



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS**

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

**ESTUDOS DE ESTRUTURA-FUNÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia
virosa* COM ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA: UMA POTENCIAL
FERRAMENTA ANTICÂNCER**

FORTALEZA

2016

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

ESTUDOS DE ESTRUTURA-FUNÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia*
virosa COM ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA: UMA POTENCIAL
FERRAMENTA ANTICÂNCER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O94e Osterne, Vinicius José da Silva.

Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anti-câncer / Vinicius José da Silva Osterne. – 2016.
95 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

1. Lectina. 2. *Canavalia virosa*. 3. Estrutura. 4. Pró-inflamatória. 5. Anticâncer. I. Título.

CDD 660.6

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

ESTUDOS DE ESTRUTURA-FUNÇÃO DA LECTINA DE SEMENTES DE CANAVALIA
VIROSA COM ATIVIDADE INFLAMATÓRIA E CITOTÓXICA: UMA POTENCIAL
FERRAMENTA ANTI-CÂNCER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 17/02/2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Prof. Dra. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais e avós.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por me abençoar e me guiar em todos os momentos me permitindo enfrentar todos os desafios pelo caminho.

A meus avós Lúcia, Wandir e Nascy por estarem sempre presentes na minha vida. Grande parte das minhas vitórias eu devo a vocês.

Aos meus pais Alzenir e Wladimir por terem me dado o dom da vida, o apoio de vocês foi essencial para essa conquista.

Ao meu irmão Victor por todos os momentos divertidos e importantes.

Aos meus primos Gabriel, Rodrigo e Luiza pelos momentos de descontração que passamos juntos, vocês são sempre tão divertidos e animados. Em especial a prima Ana Luiza por indicar os melhores animes.

Aos professores Drs Benildo e Kyria por me permitirem trabalhar no BioMol e por todo o apoio. Pra mim, os senhores são bem mais que professores, são amigos preciosos que eu posso contar sempre. Agradeço também por aceitarem participar da minha banca!

Aos amigos Vanir, Mayara, Cecília, Adolph, Alysson...(etc) por todo o apoio, vocês são todos muito importantes pra mim.

A todos os alunos do Laffin e as professoras Ana Maria e Alana Pires pela participação importantíssima nesse trabalho. Agradeço em especial a Profa Alana que, mais uma vez, aceitou participar da minha banca!

Ao professor Rodrigo Bainy e seus alunos por darem uma chance para a ConV. A participação de vocês foi de extrema importância.

Aos colegas de laboratório que estão sempre presentes e dispostos a ajudar. Esse trabalho é o resultado do trabalho de todo o grupo.

Aos amigos JV e Bia pelos momentos divertidos. Um dia volto a jogar Rag! Prometo... :)

A Funcap pelo apoio financeiro.

A UFC por permitir o uso do seu espaço para as pesquisas.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam de forma específica a carboidratos e são capazes de formar complexos com moléculas contendo sacarídeos, sem alterar a estrutura covalente dos ligantes glicosídicos. Devido as diversas atividades biológicas apresentadas por essas proteínas, elas possuem grande aplicabilidade em biotecnologia. Nesse contexto, o presente trabalho relata a obtenção das estruturas primária e tridimensional da lectina extraída de sementes de *Canavalia virosa*, denominada ConV, além da investigação dos seus efeitos no processo inflamatório e como agente citotóxico para células de glioma. A planta *Canavalia virosa* pertence a família das leguminosas, subtribo Diocleinae. A maior quantidade de estudos com lectinas se concentram nesta família e a subtribo Diocleinae merece destaque devido a presença de lectinas altamente estudadas como a ConA. As lectinas de Diocleinae apresentam alta similaridade estrutural mas apresentam diferenças nos resultados de atividades biológicas, o que pode ser explicado pelo estudo estrutural dessas proteínas. ConV foi purificada em um único passo em cromatografia de afinidade com matriz de Sephadex-G50. A sequência de aminoácidos da lectina foi obtida por espectrometria de massas e apresentou alta similaridade com outras lectinas extraídas de plantas da mesma subtribo. Cristais de ConV utilizados para determinação da estrutura tridimensional foram obtidos pelo método de difusão de vapor a 293 K, apresentaram grupo espacial ortorrômbico P2₁2₁ com um dímero na unidade assimétrica. A estrutura foi resolvida a 2,53 Å e a metodologia escolhida para resolver o problema da fase foi a substituição molecular utilizando-se as coordenadas da lectina de *Canavalia maritima* (PDB: 2CWM) que demonstra 99% de similaridade com ConV. A estrutura obtida após todos os refinamentos apresentou Rfactor e Rfree de 18,91% e 24,92% respectivamente com nenhum resíduo em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran. A estrutura obtida se mostrou bastante semelhante a outras lectinas dos mesmo gênero. Nos ensaios de inflamação, ConV elicitou edema, aumentando o volume da pata dos animais, e a incubação da lectina com glicose antes da aplicação foi capaz de reduzir o efeito edematogênico indicando a participação do domínio de reconhecimento a carboidrato nesse processo. ConV apresentou alta toxicidade para células de glioma com IC₅₀ de 58,8 µg/mL, essa toxicidade provavelmente é causada por indução de autofagia dessas células, indicando potencial anticâncer para a lectina. Estudos *in silico* confirmaram que ConV interage preferencialmente com dimanosídeos e trimanosídeos, carboidratos que compõem os *N*-glicanos de glicoproteínas. Esse dado corrobora com a hipótese que o domínio lectínico interage com receptores contendo manosídeos e isso contribui para os efeitos observados nas atividades biológicas.

Palavras-chaves: Lectina, *Canavalia virosa*, Estrutura, Pró-inflamatória, Anticâncer.

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind specifically to carbohydrates and are capable of forming complexes with molecules containing saccharides without changing the structure of the glycosidic ligands. Because of the diverse biological activities displayed by these proteins they have great applicability in biotechnology. In this context, this work reports the obtention of primary and three-dimensional structures of lectin extracted from *Canavalia virosa* seeds, called ConV. In addition to the analysis of its effects on inflammatory process and as cytotoxic agent for glioma cells. The *Canavalia virosa* plant belongs to the legume family, subtribe Diocleinae. The largest number of studies with lectins focuses on this family and the subtribe Diocleinae are noteworthy due to the presence of highly studied lectins such as ConA. Lectins from Diocleinae have high structural similarity but differ on the results of biological activities, which may be explained by the structural study of proteins. ConV was purified by a single step by affinity chromatography with Sephadex G-50 matrix. The amino acid sequence of the lectin was obtained by mass spectrometry and showed high similarity to other plant lectins derived from the same subtribe. ConV crystals used for determination of the three dimensional structure were obtained by vapor diffusion method at 293 K and belonged to orthorhombic space group P2₁2₁2₁ with a dimer in its asymmetric unit. The structure was solved at 2.53 Å and the methodology chosen to solve the phase problem was the molecular replacement using coordinates of the lectin from *Canavalia maritima* (PDB: 2CWM). The structure obtained after all the refinements presented Rfactor and Rfree of 18.91% and 24.92% respectively, with no residues in not allowed regions of Ramachandran plot. The obtained structure proved to be very similar to other lectins from the same gender. In inflammatory tests, ConV elicited edema, increasing the animal's paw volume, and the incubation of lectin with glucose before the application was able to reduce the edematogenic effect indicating the involvement of the carbohydrate recognition domain in this process. ConV showed high toxicity to glioma cells with IC₅₀ of 58.8 µg/mL, this toxicity is probably caused by the induction of autophagy in these cells, indicating a anticancer potential for the lectin. *In silico* studies confirmed that ConV interacts preferentially with dimmannosides and trimmannosides, carbohydrates that compose the N-glycans of glycoproteins. This finding corroborates with the hypothesis that the lectin domain interacts with receptors containing mannoses and this contributes to the effects observed in biological activities.

Keywords: Lectin, *Canavalia virosa*, Structure, Pro inflammatory, Anticancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação das lectinas em famílias evolutivamente relacionadas.....	22
Figura 2 - Classificação estrutural das lectinas de plantas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.....	23
Figura 3 – Esquema do monômero de uma lectina de leguminosa.....	26
Figura 4 - Diagrama esquemático do processamento pós-traducional de permutação circular.....	28
Figura 6 - Esquema dos componentes de um espectômetro de massas.....	32
Figura 7 - Esquema do processo de sequenciamento de proteínas por espectrometria de massas em tandem (MS/MS).....	35
Figura 8 - Diagrama de fases para a cristalização de macromoléculas	37
Figura 9 - Representação esquemática dos três métodos de difusão de vapor para cristalografia de macromoléculas. A) Gota suspensa, B) Gota sentada e C) Gota sanduíche.....	38
Figura 10 - Etapas da cristalografia de raios X de proteínas.....	41
Figura 11 - Alterações vasculares e celulares induzida pelo processo inflamatório.	44
Figura 12 - Emigração de leucócitos para o local da injúria, são mostradas as etapas de rolamento, adesão e transmigração.	46
Figura 13 – Diagrama esquemático dos passos do processo de autofagia.	50
Figura 14 - Cromatograma do extrato bruto em Sephades-G50 e SDS-Page de ConV.....	60
Figura 15 - Sequência de aminoácidos de ConV obtida por espectrometria de massas.....	62
Figura 16 – Alinhamento múltiplo entre a lectina de <i>Canavalia virosa</i> e outras lectinas extraídas de sementes da subtribo Diocleinae.	63
Figura 17 - Cristal de ConV.	65
Figura 18 - Gráfico de Ramachandran da estrutura final de ConV.....	67
Figura 19 - Estrutura do dímero de ConV presente na unidade assimétrica.	69
Figura 20 - Estrutura tetramérica de ConV.	70
Figura 21 – Representação e LigPlot do DRC de ConV.	71

Figura 22 - Representação do sítio de ligação a metais de ConV	72
Figura 23 – LigPlots do sítio de ligação a metais de ConV	73
Figura 24 – Sobreposição do DRC e do sítio de ligação a metais de ConV e ConM	75
Figura 25 – Resultados do modelo de edema de pata utilizando ConV.....	76
Figura 26 - Gráfico de concentração x viabilidade celular mostrando os resultados dos testes de citotoxicidade.....	77
Figura 27 – Representação e LigPlot do DRC de ConV ligado ao dimanosídeo manose- α -1,3-manose como mostrado pelo docking molecular.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de difração, substituição molecular, refinamento e validação.....	68
Tabela 2 – RMSD resultante da sobreposição da estrutura resolvida de ConV com outras lectinas de Diocleinae.	74
Tabela 3 – Escores obtidos no docking de ConV com diversos carboidratos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å - Angstron

ATG - Genes de autofagia

AUC - Área sob a curva

BSA - Albumina sérica bovina

Ca - Cálcio

CGL - Lectina de *Canavalia gladiata*

CID - Dissociação induzida por colisão

ConA - Lectina de *Canavalia ensiformes*

ConBol - Lectina de *Canavalia boliviiana*

ConBr - Lectina de *Canavalia brasiliensis*

ConGF - Lectina de *Canavalia grandiflora*

ConV - Lectin de *Canavalia virosa*

CoxyL - Lectina de *Canavalia oxyphylla*

CPL - Lectina de *Camprosema pedicelatum*

CRA - Lectina de *Cratylia mollis*

CRL I - Lectina manose-específica de *Cymbosema roseum*

Da - Dalton

DDA - Análise direta de dados

DGui - Lectina de *Dioclea guianensis*

DlyL - Lectina de *Dioclea lasiophylla*

DM - Docking molecular

DRC - Domínio de Reconhecimento a carboidrato.

DrfL - Lectina de *Dioclea reflexa*

DRL - Lectina de *Diclea rostrata*

DSL - Lectina de *Dioclea sclerocarpa*

DVL - Lectina de *Dioclea violacea*

DWL - Lectina de *Dioclea wilsonii*

ESI - Ionização por eletrospray

Gal - Galactose

HCl - Ácido clorídrico

K - Kelvin

kDa - Kilodalton

LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas em tandem

m/z - Relação massa sobre carga

M13 - Manose- α -1,3-manose

mA - Microampères

MALDI - Ionização/dessorção a laser assistida por matriz

Man - Manose

Mn - Manganês

MS - Espectrometria de massas

MS/MS - Espectrometria de massas em tandem

MT1-MMP - Proteína de membrana - metaloproteinase tipo 1

MTT - Tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NCBI - Nacional Center of Biotechnology Information

NO - Óxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAF - Fator de agregação plaquetária

PDB - Protein Data Bank

PHA - Lectina de *Phaseolus vulgaris*

pI - Ponto isoelétrico

PPL-2 - Quimerolectina quitina-específica de *Parkia platycephala*

RMSD - desvio médio da raiz quadrada

SDS - Docecil Sulfato de Sódio

SDS-Page - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil sulfato de sódio.

TEMED - N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina

TOF - Analisador por tempo de voo

TxLCI - Lectina do bulbo da tulipa

TZM - Temozolomida

V - Volts

W - Watts

WGA - Lectina do gérmen de trigo

Xil - Xilose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Lectinas	18
1.1.1 Definição e histórico	18
1.1.2 Classificação das lectinas	20
1.1.2.2 Baseada em relações de sequência e evolutivas	20
1.1.2.2 Baseada na organização estrutural e nos DRCs.....	22
1.1.3 Lectinas de leguminosas.....	24
1.1.4 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas.....	25
1.1.5 Lectinas de Diocleinae	27
1.1.7 Atividades biológicas / Aplicações biotecnológicas de lectinas	30
1.2 Espectrometria de massas (MS)	31
1.2.1 Fonte de Ionização	32
1.2.1.1 Ionização por eletrospray (ESI).....	32
1.2.1.2 Ionização/Dessorção a Laser assistida por Matriz (MALDI).....	33
1.2.2 Analisadores de massa e Detectores.....	33
1.2.3 Espectrometria de massas em tandem.....	34
1.3 Cristalografia de proteínas	35
1.4 Docking molecular e screening virtual.....	41
1.6 Câncer, autofagia e gliomas	46
1.6.1 Cancer.....	46
1.6.2 Gliomas	47
1.6.3 Autofagia	48
1.7 Processo inflamatório x câncer	50
2 OBJETIVOS	52
2.1 Objetivo geral.....	52
2.2 Objetivos específicos	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Purificação da lectina de sementes de <i>Canavalia virosa</i> (ConV)	53
3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	53
3.3 Sequenciamento de ConV por espectrometria de massas	54
3.4 Análise da sequência primária de ConV.....	55

3.4 Cristalização de ConV	55
3.5 Coleta de dados	56
3.6 Resolução e análise da estrutura	56
3.7 Sobreposição da estrutura de ConV com outras lectinas de Diocleinae	57
3.8 Análise da interação de ConV com carboidratos por <i>Docking</i> molecular.....	57
3.9 Edema de pata	58
3.10 Indução de morte autófágica de gliomas pela ConV	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1 Purificação e SDS-Page de ConV	60
4.2 Sequenciamento e análise da sequência de ConV	61
4.3 Resolução da estrutura de ConV.....	64
4.3.1 Cristalização de ConV.....	64
4.3.2 Coleta de dados	65
4.3.3 Resolução da estrutura	65
4.4 Estrutura tridimensional de ConV.....	68
4.5 Atividades biológicas	75
4.7 Docking molecular	78
5 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Definição e histórico

O termo lectina vem do latim *legere* que significa “selecionar” ou “escolher”. Lectinas tem sido definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos sem, no entanto, alterar suas estruturas químicas. Essas moléculas estão amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas em praticamente todos os organismos desde microorganismos, como vírus e bactérias, até animais superiores como os seres humanos. As lectinas também podem ser denominadas de aglutininas devido a sua capacidade de aglutinar células e/ou precipitar gliconjugados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995, KOCOUREK; HOUREJSI, 1983).

O primeiro relato de uma atividade aglutinante com o envolvimento de lectinas foi realizado em 1860 pelo psiquiatra e neurologista Silas Weir Mitchel, que verificou que uma gota do veneno da cobra *Crotalus durissus* foi capaz de aglutinar rapidamente uma gota de sangue de um pombo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). No ano de 1902 a atividade aglutinante foi confirmada por Simon Flexner e H. Noguchi, quando relataram com mais detalhes o processo de hemaglutinação (KILPATRICK, 2002). Em relação a lectinas oriundas de plantas, o primeiro relato data de 1888 por Peter Hermann Stillmark que, enquanto estudava os efeitos tóxicos da mamona (*Ricinus communis*), verificou que ao misturar eritrócitos com o extrato dessa semente ocorria hemaglutinação, a partir desse dado, a aglutinina tóxica foi isolada e denominada Ricina. Posteriormente, em 1891, H. Hellin demonstrou que o extrato de sementes de *Abrus precatorius* demonstrava as mesmas atividades da ricina, e, partindo-se dessa observação, a hemaglutinina tóxica foi isolada e denominada Abrina (MOREIRA *et al.*, 1991). Em 1891, Paul Ehrlich fez uso das duas hemaglutininas tóxicas Ricina e Abrina e obervou que camundongos se tornaram imunes a uma dose letal de ricina ou abrina através da aplicação repetitiva de pequenas doses subletais, também foi verificado que o anticorpo anti-ricina não protegia os animais do efeito tóxico de abrina e nem o anti-abrina os protegia contra a ricina. Esses resultados eram evidências claras da especificidade da resposta imune. Esses anticorpos foram utilizados para diversos experimentos e, com isso, foi possível estabelecer vários dos princípios fundamentais da imunologia tais como: a especificidade da resposta do anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral da mãe para sua progênie (SHARON; LIS, 2004). No ano de 1907, em trabalho realizado por

Landsteiner e Raubischek, se verificou que extratos de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa* possuíam atividade hemaglutinantes distintas frente ao sangue de vários animais indicando que as lectinas possuíam diferenças quanto as suas capacidade de aglutinação, além disso esses extratos não eram tóxicos o que demonstrou que a toxicidade não é uma propriedade intrínseca das lectinas (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, se teve o primeiro relato da purificação de uma hemaglutinina de planta, quando Jammes B. Summer purificou a lectina chamada de Concanavalina A ou ConA a partir de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*). Passadas duas décadas, no ano de 1936, Summer e Howell relataram que a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA) possuía a capacidade de aglutinar células como eritrócitos e leveduras e também era capaz de precipitar glicogênio em solução. Esses pesquisadores também demonstraram a inibição da atividade hemaglutinante da ConA com o uso de sacarose, esse sendo o primeiro relato de que as lectinas são capazes de se ligar a carboidratos. A partir desse dados foi sugerido que a lectina era capaz de interagir com os carboidratos encontrados na superfície celular (SHARON; LIS, 2004). Os pesquisadores Boyd e Shapleigh (1954) verificaram que extratos brutos de várias plantas possuíam perfis de hemaglutinação distintos quando testados com diferentes grupos sanguíneos humanos. As lectinas de plantas eram anteriormente designadas como aglutininas ou fitoaglutininas mas após a observação de que essas proteínas possuíam certa especificidade pelo tipo sanguíneo foi proposto o nome de lectinas, do latim *legere*, que significa selecionar (LAM; NG, 2010). O número de lectinas purificadas cresceu significativamente a partir da década de 70 com o desenvolvimento das cromatografias de afinidade aplicado a purificação dessas proteínas (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965). Houve um aumento no interesse pelas lectinas quando essas proteínas mostraram ter diversas aplicações biotecnológicas tais como: detecção e caracterização de glicoconjugados (FISHER *et al.*, 1984); análises de mudanças que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos (AUB; SANFORD; COTE, 1965) e mitogenicidade para linfócitos (MOREIRA *et al.*, 1991). Devido as diversas aplicações biotecnológicas das lectinas, hoje já se tem um grande número de lectinas de plantas, microorganismos, algas e animais, todas purificadas e caracterizadas.

1.1.2 Classificação das lectinas

1.1.2.2 Baseada em relações de sequência e evolutivas

Peumans e Van Damme (1998) propuseram uma divisão das lectinas em famílias baseando-se em suas relações de sequência e evolutivas, e de acordo com essa divisão as lectinas são subdivididas nas sete famílias a seguir: lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose, lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos, proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2, proteínas relacionadas a jacalina, lectinas de *Amaranthaceae* e lectinas do floema de *Cucurbitaceae*.

