou de ricina. Esta lectina além de aglutinar eritrócitos era capaz de aglutinar células epiteliais, células de fígado, leucócitos e que reagia de maneira distinta com diversos tipos de eritrócitos (KENNEDY, et al., 1995; CASTRO, 2007).

No entanto, alguns autores acreditam que as lectinas animais foram descobertas quase 20 anos antes dos trabalhos de Stillmark, pois as lectinas estudadas por ele não foram associadas como proteínas ligantes de carboidrato. Dessa forma concluiu-se que a primeira lectina descoberta foi de origem animal e que a primeira atividade hemaglutinante dessas proteínas foi observada em peçonhas de serpentes da espécie *Crotalus durissus* (KILPATRICK & GREEN, 1992; KILPATRICK, 2002).

O primeiro nome dado às moléculas e extratos vegetais capazes de aglutinar eritrócitos e outras células, foi “aglutinina”. A partir de então, outros nomes foram surgindo ao longo do tempo para descrever esta classe protéica, a qual apresentava atividade aglutinante. Foram chamadas de hemaglutininas, fitohemaglutininas e fitoaglutininas (KENNEDY, et al., 1995). Somente a partir da década de 50 que o

termo “lectina” foi empregado, originando-se do latim *legere*, que significa selecionar, eleger. Este termo refere-se à habilidade dessas proteínas ligarem-se seletivamente e reversivelmente a carboidratos, e que são capazes de reconhecer receptores glicídicos específicos presentes nas células vermelhas do sangue, promovendo aglutinação (ETZLER, 1985; SHARON & LIS, 2004) (FIGURA 1).

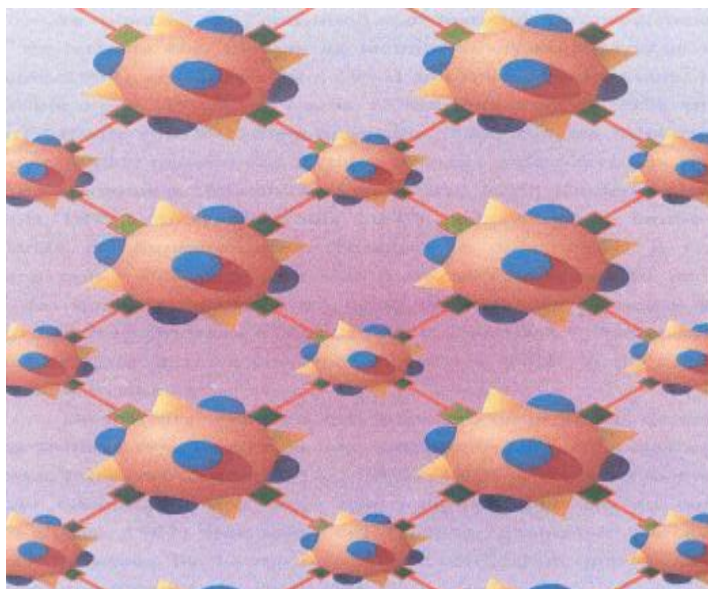


FIGURA 1: Representação esquemática de aglutinação por lectinas: LECTINA , e seus ligantes de superfície da célula , carboidratos ou não-carboidratos, ligantes ou não-ligantes.

Fonte: Adaptado de KENNEDY, et al., 1995.

Os estudos de Ehrlich (1891) com a ricina e a abrina (lectina de *Abrus precatorius*) contribuíram para o surgimento da Imunologia Básica, visto que, bezerros poderiam ser prevenidos da intoxicação por abrina ou ricina quando alimentados por pequenas concentrações de suas respectivas sementes de origem. Atualmente sabe-se 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).

No ano de 1970 iniciou-se o estudo da “lectinologia”, após a publicação do trabalho de Sharon e Lis (1972), realizando uma listagem das lectinas até então

isoladas e caracterizadas e suas possíveis aplicações, principalmente no campo da histopatologia. Segundo Loris (2002), o estudo estrutural das lectinas teve início nesta mesma década de 1970, com a estruturação da forma cristalizada da Concavalina A (ConA), no entanto, apenas em 1989 foi determinado o primeiro carboidrato ligante de ConA, o metil- α -D-manopiranosídeo.

Somente em 1974 foi descrita a primeira lectina de origem animal, sendo esta denominada como “uma lectina hepática de mamíferos”. A investigação sobre lectinas que interagem com β -galactosídeos tiveram o seu início com as eletrolectinas extraídas da enguia, na mesma década (TEICHBERG et al., 1975; HARRISON, 1991).

As lectinas ocorrem em toda a natureza, sendo encontrados nos mais diversos organismos. É possível constatar a presença de lectinas em microorganismos (KENNEDY, et al., 1995; WEIS, 1997; LORIS, 2002), em plantas (MOREIRA, et al., 1997; OLSNES & KOZLOV, 2001; ZANETTI, 2007; SILVA, et al., 2010), em fungos (LIU, et al., 2004; LI, et al., 2008; FENG, et al., 2006; ZHAO, et al., 2008), em animais (TUNER, 1996; WANG & WANG, 2012).

A dificuldade de se iniciar os estudos com lectinas animais se deve ao fato de apresentarem uma expressão tecidual inferior em relação às lectinas vegetais. Para uma caracterização mais detalhada das lectinas animais, se faz necessário partir de uma quantidade muito grande de material bruto (LAM & NG, 2011).

Em invertebrados as lectinas são encontradas na hemolinfa e auxiliam na resistência a infecções (papel análogo ao das imunoglobulinas nos vertebrados). Em vertebrados as lectinas são encontradas em duas formas: na forma solúvel; e ligadas à membrana, podendo agir como mediadores no reconhecimento entre as células (SHARON & LIS, 1993).

A característica fundamental das lectinas é sua capacidade de reconhecimento de carboidratos tanto em solução como na superfície celular. Baseado na sequência de aminoácidos das lectinas animais, foi proposto que a atividade do ligante carboidrato na sua maioria reside em um segmento polipeptídico chamado Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD – *Carbohydrate recognition domain*) (SHARON & LIS, 2004). Diversos tipos de CRDs foram descritos, cada um compartilhando um padrão invariante e altamente conservado d

resíduos de aminoácidos. Dessa forma é possível dividir a maioria das lectinas animais em cinco classes principais, com base no alinhamento das sequências de aminoácidos dos CRDs (POWELL & VARKI, 1995; DRICKAMER, 1998).

A classificação mais aceita para lectinas de origem animal, baseando-se nas características estruturais, são lectinas do tipo-C, lectinas do tipo-P, lectinas do tipo-I (ou selectinas), lectinas do tipo-S (ou galectinas) e pentraxinas (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002).

As lectinas do tipo-C requerem íons Ca^{2+} para sua atividade de ligação a carboidratos e o CRD é caracterizado por um domínio constituído de 100 a 130 resíduos de aminoácidos. Este grupo de lectinas apresenta solubilidade variável, estão localizadas principalmente no meio extracelular e possuem resíduos de cisteínas ligados formando pontes dissulfeto (DRICKAMER, 1998).

As lectinas do tipo-S, também conhecidas como galectinas, apresentam atividade independente de Ca^{2+} , possuem CRD conservado e ligação a β -galactosídeos (DRICKAMER, 1998). As galectinas são amplamente distribuídas no reino animal e têm sua propriedade molecular básica conservada como especificidade e arquitetura protéica (KASAI & HIRABAYASHI, 1996). São estudadas intensivamente devido ao seu desempenho na adesão, regulação do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (KILPATRIK, 2002; PERILLO, et al., 1998; KASAI & HIRABAYASHI, 1996). Podem ser encontradas tanto intra quanto extracelularmente. São solúveis e possuem grupos tióis livres, pois a oxidação inibe sua atividade (DRICKAMER, 1988).

As lectinas do tipo-I consistem em um grupo de lectinas que desempenha função no sistema imune. São conhecidas como imunoglobulinas-*like*, pois pertencem estruturalmente à superfamília das imunoglobulinas, desempenhando papel no sistema imune. Estão nesta categoria lectinas que se ligam ao ácido siálico, de maneira independente de Ca^{2+} . São proteínas integrais de membrana e possuem amplos domínios citosólicos com potenciais sítios de fosforilação (POWEEL & VARKI, 1995).

As lectinas do tipo-P são altamente específicas para manose-6-fosfato. São formadas por apenas dois membros (o receptor mano-6-fosfato dependente de cálcio e o fator II de crescimento semelhante à insulina/receptor manose-6-fosfato)

com massa molecular de 300 e 46 kDa respectivamente (DAHMS & HANCOCK, 2002).

As pentraxinas são proteínas plasmáticas que incluem, dentre outras, a proteína reativa C. Essas lectinas proliferam quando há algum processo de inflamação ou injúria tecidual no organismo e podem desempenhar funções como estimulação da fagocitose por leucócitos. Estas lectinas formam pentâmeros e são ligantes de ligantes Ca^{2+} (GABIUS, 1997; BRINDA, et al., 2005; GABIUS & WU, 2006).

1.3.2 – Propriedade das Lectinas: especificidade por açúcares

Interações entre proteínas e carboidratos são a base de inúmeros processos biológicos, sejam eles naturais ou patológicos (SHARON & LIS, 2003). Desta forma as lectinas encontram-se relacionadas a diversas infecções causadas por vírus, bactérias, fungos e outros microrganismos; interação entre células; fertilização; reconhecimento; processo de metástase; crescimento e diferenciação celular (LORIS, et al., 1998).

O papel fisiológico desempenhado pelas lectinas está intimamente ligado aos receptores naturais a essas proteínas. Os glicoconjugados possuem uma porção glicídica com estrutura complementar ao domínio de reconhecimento de carboidrato da lectina, caracterizam-se assim, como os receptores destas proteínas nos diversos organismos. Com exceção de algumas enzimas as lectinas são as únicas proteínas capazes de interagirem com glicoconjugados presentes na superfície de microorganismos (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

As lectinas interagem especificamente com monossacarídeos, estejam eles livres como açúcares simples ou como parte de grandes moléculas (oligossacarídeos simples ou complexos; ou os polissacarídeos).

A D-galactose é constituinte de vários oligossacarídeos como a lactose, melibiose e rafinose. Este monossacarídeo pode ser liberado na hidrólise de polissacarídeos incluindo gomas e mucilagens (SZAIDMAN, 1999).

A especificidade das lectinas pode ser definida em função dos monossacarídeos que apresentam capacidade de inibição das reações de aglutinação e precipitação induzidas pela lectina (BOI, et al., 2006). Os componentes monossacarídicos podem ser classificados em dois grupos, com base no padrão de reconhecimento das lectinas, função e história evolucionária. Todos os açúcares, em ambos os grupos, na forma piranosídica, mostram um arranjo em comum da hidroxila do C-3, do oxigênio do anel e dos carbonos das posições 5 e 6 do anel. Um dos grupos é constituído por glucose, manose e N-acetilglucosamina (GlcNAc), que possuem o mesmo arranjo de grupos hidroxila equatoriais nas posições C-3 e C-4, enquanto o segundo grupo, constituído por galactose e N-acetilgalactosamina (GalNAc), é caracterizado pela presença de um grupo hidroxila axial na posição C-4. Dessa forma, os dois grupos podem ser distinguidos pela orientação do grupo hidroxila do C-4. Dentro de cada grupo, a orientação e substituição na posição 2 do anel varia (FIGURA 2) (DRICKAMER, 1997).

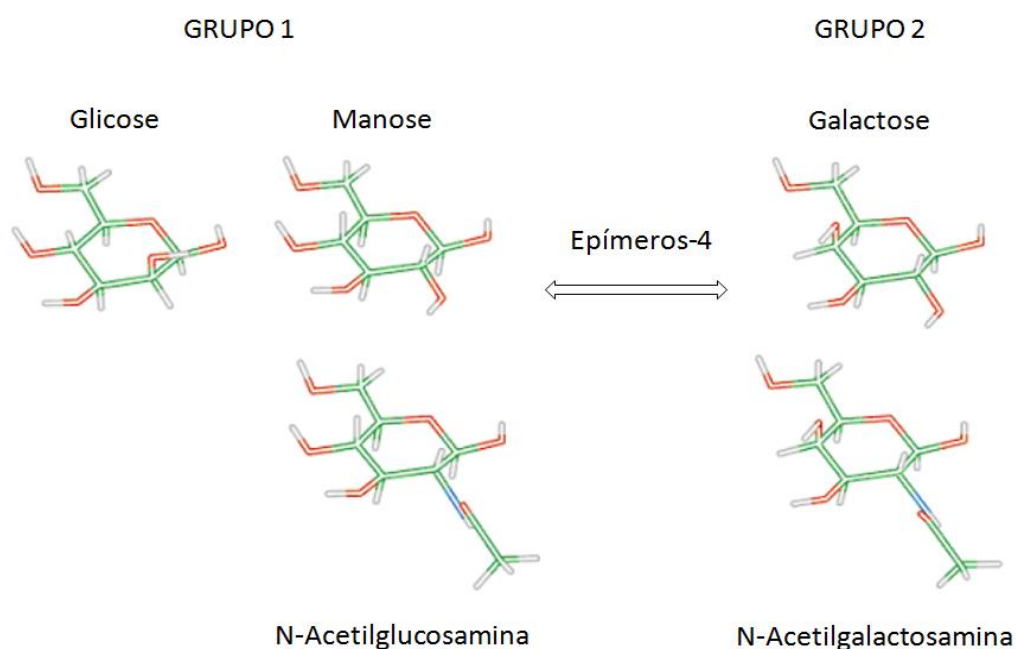


FIGURA 2: Componentes monossacarídicos.

Fonte: Adaptado de DRICKAMER, 1997.

Lectinas que apresentam especificidade por D-galactose não interagem com D-glucose (seu epímero-4) ou D-manose (epímero-2 da glucose), e vice-versa (LIS & SHARON, 1998).

Quando o anel piranosídico desses monossacarídeos é formado, dois isômeros configuracionais podem ser obtidos devido ao surgimento do centro anomérico em C-1 (SZNAIDMAN, 1999). O grupo hidroxila no carbono anomérico pode, então, assumir as posições α ou β (CARPITA & MCCANN, 2000). Certas lectinas, que possuem a mesma especificidade, combinam-se preferencialmente, ou, em alguns casos, exclusivamente, com um dos anômeros α ou β do monossacarídeo, enquanto outras perderam essa especificidade anomérica (LIS & SHARON, 1998). Algumas lectinas, portanto, reconhecem seqüências específicas de sacarídeos não somente pela ligação glicosídica inter-residual, mas também pela configuração anomérica desses açúcares (DE-SIMONE, et al., 2006).