- a) Lectinas de leguminosas: correspondem a família de lectinas mais bem estudada, as proteínas desse grupo contém alta similaridade estrutural e de sequência. Se enquadram nesse grupo a lectinas extraídas de *Dioclea reflexa* (DrfL), *Canavalia oxyphylla* (Coxyl) e *Dioclea lasiophylla* (DlyL) (SANTIAGO *et al.*, 2014; PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013; PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2016). Mais detalhes sobre as lectinas de leguminosas é mostrado adiante. A estrutura da lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRL I) é mostrada na figura 1A.
- b) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose: é um grupo de lectinas bastante similares que foram encontradas em diversas famílias de monocotiledôneas: *Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Orchidaceae*, *Liliaceae* e *Bromeliaceae*. Quando se compara a sequência desse grupo de lectinas verifica-se que essas lectinas pertencem a uma única superfamília de proteínas evolucionariamente relacionadas. Estruturalmente, essas lectinas são formados por 1 a 4 subunidades de aproximadamente 12 kDa e são específicas exclusivamente por manose (PEREIRA *et al.*, 2015; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Algumas atividades biológicas relatadas para esse grupo de proteínas são as atividades antiviral (KAUR *et al.*, 2007) e inseticida (DAS *et al.*, 2013, MONDAL *et al.*, 2012). Na figura 1B. tem-se a estrutura da lectina manose-específica de *Gastrodia elata*.
- c) Lectinas ligantes a quitina homólogas a heveína: é um grupo de lectinas que possui especificidade por *N*-acetil-glicosamina e possuem como característica principal a presença de domínios heveínicos. Esse domínio heveíntico se refere a heveína, uma merolectina ligante a quitina que possui em sua estrutura primária 43 resíduos de aminoácidos e é extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2015). Esse grupo de

lectinas possui como principal representante a lectina de gérmen de trigo (WGA), que é composta por duas subunidades de 18 kDa e é constituído por quatro domínios estruturalmente semelhantes a Heveína (PORTILLO-TÉLLEZ *et al.*, 2011). A estrutura da lectina WGA é mostrada na figura 1C.

d) Proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2: As RIPs tipo 2 são formadas por duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B). A cadeia A é formada por um polipeptídeo constituído de um domínio adenosa glicosidase e a cadeia B possui propriedades lectínicas que permitem a ligação dessas proteínas aos carboidratos da superfície celular. As cadeias A e B estão inicialmente unidas por pontes dissulfeto mas quando há a penetração nas células a ligação é rompida e a cadeia A adquire forte atividade N-glicosidase e, com isso, a proteína consegue inativar ribossomos procarióticos e eucarióticos (SCHROT; WENG; MELZIG, 2015). A atividade de inativação dos ribossomos por essas proteínas ocorre devido a sua capacidade de remover um resíduo de adenina específico de um *loop* na subunidade maior do RNA ribossomal 28 S (ENDO *et al.*, 1987). Como exemplos clássicos se tem a Ricina e a Abrina extraídas de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*, respectivamente, e a Pulchelina, lectina extraída de *Abrus pulchellus* (CASTILHO *et al.*, 2008). A estrutura da Abrina é mostrada na figura 1D.

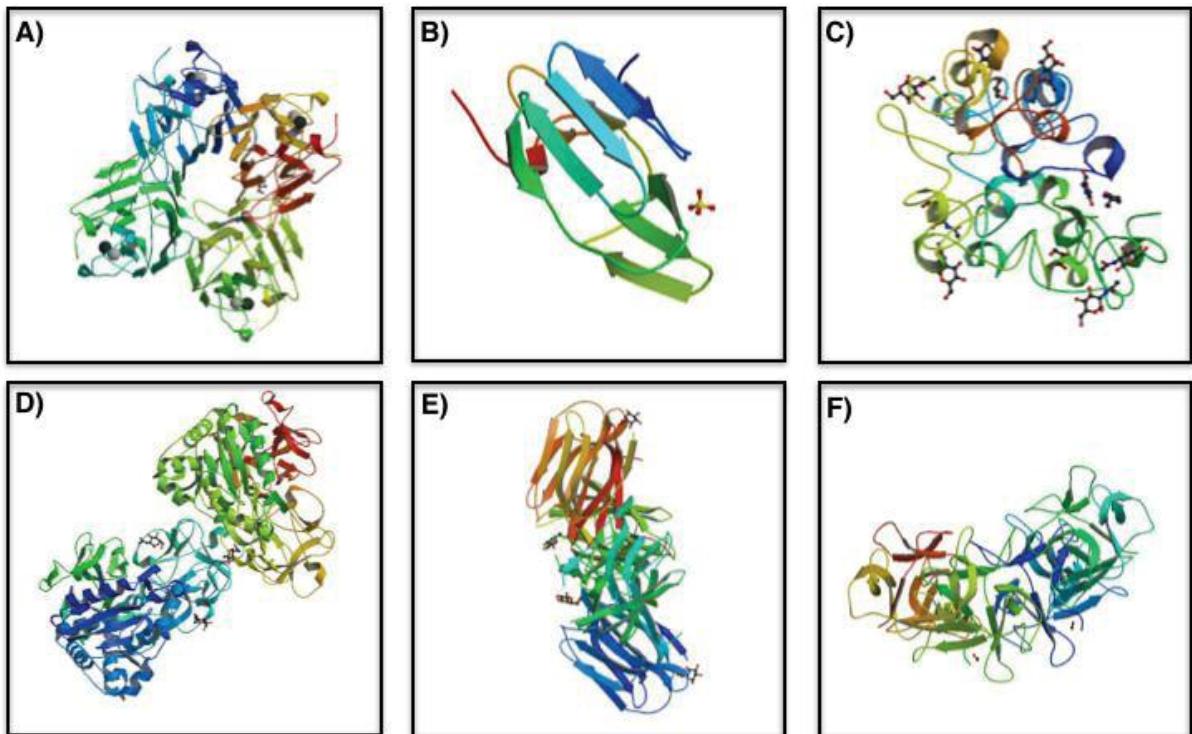
e) Lectinas relacionadas a jacalina: a jacalina é uma das duas lectinas que está presente em sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). O termo “lectinas relacionadas a jacalina” é utilizado para todas as lectinas que são estruturalmente e evolutivamente relacionadas a jacalina. Baseado na especificidade por carboidratos, essas lectinas são classificadas em dois grupos: as ligantes a galactose e as ligantes a manose. Lectinas pertencentes a esse grupo são encontradas em espécies de *Moraceae* e *Convovulaceae* (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Sabe-se que as lectinas galactose específicas, principalmente extraída de espécies de *Moraceae* possuem alta afinidade pelo antígeno T expresso em vários tipos de câncer [Gal β(1,3)GalNAc] (AHMED; MOHAMMED; VEERAPPAN, 2015, GAIKWAD; KHAN, 2006). A estrutura da jacalina é mostrada na figura 1E.

f) Lectinas de *Amaranthaceae*: esse grupo tem como representante principal a Amarantina, lectina extraída de *Amaranthus caudatus*, que não se assemelha a nenhuma outra lectina de planta tanto na sequência de aminoácidos quanto em sua estrutura tridimensional. Estruturalmente, são proteínas homodiméricas compostas de duas subunidades idênticas de aproximadamente 30 kDa. Esse grupo contém várias outras lectinas extraídas de plantas do

gênero *Amaranthus*, todas elas sendo ligantes a *N*-acetil-galactosamina (KAUR *et al.*, 2006; PEUMANS; VAN DAMME, 1998). A estrutura da Amarantina é mostrada na figura 1F.

g) Lectinas do floema de *Cucurbitaceae*: uma pequena família de lectinas ligantes a quitina que ocorrem no floema de algumas plantas da família *Cucurbitaceae*. Estruturalmente esse grupo contém lectinas diméricas compostas de duas subunidades idênticas de 24 kDa. Essas lectinas possuem grande similaridade sequencial entre si mas são muito diferentes de outras lectinas de plantas (LANOO; VAN DAMME, 2014; PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Até o momento não se tem estruturas resolvidas de lectinas de floema de *Cucurbitaceae*.

Figura 1 - Classificação das lectinas em famílias evolutivamente relacionadas.



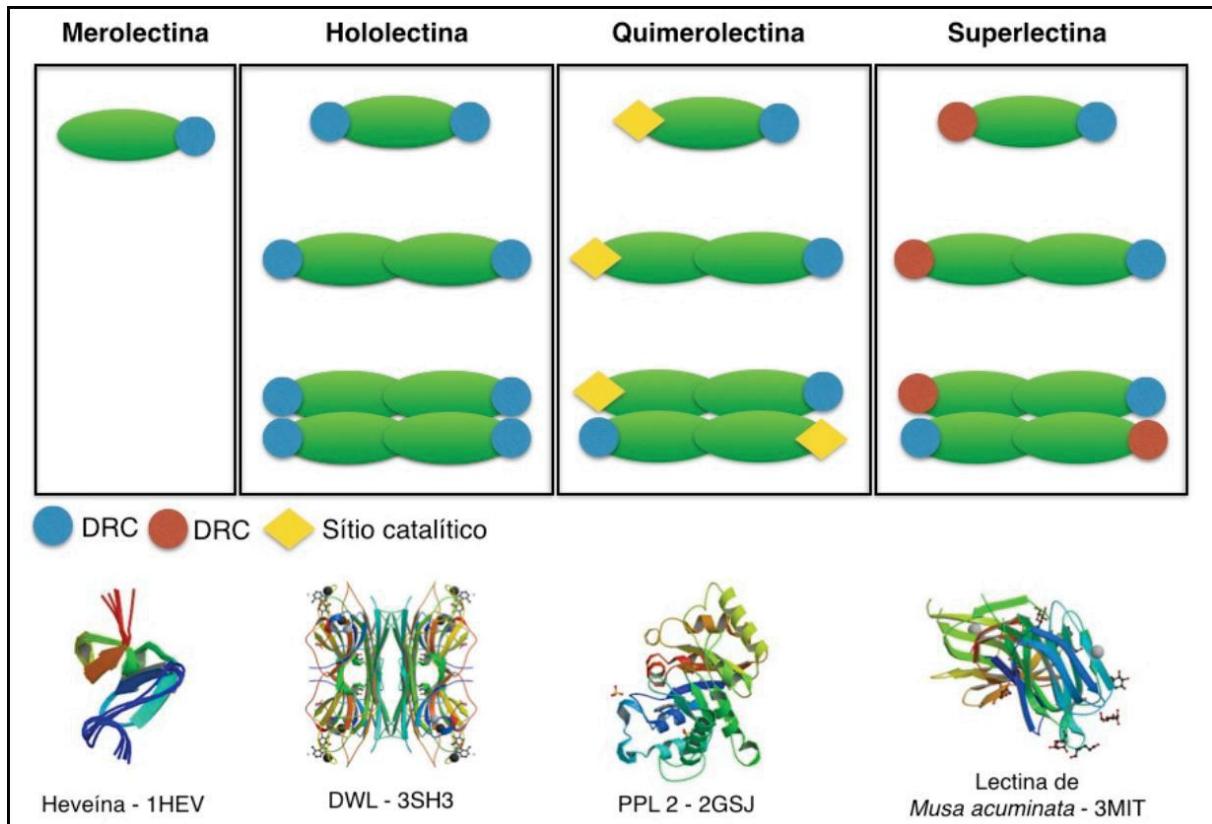
Fonte: Imagem produzida pelo autor. Estrutura tridimensional de lectinas de cada grupo. A) CRL I (PDB 3A0K), B) Lectina manose-específica de *Gastrodia elata* (PDB 1XDG), C) WGA (2UVO), D) Abrina (PDB 2ZR1), E) Jacalina (PDB 1UGW), F) Amarantina (PDB 1JLY).

1.1.2.2 Baseada na organização estrutural e nos DRCs

As lectinas também podem ser agrupadas em famílias caracterizadas por sequências similares ou organização estrutural. Van Damme *et al.* (1998) subdividiu as lectinas vegetais de acordo com a organização estrutural e os domínios de reconhecimento a carboidrato, esta

divisão gerou quatro classes estruturais principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 2).

Figura 2 - Classificação estrutural das lectinas de plantas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: Imagem adaptada de VAN DAMME *et al.*, 1998. DRC: domínio de reconhecimento a carboidratos.

a) Merolectinas: As merolectinas são lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidrato na sua estrutura. Esta característica dá um caráter monovalente a essas proteínas, dessa forma elas são incapazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjungados. A heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), é uma merolectina ligante a quitina (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; VAN PARIJS *et al.*, 1991).

b) Hololectinas: As hololectinas contém dois ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos que são idênticos e se ligam aos mesmos carboidratos ou carboidratos estruturalmente relacionados. Como as hololectinas são multivalentes, elas podem aglutinar células e/ou precipitar glicoconjungados devido a sua capacidade de formar ligações cruzadas. Essa é a classe de lectinas mais comum e corresponde a maioria das lectinas estudadas. Como

exemplo de lectina dessa classe se tem a lectina extraída se sementes de *Dioclea wilsonii* (DWL) (RANGEL *et al.*, 2011).

c) Quimerolectinas: As quimerolectinas consistem em um ou mais domínios de reconhecimento a carboidrato e um outro domínio não relacionado, com atividade catalítica bem definida, cuja ação é independente dos DRCs. Dependendo do número de DRCs as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. Representantes típicos deste grupo são as proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 2, como por exemplo a ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS & VANDAMME, 1998). Outro exemplo é a PPL-2, uma lectina ligante a quitina isolada de sementes de *Parkia platycephala* que, além do domínio de reconhecimento a carboidrato, possui um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

d) Superlectinas: As superlectinas consistem de no mínimo dois domínios de reconhecimento a carboidratos que reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como exemplo se tem a lectina do bulbo da tulipa (TxLCl) que é capaz de se ligar a manose e N-acetilgalactosamina e a lectina da banana que possui dois sítios distintos de reconhecimento de laminaríbiose e Xil- β 1,3-Man- α -O-Metil em domínios distintos (MEAGHER *et al.*, 2005), outro exemplo é a lectina da bactéria *Burkholderia cenocepacia* (SULÁK *et al.*, 2011).

1.1.3 Lectinas de leguminosas

Entre as plantas, a família das leguminosas tem recebido maior atenção, devido as sementes dessas plantas serem particularmente ricas em lectinas. Graças a isso e a relativa facilidade de purificação dessas proteínas se tem um grande número de lectinas de leguminosas que foram purificadas e caracterizadas (ALMEIDA *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2012; PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013). Esse grupo de lectinas são bastante similares quanto as suas propriedades físico-químicas e estruturais, mas apesar da grande similaridade entre elas, as lectinas de leguminosas demonstram muitos resultados diferentes quando testadas em várias atividades biológicas (CAVADA *et al.*, 2001).

As lectinas de leguminosas constituem à família de lectinas mais estudada, sendo uma ampla família de proteínas estreitamente relacionadas encontradas exclusivamente em espécies representativas desta família. Dentro das leguminosas a maioria dos estudos correspondem a lectinas extraídas de membros da subfamília Papilionoideae, principalmente

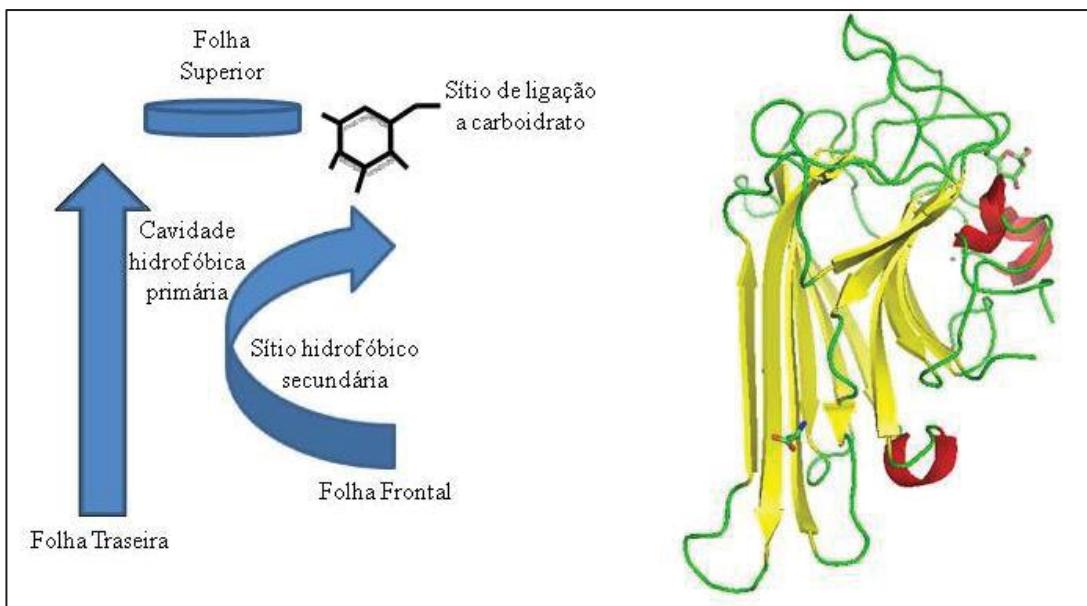
da tribo Phaseoleae (CORREIA *et al.*, 2011; OSTERNE *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2014). Em geral as lectinas estão presentes em sementes, folhas, caules e raízes (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Algumas lectinas de leguminosas podem ser encontradas em diferentes isoformas, como exemplo se tem a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que é formada por duas subunidades gênicas diferentes, denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), que são combinadas e dão origem a uma família de cinco isolectinas (FELSTED *et al.*, 1977). Além da heterogeneidade genética, ou seja, mais de um gene codificando uma lectina, a ocorrência de isoformas pode ser atribuída a processamentos pós-traducionais incompletos (YOUNG; WATSON; THIBAULT, 1995). A presença de isoformas têm alto impacto sobre a função biológica de lectinas, e a existência de várias isoformas poderia oferecer uma estratégia alternativa ou uma adaptação evolutiva para compensar a baixa especificidade (PEREIRA JUNIOR, 2014).

1.1.4 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas são classificadas como uma família porque possuem alta similaridade de estruturas primária, secundária e terciária bem como quanto as suas características biofísicas. As estruturas cristalográficas de um grande número de lectinas de leguminosas pode ser encontrada no Protein Data Bank (PDB) onde se tem mais 200 estruturas de cerca de 35 lectinas diferentes. As estruturas resolvidas das lectinas de leguminosas tem mostrado que cada subunidade é constituída de aproximadamente 60 % de fitas-beta antiparalelas arranjadas em duas ou mais folhas beta interconectadas por voltas, o que é conhecido como encovelamento β -sanduíche. Todas as lectinas de leguminosas até o momento possuem um motivo estrutural *jelly-roll*, esse motivo é composto de duas folhas- β dispostas paralelamente, uma anterior com seis fitas e uma dianteira com sete fitas, juntamente com uma pequena folha- β disposta sobre as outras duas. Todas conectadas por diversos loops de vários tamanhos (Figura 3) (LORIS *et al.*, 1998; WILLIAMS; WESTHEAD, 2002).

Figura 3 – Esquema do monômero de uma lectina de leguminosa.



Fonte: Adaptado de Benevides, 2011. A esquerda tem-se o esquema da estrutura terciária do monômero das lectinas de leguminosas. A direita tem-se a estrutura do monômero da lectina de *Canavalia gladiata* complexada com alfa-metil-manosídeo (PDB 2D7F).

Em relação a oligomerização das lectinas de leguminosas, essas são geralmente diméricas ou tetraméricas, com cada monômero possuindo de 25 a 30 kDa. Cada uma destas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Frequentemente, as subunidades das lectinas de leguminosas são compostas de uma única cadeia polipeptídica e a união dessas cadeias é estabelecida por interações não-covalentes como: pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Com essa união há a formação de dímeros que, em algumas lectinas, podem se unir para formar uma estrutura tetramérica (BEZERRA *et al.*, 2013).

O domínio de reconhecimento a carboidratos se encontra no lado côncavo do β -sanduíche próximo ao sítio de ligação a metais e consiste de diversos loops com diferentes graus de variabilidade. As conformações desses loops que permitem a interação com os carboidratos são determinadas pela presença de íons metálicos como o cálcio e o manganês na estrutura da lectina, ambos coordenados por pelo menos quatro aminoácidos e duas moléculas de água (BOUCKAERT *et al.*, 2000; LORIS *et al.*, 2004). Em lectinas de Diocleinae a presença desses íons é fundamental para a manutenção da ligação Ala207-Asp208 na conformação cis necessária para a ligação da lectina com o carboidrato (BARROSO-NETO *et al.*, 2014). O DRC das lectinas de leguminosas consiste em uma cavidade na superfície da molécula formada por quatro loops, nessa cavidade ocorre a interação da proteína com o açúcar que se dá por intermédio de pontes de hidrogênio, interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas

(MORENO *et al.*, 2008). A especificidade das lectinas é, em parte, explicada por variações na composição e no tamanho de um dos quatro loops. Além disso contatos adicionais entre o carboidrato e a superfície da proteína, que podem ocorrer diretamente ou por intermédio de moléculas de água, contribuem para a alta seletividade dessas proteínas (MANOJ; SUGUNA, 2001).

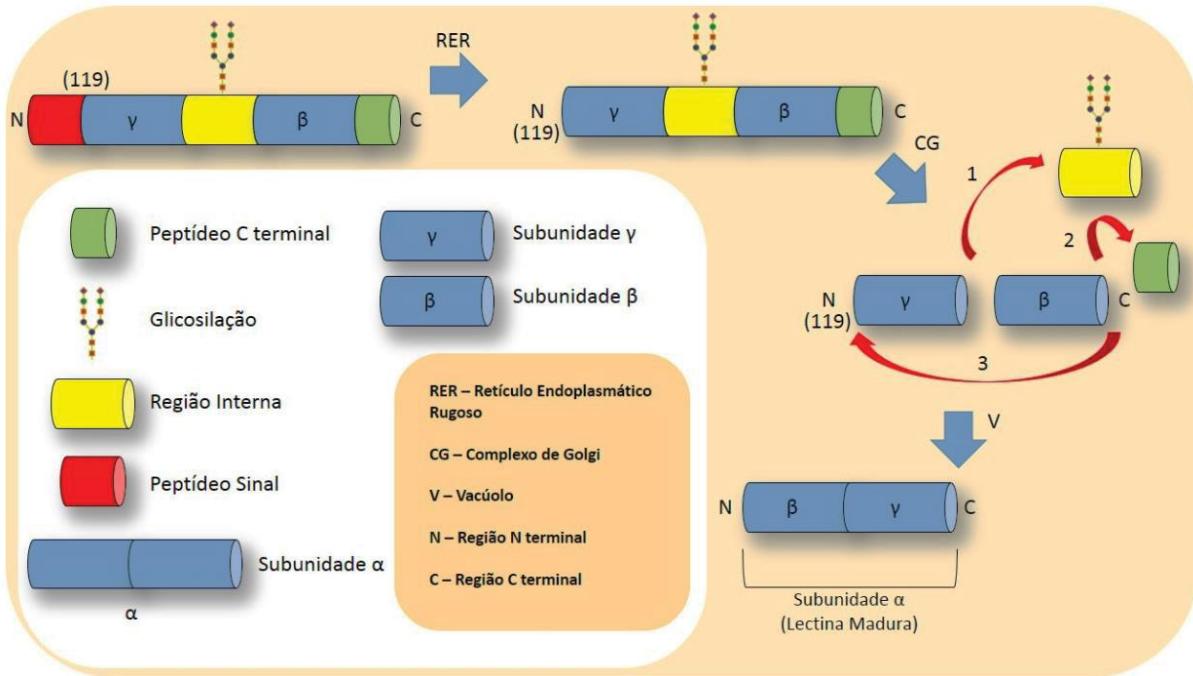
1.1.5 Lectinas de Diocleinae

Lectinas do tipo ConA-*like* extraídas de plantas da subtribo Diocleinae apresentam especificidade por manose/glicose e carboidratos relacionados. Dentre essas lectinas muitas já possuem suas estruturas cristalográficas resolvidas como por exemplo: a lectina de: *Canavalia brasiliensis* (ConBr) (BEZERRA *et al.*, 2010), *Canavalia grandiflora* (ConGF) (BARROSO-NETO *et al.*, 2014), *Canavalia gladiata* (CGL) (BEZERRA *et al.*, 2007), *Dioclea sclerocarpa* (DSL) (BARROSO-NETO *et al.*, 2016) dentre outras. Uma característica interessante sobre esse grupo de lectinas é o seu elevado grau de similaridade, mas apesar disso a substituição de alguns aminoácidos na pode alterar a posição de alguns resíduos chaves, o que conferie a estas lectinas a capacidade de desempenhar um vasto espectro de atividades biológicas.

Lectinas de Diocleinae são conhecidas por apresentarem um conjunto de subunidades bastante característico, também é sabido que o produto gênico sofre processamentos pós-traducionais. Nesse processo, chamado de permutação circular, a lectina é produzida como pré-pro-lectina. No retículo endoplasmático ela perde o peptídeo-sinal onde passa a ser chamada de pro-lectina. No complexo de Golgi a pro-lectina sofre uma clivagem proteolítica e perde um segmento glicosilado de quinze aminoácidos no centro de sua estrutura e um peptídeo agora na sua região C-terminal, liberando energia suficiente para que haja uma posterior religação. Com essa perda a cadeia inicial é dividida em duas, β e γ , que são religadas, mas em locais diferentes. A cadeia γ que antes estava na região N-terminal é religada a cadeia β havendo uma inversão entre as regiões N e C-terminal formando-se cadeia α . Esse processo é catalizado por uma enzima asparaginil endopeptidase. Esse processamento não possui rendimento de 100%, as cadeias β e γ estão sempre presentes no preparo dessas lectinas. Portanto, quando a lectina é analisada por SDS-PAGE, são observadas três bandas polipeptídicas. Acredita-se que a maioria das lectinas da subtribo Diocleinae sofrem o mesmo processamento (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; SHARON, 2007). Apesar disso estudos de sequências destas proteínas tem mostrado que esse processo não ocorre em algumas dessas lectinas, o que pode explicar as diferenças de afinidade apresentadas por proteínas

isoladas de uma mesma semente (PEREZ; HERNANDEZ; MORA, 1990; PEREZ, 1998). A determinação da estrutura primária e a resolução da estrutura tridimensional tem sido utilizada como forma de entendimento desta diferença na especificidade de proteínas isoladas de espécimes da mesma tribo e para obter informação acerca de sua origem evolutiva. Um esquema do processo de permutação circular é mostrado na figura 4.

Figura 4 - Diagrama esquemático do processamento pós-traducional de permutação circular.



Fonte: Retirado de Santiago (2013).

Uma outra característica de algumas lectinas extraídas de plantas da subtribo Diocleinae é a oligomerização dependente de pH, onde a proporção entre proteínas estado dimérico e no estado tetramérico pode ser alterada de acordo com pH do meio (NAGANO *et al.*, 2008). A alteração desse equilíbrio dímero/tetrâmero dependente de pH pode influenciar diretamente nas atividades biológicas dessas lectinas, pelo fato dessas proteínas serem capazes de se ligar aos receptores glicoconjugados da superfície das membranas com uma maior afinidade quando na forma tetramérica (DELATORRE *et al.*, 2006).

1.1.6 *Canavalia virosa*

Canavalia virosa é uma planta pertencente à família *Leguminosae*, subtribo Diocleinae. É uma planta herbácea e trepadeira, é bianual ou perene, tem ocorrência em regiões tropicais na África, Austrália, Ásia e muitas ilhas do Pacífico. É utilizada na alimentação humana e animal e é considerada rica em proteínas e carboidratos, suas características de crescimento rápido, resistência a pesticidas e tolerância a habitats desfavoráveis como: solos secos, arenosos e salinos são favoráveis no uso desta planta. Outros usos dessa planta são: adubação verde, uso em pastagens, fitoterápico, ou como adorno (SEENA; SRIDAR, 2006). Uma imagem da planta e das sementes é mostrada na figura 5.

A lectina de sementes de *Canavalia virosa* foi purificada e caracterizada parcialmente por Osterne *et al.* (2014). A lectina denominada ConV foi isolada em Manose-Sepharose, demonstrou perfil eletroforético semelhante a lectinas do mesmo gênero. Apresentou atividade hemaglutinante com sangue de coelho e foi inibida pelos açúcares: D-manose, D-glicose, α-metil-D-manosídeo e pelas glicoproteínas: fetuína de soro fetal bovino e ovalbumina de clara de ovo. As propriedades físico-químicas de ConV se mostraram bastante semelhantes a outras lectinas de Diocleinae. Algumas aplicações biológicas foram testadas, como o efeito vasorelaxante de músculo liso e a imobilização da lectina. ConV mostrou possuir efeito relaxante no modelo de anéis de aorta e também demonstrou potencialidade para estudos de glicômica devido a sua capacidade de capturar glicoproteínas em solução.

Reino: *Plantae*

Filo: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Leguminosae*

Tribo: *Phaseoleae*

Subtribo: *Diocleinae*

Gênero: *Canavalia*

Espécie: *Canavalia virosa*

Figura 5 - Planta e sementes de *Canavalia virosa*.



Fonte: <http://www.biolib.cz/en/image/id51780/>
<http://www.natureloveyou.sg/Canavalia%20cathartica/Main.html>
 Acesso em: 20/01/2015 as 23:53

1.1.7 Atividades biológicas / Aplicações biotecnológicas de lectinas

As lectinas são proteínas com uma grande aplicabilidade em biotecnologia e a grande maioria dessas aplicações depende da interação da lectina com algum componente glicosídico.

Algumas das aplicações das lectinas são: o uso de lectinas tóxicas, por exemplo a Ricina e a Abrina, em combinação com anticorpos monoclonais específicos e aplicados como immunotoxinas na terapia do câncer (OLSNES, 2004; SŁOMIŃSKA-WOJEWÓDZKA; SANDVIG, 2013); como ferramentas de investigação de receptores celulares glicosilados de microorganismos, plantas e animais superiores (FRANZ, *et al.*, 2006; MURSHID *et al.*, 2011); tipagem e identificação de microorganismos como: bactérias, fungos e protozoários (LIS; SHARON, 1986; SAHLY *et al.*, 2007). Uma outra aplicação das lectinas diz respeito ao seu uso para tipagem sanguínea onde se utilizam lectinas específicas para grupos sanguíneos diferentes, visando a identificação desse grupo (SHARON; LIS, 2004), tornando-as ferramentas muito úteis em bancos de sangue. Outras atividades/aplicações das lectinas são: atividade inseticida (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; ROY *et al.*, 2014), atividade anti-fúngica (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011; KLAFFKE *et al.*, 2013), bactericida e anti-

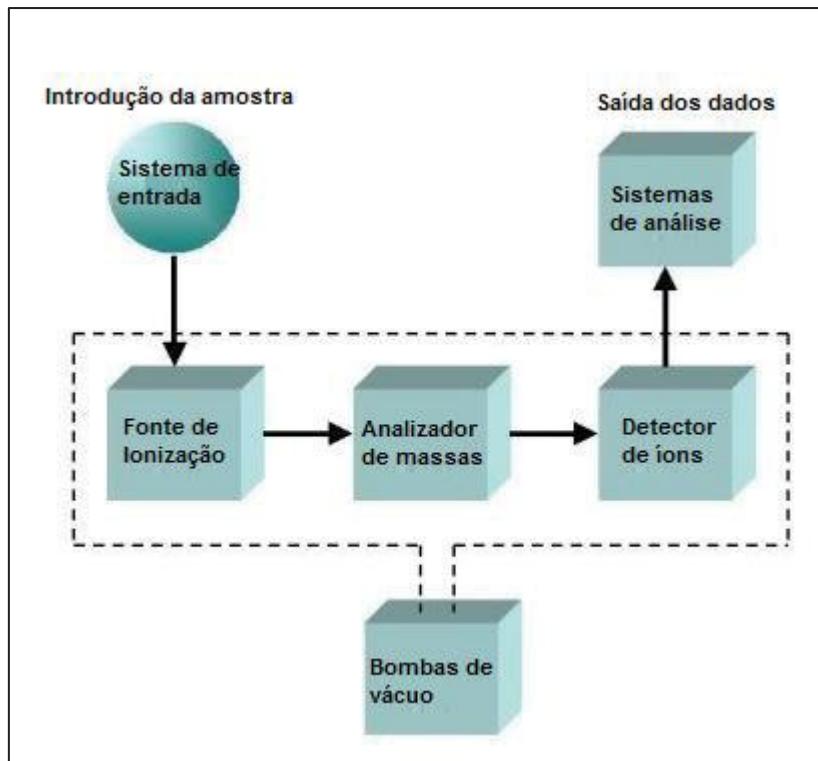
biofilmes (CARVALHO *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2015), lectinas com efeito no processo inflamatório (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2014), lectinas com efeito vasorelaxante (ALVES *et al.*, 2015; BARROSO-NETO *et al.*, 2014), lectinas usadas para mapeamento e diagnóstico do câncer (PRATT; ROY; ANNABI, 2012; YAU *et al.*, 2015), lectinas imobilizadas em matrizes visando seu uso para captura de glicoproteínas e glicoproteômica (ALVES *et al.*, 2015; OSTERNE *et al.*, 2014; PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013), etc. Recentemente, também é possível se encontrar o uso dessas moléculas em nanobiotecnologia visando o seu uso terapêutico ou em pesquisa (CHO *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2010).

1.2 Espectrometria de massas (MS)

Hoje em dia, espectrômetros de massas são instrumentos bem estabelecidos para análise proteômica de amostras. Eles produzem íons dos compostos a serem analisados e separam esses íons de acordo com a relação massa/carga (m/z) dos mesmos. A espectrometria de massas é uma técnica extremamente versátil e sensível e devido a isso se tornou bastante importante em diversas áreas das Ciências Biológicas, Médicas e da Tecnologia. Algumas das aplicações em proteômica são: determinação da massa molecular das proteínas, quantificação, identificação e elucidação de sua estrutura primária.

Um espectrômetro de massas é formado por três componentes: uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector e todos esses componentes trabalham em conjunto para permitir a obtenção dos dados. Um esquema dos componentes de um espectrômetro de massas é mostrado na figura 6.

Figura 6 - Esquema dos componentes de um espectômetro de massas.



Fonte: Adaptado de: http://www.labspaces.net/blog/1225/quick_and_dirty_intro_to_mass_spectrometry
 Acesso em: 21/01/2016 as 02:13

1.2.1 Fonte de Ionização

É na fonte de ionização que os analitos são ionizados. As duas principais formas de ionização branda que produzem íons moleculares estáveis de biomoléculas grandes são a ionização por eletrospray (ESI) e Ionização/Dessorção Laser assistida por matriz (MALDI), sendo estas as duas fontes de ionização utilizadas para proteínas (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

1.2.1.1 Ionização por eletrospray (ESI)

Durante a ionização por ESI, a solução do analito contendo proteínas/peptídeos é forçada por entre um capilar onde um alto potencial é aplicado. O alto potencial faz com que a solução emergente se disperse em um fino spray de gotículas carregadas. Essas micro-gotas evaporam rapidamente até que o número de cargas em sua superfície se torne muito alto de forma que elas explodem formando micro-gotas ainda menores. O processo continua até que o íon do analito escape da gota, o que é chamado de dessorção do íon. Esta fonte de ionização gera íons multicarregados. Como o ESI gera íons a partir de solução ele é facilmente acoplado

a um sistema de cromatografia líquida que separa as proteínas (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

1.2.1.2 Ionização/Dessorção a Laser assistida por Matriz (MALDI)

A ionização por MALDI é um processo baseado na capacidade de um composto matriz de absorver luz ultravioleta (UV). Em um primeiro passo, a matriz e a amostra são misturados em um solvente apropriado e colocados em uma placa de MALDI. Após a evaporação do solvente, são obtidas moléculas do analito co-cristalizadas incorporadas nos cristais de matriz. Quando um laser é aplicado nos cristais, a matriz absorve a energia e vaporiza parcialmente carreando moléculas intactas do analito para a fase gasosa. Durante a expansão da chamada pluma de MALDI, são trocados prótons entre os analitos e as moléculas de matriz, resultando na formação de moléculas de analito carregadas positivamente ou negativamente (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

1.2.2 Analisadores de massa e Detectores

Os analisadores de massa separam os íons de acordo com a relação massa/carga dos mesmos. Isso é conseguido através da geração de campos elétricos ou magnéticos dentro do instrumento. Esses campos separam os íons influenciando suas trajetórias espaciais, velocidade ou direção. Os quatro tipos básicos de analisadores utilizados em proteômica são: *ion trap*, *Fourier Transform Ion Cyclotron*, tempo de voo (TOF) e quadrupolo. Eles diferem em design e performance, cada um com suas vantagens e desvantagens (HAN; ASLANIAN; YATES, 2008). Dentre os quatro citados o quadrupolo e o tempo de voo são os mais utilizados. Analisadores quadrupolo são formados por quatro hastes e são capazes de separar os íons utilizando campos elétricos variáveis geradas alternando a voltagem nessas hastes. Essa variação permite uma trajetória estável apenas para íons de uma m/z desejada. Íons que não estejam dentro da faixa escolhida ficam presos na estrutura do quadrupolo e não conseguem chegar ao analisador devido a isso analisadores quadrupolos também são considerados filtros de massa. Analisadores TOF são mais simples, eles consistem essencialmente de um tubo de voo em alto vácuo. É aplicada uma quantidade de energia nos íons e o tempo de voo do íon no tubo é calculado, esse tempo é proporcional a massa dos íons de forma que permite o cálculo da massa dos íons. O caminho dos íons no tubo pode ser revertido e aumentado utilizando um espelho eletrostático (*Reflectron*) para refletir íons até o fim do percurso. O *reflectron* pode

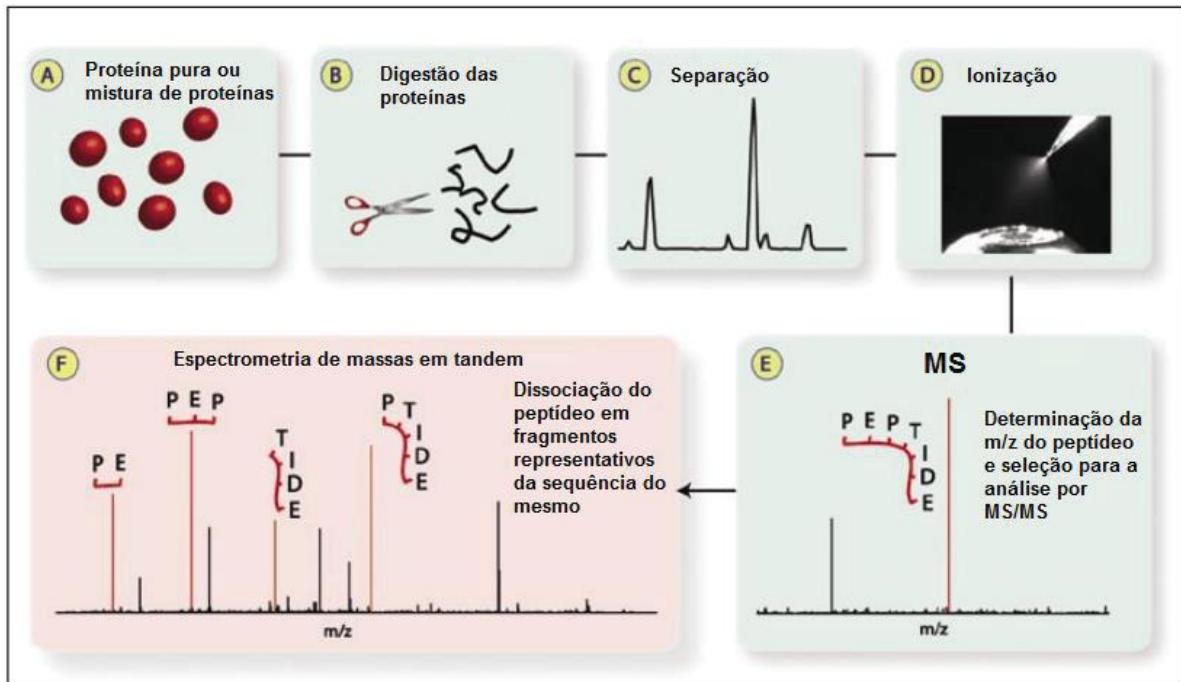
compensar a pequena diferença de energia cinética entre eles permitindo uma penetração mais funda dos íons mais rápidos aumentando, desta forma, a resolução. Instrumentos TOF tem alta sensibilidade, resolução e precisão (HAN; ASLANIAN; YATES, 2008; HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

Detector: o detector registra a relativa abundância de íons de cada m/z. A medida resultante é chamada de espectro de massas e consiste de uma plotagem da abundância do íon pela sua razão m/z (HAN; ASLANIAN; YATES, 2008; HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

1.2.3 Espectrometria de massas em tandem

Espectrometria de massas em tandem é um tipo de técnica especializada de MS que permite o sequenciamento de peptídeos. É dita “em tandem” porque os espectrômetros de massas utilizados nessa técnica contêm pelo menos dois analisadores, por esse motivo esta técnica é chamada também de MS/MS. Primeiramente uma amostra contendo a(s) proteína(s) de interesse são digeridas por proteases ou outros compostos, posteriormente essa amostra passa por um processo de separação que geralmente é realizado por cromatografia líquida, as amostras que saem do processo de purificação entram no espectrômetro onde são ionizadas. Íons do peptídeo de interesse são primeiramente selecionados em um escaneamento inicial para a seleção de um precursor, tipicamente, o computador controlando o espectrômetro automaticamente seleciona aqueles íons mais abundantes. Esses íons chamados de precursores ou parentais são isolados e submetidos a colisões energéticas com o objetivo de induzir fragmentação do peptídeo, essa dissociação induzida por colisão (CID) dos peptídeos resulta em uma quantidade de produtos iônicos estruturalmente significativos que serão analisados e a m/z de todos eles serão determinados. Na maioria dos casos, a ligação peptídica é clivada entre o carbono da carbonila e o nitrogênio da amida. Se a carga permanece no fragmento N-terminal o íon é chamado íon-b mas se a carga permanecer no fragmento C-terminal ele é chamado íon-y. Tendo-se os valores de m/z e as intensidades dos íons b e y juntamente com a m/z do íon precursor, a sequência do peptídeo pode ser determinada por bioinformática (COON *et al.*, 2005; HOFFMAN; STROOBANT, 2007). Um resumo do processo é mostrado na figura 7.