1.3.3 – Sítios carboidrato-ligantes e interações lectina-carboidrato

As lectinas são classificadas de acordo com suas características topológicas no sítio de combinação com o carboidrato. Neste sentido essas proteínas podem ser divididas em dois grupos principais: as proteínas do grupo I, as quais apresentam um sítio de ligação enterrado e engolfa totalmente o ligante sobre o sítio (proteínas de transporte periplásmico bacteriano e enzimas); e as proteínas do grupo II, que diferem das primeiras por possuírem um sítio raso, superficial, a maioria na forma de uma depressão na superfície protéica. Este grupo compreende as três clássicas famílias de lectinas (lectinas de legumes, lectinas tipo-C e galectinas), assim como outras lectinas de plantas, proteínas virais, toxinas, anticorpos anticarboidrato e pentraxinas (ELGAVISH & SHAANAN 1997).

Segundo Sharon e Lis (2003) os sítios de ligação das lectinas são diversos, mesmo quando a especificidade é a mesma. No entanto, dentro de uma mesma família de lectinas, os sítios podem ser semelhantes.

A interação entre os carboidratos e lectinas ocorre primariamente por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Em alguns casos pode ocorrer por ligações metálicas e interações eletrostáticas (LIS & SHARON, 1998).

A disponibilidade de hidroxilas (grupo OH) nos carboidratos capacita-os a participarem de redes complexas de pontes de hidrogênio, formadas usualmente por pontes de hidrogênio cooperativas, nas quais a hidroxila atua simultaneamente como doador e aceptor de elétrons (SHARON & LIS, 2003). Baseando-se na estrutura piranosídica dos monossacarídeos, as hidroxilas dos carbonos 4 e 6 são as que formam mais extensivamente pontes de hidrogênio, embora a hidroxila em C-3 também esteja engajada com um grupamento amida da estrutura da lectina. As pontes de hidrogênio geralmente não envolve a hidroxila em C-2, pois se posiciona fora da superfície proteica. A D-galactose apresenta hidroxilas nas posições 3 e 4 que estão envolvidas em um série de pontes de hidrogênio (DRICKAMER, 1997).

A região da lectina que participa das pontes de hidrogênio são as cadeias laterais dos seus aminoácidos, com maior frequência os resíduos de aspartato e asparagina, além de glutamato, glutamina, arginina e serina. Os átomos de hidrogênio e oxigênio dos grupos NH e CO da cadeia principal também contribuem para a formação de pontes de hidrogênio em uma menor extensão. Estas pontes entre proteínas e carboidratos podem ocorrer mediadas ou não por água (SHARON & LIS, 2003).

De acordo com Weis e Drickamer (1996), apesar de os carboidratos apresentarem caráter hidrofílico, a disposição estérica dos grupos hidroxila cria regiões hidrofóbicas na superfície da molécula, que interagem com cadeias laterais hidrofóbicas da proteína. Assim, interações hidrofóbicas desempenham o principal papel de reconhecimento das moléculas de açúcar pelas lectinas. Podemos destacar, principalmente, a interação entre resíduos aromáticos do sítio das lectinas galactose-ligantes e a molécula de galactose. Um resíduo de aminoácido aromático, geralmente Trp, mas em poucos casos, Tyr e Phe, possivelmente, é o componente-chave do sítio de ligação de diversas proteínas ligantes de carboidrato. Esse resíduo de aminoácido, provavelmente, assegura a orientação adequada do açúcar no sítio de ligação, pois orienta os átomos de hidrogênio apolares desse sacarídeo em direção ao anel aromático e mantém os átomos de oxigênio afastados desse anel. Os átomos de hidrogênio C3-H, C4-H, C5-H e C6-H da galactose interagem com o resíduo aromático em numerosas posições-orientações. Esses átomos de hidrogênio fazem interações com diferentes regiões do resíduo aromático nos diferentes complexos que podem ser formados (SUJATHA et al., 2004).

A galactose tem a liberdade de se mover ao longo do plano do resíduo aromático para estabelecer interações ótimas com o sítio de ligação das proteínas galactose-ligantes. Após atingir a distância apropriada e a orientação favorável para a galactose em relação ao aminoácido aromático, esse sacarídeo estará posicionado de forma a otimizar também as interações com os demais resíduos do sítio de ligação (SUJATHA & BALAJI, 2004).

Cátions divalentes como o cálcio (Ca^{2+}), estão envolvidos no reconhecimento de carboidratos em algumas lectinas, modelando indiretamente, o sítio de ligação (WEIS & DRICKAMER, 1996).

As lectinas animais que apresentam esta peculiaridade, as denominadas lectinas tipo-C, apresentam o CDR como uma estrutura globular compacta (WEIS, et al., 1991). Outro fator estrutural é o posicionamento da região ligante de cálcio em um super loop (ZELENSKY & GREARY, 2005).

Lectinas ligantes de D-galactose, provenientes de peçonhas ofídicas, geralmente possuem 135 aminoácidos em cada cadeia, são ácidas e apresentam o CRD e o loop ligante de cálcio altamente conservado. Além disso, são homodiméricas, sendo suas subunidades conectadas por resíduos de cisteínas na posição 86 de cada cadeia que formam ponte dissulfeto (FIGURA 3). Não são apenas as pontes dissulfetos que estabilizam a proteína, as pontes de hidrogênio intermoleculares e interações hidrofóbicas estariam envolvidas nessa estabilidade (GUIMARÃES-GOMES, et al., 2004).

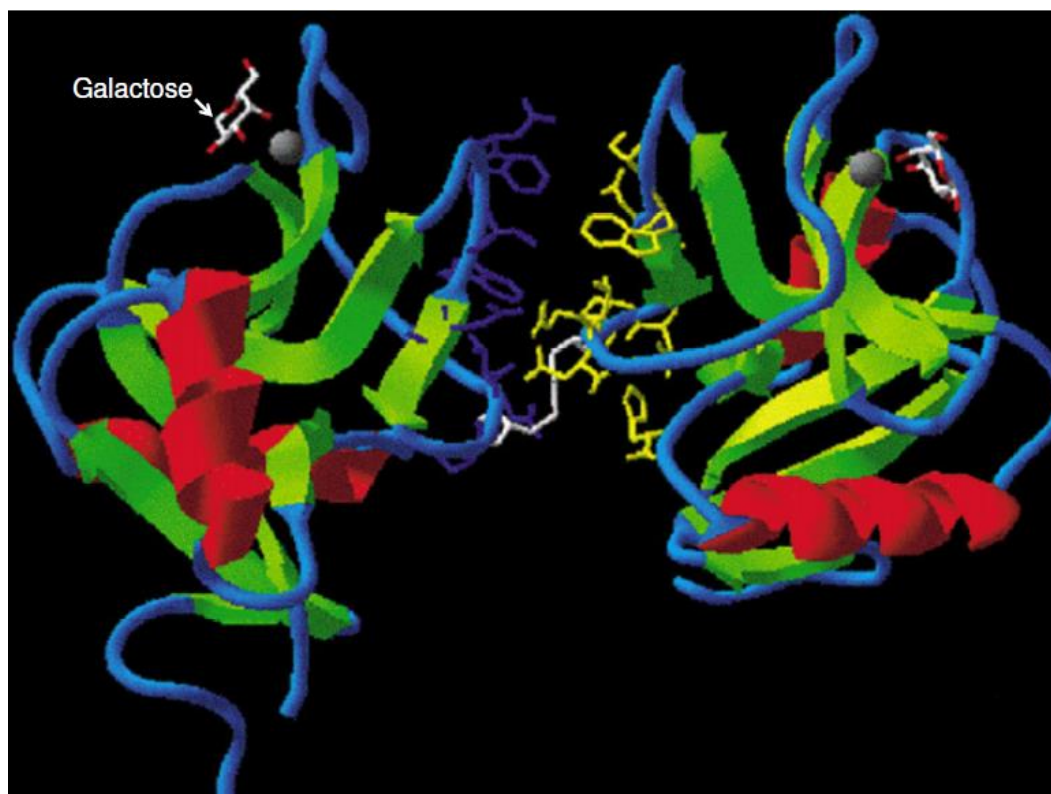


FIGURA 3: Estrutura secundária de uma lectina (BiL) isolada de peçonha da serpente *Bothrops insularis*, complexada com o Ca^{2+} (esfera cinza) e a galactose.

Fonte: Adaptado de GUIMARÃES-GOMES, et al., 2004.

De acordo com o modelo estrutural da BiL, Gomes-Guimarães e colaboradores (2004) afirmam que estruturalmente os ligantes de cálcio envolveriam a cadeia lateral de átomos de oxigênio dos aminoácidos Gln96, Asp98, Glu104 e Asn119, de modo que o 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 4).

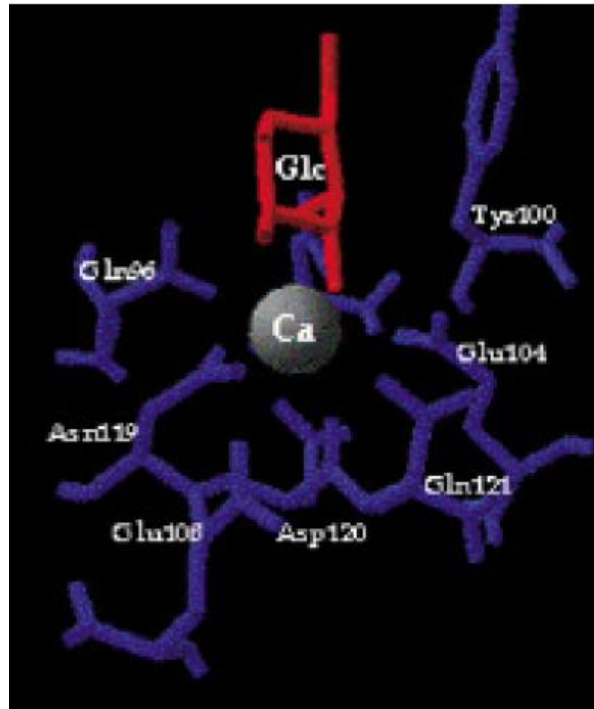


FIGURA 4: Domínio de reconhecimento de carboidrato e loop ligante de cálcio. A galactose está representada em vermelho, o Ca^{2+} em cinza. Os aminoácidos envolvidos também estão destacados em azul.

Fonte: GOMES-GUIMARÃES, et al., 2004.

Esse domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) então se liga aos carboidratos presentes na membrana dos eritrócitos, 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.

Segundo Drickamer e Taylor (1993), a presença do CRD em cada subunidade pode não ser um fator determinante para que as proteínas que o possuam apresentem atividade ligante de carboidratos. Essa situação ocorre com as chamadas lectinas-like, proteínas encontradas em diversos organismos, inclusive peçonhas de serpentes, sendo que algumas até possuem o CRD conservado, porém podem não apresentar atividade hemaglutinante. As lectinas-like são proteínas compostas por $\alpha\beta$ heterodímeros de aproximadamente 14 kDa e 18 kDa, respectivamente. Essas moléculas diferenciam-se das lectinas verdadeiras por não

serem capazes de interagir com carboidratos e são chamadas dessa forma por apresentarem homologia sequencial com o CRD (ARLINGHAUS & EBLE, 2012).

É comum que as lectinas apresentem baixa afinidade por monossacarídeos e possuam uma afinidade maior por carboidratos ramificados. Acredita-se que a seletividade por um determinado ligante é aumentada várias ordens de magnitude por meio de ligantes múltiplos (mecanismos de ligação adicional em subsítios) e multivalência de subunidade (RINI, 1995; WEIS & DRICKAMER, 1996). Multivalência de subunidade, por outro lado, ocorre quando várias subunidades da mesma lectina se ligam a diferentes extensões de um carboidrato ramificado (ELGAVISH; SHAANAN, 1997).

Enquanto a seletividade definitiva das lectinas se deve, provavelmente, aos mecanismos de multivalência, o fator principal discriminatório no reconhecimento de carboidratos é a especificidade primária por monossacarídeos, que é também indicativo do carboidrato ramificado que está sendo reconhecido. Dessa forma, lectinas galactose-específicas requerem a presença de galactose, ou seus derivados amino-acetilados para se ligarem. A estereoquímica das pontes de hidrogênio formadas e a disposição preferencial dos resíduos aromáticos desempenham um papel-chave na elucidação da especificidade primária (ELGAVISH; SHAANAN, 1997).

1.3.4 – Funções biológicas das lectinas

A propriedade das lectinas em interagirem com carboidratos é a base para o estabelecimento das diversas funções biológicas destas biomoléculas. Os carboidratos servem como mediadores determinantes no reconhecimento pelas lectinas em interações célula-molécula e célula-célula (SHARON & LIS, 1989). As lectinas estão associadas a processos biológicos como endocitose, translocação intracelular, migração, adesão, fagocitose e ligação de microorganismos em células hospedeiras (SHARON & LIS, 1993; CARVALHO, et al., 2001; GABIUS, et al., 2002; IMBERTY, et al., 2004) (FIGURA 5).

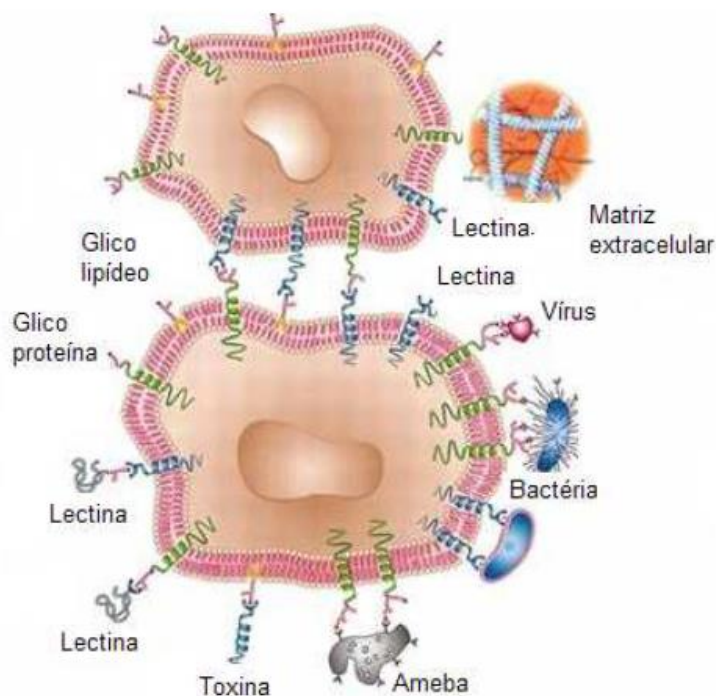


FIGURA 5: Interações das lectinas com carboidratos de superfície: Lectinas promovem interações célula-célula e/ou célula matriz extracelular através do reconhecimento específico de glicoconjugados.

Fonte: SHARON & LIS, 2004.

. Foi sugerido que as lectinas funcionam como substâncias de reserva, já que são degradadas e contribuem com aminoácidos para o desenvolvimento das plântulas e ainda como mediadoras da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de leguminosas, assim como, agentes de defesa da planta contra patógenos e predadores (PEUMANS & VAN DAMME, 1993; WANG, et al., 2000).

Nos fungos, as lectinas apresentam importante papel na dormência, crescimento e morfogênese, combate a infecções parasitárias e reconhecimento celular durante os primeiros estágios de micorrização (CUNHA, 2010).

Em animais as lectinas apresentam funções de imunidade inata, regulação de crescimento e ciclo celular, reconhecimento óvulo espermatozóide entre outros (SHARON & LIS, 2004).

As funções biológicas das lectinas em venenos e peçonhas ainda não estão esclarecidas, no entanto, alguns efeitos biológicos de lectinas de peçonhas de

serpentes têm sido relatados, tais como agregação plaquetária, indução de edema, liberação de cálcio do estoque interno de células, inibição da proliferação de células, indução de inflamação e citotoxicidade (MARCINKIEWICZ, et al., 1997; PANUNTO, et al., 2006).

1.3.5 – Lectina de venenos e peçonhas animais

As lectinas têm sido descritas em sementes, bactérias, caramujos, vertebrados, fungos, venenos e peçonhas animais, dentre outros organismos (KILPATRICK, 2002).

Os venenos e peçonhas animais caracterizam-se como fonte de lectinas ainda pouco explorada. A importância toxicológica dessas moléculas tem sido demonstrada em alguns organismos, mas não totalmente esclarecida. No entanto, os estudos com lectinas de venenos e peçonhas caracterizam-se como promissores no campo da biotecnologia.

A dificuldade nas pesquisas com as lectinas animais, principalmente nos venenos e peçonhas, relaciona-se ao fato de que os rendimentos são extremamente baixos. A massa de purificação dessas lectinas necessita de grandes quantidades de matérias-primas (LAM & NG, 2011).

As lectinas de peçonhas mais estudadas são as de serpentes, denominadas SVL (snake venom lectin), e foram isoladas das peçonhas referentes às famílias Elapidae, Viperidae e Crotalidae. Estas proteínas compõem a família das lectinas tipo-C e correspondem de 1 a 5% do peso seco da peçonha (NIKAI, et al., 2000; HAVT, et al., 2005).

A primeira lectina isolada e parcialmente caracterizada de uma peçonha animal foi obtida da serpente *Bothrops atrox*. Esta lectina foi denominada trombolectina e suas características bioquímicas e biológicas são: lectina β -galactosídea; proteína homodimérica ligada por ponte dissulfeto com monômeros de peso molecular em torno de 15.000 Da; proteína não glicosilada; ponto isoelétrico heterogêneo (pI 6,4 ou entre 9,5-9,7); lectina ligante de cálcio; atividade de hemaglutinação dependente da presença de cálcio e inibida por agentes redutores,

EDTA, açúcares e aquecimento (GARTNER, et al, 1980; GARTNER & OGILVIE, 1984).

Lectinas isoladas das peçonhas de serpentes já mostraram ter ações terapêuticas como ação anti-tumoral e ação bactericida (BARBOSA, et al., 2010, KASSAB, et al., 2004; 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).

As SVL apresentam atividade mitogênica em linfócitos, indução de edemas em ratos, inibição da proliferação de células tumorais e estimulação da migração e adesão de neutrófilos *in vivo* (LOMONTE & CARMONA, 1992; OZEKI, et al., 1994; DE CARVALHO, et al., 2001; ELIFIO-ESPOSITO, et al., 2007).

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.

Lectinas da peçonha de outras espécies de serpentes também foram isoladas e tiveram seus Domínios de Reconhecimento de Carboidratos (CRD) caracterizados, como a lectina CaL de *Crotalus atrox* (WALKER, et al., 2004), lectina BjL de *Bothrops jararaca*, lectina BpL de *Bothrops pirajai*, lectina ApL de *Agkistrodon*

piscivorus, lectina BaL de *Bitis arietans*, lectina BiL de *Bothrops insularis* e a lectina BjcuL de *Bothrops jararacussu* (GUIMARÃES-GOMES, et al., 2004).

Outras espécies de animais peçonhentos tiveram suas lectinas isoladas e identificadas, como a lectina SHL-I da aranha *Selenocosmia huwena* (LU, et al., 1999), quatro lectinas da aranha *Ornithoctonus huwena* (YUAN, et al., 2007), a lectina Nattectina, uma lectina D-galactose ligante do tipo-C da peçonha do peixe *Thalassophryne natterii* (SARAIVA, 2007).

A peçonha do escorpião *Buthus occitanus* teve uma lectina isolada e parcialmente caracterizada por Hoang e colaboradores (2001). Uma lectina chamada Odorranalectina foi identificada no veneno secretado pela pele do sapo *Odorrana grahami* (LI, et al., 2008).

2 – OBJETIVOS

2.1 – GERAL

Isolar e caracterizar bioquimicamente a fração lectínica da apitoxina da abelha *Apis mellifera* L.

2.2– ESPECÍFICOS

2.2.1 - Obter a fração lectínica constituinte da apitoxina;

2.2.2 - Determinar o carácter lectínico da fração protéica isolada;

2.2.3 - Realizar a caracterização bioquímica da fração;

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – AMOSTRAGEM: APITOXINA DE *Apis mellifera* L.

A amostra de apitoxina foi adquirida de abelhas da espécie *Apis mellifera* L. criadas em apiários do município de São Bento, município do estado do Maranhão, localizado na Baixada Maranhense a uma latitude 02°41'45" sul e a uma longitude 44°49'17" oeste.

A apitoxina foi coletada por meio de extrator elétrico como descrito por Peiren e colaboradores (2005). O aparelho coletor de apitoxina é composto por um gerador de pulsos, placas coletoras de vidro e uma bateria. As placas coletoras de apitoxina foram posicionadas na entrada de cinco colméias simultaneamente, gerando um pulso elétrico de 12 volts e 2 ampéres. O tempo de coleta foi de uma hora, sendo realizada no período da manhã.

Ao término do período, os coletores foram retirados e as placas de vidro mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a evaporação dos componentes voláteis, a apitoxina foi raspada, armazenada em tubo eppendorf e mantida sob congelamento.

3.2 – ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APTOXINA

3.2.1 – Preparação da amostra

Uma amostra de 100 mg de apitoxina foi solubilizada em 5mL de solução salina (NaCl 0,15M, pH 7,4) sob agitação magnética em Banho de gelo por uma hora. A suspensão foi centrifugada em Centrífuga Excelsa Baby I (mod. 206 Fanen) a 600g. por 10 minutos a 25°C para remoção das substâncias insolúveis.

3.2.2 – Cromatografia de bioafinidade em matriz de galactomananas

A amostra de apitoxina (3mL), na concentração protéica de 10,32 mg/mL, foi aplicada em coluna (15cm x 1cm) contendo 10 ml de matriz de galactomananas endospérmicas de *Adenanthera pavonina* L. (heteropolissacarídeo com resíduos de α -D-galactose reticulados com epicloridrina – 500 μ L e NaOH 3,0M), previamente equilibrada com tampão salino (NaCl 0,15M, pH 7,4).

O material não retido na coluna foi eluído com o tampão de equilíbrio e coletado em frações de 2,0 mL, em fluxo de 1mL/min, até a obtenção de valores de densidade ótica inferiores a 0,009. O material retido à matriz de galactomananas foi eluído com tampão salino (NaCl 0,15M) contendo D-galactose (0,2M) e coletado em frações de 2,0 mL. As frações obtidas foram monitoradas pela leitura de absorbância a 280nm em espectrofotômetro (SHIMADZU, UV SPECTROPHOMETER – MODELO: UV-1800).

As frações retidas que apresentaram valores de densidade ótica acima de 0,05 foram reunidas em um único grupo e tiveram suas concentrações protéicas determinadas.

As frações protéicas foram submetidas a diálise exaustiva contra tampão salino (NaCl 0,15M) para retirada dos monômeros de D-galactose, ou contra água destilada para troca de tampão e remoção da D-galactose, de acordo com a sua posterior aplicação. Posteriormente foram concentradas em tubos Vivaspin (SIGMA-ALDRICH) com membranas de exclusão MWCO 3,000 Da.

Após estes procedimentos as amostras foram condicionadas sob congelamento para uso posterior.

3.3 – DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação das proteínas totais de todas as amostras foi determinada pelo método “protein-dye-binding” segundo Bradford (BRADFORD, 1976). Esse método baseia-se na ligação do corante *Comassie brilliant blue* G-250 na sua forma aniônica à proteína por interações eletrostáticas e hidrofóbicas causando alteração

no comprimento de onda da absorção máxima do corante de 465 nm para 595 nm, sendo a absorbância monitorada a 595 nm.

3.4 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

3.4.1 – SDS-PAGE

As frações cromatográficas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito por Laemmli (1970). Foram aplicadas no gel de eletroforese, amostras contendo 20 µg de proteínas.

Os géis de eletroforese foram preparados a partir de uma solução de acrilamida e N’N’ metileno-bisacrilamida na proporção de 30:0,8%. Foi preparado o gel de separação a 12% utilizando-se tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8, 150µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio – 10%), 0,1% (v/v) de N-N-N-N-tetrametildiamina (TEMED) e 0,1% de Persulfato de Amônio (10%). O gel de concentração foi preparado a 4% utilizando-se tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 100µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio – 10%), 0,1% (v/v) de N-N-N-N-tetrametildiamina (TEMED) e 0,1% de Persulfato de Amônio (10%).

As amostras foram dissolvidas na proporção de 1:1 em tampão de amostra na presença ou ausência de β-mercaptoetanol contendo SDS (10%), Glicerol, Azul de bromofenol (0,5%) e tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8. As amostras foram levadas para banho-maria (100°C) por 5 minutos.

Foram usados como padrão os seguintes marcadores moleculares: albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), gliceraldeído-3 fosfato dehidrogenase (36 kDa), tripsinogênio (24 kDa), lisozima (14,3 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

O tempo de corrida foi de 4 horas ou até que as amostras atinssem 1,5 cm do final do gel a 180V, iniciando com 20mA e posteriormente aumentando a amperagem para 30mA.

Após a corrida o gel foi fixado em solução contendo etanol (50%), ácido acético (12%) e formol (0,05%). Posteriormente foi lavado com solução de etanol

(20%), em seguida, adicionado solução de sensibilização (0,02% de tiosulfato de sódio). Após esses procedimentos o gel foi submetido a uma solução de coloração contendo nitrato de prata (0,2%) e formalina (0,076%), o gel foi então lavado com solução de revelação contendo 6% de carbonato de sódio, tiosulfato de sódio (0,0004%) e formol (0,05%). Por fim foi submetido a uma solução de terminação contendo ácido acético e solução de sacagem com etanol a 20%.

A distância de migração de cada ponto foi determinada em centímetros e traçada uma curva padrão para determinação da massa molecular relativa que relaciona logaritmos dos valores da massa molecular relativa dos padrões com a distância de migração.

3.4.2 – Gel Nativo

Para a preparação do gel nativo foram utilizados os mesmos passos do item anterior, no entanto, toda essa preparação foi feita na ausência de SDS (agente desnaturante).

Foram aplicadas no gel de eletroforese, amostras contendo 24 µg de proteínas das frações retidas.

Após a corrida o gel foi fixado em solução de fixação contendo metanol (45%) e ácido acético (10%). Posteriormente foi corado com solução corante contendo Comassie blue G-250 (0,1%), metanol 40% e Ácido Acético 10%, por 24 horas. O gel foi descorado em solução contendo Ácido acético (5%) e Metanol (10%).

3.5 – AVALIAÇÃO DO CARÁTER LECTÍNICO DAS FRAÇÕES

3.5.1 - Teste de Hemaglutinação

Os testes de atividade hemaglutinante da fração lectínica da apitoxina de *Apis mellifera* L. foram realizadas segundo Carvalho e colaboradores (1998), com algumas modificações.

Placas de titulação com fundo “V” receberam inicialmente 50 µL de Tampão salino (NaCl, 0,15M pH 7,4) em cada poço, em seguida foram aplicados 50 µL (concentração proteica = 77,24 µg/mL) das amostras de apitoxina bruta, fração não retida e fração lectínica no primeiro poço de cada fileira, em duplicata e diluídas de forma duplo-seriada (1:2, 1:4, 1:6, 1:8,...). Em seguida foi adicionado a estas diluições, o volume de 50 µL de uma suspensão de eritrócitos humanos (2%) não tratados, dos tipos A, B, AB e O. As amostras de sangue foram obtidas do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão (Hemomar).

O controle negativo continha 50 µL de Tampão salino (NaCl, 0,15M pH 7,4) e 50 µL de uma suspensão de eritrócitos humanos (2%). As placas foram mantidas em repouso por 30 minutos a 37°C e em seguida realizou-se a leitura dos resultados.

3.5.1.1 – Determinação do Título de Hemaglutinação

O título de hemaglutinação deve ser medido em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível macroscopicamente, obtido através da seguinte equação exponencial: $U.H. = 2^n$, onde “n” corresponde ao número do último tubo da diluição onde foi possível detectar hemaglutinação.

3.5.1.2 – Cálculo da atividade hemaglutinante específica

A atividade hemaglutinante específica refere-se à divisão do título de hemaglutinação (U.H./mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP/mL). O quociente deve ser expresso em U.H./mgP (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína).

3.5.2 – Teste de inibição da hemaglutinação por carboidratos

A especificidade por carboidratos da fração lectínica da apitoxina foi determinada por meio do teste de inibição da atividade hemaglutinante, qual foi realizado segundo Ramos e colaboradores (1996) com adaptações.

Para a realização do teste, 50 µL de soluções dos seguintes carboidratos: glicose (1M), manose (1M), galactose (1M), sacarose (1M) e lactose (300mM) foram adicionados na coluna 1 da placa de microtitulação e foram diluídos serialmente em tampão salino (NaCl 0,15M, pH 7,4). Em seguida foi adicionado a cada poço 25 µL da fração lectínica na concentração de 0,25 µg/mL.

A placa foi incubada por 1 hora a 25°C. Após este período, foram acrescentados 50 µL de solução de eritrócitos (2%) do tipo sanguíneo com maior U.H. em todos os poços da placa de microtitulação e em seguida foi novamente incubada a 37°C por 30 minutos. A inibição da atividade hemaglutinante foi então determinada.

Grupos controles foram estabelecidos. O grupo controle positivo foi composto de 25 µL de tampão salino, 25 µL da fração lectínica e 50 µL de solução de eritrócitos (2%). O controle negativo foi composto de 50 µL do carboidrato e 50 µL de solução de eritrócitos (2%).

Para os carboidratos que foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC), a qual corresponde à maior diluição, ou menor concentração, do açúcar onde permaneceu a ausência de atividade hemaglutinante.

3.5.3 – Teste de requerimento de cátions divalentes

O requerimento de cátions divalentes da fração lectínica foi investigado utilizando-se EDTA no sistema de hemaglutinação, em placas de microtitulação.

Foram acrescentados nos poços da coluna 1 da placa de microtitulação 50 µL de EDTA (10mM) e foram diluídos duplo-serialmente em tampão salino (NaCl 0,15M, pH 7,4) presentes nos demais poços. O volume de 25 µL da fração lectínica da apitoxina (concentração de 0,25 µg/mL) foi adicionado em todos os poços e incubado por 1h a 25°C. Em seguida, 50 µL de solução de eritrócitos (2%) do tipo

sanguíneo com maior U.H. forma acrescentados e a placa foi novamente incubada por 30 minutos a 37°C. O grupo controle positivo foi composto de 25 µL de tampão salino, 25 µL da fração lectínica e 50 µL de solução de eritrócitos (2%). O controle negativo foi composto de 50 µL de EDTA (10mM) e 50 µL de solução de eritrócitos (2%).