Figura 7 - Esquema do processo de sequenciamento de proteínas por espectrometria de massas em tandem (MS/MS).



Fonte: Adaptado de Coon *et al.*, 2005

Alguns exemplos do uso dessa técnica para lectinas são: determinação da estrutura primária de lectinas (BARROSO-NETO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2015); determinação de massa intacta (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014; OSTERNE *et al.*, 2014); determinação da sequência de glicanos em lectinas glicosiladas (CALVETE *et al.*, 1998; CHAMBERLY *et al.*, 2008).

1.3 Cristalografia de proteínas

A cristalografia de raios X é atualmente a metodologia padrão para a resolução da estrutura de proteínas. Essa técnica surgiu devido aos estudos de Max Perutz e John Kendrew, que foram agraciados com o prêmio Nobel de física pela resolução da estrutura da mioglobina e hemoglobina. Hoje, a evolução da bioinformática e a disponibilidade de equipamentos capazes de produzir feixes extremamente colimados de raios X tem permitido um avanço enorme na biologia estrutural. Essa evolução pode ser vista pela quantidade enorme de proteínas depositadas no PDB (AZEVEDO, 2004; PEREIRA JÚNIOR, 2014). Mas apesar dos avanços a cristalografia ainda possui algumas dificuldades inerentes da própria técnica, sendo a principal delas a cristalização das proteínas.

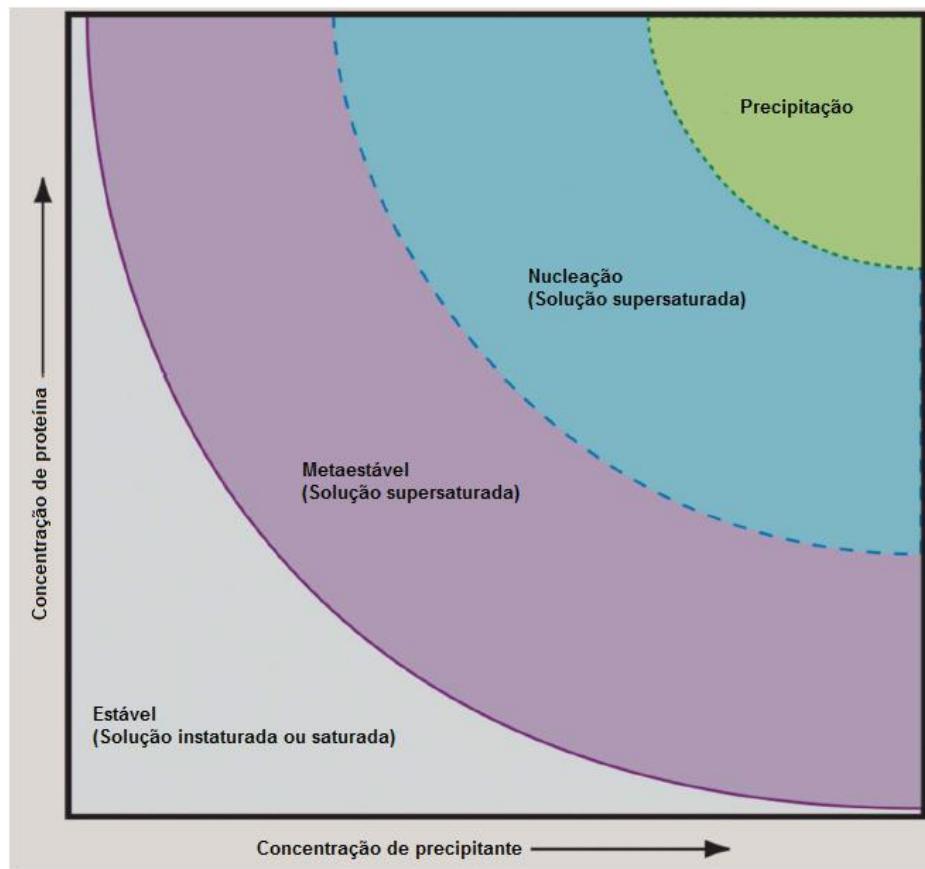
A cristalização é um passo limitante na cristalografia de proteínas. Os princípios para a cristalização de proteínas são análogos aos de moléculas pequenas, porém existem muitas diferenças entre cristais de moléculas pequenas e cristais de proteínas. Em geral cristais de moléculas pequenas crescem até relativamente grandes dimensões (1 – 100 cm), eles são fisicamente duros, fáceis de manusear, possuem propriedades óticas fortes e podem difratar raios X intensivamente. Isso ocorre porque estes cristais exibem fortes interações entre as camadas e arranjos altamente ordenados no cristal. Em comparação, cristais de proteínas são geralmente menores em tamanho (1 – 1000 μ m), esmagados sem dificuldade e possuem interações cristalinas fracas. Estes tipos de cristais, que redissolvem se ocorrer desidratação, possuem propriedades óticas fracas e difratam raios X fracamente (MCPHERSON; GAVIRA, 2014). Eles também são sensíveis a temperatura, o que se deve ao fato de a solubilidade das proteínas alterarem em função da temperatura. Em teoria, com o aumento da temperatura, a solubilidade das proteínas aumenta e, devido a isso, não se formam cristais ou os cristais formados redissolvem. Quando os cristais de proteína são expostos a radiação raios X por um tempo longo, ocorre um dano extensivo, isso ocorre devido as interações fracas entre as camadas na estrutura do cristal ou danos químicos nas moléculas proteicas (BENEVIDES, 2011). Devido a esses fatores todas as condições de crescimento, transporte e difração dos cristais de proteína têm que ser finamente controladas, em geral para evitar danos aos cristais a difração é realizada a 100 K.

A cristalização de proteínas a partir da solução é um fenômeno de equilíbrio reversível que ocorre em três estágios: nucleação, crescimento e cessação do crescimento. A formação dos cristais ocorre devido a diminuição da energia livre do sistema enquanto a formação de muitas ligações químicas simultaneamente compensa a diminuição da entropia e permite o surgimento e o crescimento de uma estrutura altamente organizada. Em outras palavras, a energia livre do sistema é reduzida a um mínimo e uma força termodinâmica direciona o processo de ordenamento dos cristais (MCPHERSON; GAVIRA, 2014; MCPHERSON, 1990).

A estratégia básica para a produção de cristais de proteína é a geração de certo grau de supersaturação na solução. No ponto de equilíbrio, a quantidade de moléculas de proteínas entrando na solução é a mesma quantidade das moléculas saindo da solução. Isso é chamado de limite de solubilidade da proteína. Se a concentração de proteína está abaixo desse limite a solução está insaturada e acima desse limite está saturada. Cristais podem crescer apenas se a solução está acima desse limite. Diminuir a solubilidade é o meio mais efetivo de criar a supersaturação. Esse processo pode ser conseguido por diferentes abordagens incluindo: alterar

o pH do meio, alterar a temperatura, concentração de proteína, etc (MCIPHERSON; GAVIRA, 2014). O processo de cristalização pode ser ilustrado pelo diagrama de fases, digrama que relaciona a concentração de proteína com a concentração do agente precipitante. Esse diagrama é dividido em uma região de instaturação/saturação e uma região de supersaturação. A região de supersaturação, por sua vez, é dividida nas regiões: metaestável, nucleação e precipitação. Na região de nucleação poderá ocorrer a formação de núcleos cristalinos, mas não ocorrerá crescimento dos cristais; na região metaestável tanto a nucleação quanto o crescimento poderão ocorrer e na região de precipitação o mais provável é que não ocorra nucleação e/ou crescimento de cristais, nessa região a proteína provavelmente precipitará. Para a cristalização espera-se que o experimento inicie na zona de nucleação e, com o avanço do processo, passe para a região metaestável permitindo o processo de nucleação e de crescimento do cristal (MCIPHERSON; GAVIRA, 2014). O diagrama de fases é mostrado na figura 8.

Figura 8 - Diagrama de fases para a cristalização de macromoléculas



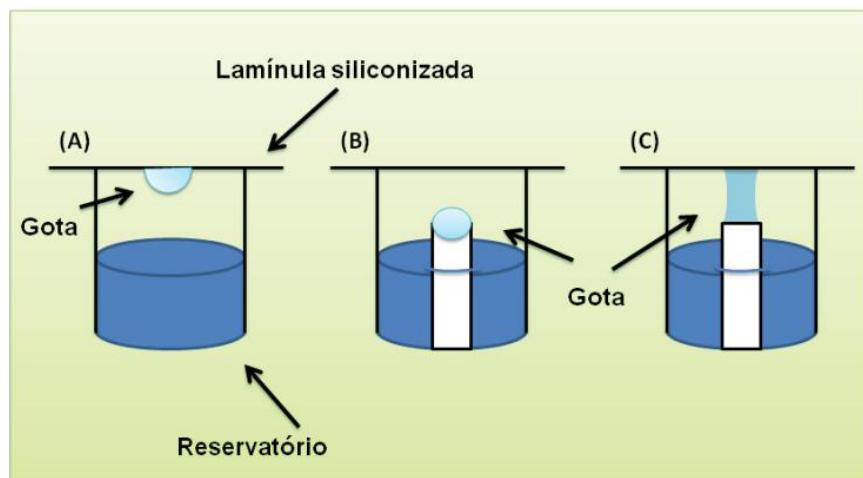
Fonte: Adaptado de McPherson e Gavira (2014).

O processo de cristalização é influenciado por um grande número de fatores, e cada proteína é única. Os vários parâmetros que afetam a cristalização são interdependentes e a

relação entre eles é complicada e difícil de distinguir (MCPHERSON; GAVIRA, 2014; MCPHERSON, 1990). Encontrar a condição ideal para a cristalização de uma proteína não é uma tarefa simples. A única forma de se fazer isso é identificar os componentes importantes e refiná-los individualmente.

O método mais utilizado para a cristalização de proteínas atualmente é o método de difusão de vapor. Uma gota contendo a proteína a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota seja igual à pressão de vapor do reservatório. Uma vez que o equilíbrio ocorre através da troca de vapor de água (da gota para o reservatório), o volume da gota diminui e há um aumento das concentrações de todos os constituintes da gota de cristalização o que permite o surgimento de uma condição de superstaturação. A técnica de difusão de vapor é a ideal para a varredura de um amplo espectro de condições de cristalização e para otimizar o tamanho dos cristais (DESSAU; MORDIS, 2011; MCPHERSON; GAVIRA, 2014). Os três principais métodos para cristalização de proteínas por difusão de vapor são: gota suspensa, gota sentada e gota sanduíche (Figura 9).

Figura 9 - Representação esquemática dos três métodos de difusão de vapor para cristalografia de macromoléculas. A) Gota suspensa, B) Gota sentada e C) Gota sanduíche.



Fonte: Retirado de Balliano (2010).

Os avanços na tecnologia do DNA recombinante permitiram a produção de proteínas com alto grau de pureza. Devido a isso a cristalização de proteínas tinha uma grande demanda. Com o advento de *screens* comerciais os experimentos de cristalização cobrindo uma

grande quantidade de condições se tornaram bem mais simples. A abordagem de matriz esparsa é a mais popular e vem sendo comercializada por várias marcas. Esse *screen* contém numerosas condições com diferentes tipos de agentes precipitantes, concentrações de precipitantes, tampões, pHs e sais. Uma vez que as condições iniciais foram encontradas, o próximo passo é otimizar as condições de cristalização para a obtenção de melhores cristais quanto ao tamanho e forma (WOOH *et al.*, 2003; JANCARIK; KIM, 1991). Uma outra estratégia que pode ser utilizada é o *seeding* que se baseia em facilitar a cristalização através da adição de núcleos de cristais pré-formados (STEWART *et al.*, 2011; THALLER *et al.*, 1981).

Após a obtenção do cristal se segue com a difração do mesmo por raios X. A qualidade desse passo depende bastante do cristal e da fonte de radiação utilizada. É nesta etapa que ocorre a caracterização dos cristais através da definição de seus parâmetros de rede e sua simetria. O conhecimento das amplitudes e das fases permite a reconstituição da densidade eletrônica do cristal. Quando um cristal é colocado em um feixe de raios X, a densidade eletrônica de cada átomo do cristal interage com a radiação, dispersando-a em todas as direções do espaço. É a presença de uma rede cristalina que amplifica a radiação somente em determinadas direções, dando origem ao padrão de difração característico. As bases matemáticas e geométricas do processo de espalhamento foram feitas por Bragg, Laue e Ewald no início do século. O cristal é girado em torno de um eixo geralmente perpendicular ao feixe de raios X e os raios difratados são coletados em um detector capaz de gravar um grande número de pontos (spots) em um tempo de aquisição bem curto. Cada imagem corresponde a uma rotação de 0,2-1° grau e pode ser considerada uma "fatia" do espaço recíproco. A posição de uma reflexão contém as informações sobre a geometria do grupo espacial e da rede cristalina, enquanto que a intensidade I medida depende da distribuição da densidade eletrônica na unidade assimétrica. Logo no início do processo, após a obtenção de algumas imagens, através de programas que realizam indexação de imagens é possível determinar o grupo espacial, dimensões e orientação da célula unitária e estimar a mosaicidade, isso é necessário para definir a estratégia de coleta dos dados (SMYTH; MARTIN, 2000; WLODAWER *et al.*, 2013).

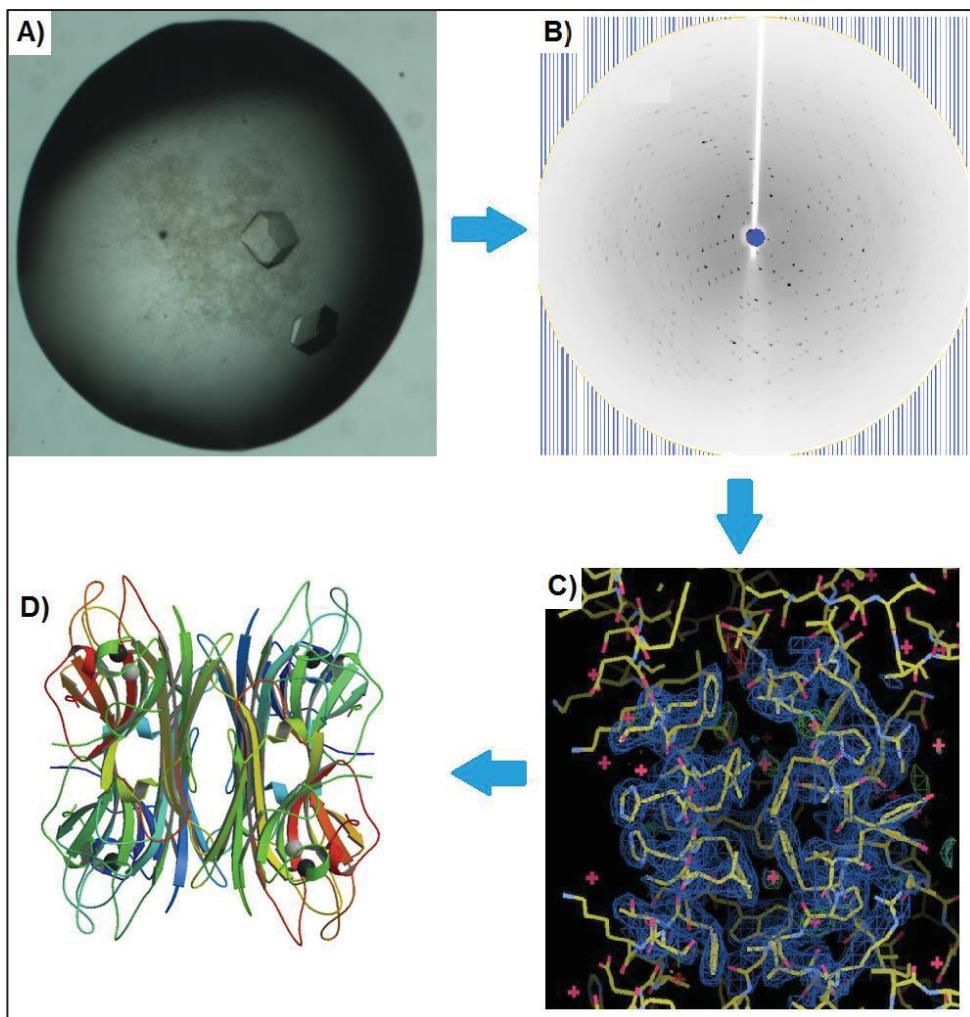
Durante o processo de difração é possível medir a amplitude de cada reflexão, mas não sua fase correspondente, que é invariavelmente perdida durante o experimento de difração, ou seja, toda a informação angular é perdida. Isso é chamado de "problema da fase" (LI; HE; ZHANG, 2015; WLODAWER *et al.*, 2013). Existem diferentes métodos criados para resolver esse "problema". A técnica mais utilizada para esse fim é a substituição molecular que se baseia no princípio de que macromoléculas que apresentam alta homologia sequencial tendem a se enovelar de forma similar, e desta forma, uma proteína já resolvida serve como modelo inicial

para a obtenção de um conjunto de fases que será subsequentemente refinado (ABERGEL, 2013; WLODAWER *et al.*, 2013).

Uma vez que o modelo preliminar foi conseguido o próximo passo é o refinamento das posições atômicas, ou seja, encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da molécula e sua estrutura real. O acompanhamento da qualidade do modelo é analisado pelo Rfactor, que é um fator de correlação entre o modelo atual e o modelo real (HOLTON *et al.*, 1992; MURSHDOV *et al.*, 2011). Uma estrutura com resolução menor que 2,0 Å está considerada resolvida quando o valor do Rfactor atingir valores menores ou igual a 20%. Um outro fator importante é o Rfree que é uma pequena porcentagem das reflexões que são excluídas do refinamento e utilizadas como um teste para verificar se não houve superrefinamento da estrutura, em geral a diferença entre o Rfactor e o Rfree não deve ultrapassar 5% (KARPLUS; DIEDERICHS, 2015; MORRIS *et al.*, 2014).

O último passo é a validação do modelo quanto aos parâmetros estruturais. Esses programas realizam análises das distâncias ideais entre as ligações, os ângulos de ligação, os ângulos diédricos e os contatos de Van der Waals, usando para isso a comparação com proteínas modelos. Uma das saídas destes programas é o diagrama de Ramachandran, que afere as medidas dos ângulos diédricos Φ e Ψ e é um bom indicador da qualidade do modelo (COOPER *et al.*, 2012; HOLLINGSWORTH; KARPLUS, 2011; WLODAWER *et al.*, 2013). Um resumo do processo de cristalografia de proteínas é mostrado na figura 10.

Figura 10 - Etapas da cristalografia de raios X de proteínas.



Fonte: Produzida pelo autor. A) Cristalização, B) Difração de cristal e obtenção do padrão de difração, C) Resolução da estrutura por bioinformática e D) Estrutura tridimensional (Ex: ConM PDB 2CWN).

Atualmente, diversas lectinas tiveram sua estrutura tridimensional determinadas por cristalografia de raios X (BARROSO-NETO *et al.*, 2014; BARROSO-NETO *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2014).