Os resultados foram expressos como a concentração mínima (MIC) de EDTA necessária para inibir a atividade hemaglutinante da fração lectínica.

3.5.4 – Teste da estabilidade da atividade lectínica por aquecimento

O teste da estabilidade por aquecimento foi realizado conforme descrito por Moura e colaboradores (2006) com algumas modificações.

Amostras de 1 mL da fração lectínica na concentração de 77,24 µg/mL foram aquecidas a 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C por 30 minutos e subsequentemente foram subtidas à determinação da atividade hemaglutinante como descrito no item 3.4.1 (Teste de Hemaglutinação). Foi determinado um grupo controle com amostras a temperatura ambiente (25°C).

O teste da estabilidade da atividade lectínica por aquecimento foi realizado com eritrócitos humanos (2%) do tipo sanguíneo que apresentou maior título de hemaglutinação (U.H.).

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – ISOLAMENTO DA FRAÇÃO LECTÍNICA DA APITOXINA

Uma fração proteica (F2) foi isolada da apitoxina da abelha *Apis mellifera* através do método de cromatografia de biofinidade. Esta fração consiste em proteínas ligantes de D-galactose que reconhecem α -galactosídeos. (FIGURA 6).

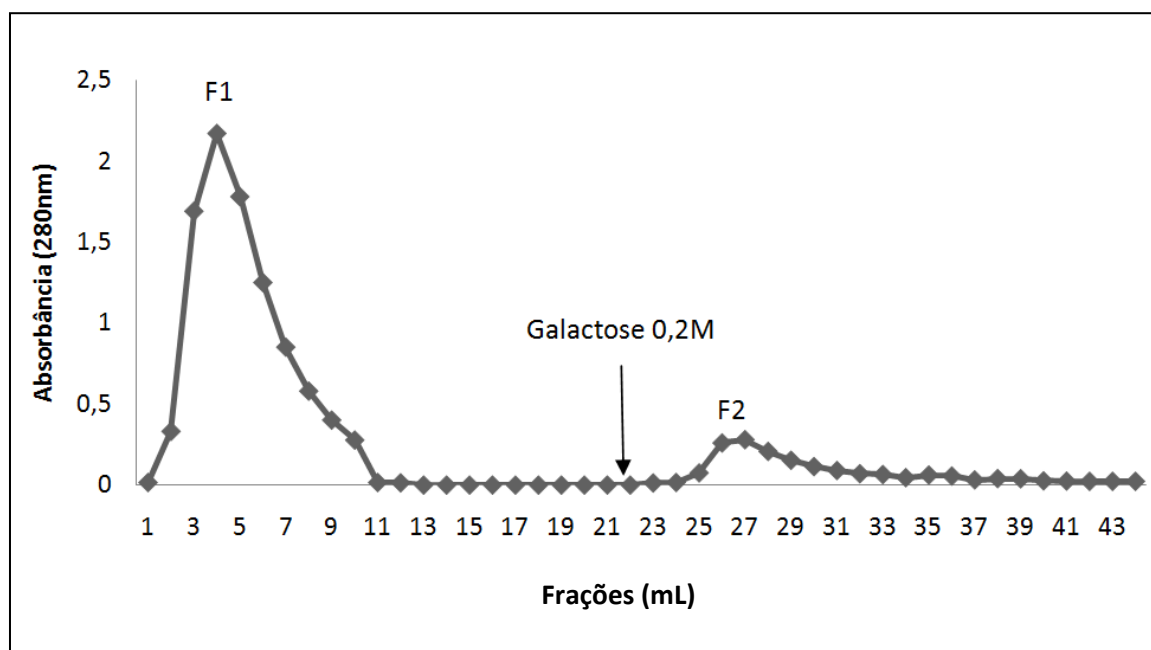


FIGURA 6: Perfil cromatográfico da fração lectínica da apitoxina da abelha *Apis mellifera* em matriz de galactomananas.

Esta fração proteica isolada (F2) teve sua característica lectínica demonstrada por promover a aglutinação de eritrócitos humanos, não tratados, dos tipos A, B, AB e O. A fração lectínica ajustada a uma concentração de 77,24 μ g/mL foi capaz de aglutinar os quatro tipos sanguíneos humanos (FIGURA 7).

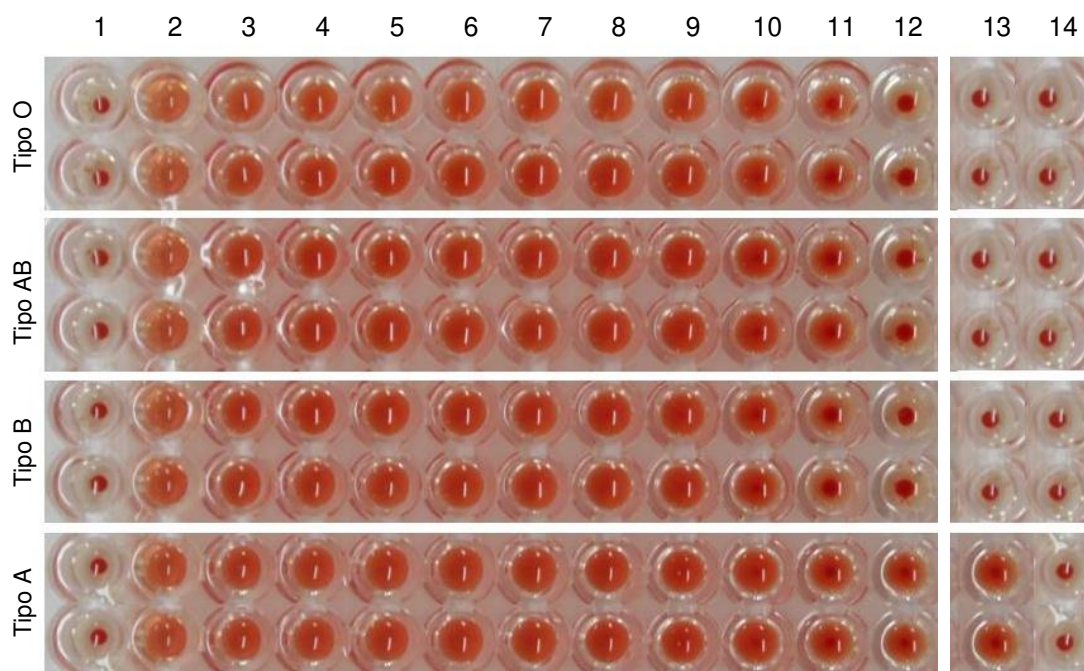


FIGURA 7: Teste da atividade hemaglutinante das frações obtidas a partir da cromatografia de bioafinidade da apitoxina de *Apis mellifera* sobre eritrócitos dos tipos A, B, AB e O. Teste realizado em duplicata. **Fileira 1:** Controle negativo – poços indicando ausência de hemaglutinação. **Fileira 2:** Frações não retidas (F1) – poços indicando hemólise. **Fileiras 3 – 14:** Frações retidas (F2) – Diluições seriadas da fração lectínica (concentração inicial de 77,24 µg/mL). Poços indicando atividade hemaglutinante.

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Os eritrócitos do tipo A foram os que apresentaram maior título de hemaglutinação, correspondente a 2048 U.H./mL e uma atividade hemaglutinante específica igual a 25.600 U.H./mgP. O menor título de hemaglutinação foi determinado para os eritrócitos tipo B, correspondendo a 512 U.H. e 6.400 U.H./mgP (TABELAS 1 e 2).

TABELA 1: Atividade hemaglutinante (U.H.) das frações obtidas a partir da apitoxina de *Apis mellifera* por meio do fracionamento por cromatografia de bioafinidade.

Amostra	Ocorrência de hemaglutinação	Título de Hemaglutinação (U.H./mL)			
		A	B	AB	O
Apitoxina Bruta	AUSENTE	-	-	-	-
Fração Não-Retida	AUSENTE	-	-	-	-
Fração Retida (Fração lectínica)	PRESENTE	2048	512	1024	1024

TABELA 2: Atividade hemaglutinante específica (A.H.E.) das frações.

Amostra	Ocorrência de hemaglutinação	Unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína (U.H./mgP)			
		A	B	AB	O
Fração Retida – F2	PRESENTE	25.600	6.400	12.800	12.800

Quando a peçonha bruta e as frações não retidas da apitoxina foram submetidas ao teste de hemaglutinação, não ocorreu atividade aglutinante, foi observado em ambas as amostras a hemólise das células (plasmoptise) dos quatro tipos sanguíneos. Apenas a fração retida promoveu a hemaglutinação (FIGURA 8).

A hemólise observada foi provavelmente proporcionada pelas diversas enzimas constituintes da apitoxina, principalmente a fosfolipase A2 (PLA₂) e a melitina, que juntas ocupam mais de 60% do peso seco da apitoxina. Essas moléculas fazem parte dos componentes hemolíticos e imunogênicos, contribuindo para a toxicidade generalizada no envenenamento (HABERMANN, 1972; OWNBY, et al., 1997).

A atividade hemolítica da apitoxina bruta e das frações não retidas (F1), em contraste com a atividade hemaglutinante induzida pelas frações isoladas (F2), certifica que o método cromatográfico foi eficiente no fracionamento da apitoxina,

proporcionando o isolamento de frações lectínicas com o mínimo possível de componentes tóxicos contaminantes.

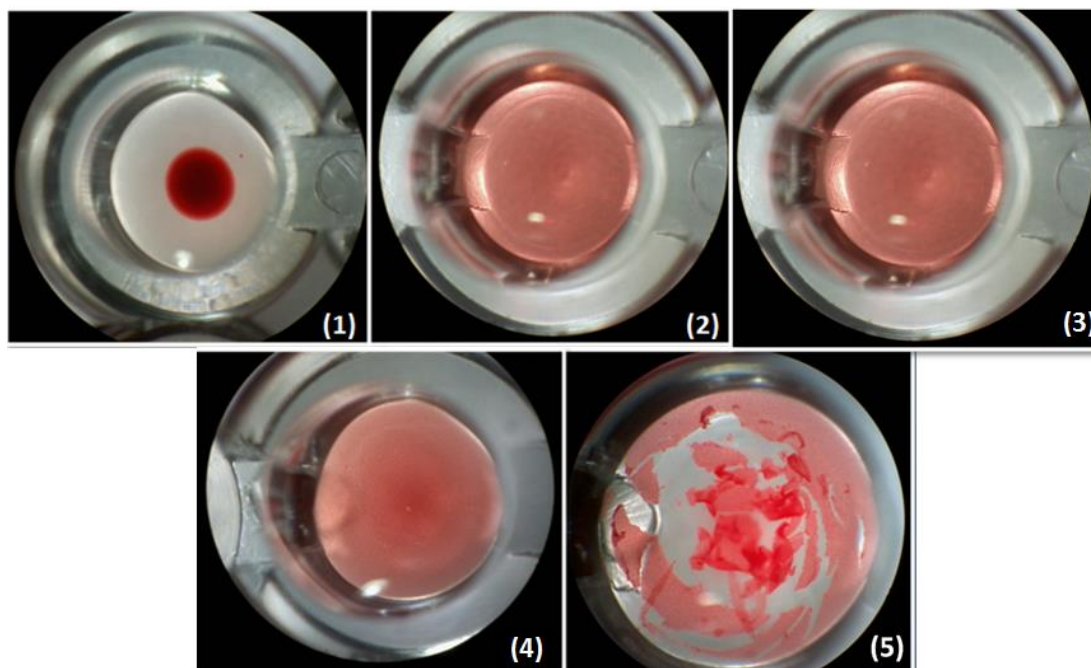


FIGURA 8: Teste da atividade hemaglutinante das frações obtidas a partir da cromatografia de bioafinidade da apitoxina de *Apis mellifera* sobre eritrócitos do tipo A. **(1)** Controle negativo. **(2) e (3)** Apitoxina Bruta e Fração não retida (F1) – poços indicando hemólise. **(4)** Fração retida (F2) – Poço indicando atividade hemaglutinante. **(5)** Rede molecular de eritrócitos aglutinados após agitação. As placas aglutinadas não se desfazem. FOTOGRAFIAS OBTIDAS COM AUXÍLIO DE LUPA ESTEREOSCÓPICA STEMI DV4 (CARL ZEISS).

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

A cromatografia de afinidade vem sendo frequentemente empregada e se caracteriza como um dos melhores métodos para o isolamento e purificação de lectinas, na qual a matriz cromatográfica contém o açúcar ligante (MONTEIRO-MOREIRA, 2002).

Diversas lectinas de peçonhas e venenos animais são isoladas e purificadas pelo método da cromatografia de afinidade e são estudadas do ponto de vista das suas características biológicas e físico-químicas. Comprovadamente temos relatos de lectinas isoladas da peçonha da serpente *Bothrops atrox*, conhecida como

trombolectina (GARTNER, et al, 1980; GARTNER & OGILVIE, 1984); da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (BmLec) (BARBOSA et al., 2010); de *Crotalus atrox* (CaL) (WALKER, et al., 2004); da aranha *Selenocosmia huwena* (SHL-I) (LU, et al., 1999); e da peçonha do peixe *Thalassophryne nattereri* (Natlectina) (SARAIVA, 2007).

A utilização da matriz de galactomananas para o isolamento da fração lectínica da apitoxina em estudo, determina sua especificidade por D-galactose e o reconhecimento de α -galactosídeos, visto que, estes carboidratos vegetais são heteropolissacarídeos oriundos do endosperma de sementes, consistindo em cadeias lineares de resíduos β -D-manopiranosil (1 $\rightarrow$ 4) ligados, substituídos em O-6 por unidades de α -D-galactopiranosil (DEA & MORRISON, 1975).

As lectinas isoladas de peçonhas de serpente apresentam como característica geral a especificidade por açúcares β -galactosídeos, diferente da fração lectínica da apitoxina que apresenta especificidade por α -galactosídeos.

Lectinas purificadas da peçonha das serpentes de *Bothrops newiedi*, *Bothrops jararacussu*, *Lachesis muta rhombeata*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararaca* foram obtidas a partir do procedimento de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL-6B. Estas lectinas apresentam especificidade por β -D-galactose (DE-SIMONE, et al., 2006).

Outras lectinas como a convulxina, isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* (KOLATKAR & WEIS, 1996) e as vegetais: C1-jacalina (MOREIRA & AINOUS, 1978) e C1-frutalina (MOREIRA, et al., 1998) isoladas das sementes de *Artocarpus integrifolia* e *Artocarpus incisa*, respectivamente, são ligantes específicas de α -galactosídeos.