1.4 Docking molecular e screening virtual

O docking molecular (DM) é uma ferramenta computacional muito aplicada em projetos de *drug discovery* e em estudos de interações de proteínas com ligantes. Tradicionalmente, o docking molecular é utilizado para abordar uma das seguintes aplicações: 1) dada uma molécula de um ligante e um receptor proteico, fazer a predição do modo de ligação do ligante com o receptor, 2) realizar uma varredura de uma coleção de moléculas pequenas com um receptor e fazer um *ranking* de acordo com a probabilidade de ligação com o mesmo e 3) dada uma molécula de um ligante e um receptor alvo, predizer a afinidade de ligação entre

os dois. A orientação assumida pelas moléculas em um complexo depende da complementaridade em tamanho, forma, distribuição de cargas, polaridade e potencial de interações, e da afinidade entre as moléculas (POLANSKI; KIMMEL, 2007). A simulação geralmente é realizada utilizando-se um algoritmo capaz de prever o modo ideal de ligação entre o ligante e o sítio de ligação de uma molécula alvo. No *docking*, usualmente a estrutura do receptor permanece rígida e várias posições de possíveis para o ligante são identificadas pelo software (COLEMAN *et al.*, 2013; POLANSKI; KIMMEL, 2007).

Essa técnica permite realizar a triagem de grandes bibliotecas de compostos, avaliando afinidade e a especificidade a partir de propriedades estruturais e químicas, como tamanho, geometria, distribuição de cargas, polaridade e potencial de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. O objetivo da triagem de bancos de possíveis ligantes é identificar compostos que se ligam a uma proteína alvo. Dessa forma, a reação bioquímica que a proteína alvo realiza pode ser alterada, permitindo a descoberta de possíveis ferramentas médicas e/ou biotecnológicas (ROCHA, 2011). Atualmente, o acesso via internet a banco de dados de estruturas de proteínas, como o PDB, e de grandes bibliotecas de pequenas moléculas comercialmente acessíveis, como o ZINC database (IRWIN; SHOICHET, 2005) fornecem um grande número de possíveis novos ligantes. Uma vez que esses ligantes forem testados *in silico* eles podem ser comprados ou sintetizados para teste *in vitro* e/ou *in vivo*, agilizando desta forma a pesquisa farmacêutica e de biotecnologia (SHOICHET, 2005). Essa abordagem de se testar uma grande quantidade de compostos por meio de *docking* molecular é chamada de screening virtual.

Análises de DM podem permitir a localização de sítios de ligação em proteínas, locais de ligação de drogas, análises de ligação entre lectinas e carboidratos, medida da força das interações entre as moléculas. Além disso é possível verificar como alterações estruturais podem afetar a ligação da proteína com os ligantes, por meio análises comparativas com moléculas mutadas (REGO, 2012).

O *docking* de moléculas com possíveis ligantes segue uma ordem. Primeiramente se faz a separação dos prováveis sítios de ligação, depois disso se faz a sobreposição destas regiões e por meio de análises estatísticas e funções de pontuação tenta-se obter os complexos mais próximos do que ocorre experimentalmente. A análise dos encaixes é dada pontuando-se a formação de cada complexo. A partir desta pontuação é realizada uma análise comparativa, em que cada complexo formado é avaliado e ao final eles são posicionado em um *ranking* (SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al.*, 2012; SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al* 2005).

O *docking* molecular vem sendo bastante aplicado no estudo com lectinas no objetivo de buscar estruturas glicídicas capazes de se ligar as lectinas de interesse. Alguns exemplos de aplicação dessa técnica são: uso do DM na lectina de *Dolichos lablab* para análise de interação entre a proteína e oligomanosídeos (TEIXEIRA *et al.*, 2014), busca de ligantes para lectinas de bactérias (TOPIN *et al.*, 2013) e para análise da forma de interação das lectinas de *Yucca fialamentosa* e *Arum maculatum* com ácido siálico (XU *et al.*, 2012).

1.5 Aspectos gerais do processo inflamatório

A inflamação pode ser definida como um evento localizado e protetor elicitado por injúria ou outros traumas que serve para destruir, diluir ou repelir tanto o agente nocivo quanto o tecido injuriado. A resposta inflamatória é desencadeada por sinais químicos liberados por tecidos ou células do sistema imune (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004). Os sinais clínicos que caracterizam um processo inflamatório são: calor, tumor, rubor, dor e perda de função. Os processos inflamatórios podem ser divididos em crônicos e agudos dependendo do tempo de duração e das características patológicas. A inflamação aguda apresenta curta duração (horas a dias) enquanto a inflamação crônica pode durar semanas, meses ou até mesmo anos, este último caracteriza-se pela presença do processo inflamatório simultaneamente com a tentativa de reparo tecidual com consequente destruição do tecido e formação de fibrose (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015, PIRES, 2011).

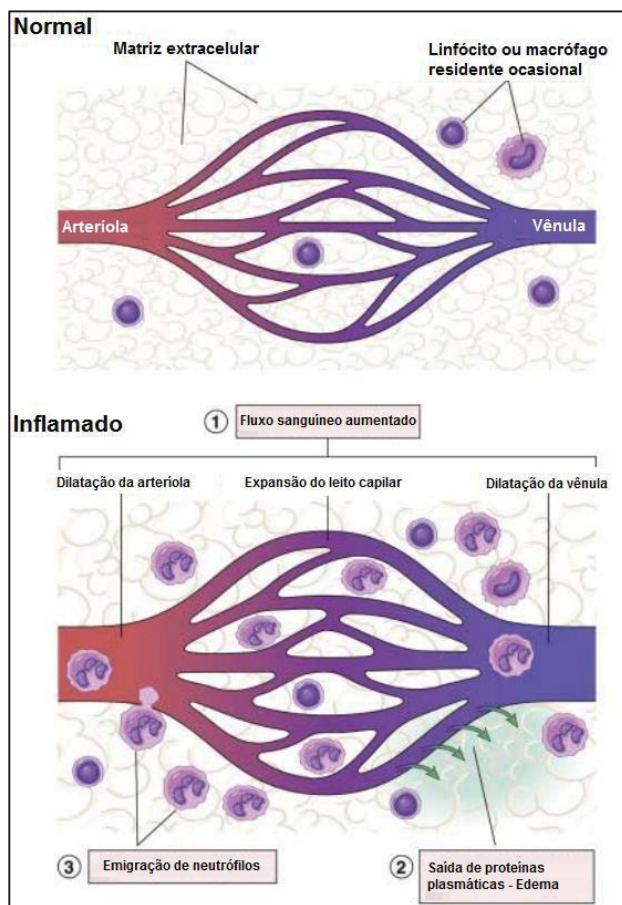
O processo inflamatório, atualmente, é caracterizado por um número de traços que incluem: vasodilatação que leva a vermelhidão, aumento da permeabilidade vascular que gera o inchaço nos tecidos (edema), dor, recrutamento de leucócitos nos tecidos e alteração da função tecidual (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004).

Durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como o óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, promovem principalmente vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004). A vasodilatação é uma das primeiras mudanças físicas em resposta ao estímulo inflamatório. Nesse processo ocorre uma mudança conformacional do endotélio o que desencadeia dois eventos importantes: o aumento do leito dos capilares, promovendo maior aporte sanguíneo e levando à vermelhidão e ao calor locais; e aumento da permeabilidade vascular, que ocorre por contração das células endoteliais pós-capilares (MAJNO; PALADE, 1961) e pela abertura de canais intracelulares nas próprias células endoteliais (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997). Este último permite a saída de fluído

plasmático rico em proteínas do interior dos vasos para o interstício e a presença de proteínas plasmáticas no tecido, como a albumina, provoca um aumento da pressão intersticial que leva a um maior extravasamento de plasma.

Dependendo do volume de líquido extravasado e da eficiência do sistema de drenagem linfática, pode ocorrer um aumento no volume local: o edema (CARNEIRO, 2009). O edema ocorre justamente devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de substâncias vasoativas como histamina, bradicinina, leucotrienos, produtos da ativação do complemento e da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamado (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004, PIRES, 2011). Alguns desses processos são mostrados na figura 11.

Figura 11 - Alterações vasculares e celulares induzida pelo processo inflamatório.



Fonte: Adaptado de Kumar; Abbas e Aster (2015)

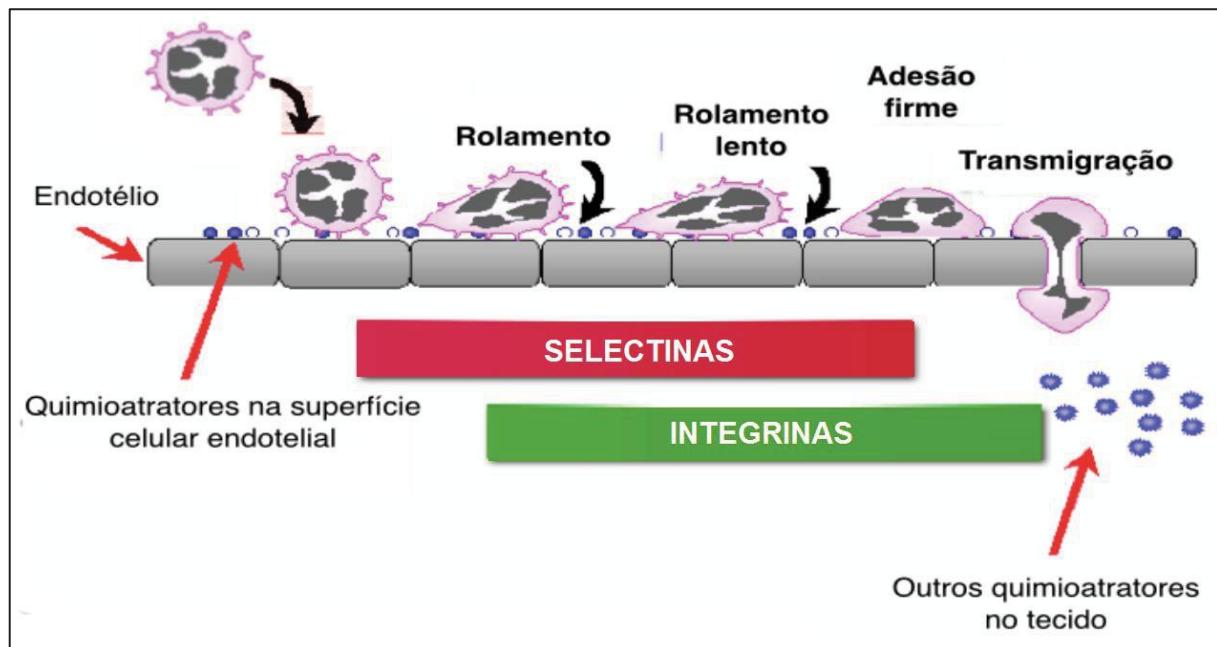
Uma das funções principais da inflamação é recrutar os leucócitos diretamente ao local da injúria. Essas células de defesa atuam no processo inflamatório fagocitando os agentes agressores, impedindo o crescimento de um eventual microorganismo patogênico, removendo restos celulares da área afetada, degradando o tecido necrótico e iniciando a reparação tecidual (FORD-HUTCHINSON, 1992). O extravasamento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido perivascular (diapedese) ocorre através de três passos coordenados: rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão firme às células endoteliais e a transmigração para o sítio de injúria (SPRINGER. 1995). Os eventos iniciais de migração são mediados pelas moléculas chamadas selectinas. Entre essas moléculas destacam-se a E-selectina e a P-selectina presentes no endotélio ativado e em plaquetas e a L-selectina, presentes constitutivamente nos leucócitos. O papel desta classe de moléculas de adesão é formar ligações de baixa afinidade entre os leucócitos e a parede endotelial, diminuindo a velocidade destas células dentro das vênulas e promovendo a etapa de captura e rolamento (SPRINGER, 1995, PIRES, 2011).

Estruturalmente as selectinas apresentam um domínio N-terminal semelhante ao domínio lectínico que é responsável por sua propriedade adesiva, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico, um número variável de repetições consenso de uma sequência encontrada em proteínas reguladoras do sistema complemento, um domínio transmembrana e uma curta causa citoplasmática (ROSSITER; ALON; KUPPER, 1997).

Enquanto os leucócitos rolam sobre o endotélio movidos pela força do fluxo sanguíneo, eles são ativados por quimiocinas e outros fatores atraentes, mudando seu padrão de expressão de receptores de superfície tanto para estas substâncias, como para as moléculas de adesão (VIDEM; STRAND, 2004). Como consequência da ativação, ocorre uma redistribuição das integrinas leucocitárias, seguindo-se uma mudança conformacional nas mesmas, facilitando assim a aderência firme às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, expressas no endotélio ativado. O aumento da aderência leva a uma diminuição do rolamento dos leucócitos, fazendo com que os mesmos parem, apesar do fluxo sanguíneo contínuo. Após a firme fixação ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrente do fluxo sanguíneo aumentando-se, desta forma a área de contato com a superfície endotelial vascular. Firmemente aderidos ao endotélio, os leucócitos iniciam então o processo de transmigração do espaço intra para o extravascular através das junções endoteliais. Após o extravasamento, os leucócitos emigram nos tecidos em direção à região injuriada através de um processo denominado de quimiotaxia ou locomoção através de um gradiente químico. A inflamação aguda finaliza-se com a resolução de todos os eventos do processo inflamatório e retorno do tecido lesionado à

normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY *et al.*, 2004, PIRES, 2011; ADEREM; SMITH, 2004). Este processo é mostrado na figura 12.

Figura 12 - Emigração de leucócitos para o local da injúria, são mostradas as etapas de rolamento, adesão e transmigração.



Fonte: Adaptado de Kumar; Abbas e Aster (2015)

Em geral, muitas lectinas da tribo *Diocleinae* possuem algum efeito na inflamação, podendo ser pró- e/ou anti-inflamatórias dependendo da via de aplicação. Por exemplo, quando aplicadas por via sistêmica algumas delas inibem o edema de pata induzido por carragenina, sendo, portanto, são anti-inflamatórias por essa via (ASSREUY *et al.*, 1997). Quando as lectinas são aplicadas por via local a resposta tende a ser mais estimulatória da inflamação, tendo-se como exemplo as lectinas de *Canavalia oxyphylla* e de *Dioclea reflexa* que induzem edema, sendo consideradas pró-inflamatórias por via local (SANTIAGO *et al.*, 2014, PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015).

1.6 Câncer, autofagia e gliomas

1.6.1 Cancer

O termo câncer inclui diferentes patologias que tem como características comuns: desregulação na divisão celular, perda da capacidade de diferenciação das células, aumento da sobrevivência celular e aumento da capacidade de migração celular (CORNER; BAILEY,

2008). A tumorigênese em humanos é um processo complexo que reflete alterações genéticas que direcionam uma transformação progressiva de células normais em derivativos altamente malignos (TABASSUM; POLYAK, 2015).

O processo pelo qual células normais se transformam progressivamente em células tumorais pode ser resultado de processos endógenos como erros na replicação do DNA, a instabilidade química intrínseca de algumas bases do DNA, a perda de heterozigose ou um ataque de radicais livres gerados durante o metabolismo. Danos ao DNA também podem ser resultado de interações com agentes exógenos como radiações ionizantes, radiação UV e/ou carcinogênicos químicos (BERTRAM, 2000). As células possuem mecanismos para reparar tais danos, mas, por várias razões erros podem ocorrer e, com isso, mutações no genoma dessas células (BERTRAM, 2000).

A transição de célula normal para tumoral envolve a participação de genes envolvidos em mecanismos de homeostase que controlam a proliferação e morte celular. Se essas mudanças e mutações induzem a ativação de genes que estimulam a proliferação ou protegem a célula da morte, esses genes são referidos como protooncogenes. Se mutações inativam genes que normalmente inibem a proliferação, esses genes são referidos como supressores de tumor (CHIAL, 2008; ZHU *et al.*, 2015).

As marcas do câncer são seis capacidades adquiridas durante o processo de desenvolvimento dos tumores. Elas incluem a manutenção de sinalização proliferativa, evasão dos supressores proliferativos, resistência a morte celular, ativação da imortalidade replicativa, indução de angiogênese e capacidade de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

1.6.2 Gliomas

Gliomas malignos são os tumores cerebrais primários mais comuns. Os gliomas mais comuns incluem astrocitomas, oligodendrocytomas, ependimomas e glioblastomas. Mesmo que relativamente raros (menos de 1 % de incidência), tipicamente representam 30 % de todos os tumores cerebrais de adultos, e cerca 80% de todos os tumores cerebrais malignos de adultos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Eles são caracterizados por uma proliferação local, uma infiltração pelo parênquima cerebral e uma angiogênese robusta. O atual tratamento convencional inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Muitos agentes terapêuticos como a temozolomida (TZM), cisplatina, carmustina e lomustina vem sendo usados para tornar mais lenta a progressão desses canceres incuráveis (JOHNSON; WHITE;

GRIMALDI, 2011). Um problema que ocorre é que as células de glioma frequentemente adquirem resistência a esses agentes (HEGI *et al.*, 2005). O tempo médio de vida para pacientes diagnosticados com glioblastoma é de aproximadamente 12 meses, por essa razão, tem se feito esforços para a busca de vias moleculares visando o desenvolvimento de novos agentes e terapias contra este tipo de câncer (FURNARI *et al.*, 2007).

Existem diversos tipos de tumores cerebrais, a eles são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) baseando-se na sua origem celular e aparência histopatológica.

Astrocitomas: a maioria dos tumores que se desenvolvem no cérebro começam como células gliais chamadas astrócitos. Esses tumores são chamados astrocitomas. Dois de cada dez tumores no cérebro são astrocitomas. A maioria desses pode se espalhar amplamente pelo cérebro e se misturar com o tecido sadio, o que os tornam bastante difíceis de se remover cirurgicamente. É muito raro que eles se espalhem para fora do cérebro ou medula espinhal. Astrocitomas são geralmente classificados como de baixo grau, grau intermediário e de alto grau baseado em como na aparência das células ao microscópio. O astrocitoma de mais alto grau é conhecido como glioblastoma, sendo esse o de progressão mais rápida e o tipo de tumor maligno cerebral mais comum em adultos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Oligodendroliomas: esses tumores iniciam em célula do cérebro chamadas olidendrócitos. Como astrocitomas, a maioria deles pode se infiltrar nos tecidos próximos e não podem ser completamente removidos com cirurgia. Oligodendroliomas raramente se espalham para fora do cérebro ou medula espinhal. Formas muito agressivas desses tumores são chamadas oligodendroliomas anaplásticos. Apenas 2 % dos tumores cerebrais são oligodendroliomas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Ependimomas: esses tumores surgem a partir de células ependimais que delimitam os ventrículos. Eles podem variar de tumores de grau muito baixo (menos agressivo) até tumores de alto grau, chamados de ependimomas anaplásticos. Ependimomas não se espalham para fora do cérebro ou medula espinhal. Diferentemente dos tipos anteriores esse tipo de tumor não infiltra em tecidos saudáveis permitindo, na maioria das vezes, sua retirada por cirurgia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

1.6.3 *Autofagia*

Autofagia é um processo celular evolutivamente conservado de degradação e reciclagem de proteínas e organelas. É um mecanismo induzido como resposta a diversos

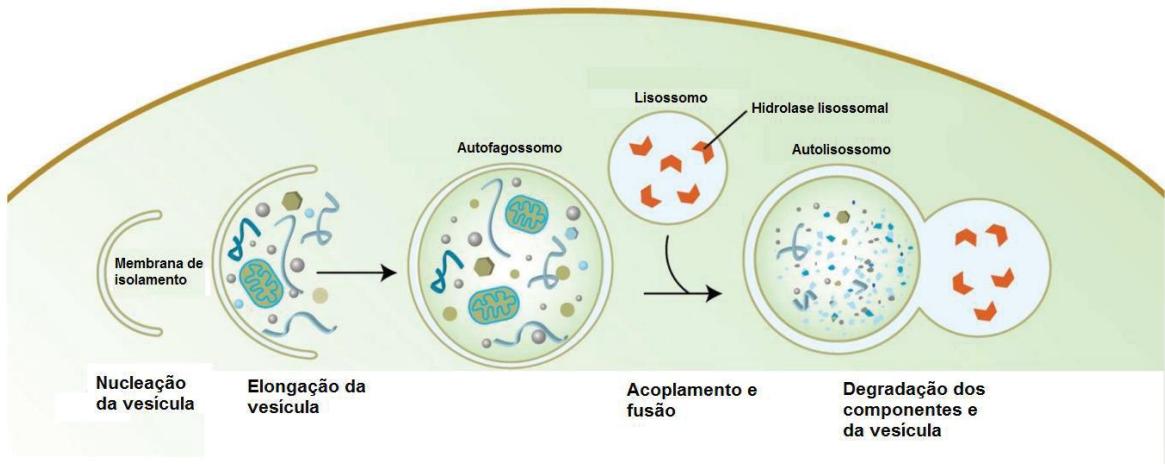
estímulos como estresse oxidativo, hipóxia ou depleção de nutrientes. Sendo um processo constitutivo, a autofagia basal tem importante função na manutenção na homeostase, através da manutenção do controle de qualidade de proteínas e organelas. Mesmo que a maioria das evidências suportem uma função de manutenção da sobrevivência da célula, paradoxalmente, a morte celular resultando de um consumo de células progressivo tem sido atribuído a autofagia irrestrita (MIZUCHIMA, 2007; REEF *et al.*, 2006).

Os mecanismos que regulam as funções mutualmente-opostas de sobrevivência e morte para a autofagia ainda não são conhecidos. A explicação mais plausível é que o catabolismo por autofagia é predominantemente para manutenção da sobrevivência. Mas um desbalanço no metabolismo celular onde o consumo celular autofágico excede a capacidade celular de síntese, promove a morte celular (MATHEW; KARANTZA-WADSWORTH; WHITE, 2007).

Existem três formas de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas e microautofagia. Sendo a mais observada a macroautofagia (RAVIKUMAR *et al.*, 2010).

O processo de macroautofagia ocorre da seguinte forma: fagóforos (também chamados de estruturas pré-autafagossomais ou membranas de isolamento) elongam e se fundem enquanto engolfam uma porção do citoplasma em vesículas, chamadas autafagossomos. Esses autafagossomos primeiro se fundem com endossomos para formar organelas híbridas chamadas anfissomos que posteriormente se fundem com lisossomos ácidos onde o conteúdo citoplasmático é degradado (Figura 13). Os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação da autofagia ainda não foram completamente elucidados, o que se sabe é que diversos genes de autofagia (ATG) participam da regulação desse processo celular (RAVIKUMAR *et al.*, 2010).

Figura 13 – Diagrama esquemático dos passos do processo de autofagia.



Fonte: Adaptado de Melendez e Levine (2009)

Nesse contexto, Pratt e colaboradores (2012) mostraram a capacidade de ConA de induzir morte autófágica de células de glioma na linhagem de células de glioma humano U87. Foi mostrado que essa atividade se deve a regulação da proteína MT1-MMP (proteína de membrana – metaloproteinase tipo 1), uma glicoproteína fortemente expressa em gliobastomas radio- e quimioresistentes. Essa proteína é responsável por mediar a sinalização pró-apoptótica e autófágica em células de câncer do cérebro. A lectina foi capaz de induzir a atividade da proteína com consequente aumento de vacúolos ácidos característicos de processos autófágicos.

1.7 Processo inflamatório x câncer

Uma associação entre o desenvolvimento do câncer e o processo inflamatório vem sendo discutido há bastante tempo (BALKWILL; MANTOVANI, 2002; COUSSENS; WERB, 2002). A resposta inflamatória direciona as defesas do organismo contra uma infecção microbiana e medeia a reparação tecidual e a regeneração, o que pode ocorrer devido a danos teciduais causados ou não por infecções. Evidências epidemiológicas aponta para uma conexão entre a inflamação e uma predisposição para o desenvolvimento do câncer como por exemplo: uma inflamação crônica pode levar para o desenvolvimento de displasia. Estudos da epidemiologia estimam que 15% dos casos de câncer no mundo estão associados com infecção microbiana (KUPER; ADAMI; TRICHOPOULOS, 2000). Infecção crônica em hospedeiros imunocompetentes como infecções pelo papiloma vírus humano ou os vírus da hepatite B e C pode levar a um carcinoma cervical e hepatocelular, respectivamente. Em outros casos,

microorganismos podem causar câncer devido a infecções oportunistas como o sarcoma de Kaposi (um resultado da infecção do vírus das Herpes humana 8) ou respostas imunes inapropriadas contra os microorganismos em certos indivíduos, o que pode ocorrer em câncer gástrico devido a colonização por *Helicobacter pylori* ou câncer de cólon devido a inflamação duradoura da doença inflamatória intestinal precipitada pela microflora intestinal (BALKWILL; MANTOVANI, 2002; COUSSENS; WERB, 2002). Em muitos outros casos, condições associadas com irritação crônica e inflamação subsequente predispõem ao câncer, como exposição contínua a fumaça de cigarros, amianto e sílica (BALKWILL; MANTOVANI, 2002; COUSSENS; WERB, 2002).

Sinais da inflamação, como a infiltração de leucócitos, são esperados em tumores infectados com microorganismos e sítios de inflamação crônica. Porém, como observado primeiramente por Virchow no meio do século 19, muitos tumores contendo infecções ou irritações não são, necessariamente, um fator de predisposição. Aspectos quantitativos do reparo tecidual ou expressão de genes relacionados a inflamação geralmente se correlacionam negativamente com o desenvolvimento do câncer (CHANG et al., 2004; WNAG et al., 2006; GALON et al., 2006). Mais evidências para o papel da inflamação na prevenção de formação espontânea de tumores em pessoas com polipose adenomatosa familiar (ULRICH; BIGLER; POTTER, 2006). Além disso, o câncer e a inflamação estão relacionados pela epidemiologia, histopatologia, perfis inflamatórios e a eficácia de drogas anti-inflamatórias na profilaxia. Essas observações incentivaram o estudo da relação entre o câncer e o processo inflamatório.

Se tem evidências que sugerem que os sistemas inflamatórios e o sistema imune podem inibir o desenvolvimento do câncer. Isso pode ocorrer por dois eventos de reconhecimento associados ao câncer. Na imunovigilância dos tumores, o hospedeiro pode ter um mecanismo dedicado para reconhecer e eliminar as células transformadas. Resposta imune adaptativa de抗ígenos associados ao tumor e específicos também podem ser formas importantes pelo qual o sistema imune controla o desenvolvimento do câncer (SMYTH; DUNN; SHREIBER, 2006). A relação do câncer com o processo inflamatório não é simples e não pode ser reduzida a uma grande teoria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Cristalizar, determinar a estrutura tridimensional, analisar a interação com carboidratos e investigar o efeito da lectina manose-específica de *Canavalia virosa* (ConV) em modelos de citotoxicidade para células de glioma e inflamação em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina a partir de sementes de *Canavalia virosa* utilizando metodologias tradicionais de química de proteínas.
- Analisar a homogeneidade da amostra por SDS-PAGE.
- Obter a estrutura primária da lectina utilizando técnicas de espectrometria de massas.
- Analisar e comparar a sequência da lectina dentro da subtribo Diocleinae.
- Cristalizar a lectina utilizando a técnica de difusão de vapor com a técnica de gota suspensa.
- Obter dados de difração de raios X.
- Determinar a estrutura tridimensional da lectina por cristalografia de raios X.
- Analisar a associação de ConV com diversos carboidratos utilizando metodologias de *docking* molecular.
- Avaliar o potencial edematogênico de ConV utilizando o modelo de edema de pata em camundongos.
- Analisar a citotoxicidade de ConV para células de glioma de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Purificação da lectina de sementes de *Canavalia virosa* (ConV)

A purificação da lectina de *Canavalia virosa* foi realizada segundo protocolo adaptado de Osterne e colaboradores (2014). Primeiramente as sementes foram descascadas e submetidas a Trituração através do uso de moedor elétrico (Cadence MDR301 Monovolt) até a obtenção de uma farinha fina. Posteriormente esta farinha foi ressuspensa em tampão Tris-HCl pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM, na proporção de 1: 10 (p/v) e a mistura foi mantida sob agitação por 12 horas em temperatura ambiente. Esta mistura foi então, submetida a centrifugação a 10.000 x g durante 20 minutos, o precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (WhatmanTM), coletado e denominado extrato bruto. Esse extrato foi aplicado em coluna de afinidade com matriz de Sephadex[®]-G50 previamente equilibrada com o tampão de extração. As proteínas não retidas na matriz (P1) foram eluídas com o tampão de equilíbrio e a fração retida (P2) foi eluída com glicose 0,1 M com NaCl 0,15 M. Foram coletadas frações de 1,5 mL e o fluxo utilizado foi de 2 mL/min. As frações foram monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm. As frações retidas foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água destilada e liofilizadas.

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A avaliação do grau de homogeneidade da amostra foi realizada utilizando-se SDS-PAGE seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970) com algumas modificações. O gel de separação foi montado na concentração de 15 % de acrilamida (proporção de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8) preparado utilizando-se tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,8 contendo SDS 1 %, persulfato de amônio 0,1 % e TEMED 0,04 %. O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4 % de acrilamida em tampão tris-HCl pH 6,8; SDS 1 %; persulfato de amônio 0,1 % e TEMED 0,04 %.

Uma alíquota da lectina liofilizada foi solubilizada em tampão de amostra contendo tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,02 % e SDS 1 %. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 0,025 M pH 8,8; glicina 0,192 M; SDS 0,1 %.

A corrida eletroforética foi realizada com amperagem constante de 25 mA, potência de 5 W e voltagem variando até 150 V. Um marcador de massa molecular foi utilizado como padrão de comparação e era composto de: Fosforilase B (97 KDa), albumina sérica bovina (66 KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa) e inibidor de tripsina (20,1 KDa).

Após a corrida as bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). O excesso de corante foi retirado através de sucessivas lavagens com água destilada aquecida.

3.3 Sequenciamento de ConV por espectrometria de massas

A sequência primária de ConV foi determinada por espectrometria de massas sequencial. O procedimento utilizado foi seguinte: inicialmente, a lectina foi submetida a SDS-PAGE 12 % e as bandas foram excisadas e descoradas com bicarbonato de amônio 50 mM em acetonitrila 50 %. Posteriormente, as bandas foram desidratadas com acetonitrila 100 % e secas em SpeedVac (LabConco, Kansas, MO, EUA). Para a clivagem proteolítica, os géis foram reidratados em bicarbonato de amônio 50 mM contendo tripsina (Sigma-Aldrich) e quimiotripsina (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:50 p/p (enzima/substrato), a reação ocorreu *overnight* na temperatura de 37 °C. Os peptídeos obtidos foram extraídos em uma solução de acetonitrila 50 % contendo ácido fórmico 5 % e separados em coluna C18 BEH300 (100 x 100 mm) utilizando um sistema nanoAcquity™ (Waters Corp.). A coluna foi equilibrada com ácido fórmico 0,1 % e os peptídeos retidos foram eluídos através de gradiente de acetonitrila (10-85 %), contendo ácido fórmico 0,1 % (fluxo de 600 µl/min). O sistema de cromatografia líquida foi conectado a uma fonte de ionização nanoeletrospray de um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/mobilidade iônica com aceleração ortogonal – tempo de voo (Synapt HDMS - Waters Corp., Milford, USA). O espectrômetro de massas operou em modo positivo, com a temperatura da fonte e a voltagem do capilar ajustadas para 80 °C e 3,5 kV respectivamente. A calibração do espectrômetro foi realizada previamente com os íons resultantes da fragmentação do peptídeo [Glu1]-Fibrinopeptídeo B. Para realização do experimento de LC-MS/MS foi utilizada a função DDA (análise direta de dados) selecionando os íons precursores duplamente ou triplamente protonados, que foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) utilizando argônio como gás inerte e uma rampa de energia de colisão que variou de acordo com o estado de carga e a relação massa/carga do íon precursor. As sequências de peptídeos com sequência comum a outras proteínas dos bancos de dados foram determinadas por comparação com as proteínas dos bancos de dados utilizando-se os programas ProteinLynx 2.4 (Waters) e MASCOT (Matrix Science.) Os demais peptídeos foram determinados através de interpretação manual dos espectros de CID com uso da ferramenta PepSeq presente no software MassLyns v. 4.1 (Waters).

3.4 Análise da sequência primária de ConV

A sequência primária obtida de ConV foi submetida a análises por bioinformática para a determinação da homologia/similaridade com outras proteínas do banco de dados não redundante do Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI), para isso utilizou-se ferramenta BLASTp (STEPHEN *et al.*, 1997). As proteínas com maior similaridade foram selecionadas para alinhamento múltiplo e construção da árvore filogenética através do programa ClustalOmega (SIEVERS *et al.*, 2011), o resultado do alinhamento foi representado através do uso do ESPript 3 (ROBERT; GOUET, 2014. O pI (ponto isoelétrico) teórico e a massa molecular da proteína foram obtidos com uso da ferramenta ProtParam (WILKINS *et al.*, 1999).

3.4 Cristalização de ConV

Para a obtenção de cristais, ConV foi solubilizada em Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo α -metil-D-manosídeo 5 mM na concentração final de 12,5 mg/mL. Esta solução foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi submetido a um *screening* inicial utilizando o método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991) através do uso dos kits Crystal Screen I e II (Hampton ResearchTM). Os kits são compostos por 50 condições no Crystal Screen I e 48 no Crystal Screen II, resultando em 98 condições que são indicadas para o crescimento de cristais de proteínas. A montagem das placas de cristalização foi realizada pelo sistema automatizado Mosquito[®] Crystal (TTP Labtech) com gotas de 200 nL (100 nL da solução de proteína + 100 nL da condição de cristalização) em placas de microtitulação de 96 poços seladas com ViewDropTM II (placas de 96 poços / 3 gotas por poço).

Posteriormente, as melhores condições obtidas no *screening* inicial foram otimizadas visando a obtenção de cristais adequados a difração por raios X. Isso foi feito através de variações no pH e na concentração dos precipitantes das soluções de cristalização. A otimização das condições foi realizada em placas Linbro de 24 poços e em cada poço foi colocado 300 μ L de cada solução de otimização. As gotas de cristalização (2 μ L da solução de proteína + 2 μ L da condição de cristalização) foram montadas em lamínulas 22 x 22 mm previamente siliconadas. Os poços foram vedados com silicone e deixados em repouso na temperatura de 20 °C.

3.5 Coleta de dados

Os padrões de difração obtidos a partir do cristal de ConV foram obtidos na estação experimental MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron na cidade de Campinas, São Paulo. Antes do experimento de difração o cristal foi mergulhado em solução crioprotetora contendo glicerol para evitar a formação de cristais de gelo durante a difração. Os dados foram coletados na temperatura de -173 °C mantida através de um fluxo de nitrogênio líquido. Para a difração, o cristal foi devidamente posicionado na cabeça goniométrica do difratômetro e alinhado em relação ao feixe de raios X. Um conjunto completo de 180 imagens com um ângulo de oscilação de 1 ° foi obtido através do uso do detector PILATUS2MT™ (Dectris, Swiss). A integração das intensidades do conjunto de imagens de difração de raios X foi realizada usando o programa MOSFLM (programa livre encontrado no pacote colaborativo de programas biológicos CCP4 (COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994; LESLIE; POWELL, 2005), com isso o grupo espacial, os parâmetros de cela e a mosaicidade puderam ser determinados. O escalonamento dos dados foi realizado pelo programa SCALA (COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994), esse programa monta um arquivo de intensidades com as observações únicas. De posse dessas informações a qualidade dos dados foi verificada.

3.6 Resolução e análise da estrutura

Após a indexação, integralização e escalonamento dos dados o próximo passo para a resolução da estrutura tridimensional de uma proteína é a resolução do “problema da fase”. Para ConV foi utilizado o método de substituição molecular com uso do programa MOLREP (COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994; VAGIN; TEPLYAKOV 1997). Os monômeros das lectinas com maior similaridade foram selecionados e testados, o programa realiza movimentos de rotação e translação desses monômeros visando o melhor posicionamento possível junto as moléculas reais na rede cristalina. A escolha do melhor modelo foi realizada analisando-se o escore e o fator de correlação dado pelo programa.

O modelo inicial gerado pelo MOLREP foi submetido a refinamento de corpo rígido mediante o uso do programa REFMAC5 (COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT NUMBER 4, 1994; MURSHDOV *et al.*, 2011), esse refinamento move a molécula como um todo para encaixar na nuvem eletrônica, após esse refinamento foi realizado o

refinamento de restrições com o uso do software PHENIX v. 1.10-2155 (ADAMS *et al.*, 2010), os referenciais da resolução da estrutura foram os valores de Rfactor e Rfree.

Refinamentos posicionais, correção de parâmetros geométricos e adição de ligantes e águas foram realizados no programa WinCOOT (EMSLEY *et al.*, 2010) Todos os passos manuais foram seguidos de ciclos de refinamentos posicionais e monitoramento dos valores de Rfactor e Rfree. As análises estereoquímicas, dos ângulos de ligação, distâncias interatômicas e interações foram checadas manualmente com ajuda do gráfico de Ramachandran e a análise final da qualidade da estrutura foi realizada através dos programas MolProbity (CHEN *et al.*, 2010) e PDB validation tool (READ *et al.*, 2011). As análises estruturais e figuras foram feitas com auxílio do programa PyMol (SCHRÖDINGER, LLC). As distâncias interatômicas no DRC e no sítio de ligação a metais foram visualizadas no programa LigPlot+ (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1996).

3.7 Sobreposição da estrutura de ConV com outras lectinas de Diocleinae

A estrutura tridimensional de ConV foi comparada a outras lectinas extraídas de plantas da subtribo *Diocleinae*. A escolha das lectinas para a sobreposição foi realizada pelo programa BLASTp do NCBI utilizando como banco de dados o Protein Data Bank (PDB). As lectinas com melhor escore de alinhamento tiveram suas estruturas tridimensionais comparadas com a estrutura de ConV. A comparação foi realizada pelo programa PyMol e o resultado foi expresso como o desvio médio da raiz quadrada (RMSD), esse dado representa a medida da distância média entre os átomos de proteínas sobrepostas, uma sobreposição perfeita possui RMSD de 0 e quanto maiores os valores maiores as diferenças entre as proteínas.

3.8 Análise da interação de ConV com carboidratos por *Docking* molecular

A análise da interação de ConV com diferentes carboidratos foi testada por *docking* molecular. O DM foi realizado utilizando o software CLC Drug Discovery Workbench v. 2.5 (CLC Bio, Boston, MA, USA), uma plataforma para a predição da interação entre proteínas e ligantes. O raio selecionado foi 11 Da ao redor do domínio de reconhecimento a carboidratos e o máximo de interações foi determinado como 5000. Os açúcares testados foram: *N*-acetil-D-manosamina, *N*-acetil-D-glucosamina, trealose, α -metil-D-manosídeo, alfa-metil-D-glicosídeo, maltose, D-glucose, D-manoose, manose- α -1,2-D-manoose, manose- α -1,3-D-manoose, manose- α -1,4-D-manoose, manose- α -1,6-D-manoose e o trimanosídeo man- α -1,3-D-man- α -1,6-D-manoose.

A energia de interação entre a proteína e o ligante foi expressa na forma de um escore em unidades arbitrárias (Valores mais negativos indicam uma interação mais forte). As interações entre a proteína e o ligante foram determinadas com o uso do programa LIGPLOT+. As imagens do *docking* foram feitas com o programa PyMol.

3.9 Edema de pata

O modelo experimental de edema de pata em camundongos foi empregado para se verificar a capacidade da lectina de desencadear um processo inflamatório. Foram utilizados camundongos Swiss machos (20-25 g) mantidos em ambiente controlado (ciclo circadiano, 25 °C, comida e água à vontade). Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios para uso de animais na pesquisa (diretrizes NIH) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE - n° 10130208-8/40)

O edema de pata foi induzido por injeção subcutânea intraplantar de ConV na concentração de 10 mg/kg solubilizada em NaCl 0,9 % estéril, o grupo controle recebeu apenas a salina estéril (NaCl 0,9 %; 0,01 mL/pata). O edema foi mensurado comparando o volume de líquido deslocado entre os camundongos testes e controles de 30 minutos a 24 horas após as injeções utilizando um pletismômetro (PanLab, LE 7500-Spain). Os dados foram expressos como um aumento no volume da pata (em μ L) durante o experimento subtraído do volume basal, medido no tempo zero, ou como área sob a curva (AUC) (unidades arbitrárias). Para se verificar a importância do domínio de ligação a carboidrato no processo edemato-gênico provocado pela lectina tentou-se a inibição com glicose. Para isso a solução da lectina foi incubada com o açúcar inibitório glicose (0,1 M) por 60 minutos a 37 °C antes da injeção. A lectina e o açúcar também foram incubados em soluções separadas nas mesmas condições experimentais como controles.

Os dados foram expressos como uma média \pm o erro estatístico padrão analisado pelos testes de variância de dois sentidos (ANOVA) e de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em $p < 0.05$. Todos os protocolos foram realizados usando 6 a 8 animais por grupo.