As lectinas que apresentam mesma especificidade combinam-se preferencialmente ou exclusivamente, com um dos anômeros α ou β do monossacarídeo, enquanto outras perderam essa especificidade anomérica. Quando o anel piranosídico dos monossacarídeos é formado, dois isômeros podem ser obtidos devido ao surgimento do centro anomérico C-1, desta forma o grupo hidroxila no carbono anomérico pode assumir as posições α ou β . (LIS & SHARON, 1998; CARPITA & MCCAN, 2000).

A fração lectínica em estudo, por apresentar afinidade por D-galactose, faz com que se assemelhem às lectinas tipo-S, conhecidas como galectinas, uma família de lectinas animais que apresentam afinidade por oligossacarídeos contendo galactose, as quais desempenham diferentes funções nas respostas imune inata e adaptativa, reconhecendo padrões de carboidratos presentes em microrganismos e modulando os processos de resposta inflamatória aguda (RUBISTEIN, et al., 2004), no entanto, estas frações isoladas da apitoxina, não podem ser definidas como Tipo-S, porque até o presente momento só foi observado sua especificidade por α -galactosídeos e, segundo Drickamer (1988) as lectinas deste grupo apresentam CRD conservado e interação com os β -galactosídeos.

A nattectina, isolada da peçonha do peixe *Thalassophryne natteri*, encontrado nas regiões norte e nordeste do Brasil e a BjcUL, lectina da peçonha da serpente *Bothrops jararacussu* (ELÍFIO-ESPOSITO, et al., 2007) também apresentam afinidade por D-galactose.

As hidroxilas presentes nos resíduos glicídicos em D-galactose, situadas nas posições 3 e 4 estão envolvidas nas pontes de hidrogênio que proporcionam a ligação com a lectina (DRICKAMER, 1997). Os resíduos de aminoácidos aromáticos do tipo Trp (Triptofano), ou menos provavelmente Tyr (Tirosina) e/ou Phe (Fenilalanina) são a chave das ligações com o glicídio D-galactose (SUJATHA et al., 2004)

Diversas aplicações biotecnológicas e biomédicas são atribuídas às lectinas ligantes de galactose. As ligantes de N-acetilgalactosamina (GalNAc) tem sido utilizadas no diagnóstico de artrite reumatoide e infecções fúngicas (LILJEBLAD, et al., 2000; CIOCI, et al., 2006).

Segundo Peumans e Van Damme (1995), ao interagirem com glicoconjugados da superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, causando sua hemaglutinação.

Os grupos sanguíneos humanos caracterizam um sistema de sinalização controlado pela estrutura de carboidratos em glicoproteínas. Os grupos A e B diferem em apenas um tipo de monossacarídeo nos glicolipídios ou glicoproteínas das hemácias. No grupo A está presente a N-acetilgalactosamina (uma galactose

liga a grupos químicos amino e acetil), o grupo B tem a D-galactose, o grupo O apresenta L-fucose (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

Desta forma, por apresentarem maior U.H/mL para o tipo sanguíneo A, a fração lectínica de apitoxina, isolada neste trabalho, demonstrou afinidade por *N*-acetilgalactosamina. As lectinas que interagem com galactose, são em geral, também específicas para galactosamina (HATEKEYAMA, et al., 1994), corroborando o fato de que as frações lectínicas de apitoxina interagiram com eritrócitos deste tipo sanguíneo.

No caso da lectina BJcuL e também de outras lectinas isoladas de peçonhas de serpentes, os açúcares aminos, mesmo contendo galactosídeos, não apresentam efeito sobre a atividade hemaglutinante dessas lectinas (OZEKI, et al., 1994).

A galatrox, lectina da peçonha de *Bothrops atrox*, foi capaz de promover aglutinação de eritrócitos humanos, no entanto, os eritrócitos do grupo AB demonstraram maior sensibilidade à aglutinação induzida pela lectina (MENDONÇA-FRANQUEIRO, et al., 2011).

Nos ensaios de hemaglutinação com a lectina BMooL (*Bothrops moojeni*), realizados por Kassab e colaboradores (2001), foi observado que o perfil hemaglutinante desta proteína foi mais sensível a eritrócitos humanos do tipo A, apresentando sensibilidade duas vezes maior que os do tipo B e O.

Após o isolamento da fração lectínica da apitoxina foi possível determinar um rendimento de 3,2%, ou seja, a cada 100 mg de apitoxina bruta têm-se 3,2 mg de lectinas. Com relação à massa total de proteínas da apitoxina, obteve-se um rendimento de 9,3%, ou seja, a cada 10,32 mg de proteínas têm-se um total de 0,96 mg de lectinas (TABELA 3).

TABELA 3: Taxa de rendimento da fração lectínica obtida a partir da apitoxina de *Apis mellifera* por meio do fracionamento por cromatografia de bioafinidade.

Amostra	Massa de proteína (mg)*	Recuperação (mg%)
Apitoxina Bruta	10,32	100
Fração Não-Retida - F1	8,64	83,72
Fração Retida – F2 (Fração lectínica)	0,96	9,3

*Concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (1976);

A porcentagem de lectinas em relação à composição total de peçonhas, revelada pelas técnicas de proteômica e transcriptômica, varia entre 1,5 e 14,5% (JUNQUEIRA DE AZEVEDO & HO, 2002).

O rendimento de lectina por miligrama de veneno bruto varia consideravelmente em diferentes espécies animais. De acordo com De-Simone e colaboradores (2006) a porcentagem de lectinas para as peçonhas de *Bothrops newiedi*, *Bothrops jararacussu*, *Lachesis muta rhombeata*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararaca* foi respectivamente de 2,48%, 1,69%, 1,25%, 0,52% e 0,27%. Braga e colaboradores (2006), determinaram a porcentagem de 7% da lectina BiLec, na peçonha da serpente *Bothrops insularis*.

Apesar de existirem atualmente diversas pesquisas relacionadas à determinação da composição molecular da apitoxina da abelha *Apis mellifera* L., não há até o momento relatos sobre a detecção de lectinas. Após intensa busca bibliográfica consideramos este trabalho como o primeiro relato da presença de lectinas na apitoxina de *Apis mellifera* L..

A composição molecular da apitoxina das abelhas *Apis mellifera* do hemisfério norte é a mais bem determinada, por outro lado, poucos são os estudos de composição das abelhas *Apis mellifera* neotropicais (SANTOS, 2008; DIAS, 2009).

O fenômeno de hibridação resultante do cruzamento de subespécies de *Apis mellifera* que são encontradas no Brasil, a fase de desenvolvimento das abelhas, a época do ano e o tipo de alimentação podem alterar a composição protéica da apitoxina, fazendo com que novos componentes sejam descobertos constantemente

(LOMELE, 2014). Segundo Rezende (2013), é contínua a descoberta de novos componentes da apitoxina graças ao desenvolvimento de instrumentos e novas técnicas analíticas.

4.2 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FRAÇÃO LECTÍNICA

A especificidade por carboidratos da fração lectínica isolada da apitoxina foi determinada a partir do teste de inibição da hemaglutinação por açúcares, sendo assim, a atividade desta fração foi inibida por lactose e D-galactose. Outros carboidratos como sacarose, manose e glicose não foram capazes de inibir a hemaglutinação nas concentrações estudadas (FIGURA 9).

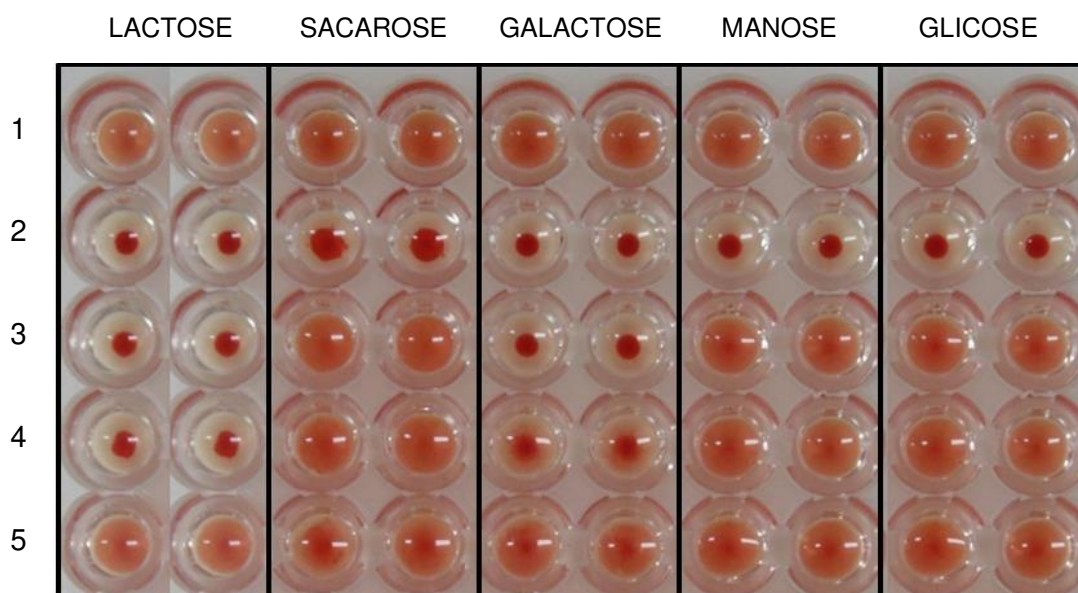


FIGURA 9: Teste de inibição da atividade hemaglutinante da fração lectínica por açúcares. Teste realizado em duplicata. **Fileira 1:** Controle positivo - atividade hemaglutinante. **Fileira 2:** Controle negativo – ausência da atividade hemaglutinante. **Fileiras 3 – 5:** Poços contendo Fração lectínica + Solução de eritrócitos a 2% + Diluições seriais do carboidrato, indicando inibição da atividade hemaglutinante pela lactose e D-galactose.

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

A atividade hemaglutinante da fração F-2 foi mais fortemente inibida pela lactose, apresentando concentração inibitória mínima de 150mM, demonstrando assim, maior especificidade por este carboidrato, seguido por D-galactose (TABELA 4).

TABELA 4: Inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos

Carboidratos	MIC* (mM)
Lactose	150
Sacarose	ND**
D-Galactose	500
D-Manose	ND
D-Glicose	ND

*Concentração mínima inibitória em mM;

**O carboidrato não inibiu a uma concentração de 1M;

Sendo D-galactose um constituinte de vários sacarídeos como a lactose, melibiose e rafinose (SZAIDMAN, 1999), justifica-se assim a especificidade desta fração pela lactose.

Este resultado assemelha-se ao comportamento de varias lectinas de peçonhas como a lectina BJcuL (*Bothrops jararacussu*), a qual apresenta maior especificidade por açúcares na seguinte ordem: Lactose > D-galactose > D-galactosamina (DE CARVALHO, et al., 1998); lectina BpaL (*Bothrops pauloensis*): Lactose > D-galactose > N-acetil-D-galactosamina (CASTANHEIRA, et al., 2013); lectina BpL (*Bothrops pirajai*): Lactose > D-galactose (HAVT, et al., 2005).

Outras lectinas de peçonhas de serpentes apresentam maior afinidade por D-galactose, seguida por galactose, como as lectinas ApL de *Akgistrodon piscivurus piscivurus* (KOMORI, et al., 1999) e a lectina BleucL de *Bothrops leucurus* (NUNES, et al., 2011).

A odorranalectina, lectina isolada do veneno do sapo *Odorrana grahami*, apresenta especificidade exclusiva por L-fucose, visto que este carboidrato foi o único capaz de inibir a atividade hemaglutinante e a atividade aglutinante sobre microrganismos (LI, et al.; 2008). A natectina, isolada da peçonha do peixe

Thalassophryne natterii, apresenta maior especificidade por *N*-acetilgalactosamina (LOPES-FERREIRA, M., 2011). Song-ping e Li (2000) demonstraram que a lectina SHL-I da aranha *Selenoscomia huwena* tem a sua atividade hemaglutinante inibida apenas por D-manosamina.

A fração lectínica de apitoxina não teve sua atividade hemaglutinante inibida por sacarose, D-manose e D-glicose. Segundo Lis & Sharon (1998) lectinas que apresentam especificidade por D-galactose não são capazes de interagir com D-glucose ou D-manose. Por consequência não interagem também com a sacarose, visto que este dissacarídeo é composto por D-frutose e D-glucose.

Compreender a base molecular do padrão de reconhecimento de carboidratos é uma questão relevante nos estudo das lectinas (GABIUS, et al., 2002; GEMEINER, et al., 2009). A maioria das lectinas de peçonhas apresenta capacidade de interagir especificamente com os açúcares através de resíduos de galactosídeos terminais (ABREU, 2006).

A atividade hemaglutinante da fração lectínica foi inibida na presença de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), um quelante de cátions divalentes (TABELA 5) (FIGURA 10).

TABELA 5: Efeito de agentes quelantes de íons divalentes na inibição da atividade hemaglutinante induzida pela fração lectínica da apitoxina de *Apis mellifera*.

Quelante de íons divalentes	MIC* (mM)
EDTA	0,156mM

*Concentração mínima inibitória em mM;

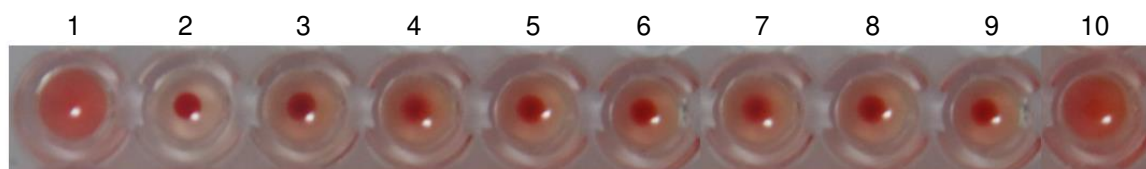


FIGURA 10: Teste da inibição da atividade hemaglutinante por EDTA sobre eritrócitos dos tipos A. **Fileira 1:** Controle positivo – poços indicando atividade hemaglutinante. **Fileira 2:** Controle negativo – poços indicando ausência de atividade hemaglutinante. **Fileiras 3 – 10:** Diluições seriais da solução de EDTA (concentração inicial de 10mM). Poços indicando inibição da atividade hemaglutinante até o poço de número 9.

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Segundo Weis & Drickamer (1996), o reconhecimento de carboidratos em algumas lectinas animais dependem de cátions divalentes como o cálcio (Ca^{2+}).

Dentro da classificação das lectinas animais, as lectinas dependentes de cátions divalentes, são as lectinas do tipo-C, as quais requerem íons Ca^{2+} para sua atividade de ligação a carboidratos (DRICKAMER, 1998).

Em geral, o CRD de lectinas ligantes de galactosídeos e dependentes de íons cálcio são representados por três resíduos de aminoácidos, Gln-Pro-Asp, os quais são considerados como determinantes da especificidade por galactose, onde a interação com esse carboidrato é mediada por íons cálcio (DRICKAMER, 1992).