3.10 Indução de morte autófágica de gliomas pela ConV

Para avaliação da citotoxicidade em células tumorais, o método utilizado foi o ensaio colorimétrico com sal de tetrazólio 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

(MTT), proposto por Mosmann (1983). Para a realização do ensaio, uma suspensão células C6 (linhagem celular de glioma de rato), com concentração de 50.000 células/mL, obtidas após dissociação química por tripsina, foram distribuídas em placas de 96 poços (100µL/poço). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ (5 %) até a confluência. Após 24 h, os poços foram tratados, em diferentes concentrações de ConV (10, 30, 50 e 100 µg/mL).

Decorridas as 24 h de incubação com as lectinas, o meio de cada poço foi substituído por 100 µL de uma solução de MTT a 0,5 mg/mL diluído em tampão HBSS pH 7,2 (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 0,63 mM; NaHCO₃ 4,17 mM; KCl 5,36 mM; KH₂PO₄ 0,44 mM; CaCl₂ 1,26 mM; MgSO₄ 0,41 mM; MgCl₂ 49 mM e glicose 5,55 mM). As placas foram incubadas por 1 h em estufa a 37 °C. Em seguida, o meio contendo MTT foi retirado e se adicionou 100 µL de DMSO/poço para dissolução dos cristais de formazana. A placa foi agitada por 5 min à temperatura ambiente para que toda a formazana fosse dissolvida e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Labsystems Multiskan MS 352, Haverhill, MA, USA) a 540 nm. Os valores de absorbância, medidos para cada concentração de cada amostra, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X %), em relação à média dos controles celulares, considerados 100% viáveis. Os dados foram expressos como uma média ± média do erro padrão (n=3). p< 0,05 comparado ao controle (*).

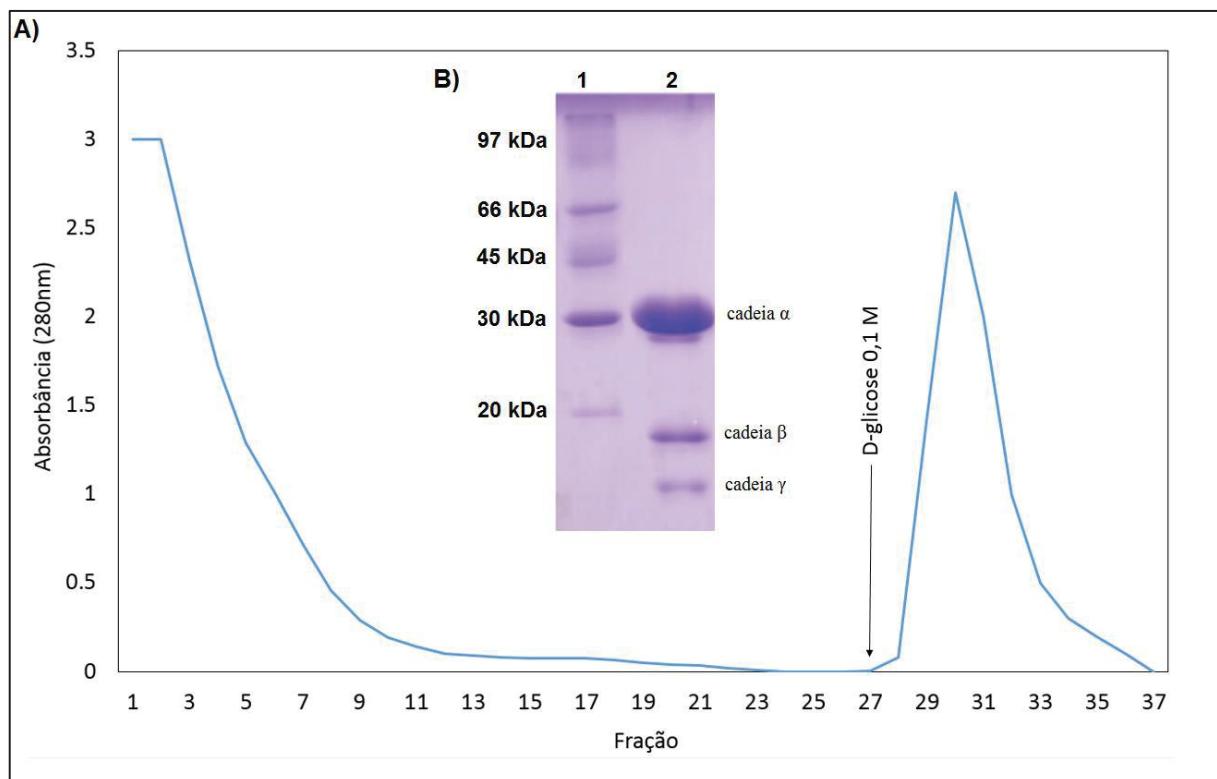
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação e SDS-Page de ConV

A lectina de sementes de *Canavalia virosa*, denominada ConV, foi purificada em um único passo cromatográfico utilizando cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex-G50. Após a remoção das proteínas que não interagiram com a matriz, a lectina purificada foi eluída com glicose 0,1 M. O cromatograma é mostrado na figura 14A.

A determinação do grau de pureza da preparação foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % na presença de SDS. Pode-se verificar que a lectina apresenta um padrão de bandas semelhante a outras lectinas ConA-like com uma banda de peso molecular aparente de 29 kDa (cadeia alfa) e outras duas de 14 e 12 kDa respectivamente (cadeias beta e gama) (Figura 14B). Também se verifica que a lectina está com elevado grau de pureza. Tanto o protocolo de purificação quanto o perfil cromatográfico de ConV não diferiram dos de outras lectinas da subtribo Diocleinae (OSTERNE *et al.*, 2014).

Figura 14 - Cromatograma do extrato bruto em Sephadex-G50 e SDS-Page de ConV.



Fonte: Elaborado pelo autor. A) Perfil de eluição do extrato bruto aplicado em cromatografia de afinidade Sephadex-G50. Aplicou-se aproximadamente 12 mL de extrato na matriz (7 x 2 cm) previamente equilibrada com a solução de extração. A fração não retida foi eluída com a solução de equilíbrio e a fração retida foi eluída com a solução de extração adicionada de glicose 0,1 M. Foram coletadas frações de aproximadamente 1,5 mL e o

conteúdo proteico foi acompanhado por espectrofotometria a 280 nM. B) Raias 1 – Marcadores moleculares (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrade Carbônica 29 kDa, Inibidor de Tripsina 20 kDa) e raia 2 – ConV pura.

4.2 Sequenciamento e análise da sequência de ConV

Para a obtenção da sequência completa de ConV, a proteína foi digerida com as enzimas Tripsina e Quimiotripsina. Foram sequenciados 10 peptídeos tripticos e 10 peptídeos quimiotripticos. Como resultado do sequenciamento foram obtidos 230 aminoácidos (97 % da sequência), os sete aminoácidos restantes foram obtidos por seobreposição com outras lectinas de *Canavalia* e por análise da densidade eletrônica conforme será mostrado mais a frente. O pI teórico calculado pelo ProtParam foi de 5,43 e massa de 25.480,3 Da. A massa molecular calculada pelo ProtParam foi bastante próxima da massa calculada por MS de 25.480 Da (OSTERNE *et al.*, 2014), esse dado assegura a confiabilidade da sequência obtida. A sequência obtida foi depositada no banco de dados UNIPROT com o código C0HJY1 e se mostrou diferente da sequência depositada da lectina de *Canavalia virosa* (P81461) indicando que a sequência depositada continha erros. O resultado do sequenciamento é mostrado na figura 15.

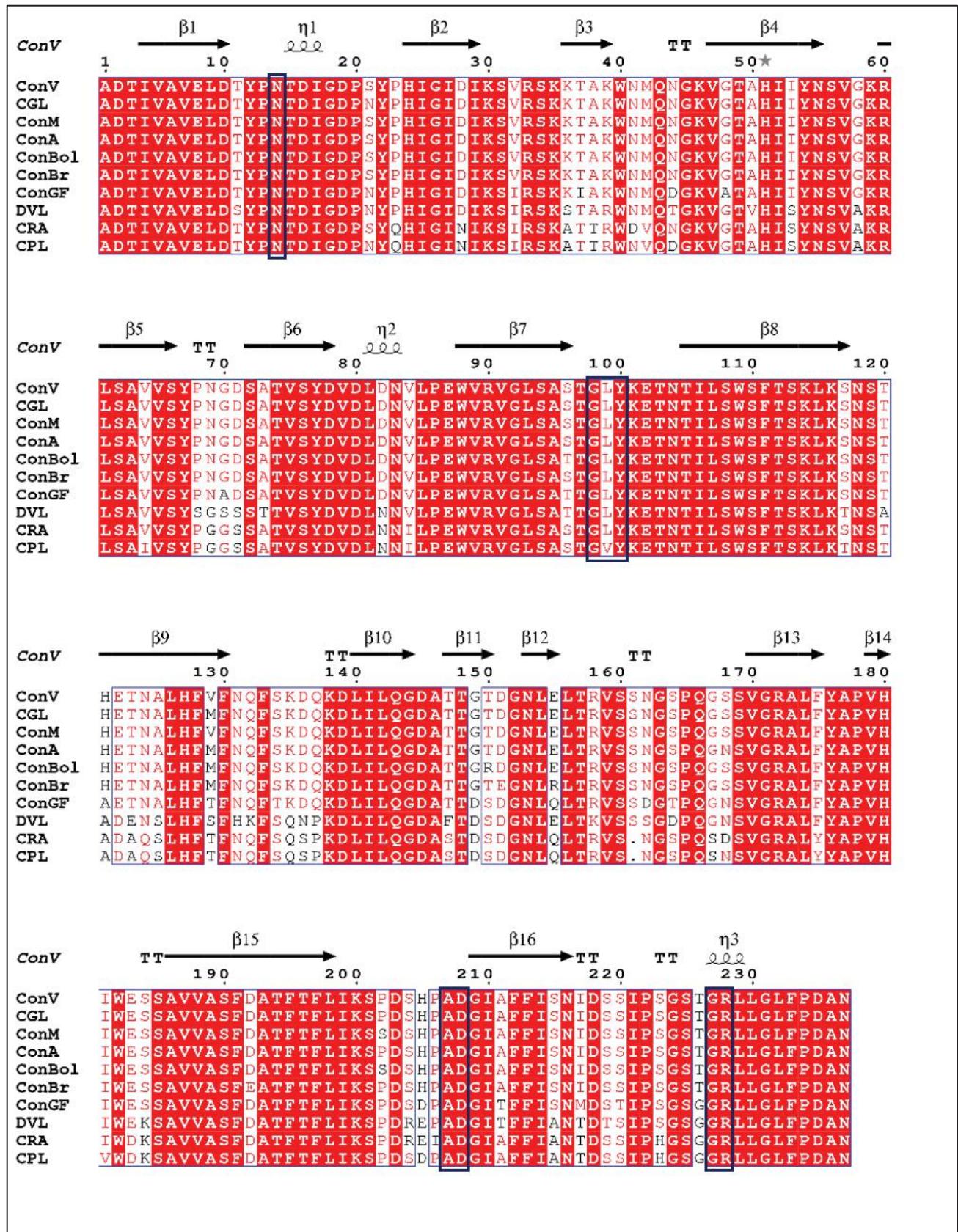
Análises comparativas da sequência primária da lectina de *Canavalia virosa* (ConV) com outras lectinas da subtribo Diocleinae mostraram um alto grau de similaridade entre as sequências dessas proteínas. A sequência de ConV apresentou 99 % de similaridade com a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA), 99 % com a lectina de *Canavalia gladiata* (CGL), 98 % de similaridade com a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), 98 % de similaridade com a lectina de *Canavalia boliviiana* (ConBol), 91 % de similaridade com a lectina de *Canavalia grandiflora* (ConGF), 82 % de similaridade com a lectina de *Dioclea violacea* (DVL), 83 % com a lectina de *Cratylia mollis* (CRA), 82 % com a lectina de *Camptosema pedicellatum* (CPL). O alinhamento múltiplo de ConV com as lectinas citadas acima está mostrada na figura 16.

Figura 15 - Sequência de aminoácidos de ConV obtida por espectrometria de massas.

<u>ADTIVAVELD TYPNTDIGDP SYPHIGIDIK SVRSKKTAKW NMQNGKVGTA</u> -----T8----- -----T9----- ----- -----Q1-----
<u>HIIYNSVGKR LSAVVSYPNG DSATVSYDVD LDNVLPFWVR VGLSASTGLY</u> ---T15--- -----T14----- -----T11--- --- -----Q2----- -----Q3----- -----
<u>KETNTILSWS FTSKLKSNST HETNALHFVF NQFSKDQKDL ILQGDATTGT</u> -----T12----- -----T16--- --Q4----- -----Q5-----
<u>DGNLELTRVS SNGSPQGSSV GRALFYAPVH IWESSAVVAS FDATFTFLIK</u> --- -----T18----- -----Q10----- ----- -----Q6-----
<u>SPDSHPADGI AFFISNIDSS IPSGSTGRLL GLFPDAN</u> -----T17----- -----T5----- --Q8----- -----Q9-----

Fonte: Elaborado pelo autor. A sequência de ConV foi obtida a partir da sobreposição dos peptídeos trípticos e quimiotripticos e comparação com a estrutura depositada de outras lectinas de *Canavalia*.

Figura 16 – Alinhamento múltiplo entre a lectina de *Canavalia virosa* e outras lectinas extraídas de sementes da subtribo Diocleinae.



Fonte: Elaborado pelo autor. A imagem foi produzida inserindo-se o alinhamento múltiplo na ferramenta ESPript 3.

Apesar destas lectinas vegetais possuírem alta similaridade entre si, pequenas alterações na sequência resultam em alterações consideráveis em suas propriedades físico-químicas e biológicas, sendo assim, cada lectina deve ser estudada isoladamente e ter seu potencial de aplicação analisado (BEZERRA *et al.*, 2013; CORREIA *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2012; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014).

Essa alta conservação na sequência primária dessas lectinas ocorre de forma mais significativa em algumas regiões de suas estruturas como nos resíduos de aminoácidos envolvidos no domínio de reconhecimento a carboidratos (Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228), no sítio de ligação a metais (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) bem como nos aminoácidos da cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) (CAVADA *et al.*, 2001; PEREIRA-JUNIOR, 2014). Esses aminoácidos estão todos presentes na estrutura de ConV.

Uma característica de algumas lectinas da subtribo Diocleinae é a presença de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH. Estudos anteriores realizados demonstraram que a substituição da histidina por asparagina na posição 131 é capaz de desordenar o loop 117-123 e reduzir os contatos entre os dímeros. Na forma ordenada ocorre uma estabilização da forma tetramérica e a lectina não apresenta equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH. A estrutura de ConV possui uma asparagina na posição 131. Isso dá um indício de que a lectina apresenta equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH. Trabalhos anteriores também mostram que somente essa alteração não é capaz de determinar por si a presença ou ausência do equilíbrio, mas sim dar um primeiro indício do mesmo (NAGANO *et al.*, 2008; ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015).

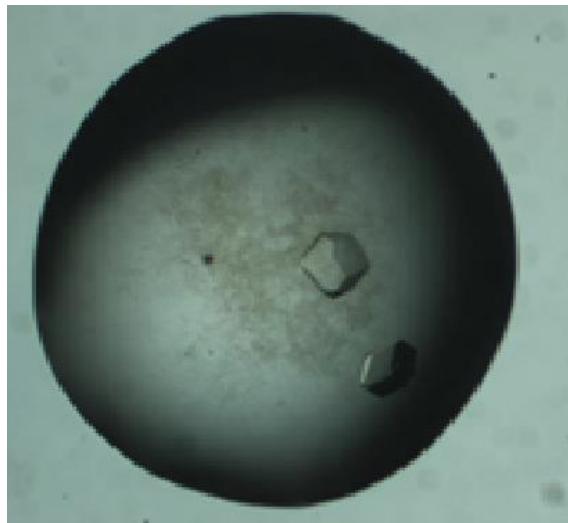
4.3 Resolução da estrutura de ConV

4.3.1 Cristalização de ConV

ConV foi cristalizada a partir de uma solução em torno de 12,5 mg/mL de proteína solubilizada em Tris-HCl 25 mM pH 7,6 contendo α -metil-D-manosídeo 5 mM. O açúcar foi utilizado para estabilizar o DRC da lectina e, consequentemente, o restante da molécula, facilitando o empacotamento cristalino. Cristais foram obtidos pelo uso do método de difusão de vapor em gota suspensa e cresceram em uma semana (Figura 17) com a placa sendo deixada em repouso a temperatura constante de 20 °C. A melhor condição para o crescimento dos

cristais foi a condição 42 do Crystal Screen II (Hampton ResearchTM), composta por Tris-HCl 0,1M pH 8,5; sulfato de amônio 1,5 M e glicerol 12 % (v/v).

Figura 17 - Cristal de ConV.



Fonte: Elaborado pelo autor. Cristais obtidos a partir da otimização da condição 42 do do Crystal Screen II. Os cristais cresceram em uma semana na temperatura constante de 20 °C.

4.3.2 Coleta de dados

Após a aplicação da solução crioprotetora, foram coletados os dados de difração de raios X dos cristais de ConV com α -metil-manosídeo utilizando como fonte de radiação a estação MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas, São Paulo), comprimento de onda de 1,47 Å usando um detector PILATUS2MTM. Foram coletadas 180 imagens, com um ângulo de oscilação igual a 1°. Os dados foram processados pelo programa MOSFLM e escalonados pelo software SCALA.

Os dados de difração dos cristais de ConV com alfa-metil-D-manosídeo foram coletados a 2,52 Å de resolução. Após a indexação dos dados determinou-se como grupo espacial o primitivo ortorrômbico P2₁2₁2₁ (ângulos $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) e os parâmetros de cela ($a = 60,25$; $b = 81,74$ e $c = 86,93$). Todas as imagens foram utilizadas no processo de indexação. O coeficiente de Matthews (2,14 Å³/Da) e a presença de 42,62 % de solvente indicaram a presença de dois monômeros na unidade assimétrica.

4.3.3 Resolução da estrutura

O próximo passo para a resolução da estrutura foi a substituição molecular onde foi utilizado o modelo de uma lectina semelhante para resolver o problema da fase. A estrutura

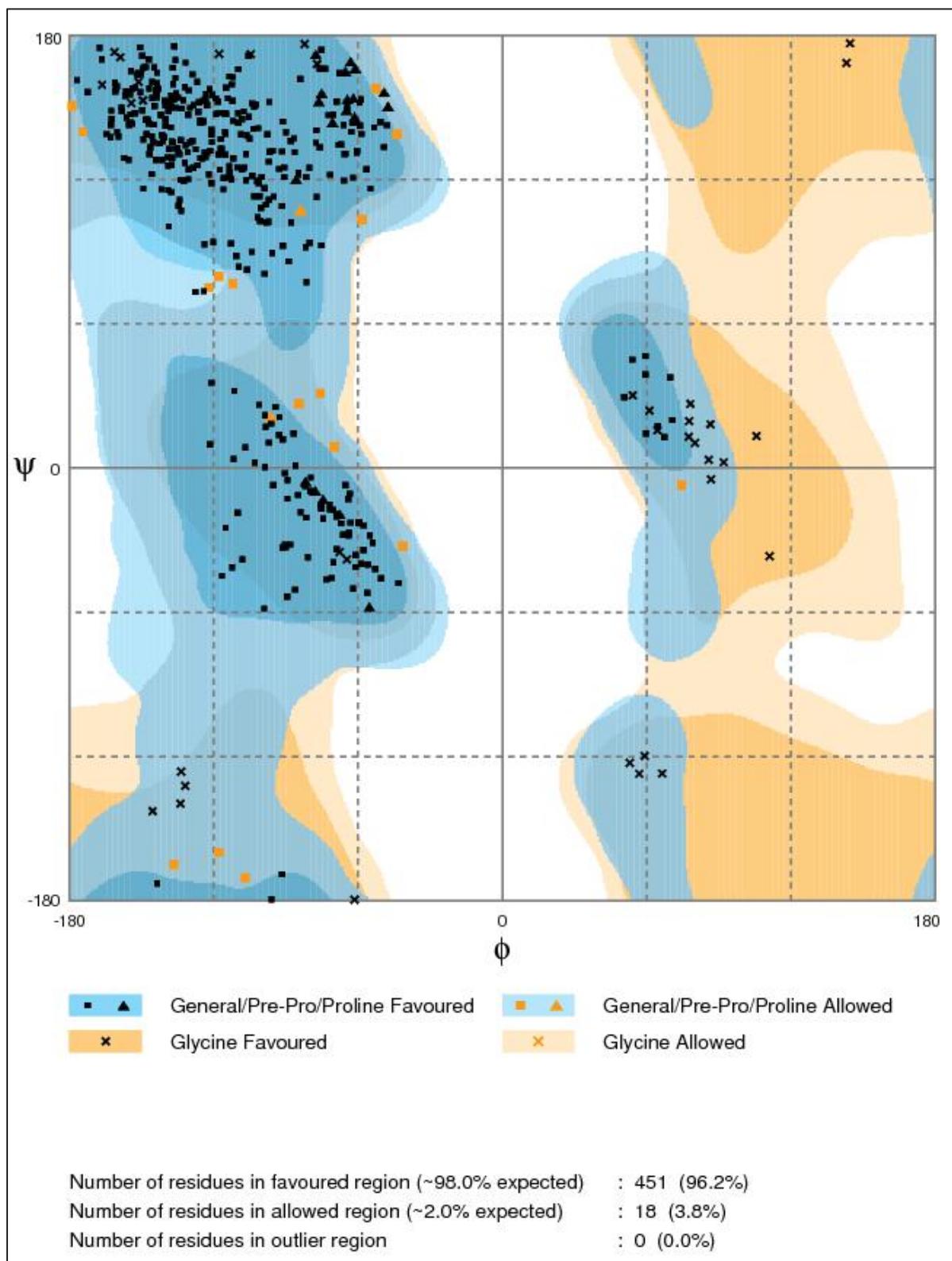
utilizada como modelo de busca foi a da lectina de *Canavalia marítima* (PDB: 2OW4), com a qual a ConV possui 99 % de identidade. A substituição molecular foi realizada pelo programa MOLREP, integrante do pacote CCP4. Os parâmetros avaliados foram o wRfactor = 0,35 e o Score = 0,65 que indicaram que o modelo escolhido era adequado para a substituição molecular.