Diversas lectinas isoladas de venenos e peçonhas animais, como as de serpentes (HIRABAYASHI, et al., 1991; OZEKI, et al., 1994; GUIMARÃES-GOMES, 2004; WALKER, et al., 2004; HAMAKO, et al., 2007; CLEMETSON, 2009; CASTANHEIRA, et al., 2013; MURKHERJEE, et al., 2014), as cinco isolectinas do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* (ANDRICH, et al., 2015), a natterctina do peixe venenoso *Thalassophryne nattereri* (LOPES-FERREIRA, et al., 2011), são lectinas dependentes de Ca^{2+} e tiveram sua atividade hemaglutinante inibida por EDTA.

A odorranalectina do veneno do sapo *Odorrana grahami* (LI, et al., 2008), a lectina da peçonha do escorpião *Buthus occinatus* sp. (HOANG, et al., 2001), além de algumas lectinas de peçonhas de serpentes (OLGILVIE, et al., 1986) não apresentam dependência de íons cálcio.

A análise eletroforética da fração lectínica isolada neste trabalho, sob condição desnaturante (SDS-PAGE) revelou três bandas que correram muito próximas no gel, com pesos moleculares de aproximadamente 14, 17 e 19 kDa respectivamente (FIGURA 11). Estas bandas mantiveram a mesma configuração em condições redutoras (presença de β -mercaptoetanol).

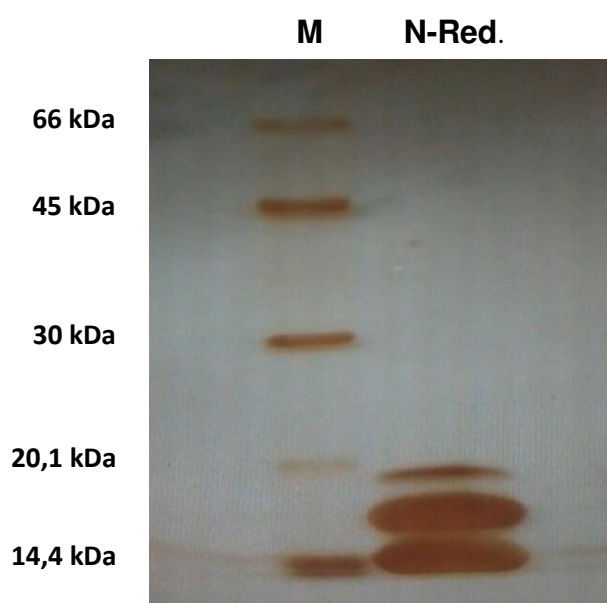


FIGURA 11: SDS-PAGE 12% em condições não redutoras da fração lectínica isoladas da apitoxina da abelha *Apis mellifera* L. **M.:** Marcador de massa molecular – Albumina Sérica Bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30 kDa), Inibidor de Tripsina (20,1 kDa) e α -Lactoalbumina de soja (14,4 kDa); **N-Red.:** Fração Lectínica sob condições não redutoras.

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

Quando esta mesma fração foi analisada em eletroforese nativa (ausência de SDS) foi observado a presença de apenas uma banda no topo do gel, sugerindo que as bandas obtidas em SDS-PAGE sejam subunidades de uma mesma proteína. (FIGURA 12).

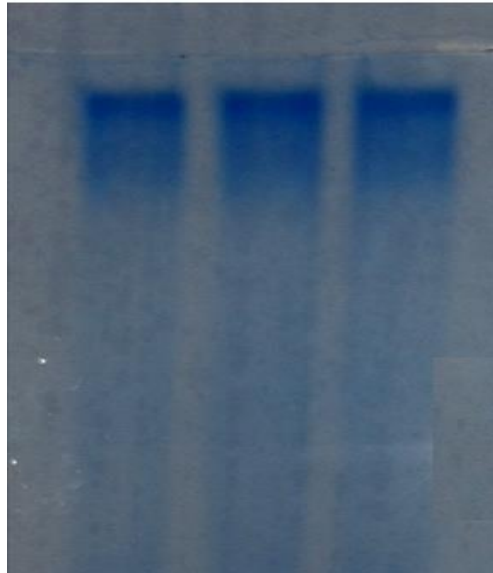


FIGURA 12: ELETROFORESE NATIVA (AUSÊNCIA DE SDS) da fração lectínica isoladas da apitoxina da abelha *Apis mellifera* L. O teste foi realizado em triplicata.

Fonte: PRÓPRIO AUTOR.

A fração lectínica demonstrou ser termoestável, mantendo sua atividade hemaglutinante mesmo após incubação a 70°C por 30 minutos. A partir de 80°C as lectinas foram totalmente desnaturadas e não ocorreu atividade hemaglutinante (FIGURA 13).

Este resultado está de acordo com outros relatos de termoestabilidade de lectinas, visto que, estas lectinas têm a tendência de perder sua atividade hemaglutinante à medida que são submetidas a temperaturas mais elevadas.

Castanheira e colaboradores (2013) observaram que a lectina BpLec da serpente *Bothrops pauloensis* perdeu completamente sua atividade quando submetida a temperaturas acima de 50°C. Mendonça-Franqueiro e colaboradores (2011) demonstraram que a desnaturação térmica da galatrox, a 100°C por 10 minutos, promoveu drástica inibição da atividade hemaglutinante.

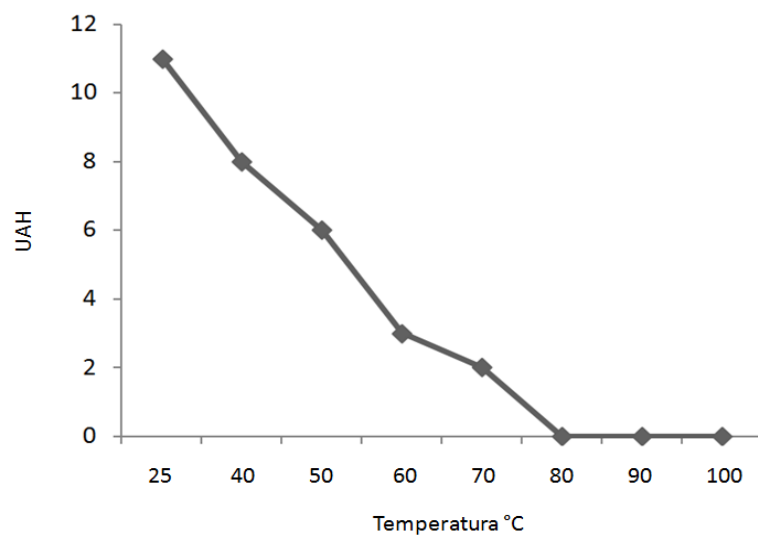


FIGURA 13: Teste da estabilidade da atividade lectínica por aquecimento (amostra: 77,24µg/mL, aquecidas por 30 min.). Os resultados foram expressos como Unidades Arbitrárias de Hemaglutinação (UAH) baseado na análise visual do nível de formação de aglutinação.

5 – CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que uma fração lectínica foi identificada e isolada da apitoxina da abelha africanizada *Apis mellifera* L. Esta fração apresenta especificidade por D-galactose e é ligante de α -galactosídeos. Apresenta um rendimento de 3,2% a partir do peso seco da apitoxina. A fração é constituída por 3 bandas eletroforéticas de aproximadamente 14, 17 e 19 kDa, quando submetida a uma eletroforese nativa foi revelada uma única banda.

A fração lectínica promoveu aglutinação de eritrócitos humanos, apresentando maior sensibilidade ao eritrócito tipo A. A atividade hemaglutinante foi inibida por lactose, D-galactose e EDTA. Esta fração apresenta proteínas termoestáveis, visto que mesmo após incubação a 70°C foi possível observar atividade aglutinante.

Estes resultados contribuem com os estudos das lectinas, apresentando a apitoxina das abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. como uma nova fonte de lectinas animais.

REFERÊNCIAS

- 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**. v. 48, n. 6, p. 690–701, 2006.
- ALTMANN, F.; KUBELKA, V.; STAUDACHER, E.; TRETTER, V.; MARZ, L.; HARD, K. Characterization of the Isoforms of Phospholipase-A(2) from Honeybee. **Insect Biochemistry**. v. 21, n.5, p.467-72, 1991.
- ANDRICH, F.; RICHARDSON, M.; NAUMANN, G. B.; CODEIRO, M. N.; SANTOS, A. V.; SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, J. S.; DE LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G. Identification of C-type isolectins in the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumier*. **Toxicon**, v. 95, p. 67-71, 2015.
- ANNAND, R. R.; KONTOYIANNI, M.; PENZOTTI, J. E.; DUDLER, T.; LYBRAND, T. P.; GELB, M.H. Active site of bee venom phospholipase A2: the role of histidine-34, aspartate-64 and tyrosine-87. **Biochemistry**. v. 35, n.14, p. 329-416, 1996.
- APPUKUTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian Journal Biochemistry Biophysics**. v. 14, p. 382-384, 1977.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**. v. 6, n. 4, p. 512-519, 2012.
- BANKS, B. E. C.; SHIPOLINI, R. A. Chemistry and pharmacology of honey bee venom. In: PIEK, T. (Edi.). **Venoms of the hymenoptera: biochemical, pharmacological and behavioral aspects**. London: Academy Press. p. 329-416, 1986.
- BARACCHI, D.; TURILLAZZI, S. Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*) determined by MALDI-TOF MS. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 56, p. 366–375, 2010.
- BARBIERI, L.; BATELLI, G. B.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1154, p. 237-282, 1993.
- BARBONI, E.; KEMENY, D. M.; CAMPOS, S.; VERNON, C. A. The purification of acid phosphatase from honeybee venom (*Apis mellifera*). **Toxicon**, v. 25, p. 1097-1104, 1987.
- 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*. **J Venom Anim Toxins**. v. 16, p. 493-504, 2010.

BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. **Rev. bras. hematol. hemoter.** v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003.

BECK, B. F. The bible of bee venom therapy: bee venom, its nature, and its effect on arthritic and rheumatoid conditions. **New York: Health Resources Press**, p. 260, 1997.

BOGAART, G. V. D.; GUZMA, N. J. V.; MIKA, J. T.; POOLMAN, B. On the Mechanism of Pore Formation by Melittin. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 283, n. 49, p. 33854-33857, 2008.

BOUTRIN, M. C. F.; FOSTER, H. A.; PENTREATH, V. W. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2 on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. **Experimental Parasitology.** v. 119, p. 246-251, 2008.

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Chemistry.** v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, M. D. M.; MARTINS, A. M. C.; AMORA, D. N.; MENEZES, D. B.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; MARANGONI, S.; BARBOSA, P. S. F.; ALVES, R. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon.** v. 47, p. 859-867, 2006.

BRAGA, R. S. **Goma endospérmica de Caesalpinia pulcherrima utilização como matriz de afinidade no isolamento de lectinas galactose ligante.** 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Ceará.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie,** v. 82, n. 9-10, p. 851-859, 2000.

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.

BROADMAN, J. Bee venom: the natural curative for arthritis and rheumatism. **New York: Health Resources Press.** p. 220, 1997.

BROCHETTO-BRAGA, M. R.; PALMA, M. S.; CARMONA, E. C.; CHAUD-NETTO, J.; RODRIGUES, A.; DA SILVA, G.P. Influence of the collection methodology on the *Apis mellifera* venom composition: Peptide analysis. **Sociobiology,** Chico, v. 47, n. 3, p.759-70, 2006.

CAIRRÃO, M. A. R. **Efeitos biológicos da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* em ratos: isolamento e caracterização química parcial de uma neurotoxina pró-convulsivante.** 2002. 125 p. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters,** v. 583, p. 1736-1743, 2009.

CAMARGO, J. M. F.; STORT, A. C. **A abelha *Apis mellifera* Linnaeus**. 2. ed. rev. São Paulo: EDART, p. 79, 1973.

CARPITA, N.C.; MCCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, cap. 2, p. 52-108, 2000.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, J. R. V. **Animais Peçonhentos No Brasil Biologia Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 2. ed. São Paulo: Editora Sarvier, p. 541, 2009.

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, n. 5, p. 933-938, 1998.

CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**. v. 39, p. 1471-1476, 2001.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P. S.; GOULART, L.R.; RODRIGUES, R.S. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Int J Biol Macromol**. v. 54, p. 57–64, 2013.

CASTRO, P. G. **Xiloglucanas e galactomananas de leguminosas: interação com lectinas D-galactose ligantes**. 2007. 100 p. Dissertação (Mestre em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CASTRO, H. J.; MENDEZ-LNOCENCIO, J. I.; OMIDVAR, B.; OMIDVAR, J.; SANTILLI, J.; NIELSEN, H. S. J. R.; PAVOT, A. P.; RICHERT, J. R.; BELLANTI, J. A. A phase I study of the safety of honeybee venom extract as a possible treatment for patients with progressive forms of multiple sclerosis. **Allergy Asthma Proceedings**, v.26, n.6, p.470-476, 2005.

CHEN, J.; LARIVIERE, W. R. The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. **Progress in Neurobiology**, v.92, n.2, p.151-183, 2010.

CHUNG, E. S.; KIM, H.; LEE, G.; PARK, S.; KIM, H.; BAE H. Neuro-protective effects of bee venom by suppression of neuroinflammatory responses in a mouse model of Parkinson's disease: Role of regulatory T cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.26, n.8, p.1322-1330, 2012.

CIOCI, G.; MITCHELL, E. P.; CHAZALET, V.; DEBRAY, H.; OSCARSON, S.; LAHMANN, M.; GAUTIER, C.; BRETON, C.; PEREZ, S.; IMBERTY, A. Structural basis for the recognition of complex-type biantennary oligosaccharides by *Pterocarpus angolensis* lectin. **Journal of Molecular Biology**. v. 357, p. 1575–1591, 2006.

CLEMETSON, K. J.; MORITA, T.; MANJUNATHA, K. R. Registry of exogenous hemostatic factors of SSC of the ISTH. Scientific and standardization committee

communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. **J Thromb Haemost.** v. 7, n. 2, p. 360, 2009.

COHEN, E.; QUISTAD, G. B. Cytotoxic effects of arthropod venoms on various cultured cells. **Toxicon**, v. 36, p. 353-358, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas (São Paulo): UNICAMP, 1997. p. 119-140. ISBN 85-268-0164-3.

CRUZ-LANDIM, C.; ABDALLA, F. C. **Glândulas exócrinas das abelhas**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 181p.

CUNHA, da D. C. S. **Purificação, caracterização e efeitos imunomodulatório e antiproliferativo de uma lectina do fungo *Clavaria cristata* (Holmsk) Pers.** 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

DANTAS, C. G.; NUNES, T. L. G. M.; NUNES, T. L. G. M.; GOMES, M. Z.; GRAMACHO, K. P. Apitoxina: coleta, composição química, propriedades biológicas e atividades terapêuticas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, Aquidabã, v.4, n.2, p.127-150, 2013.

DAHMS, N. M.; HANCOCK, M. K. P-type lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 317-340, 2002.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannan. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 31, p. 241-312, 1975.

DE CARVALHO DD, MARANGONI S, OLIVEIRA B, NOVELLO JC. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **IUBMB Life**. v. 44, n. 5, p. 933-938, 1998.

DE CARVALHO, D.; SHIMTMEIER, S.; NOVELO, 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.

DE GRAAF, D.C; AERTS, M.; DANNEELS, E.; DEVREESE, B. Bee, wasp and ant venomics pave the way for a component-resolved diagnosis of sting allergy. **Journal of Proteomics**, Amsterdam v. 72, n. 2, p. 145–154, 2009.

DE LIMA, P. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v.9, n.2, p.149–162, 2003.

DE-SIMONE, S. G.; NETTO, C. C.; SILVA JR, F. P. Simple affinity chromatographic procedure to purify β -galactoside binding lectins. **Journal of Chromatography**, v. 838, p. 135-138, 2006.

DIAS, N. B. **Análise proteômica do veneno da vespa social *Polistes lanio lanio* (hymenoptera; vespidae)**. 2009. 67 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel e

Licenciado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, p. 2851- 2871, 2009.

DOO, A. R; KIM, S. T.; KIM, S. N; MOON, W.; YIN, C. S.; CHAE, Y.; PARK, H. K; LEE, H.; PARK, H. J. Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridineinduced mouse model of Parkinson's disease. **Neurological Research**, v. 32, p. 88-91, 2010.

DOTIMAS, E. M.; HIDER, R. C. Honeybee venom. **Bee world**. v. 2, p. 51-71, 1987.

Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. **Nature**. v. 360, n. 6400, p. 183-186, 1992.

DRICKAMER, K. Making a fitting choice: common aspects of sugar-binding sites in plant and animal lectins. **Structure**, v. 5, n. 4, p. 65-68, 1997.

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.

DRICKAMER, T. M. E.; WEIS, W. I. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol Rev**. v. 163, p.19-34, 1998.

DU, X.; CLEMENTSON, K. J. Reptile C-type lectins. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. New York, p. 528. 2010.

EHRLICH, R. Experimentelle Untersuchungen über immunität. II. Ueber Abrin. **Dtsch. Med. Wschr**. n. 44, p. 1218-1219, 1891.

ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; HESS, P. L.; MORENO, A. N.; LOPES-FERREIRA, M.; RICART, C. A. O.; SOUZA, M. V.; HASSELM-ANZIELINSKI, F.; BECKER, J. A.; PEREIRA, L. F. A c-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leucocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**. v. 13, n. 14, p. 782-799, 2007.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **TIBS**, v. 22, n. 12, p. 462-467, 1997.

ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; HESS, P. L.; MORENO, A. N.; LOPES-FERREIRA, M.; RICART, C. A. O.; SOUZA, M. V.; HASSELMAN-ZIELINSKI, F.; BECKER, J. A.; PEREIRA, L. F. A C-TYPE LECTIN FROM *Bothrops jararacussu* VENOM CAN ADHERE TO EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AND INDUCE THE ROLLING OF LEUKOCYTES. **J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis**. v. 13, n. 4, p. 782-799, 2007.

ETZLER, M. E. Plant lectins molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant. Physiol.** v. 36, p. 209-234, 1985.

FENG, K.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; LIU, H. Z.; LI, J. Q.; CHEN, G.; SHENG, H. Y.; XIE, Z. L.; WANG, H. X. Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 345, p. 1573-1578, 2006.

FERREIRA JÚNIOR, R. S.; SCIANI, J. M.; MARQUES-PORTO, R.; JÚNIOR, A. L.; ORSI, R. O.; BARRAVIERA, B.; PIMENTA, D. C. Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. **Toxicon**, v. 56, p. 355-362, 2010.

FREEMAN, C. M.; CATLOW, C. R.; HEMMINGS, A. M.; HIDER, R. C. The conformation of apamin. **FEBS Letters**, v.197, n.1-2, p.289-296, 1986.

FRY, B. G. The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.** v. 10, p. 483–511, 2009.

GABIUS, H. J.; ANDRÉ, S.; KALTNE, H.; SIEBERT, H. C. The sugar code: Functional lectinomics, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 165-177, 2002.
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 os galectins including medical implications**. **Chang Gung Medical Journal**. v. 29, p. 37-62, 2006.

GARROS-ROSA, I.; REICHER, F.; PETKOWICZ, C. L. O.; SIERAKOWSKI, M. R.; MOREIRA, R. A. Characterization of the Galactomannans from Parkinsonia Aculeata Seeds and their Application on Affinity Chromatography. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 16, n. 2, p. 99-103, 2006.

GARTNER, T. K.; OGLIVIE, M. L. Isolation and characterization of three Ca²⁺-dependent β -galactoside-specific lectins from snake venoms. **Biochem J**. v. 224, p. 301-307, 1984.

GARTNER, T. K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, K. C. Trombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom, **FEBS Lett**. v. 117, p. 13-16, 1980.

GEMEINER, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TKÁC, J.; SVITEL, J.; PĚTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ E. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnol Adv**. v. 27, n. 1, p. 1-15, 2009.

GIORGINI, J. F.; GUSMAN, A. B. **A importância das abelhas na polinização**. In: Camargo, J. M. F. Manual de Apicultor. Ed. Agronômica Ceres, Brasil. p. 155-163. 1972.

GRISOTTO, L. S.; MENDES, G. R.; CASTRO, L.; BAPTISTA, M. A.; ALVES, V. A.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Mechanisms of bee venom - induced acute renal failure. **Toxicon**, v.48, n.1, p.44-54, 2006.

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.

HAGE, D. S. Affinity chromatography: a review of clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 593-615, 1999.

HAMAKO, J.; SUZUKI, Y.; HAYASHI, N.; KIMURA, M.; OZEKI, Y.; HASHIMOTO, K. Amino acid sequence and characterization of C-type lectin purified from the snake venom of *Crotalus ruber*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. v. 146, n. 3, p. 299-306, 2007.

HAN, S.; LEE, K.; YEO, J.; KWEON, H.; WOO, S.; LEE, M.; BAEK, H.; KIM, S.; PARK, K.. Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production stimulated by LPS. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.1, p.176-181, 2007.

HAN, S; LEE, K; YEO J.; KIM, W; PARK, K.. Biological effects of treatment of an animal skin wound with honeybee (*Apis Melifera L.*) venom. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v.64, n.3, p.67-72, 2011.

HARRISON, L. Soluble β -galactoside binding lectins in vertebrates, **In: KILPATRICK, D. C.; VAN DRIESCH, E., Lectin Reviews**, v. 1, Sigma, St Louis, MO, p. 17-39, 1991.

HATAKEYAMA, T.; KOHZAKI, H.; NAGATOMO, H.; YAMAZAKI, N. Purification and characterization of four Ca^{2+} -dependent lectins from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*. **J. Biochem.** v. 116, p. 209-214, 1994.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M.; FONTENELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. 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 and Cell Biol**. v. 37, n. 1, p. 130-141, 2005.

HEINEN, T. E.; VEIGA, da A. B. G. Arthropod venoms and câncer. **Toxicon**, v. 57, n. 4, p. 497-511, 2011.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca^{2+} -dependent-type lectins. **J Biol Chem**. v. 266, n. 4, p. 2320-2326, 1991.

HU, H.; CHEN, D.; LI, Y.; ZHANG, X. Effect of polypeptides in bee venom on growth inhibition and apoptosis induction of the human hepatoma cell line SMMC-7721 in-vitro and Balb/c nude mice in-vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.58, n.1, p.83-89, 2006.

HOANG, N. A.; BEREZIN, B. B.; LAKHTIN, V. M.; YAMSKOV, I. A. Isolation and Partial Characterization of Lectin from the Venom of Vietnamese Scorpion *Buthus occitanus* sp. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 37, n. 5, p. 534–537, 2001.

HUANG, T. F.; CHIANG, H. S. Effect on human platelet aggregation of phospholipase A2 purified from *Heloderma horridum* venom. **Biochem, Biophys. Acta**. v. 1211; p. 61-68, 1994.

IMBERTY, A.; WIMMEROVÁ, M.; MITCHELL, E. P.; GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: Insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infections**. v. 6, p. 221-228, 2004.

IZIDORO, L. F. M. **Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-aminoácido oxidase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai***. 2007. 74 f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, 2007.

JANG, M. H.; SHIN, M. C.; LIM, S.; HAN, S. M.; PARK, H. J.; SHIN, I.. Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. **Journal of Pharmacology Science**, v.91, n.2, p.95-104, 2003.

JATHA, M. S.; BALAJI, P. V. Identification of common structural features of binding sites in galactose-specific proteins. **Proteins**, v. 55, p. 44-65, 2004.

JO, M.; PARK, M. H.; KOLLIPARA, P. S.; AN, B. J.; SONG, H. S.; HAN, S. B.; KIM, J. H.; SONG, M. J.; HONG, J. T. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT3 pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.258, n.1, p.72-81, 2012.

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, n. 1-2, p. 279-291, 2002.

KASAI, K.; HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. **J Biochem**. v. 119, n. 1, p. 1-8, 1996.

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.; CARVALHO, D. D.; MARAGONI, S.; NOVELLO, J. C. Characterization Of A Hemagglutinating Glycoprotein Isolated From *Bothrops moojeni* Snake Venom. **Protein and Peptide Letters**, v. 8, n. 1, p.13-20, 2001.

KEITH, D. J.; ESHLEMAN, A. J.; JANOWSKY, A. Melittin stimulates fatty acid release through nonphospholipase-mediated mechanisms and interacts with the

dopamine transporter and other membranespanning proteins. **European Journal of Pharmacology**, v.650, n.2-3, p.501-510, 2011.

KEMENY, D. M.; DALTON, N.; LAWRENCE, J.; PEARCE, F. L.; VERNON, C. A. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honeybee, *Apis mellifera*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.139, n.2, p.217-23, 1984.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Poly.** v. 26, p. 219–30, 1995.

KILPATRICK, D.C.; GREEN, C. Lectins as blood typing reagents, in: FRANZ, H. **Advances in Lectin Research**, v. 5, Ullstein Mosby, Berlin, p. 51–94, 1992.

KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications, **Biochim. Biophys. Acta** v. 1572, p. 401– 413, 2002a.

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

KIM, S. J.; PARK, J. H.; KIM, K. H.; LEE, W. R.; KIM, K. S.; PARK, K. K.. Melittin inhibits atherosclerosis in LPS/high-fat treated mice through atheroprotective actions. **Journal of Atherosclerosis Thrombosis**, v.18, n.12, p.1117-26, 2011.

KIM, S. J.; PARK, J. H.; KIM, K. H.; LEE, W. R.; PAK, S. C.; HAN, S. M.; PARK, K. K.. The Protective Effect of Apamin on LPS/Fat-Induced Atherosclerotic Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

KIM, J. I.; YANG, E. J.; LEE, M. S.; KIM, Y. S.; HUH, Y.; CHO, I. H.; KANG, S.; KOH, H. K. Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. **The International Journal of Neuroscience**, v.121, n.4, p. 209-217, 2011a.

KING, T. P.; SPANGFORT, M. D. Structure and biology of stinging insect venom allergens. **Internacional Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v.123, n.2, p.99-106, 2000.

KOH, D. C.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

KOLATKAR, A. R.; WEIS, W. I. Structural Basis of Galactose Recognition by C-type Animal Lectins. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. v. 271, n. 12, p. 6679-6685, 1996.

KOLECKI, P. Delayed toxic reaction following massive bee envenomation. **Ann Emerg Med**. v. 33: p. 114-116, 1999.

KOMORI Y, NIKAI T, TOHKAI T, SUGIHARA H. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus* (Eastern cottonmouth). **Toxicon**. v. 37, n. 7, p. 1053–1064, 1999.

LAEMMELI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. Hills Road, Cambridge, v. 227, p. 680-685, 1970.

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

LEE, W.R.; KIM, S.J.; PARK, J.H.; KIM, K. H.; CHANG, Y. C.; PARK, Y. Y.; LEE, K. G.; HAN, S. M.; YEO, J. H.; PAK, S. C.; PARK, K. K.. Bee venom reduces atherosclerotic lesion formation via anti-inflammatory mechanism. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.38, n.6, p.1077-1092, 2010.

LEE, S. M.; YANG, E. J.; CHOI, S. M.; KIM, S. H.; BAEK, M. G.; JIANG, J. H.. Effects of Bee Venom on Glutamate-Induced Toxicity in Neuronal and Glial Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-9, 2012.

LEITE, G. L. D.; ROCHA, S. L. Apitoxina. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 7, n.1, jan/jun. 2005.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 2, p. 790-802, 2003.

LI, B.; GU, W.; ZHANG, C.; HUANG, X. Q.; HAN, K. Q.; LING, C. Q.. Growth arrest and apoptosis of the human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402 induced by melittin. **Onkologie**, v.29, n.8–9, p.367-371, 2006.

LI, J.; WU, H.; HONG, J.; XU, X.; YANG, H.; WU, B.; WANG, Y.; ZHU, J.; LAI, R.; JIANG, X.; LIN, D.; PRESCOTT, M. C.; REES, H. H. Odorranalectin Is a Small Peptide Lectin with Potential for Drug Delivery and Targeting. **PLoS ONE**. v. 3, n. 6, 2008.

LILJEBLAD, M.; LUNDBLAD, A.; PAHLSSON, P. Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance. **Glycoconjugate Journal**. v. 17, p. 323–329, 2000.

LI, Y. R.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1780, p. 51-57, 2008.

LIMA, S. A. M. de. **A apicultura como alternativa social, econômica e ambiental para a XI mesorregião do noroeste do Paraná**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

LIU, X.; CHEN, D.; XIE, L.; ZHANG, R.. Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.54, n.8, p.1083-1089, 2002.

LIU, Q.; WANG, H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a novel lectin from the wild mushroom *Xerocomus spadiceus*. **Peptides**. v. 25, p. 7-10, 2004.

LIU, S.; YU, M.; HE, Y.; XIAO, L.; WANG, F.; SONG, C.; SUN, S.; LING, C.; XU, Z.. Melittin prevents liver cancer cell metastasis through inhibition of the Rac1-dependent pathway. **Hepatology**, v.47, n.6, p.1964-1973, 2008.

LOMELE, R. L. **Efeito do recurso floral na composição qualitativa de apitoxina**. 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, São Paulo.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp Biochem Physiol. B**. v. 102, p. 325-329, 1992.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1572, p. 198-208, 2002.

LOPES-FERREIRA, M.; MAGALHÃES, G. S.; FERNANDEZ, J. H.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; LIMA, C.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Structural and biological characterization of Nattectin, a new C-type lectin from the venomous fish *Thalassophryne nattereri*. **Biochimie**. v. 93, p. 971-980, 2011.

LU, S.; LIANG, S.; GU, X. Three-Dimensional Structure of *Selenocosmia huwena* Lectin-I (SHL-I) from the Venom of the Spider *Selenocosmia huwena* by 2D-NMR. **Journal of Protein Chemistry**. v. 18, n. 5, p. 609-617, 1999.

MAGDELDIN, S. Gel Electrophoresis – Principles and Basics. **Intech**. Croatia, April, 2012.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R. R.; MARCINKIEWICZ, M. M.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C.; WEINREB, P. H.; BEACHAM, D. A.; MARKLAND, F. S. Snake venoms. **Drugs**, v. 54, n. 3, p. 1-10, 1997.

MARKLAND, F. S. Snake venoms. **Drugs**, v. 54, n. 3, p. 1-10, 1997.

MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; SANTOS, L. D.; PALMA, M. S. Structural characterization of novel chemotactic and mastoparan peptides from the venom of the social wasp *Agelaia pallipes* by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 181, n. 7, p. 1-7, 2004.

MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; ALVES-PAIVA, R. M.; SARTIM, M. A.; CALLEJON, R.; PAIVA, H. H.; ANTONUCCI, G. A.; ROSA, J. C.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; ARANTES, E. C.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S. V. Isolation, functional, and partial biochemical characterization of galatrox, an acidic lectin from

Bothrops atrox snake venom. **Acta Biochim Biophys Sin.** v. 43, n. 3, p.181-192, 2011.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. **Caracterização estrutural de três lectinas apresentando especificidades por açúcares distintos, isoladas de sementes de fruta pão (*Artocarpus incisa* L.)**. 2002. 103 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Ceará.

MOON, D. O.; PARK, S. Y.; HEO, M. S.; KIM, K. C.; PARK, C.; KO, W. S.. Key regulators in bee venom-induced apoptosis are Bcl-2 and caspase-3 in human leukemic U937 cells through down regulation of ERK and Akt. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 12, p. 1796-1807, 2006.

MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L. Purification of a lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia* L) seeds. **Plant Physiology**, 1978.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; HORTA, A. C. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* Var. Megacarpa seed lectin. **Phytochemistry**. v. 46, n. 1, p. 139-144, 1997.

MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**. v. 47, n. 7, p. 1183-1188, 1998.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

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. C.vL, 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**. v. 145, p.517-523. 2006.

MOURELLE, D. **Estudos sobre atividade nociceptiva/antinociceptiva de peptídeos isolados do veneno bruto de abelha *Apis mellifera***. 2011. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2011.

MOURRE, C.; FOURNIER, C.; SOUMIREU-MOURAT, B.. Apamin, a blocker of the calcium-activated potassium channel, induces neurodegeneration of Purkinje cells exclusively. **Brain Research**, v.778, n.2, p.405-408, 1997.

MÜLLER, U.R. Recombinant hymenoptera venom allergens. **Allergy**, Copenhagen, v.57, n.7, p. 570-576, 2002.

MUKHERJEE, A. K.; DUTTA, S.; MACKESSY, S. P. A new C-type lectin (RVsnaclec) purified from venom of *Daboia russelii russelii* shows anticoagulant activity via inhibition of FXa and concentration-dependent differential response to platelets in a Ca²⁺-independent manner. **Thrombosis Research**, v. 134, p. 1150-1156, 2014.

NAMAKA, M.; CROOK, A.; DOUPE, A.; KLER, K.; VASCONCELOS, M.; KLOWAK, M.; GONG, Y.; WOJEWNICK-SMITH, A.; MELANSON, M. Examining the evidence: Complementary adjunctive therapies for multiple sclerosis. **Neurological Research**, v. 30, n. 7, p. 710-719, 2008.

NISHIMURA, A.; SAWADA, S.; USHIYAMA, I.; YAMAMOTO, Y.; NAKAGAWA, T.; TANEGASHIMA, A.; NISHI, K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. **Forensic. Sci. Int.** v. 113, n. 1-3, p. 265-269, 2000.

NIKAI, T.; SUZUKI, J.; KOMORI, Y.; OHKURA, M.; OHIZUMI, Y.; SUGIHARA, H. Amino acid sequence and biological properties of the lectin from the venom of *Trimeresurus okinavensis* (Himehabu). **Toxicon**. v. 38, p. 707-711, 2000.

NNTRC - National Natural Toxins Research Center. **Snake Venoms**. Disponível em: < <http://www.ntrc.tamuk.edu/> >. Acesso em: 17 mai. 2016.

NOCELLI, R. C. F. **Contribuição à análise do processo de africanização de *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae): características do desenvolvimento das glândulas de dufour e de veneno**. 2003. 104 f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, Rio Claro.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: Funep, 2002. 191p.

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.

OLGILVIE, M. L.; DOCKTER, M. E.; WENZ, L.; GARTNER, T. K. Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. v. 100, p. 1425-1431, 1986.

OLIVEIRA, F. A.; GUIMARÃES, J. V.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Acidente humano por picadas de abelhas africanizadas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.33, n.4, p.403-405, 2000.

OLIVEIRA, de N. B.; PIRES-JÚNIOR, O. R. Venenos e peçonhas animais: aplicações tecnológicas e biopirataria. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA PÓS-GRADUAÇÃO *Lato Sensu* DA PUC GOIÁS, 6., 2011, Goiás. **Anais...** Goiás: PUC, 2011. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/Artigos3.html>> Acesso em: 20 out. 2011.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. Ricin. **Toxicon**. v. 39, p. 1723-1728, 2001.

ORŠOLIĆ, N.; SVER, L.; VERSTOVSEK, S.; TERZIC, S.; BASIC, I. Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. **Toxicon**, v.41, n.7, p.861-870, 2003.

ORŠOLIĆ, N. Bee venom in cancer therapy. **Cancer Metastasis Reviews**, v.31, n.1-2, p.173-194, 2011.

OWEN, M. D.; SLOLEY, B. D. 5-Hydroxytryptamine en the venom of the honey bee (*Apis mellifera* L): Variation with season and with insect age. **Toxicon**, Oxford, v.26, n.6, p.577-582, 1988.

OWNBY, C. L.; POWELL, J. R.; JIANG, M. S.; FLETCHER, J. E. Mellitin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle *in vivo*. **Toxicon**. v. 35, p. 67-80, 1997.

OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M.; FUJIMURA, Y.; YOSHIDA, E.; NISHIDA, S.; TITANI, K. C-type galctoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch biochem and biophys**. v. 308, n. 1, p. 306-310, 1994.

PALMA, M. S, BROCHETTO-BRAGA, M .R. Biochemical variability between venoms from different honey-bee (*Apis mellifera*) races. **Comp Bioche Physiol**. v. 106, n. 13, p. 423-427, 1993.

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.

PARDO, A. M.; CORTES, M. C.; ARMSTRONG, D. P.; ORELLANA, E. A. M.; SOTO, G. M.; PRIETO, J. P. **Manejo y control de la abeja africanizada**. El Salvador, p. 229, 1988.

PARK, J. H.; KIM, K. H.; KIM, S. J.; LEE, W. R.; LEE, K. G.; PARK, K. K.. Bee venom protects hepatocytes from tumor necrosis factor- α and actinomycin D. **Archives Pharmacal Research**, v.33, n.2, p.215-223, 2010.

PARK, H. J.; LEE, S. H.; SON, D. J.; OH, K. W.; KIM, K. H.; SONG, H. S.; KIM, G. J.; OH, G. T.; YOON, D. Y.; HONG, J. T.. Antiarthritic Effect of Bee Venom - Inhibition of Inflammation Mediator Generation by Suppression of NF-KB Through Interaction With the p50 Subunit. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3504-3515, 2004.

PEIREN, N.; VANROBAEYS, F.; DE GRAAF, D. C.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J. JACOBS, F. J. The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach. **Biochim Biophys Acta**. v. 1752, ed.1, p. 1-5, 2005.

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.

PERILLO, N. L.; MARCUS, M. E.; BAUM, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation and cell death. **J Mol Med – JMM**. v. 76, n. 6, p. 402-12, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in the defense of plants. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 8, p. 82-91, 1993.

POWELL, L. D.; VARKI, A. I-type lectins. **J Biol Chem**. v. 270, n. 24, p. 142-146, 1995.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. **R. Bras. Fisiol. Veg.** v. 8. n. 3. p. 193-199, 1996.

RESENDE, V. M. F. **Análise proteômica de venenos de *Apis mellifera* baseada em espectrometria de massas: abordagem qualitativa *label-free* e identificação de fosforilação**. 2013. 198 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

RINI, J. M. Lectin structure. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 551-577, 1995.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am.J.Physiol**, v. 156, n. 2, p. 261-273, 1949.

RUBISTEIN, N.; ILARREGUI, J. M.; TOSCANO, M. A.; RABINOVICH, G. A.; The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. **Tissue Antigens**. v. 64, n. 1, p. 1-12, 2004.

RUSSELL, P. J.; HEWISH, D.; CARTER, T.; STERLING-LEVIS, K.; OW, K.; HATTARKI, M.; DOUGHTY, L.; GUTHRIE, R.; SHAPIRA, D.; MOLLOY, P. L.; WERKMEISTER, J. A.; KORTT, A. A. Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: *in vitro* and *in vivo* studies. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v.53, n.5, p.411-421, 2004.

SANTOS, K. S. **Identificação das proteínas do veneno das abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) imunorreativas ao soro antiveneno por abordagem proteômica**. 2008. 282 f. Tese (Doutor em Ciências). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SARAIVA, T. C. **Avaliação do papel da nattectina, toxina do veneno de *Thalassophryne nattereri*, na resposta imune inata e específica**. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SCHUMACHER, M. J.; EGEN, N. B. Significance of Africanized bees for public health: a review. **Archives of International Medicine**, London, v. 155, n. 19, p. 2038–2043, 1995.

SCHUMACHER, M.; SCHMIDT, O.; EGEN, N.; LOWRY, E. Quantity, analysis, and lethality of European and Africanized honey bee venom. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v.43, p.79-86, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in Cell Recognition. **Sci. Am.** n, 268, p. 82-89, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology. Rehovot**, v. 14, p. 53-62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**, Chapman and Hall, London, 1989.

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

SHARON, N.; LIS, H. Lectins. London: Kluwer Academic Publishers, 2003.

SHEEHY, G. **Sheehy's Emergency Nursing: Principles and Practice**. 5.ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences, 2002. 828p.

SHERMAN, R. What physicians should know about Africanized honeybees. **Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 163, n. 6, p. 541-546, 1995.

SILVA, M. C.; CORRÊA, A. D.; SANTOS, dos C. D.; MARCOS, F. C. A.; ABREU, de C. M. P. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 103-107, maio, 2010. ISSN 0101-2061

SIMICS, M. Symptoms of honeybee venom. **Richmond: Apitherapy Education Service**, p. 40, 2000.

SON, D. J.; LEE, J. W.; LEE, Y. H.; SONG, H; S.; LEE, C. K.; HONG, J. T. Therapeutic application of antiarthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. **Pharmacology & Therapeutics**, v.115, n.2, p.246-270, 2007.

SONG-PING, L.; LI, L. Haemagglutination Activity Analysis of *Selenocosmia huwena* Lectin-I from the Venom of the Chinese bird Spider *Selenocosmia huwena*. **Chin. J. Biochem. Mol. Biol.** v. 16, n. 1, p. 92-95, 2000.

SPOERRI, P.E.; JENTSCH, J.; GLEES, P. Apamin from bee venom: effects of the neurotoxin on subcellular particles of neural cultures. **FEBS Letters**, v.53, n.2, p.143-147, 1975.

SUJATHA, M. S.; SASIDHAR, Y. U.; BALAJI, P. V. Energetics of galactose- and glucose-aromatic amino acid interactions: implications for binding in galactose-specific proteins. **Protein Science**, v. 13, p. 2502-2514, 2004.

SZAIMAN, M.L. Introduction to carbohydrates. In: **HECHT, S.M. Bioorganic Chemistry: Carbohydrates**. Oxford: Oxford University Press, 1999. cap. 1, p. 1-55.

TEICHBERG, V. I. Electrolectins: bête-D-galactoside-binding proteins. **Methods in Enzimology**. v. 5, p. 291-302, 1978.

TUNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**. v. 17, n. 11, p. 532-540, 1996.

VÉLEZ, G. M. Insuficiencia renal aguda por picadura múltiple de abejas africanizadas. **Nefrologia**, v. 30, n. 5, p. 531-8, 2010.

VICK, J. A.; SHIPMAN, W. H.; BROOKS, R. Jr. Beta adrenergic and anti-arrhythmic effects of cardiopep, a newly isolated substance from whole bee venom. **Toxicon**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 139-44, 1974.

WALKER, J. R.; NAGAR, B.; YOUNG, N. M.; HIRAMA, T.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of a galacto-specific C-type lectin possessing a novel decameric quaternary structure. **Biochemistry**. v. 43, p. 3783-3792, 2004.

WANG, G. L.; NA, J.; PAN, L. Z.; XING, Z.; FANG, H. J.. Ultrastructural observation on sterilization of melittin. **Science China Life Sciences**, v.54, n.2, p.166-170, 2011.

WANG, H.; NG, T.; OOI, V. E. C.; LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 32, p. 365-372, 2000.

WANG, X. W.; WANG, J. X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. **Developmental and Comparative Immunology**. 2012.

WEIS, W. I. Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 7, p. 624-630, 1997.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annual Review of Biochemistry, v. 65, p. 441-473, 1996.

WILCHEK, M.; MIRON, T. Thirty years of affinity chromatography: **Reactive & Functional Polymers**. v. 41, p. 263-268, 1999.

WINSTON, M. L. **A Biologia da Abelha**. 1.ed. Porto Alegre: Magister LTDA, 2003, 245p.

WINSTON, M.L. The Africanized "killer" bee: biology and public health. **The Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 87, p.263-267. 1994.

WONG, E. S. W.; BELOV, K. Venom evolution through gene duplications. **Gene**, v. 496, p. 1–7, 2012.

XU, X.; LI, J.; LU, Q.; YANG, H.; ZHANG, Y.; LAI, R. Two families of antimicrobial peptides from wasp (*Vespa magnifica*) venom. **Toxicon**, v. 47, p. 249-253, 2006.

YANG, E. J.; JIANG, J. H.; LEE, S. M.; YANG, S. C.; HWANG, H. S.; LEE, M. S.; CHOI, S. M.. Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival

in amyotrophic lateral sclerosis models. **Journal of Neuroinflammation**, v.7, p.69, 2010.

YANG, E. J.; KIM, S. H.; YANG, S. C.; LEE, S. M.; CHOI, S. M.. Melittin restores proteasome function in an animal model of ALS. **Journal of Neuroinflammation**, v.8, n.1, p.69-78, 2011.

YUAN, C.; JIN, Q.; TANG, X.; HU, W.; CAO, R.; YANG, S.; XIONG, J.; XIE, C.; XIE, J.; LIANG, S. Proteomic and Peptidomic Characterization of the Venom from the Chinese Bird Spider, *Ornithoctonus huwena* Wang. **Journal of Proteome Research**. v. 6, p. 2792-2801, 2007.

ZANETTI, G. D. **Lectinas dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas**. 2007. 262 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

ZHAO, J. K.; WANG, H. X.; NG, T. B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. **Toxicon**. v. 53, p. 360-366, 2009.