Após a substituição molecular, a estrutura obtida foi submetida a 20 ciclos de refinamento de corpo rígido pelo programa REFMAC5 e 3 ciclos de refinamentos de restrições pelo programa PHENIX. A finalidade desses refinamentos foram encontrar um melhor ajuste da molécula na unidade assimétrica e, consequentemente, encontrar uma maior concordância entre o modelo proposto e a estrutura real da molécula, através do encaixe do modelo na mesma posição que a molécula real ocupa na sua rede cristalina. A avaliação dos resultados foi feita analisando o Rfactor e o Rfree.

Eventuais correções nas posições dos aminoácidos foram realizadas utilizando-se o programa WinCOOT, esse programa também foi utilizado para a adição dos ligantes e das moléculas de água. Após o último refinamento a resolução final se manteve em 2,52 Å, o valor de Rfactor fechou em 0,1891 e o Rfree em 0,2492.

A qualidade estereoquímica do modelo foi comprovada pelo MolProbity e PDB validation tool. O gráfico de Ramachandran mostrou que não há resíduos em regiões não permitidas e que 96,2 % dos resíduos estão em regiões favoráveis (Figura 18). O RMSD das ligações e dos ângulos em relação ao obtido experimentalmente foi 0,014 e 1,69 Å respectivamente, conforme esperado, os desvios estão concentrados em regiões de loops. A tabela 1 contém os dados de difração, substituição molecular, refinamento e alguns dados de validação.

Figura 18 - Gráfico de Ramachandran da estrutura final de ConV.



Fonte: Elaborado pelo autor. Foi utilizado o programa RAMPAGE para a construção do gráfico (LOVELL *et al.*, 2002)

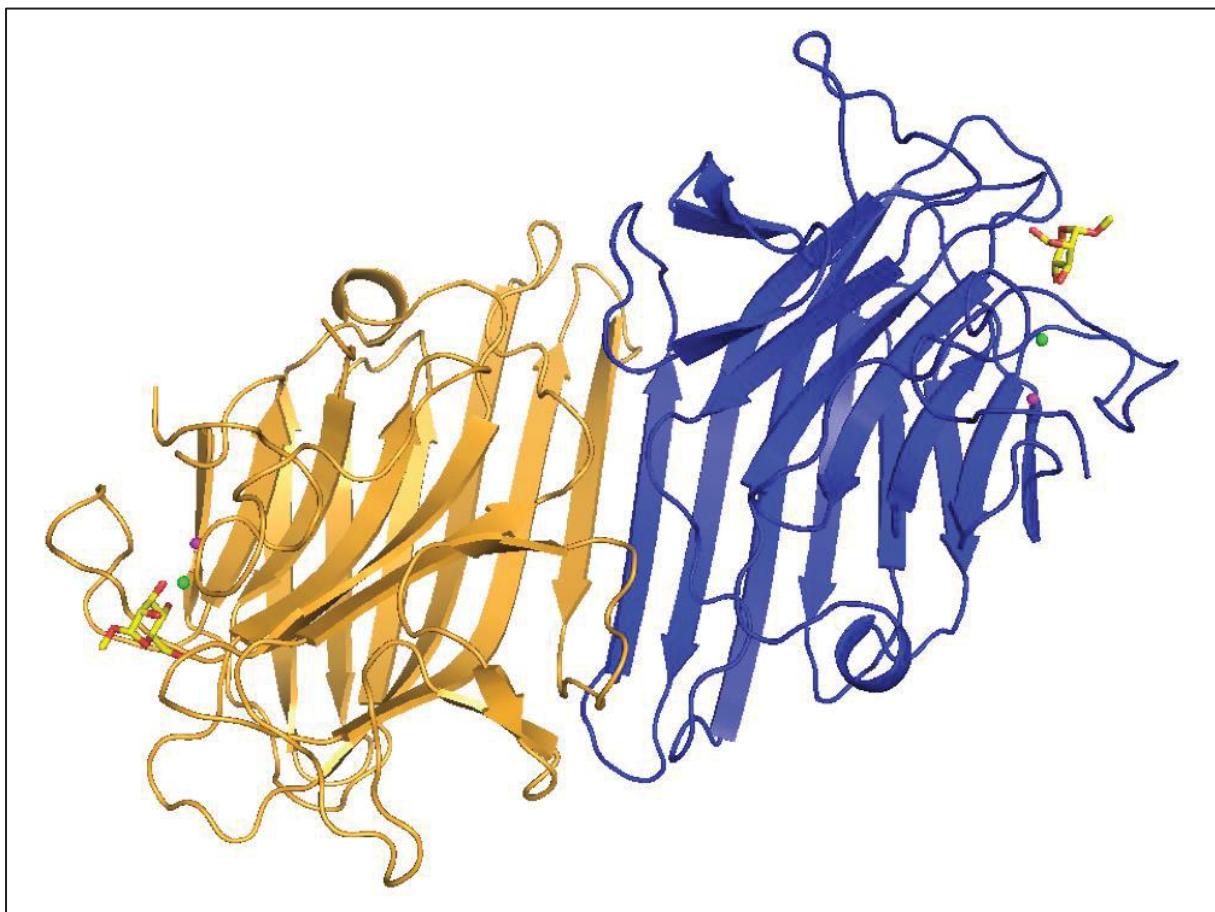
Tabela 1 – Dados de difração, substituição molecular, refinamento e validação.

Parâmetros	Valores
Coleta de dados	
Comprimento de onda	1,47 Å
Grupo espacial	P21221
Parâmetros da cela unitária Å	
A	60,25
B	81,74
C	86,93
Número de reflexões totais	68.816
Número de reflexões únicas	14.761
Número de moléculas por unidade assimétrica	2
Limite de resolução	42,37 – 2,523
Rmerge (%)	0,095 (8,2) ^d
Completeza (%)	92,1 (95,4) ^d
Multiplicidade	4,7 (4,2) ^d
I/(σ)	11,7 (14,7) ^d
Substituição molecular	
Coeficiente de correlação	65,0
Rfactor (%)	35,0
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	36,99 – 2,523
Rfactor(%)	18,91
Rfree(%)	24,92
Número de resíduos em unidade assimétrica	474
Número de moléculas de água	102
R.M.S.D	
Comprimento de ligação (Å)	0,014
Ângulos de ligação (graus)	1,69
Média do B fator para toda a cadeia da proteína (Å)	28,33
Gráfico de Ramachandran	
Resíduos em regiões mais favorecidas (%)	96,2
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	3,8
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,0

4.4 Estrutura tridimensional de ConV

Do mesmo modo que os monômeros das lectinas de leguminosas, o monômero de ConV exibe o domínio *jelly-roll*. Com os dados obtidos se tem um dímero na unidade assimétrica com 474 resíduos de aminoácidos, 2 ligantes α-metil-D-manosídeo, 102 moléculas de água, 2 íons de cálcio e 2 íons de manganês. A representação do dímero presente na unidade assimétrica pode ser vista na figura 19.

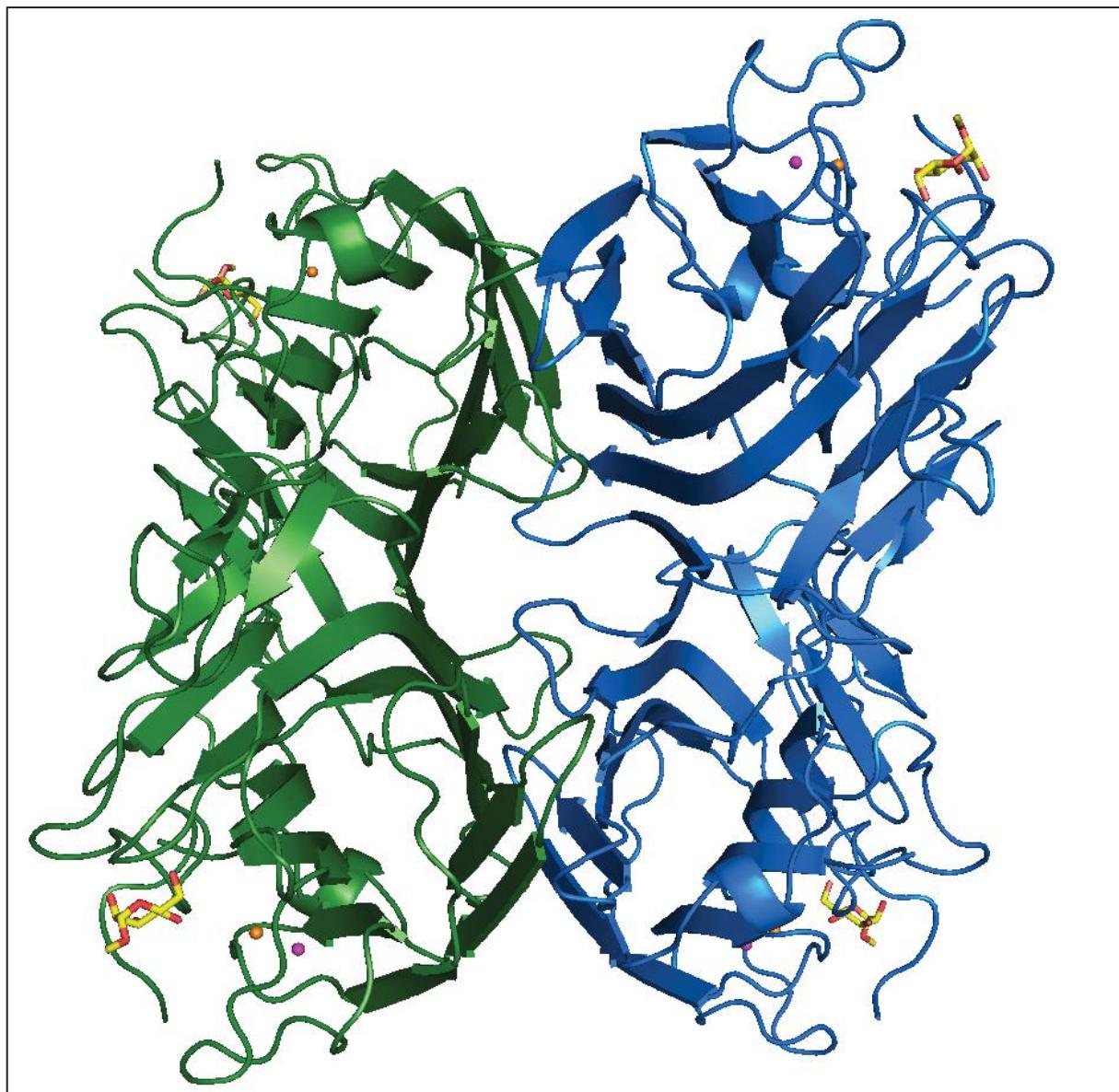
Figura 19 - Estrutura do dímero de ConV presente na unidade assimétrica.



Fonte: Elaborado pelo autor. Em amarelo e azul se tem os monômeros de ConV exibindo o domínio jelly-roll. Os íons metálicos estão representados como esferas (verde – Ca e roxo – Mn), o α -metil-D-manosídeo está representado como stick com carbonos em amarelo.

Em condições naturais, as lectinas ConA-*like* se oligomerizam e se apresentam na forma tetramérica, formada por dímeros de dímeros canônicos (BARROSO NETO, 2010). A análise de PISA confirmou o arranjo tetramérico para ConV. A estrutura final de ConV é mostrada na figura 20.

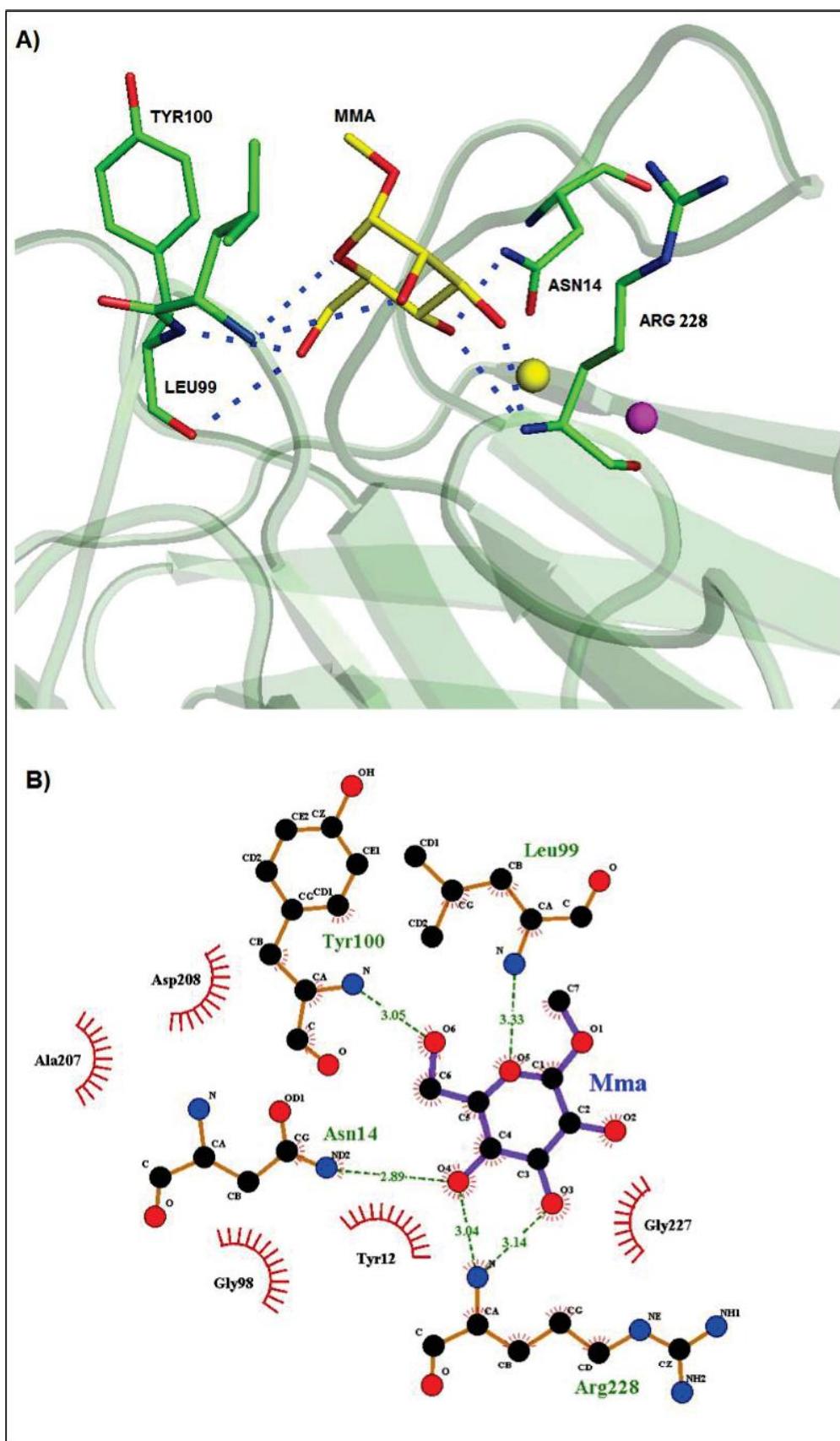
Figura 20 - Estrutura tetramérica de ConV.



Fonte: Elaborado pelo autor. Em verde e azul se tem os dímeros de ConV na representação de cartoon. Os íons metálicos estão representados como esferas (laranja – Ca e roxo – Mn) e os α -metil-manosídeos estão na representação de sticks com carbonos em amarelo.

Na estrutura, ConV está complexada com α -metil-D-manosídeo, que foi modelado na lectina utilizando o mapa de densidade eletrônica não explicado. No DRC a ASN14 forma ponte de hidrogênio com o O4 do manosídeo, LEU99 com o O5, TYR 100 com o O6 e ARG228 com O3 e O4. Interações hidrofóbicas entre ligante e os aminoácidos: TYR12, GLY98, ALA207, ASP 208 e ARG 228 também contribuem para a ligação da lectina com o carboidrato. Uma representação do DRC e das interações pode ser vista na figura 21.

Figura 21 – Representação e LigPlot do DRC de ConV.

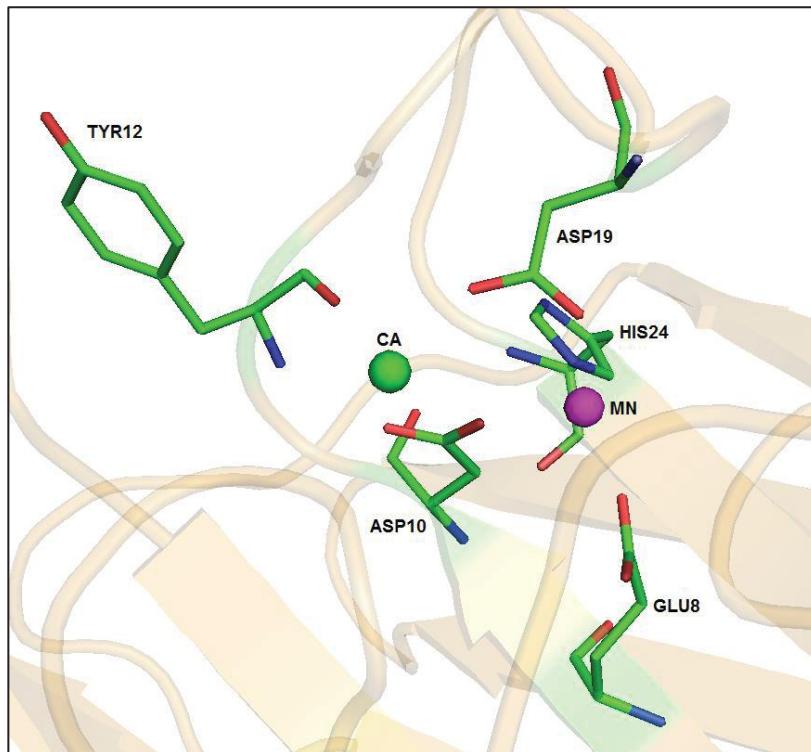


Fonte: Elaborado pelo autor. A) Representação do DRC de ConV, os aminoácidos que interagem e o ligante estão na representação de sticks (carbonos em verde para os aminoácidos e carbonos em amarelo para o ligante). Os

metais estão representados como esferas (amarelo – Ca e roxo – Mn), tracejados azuis representam ligações polares e B) LigPlot das interações entre o α -metil-manosídeo (MMA) e os aminoácidos.

A estrutura de ConV possui um sítio de ligação a metais formado por resíduos conservados. O sítio de ligação a metais se encontra próximo ao DRC e a ligação aos íons favorecem interações que auxiliam na estabilização do DRC (Figura 22). Quatro aminoácidos e duas moléculas de água coordenam cada íon.

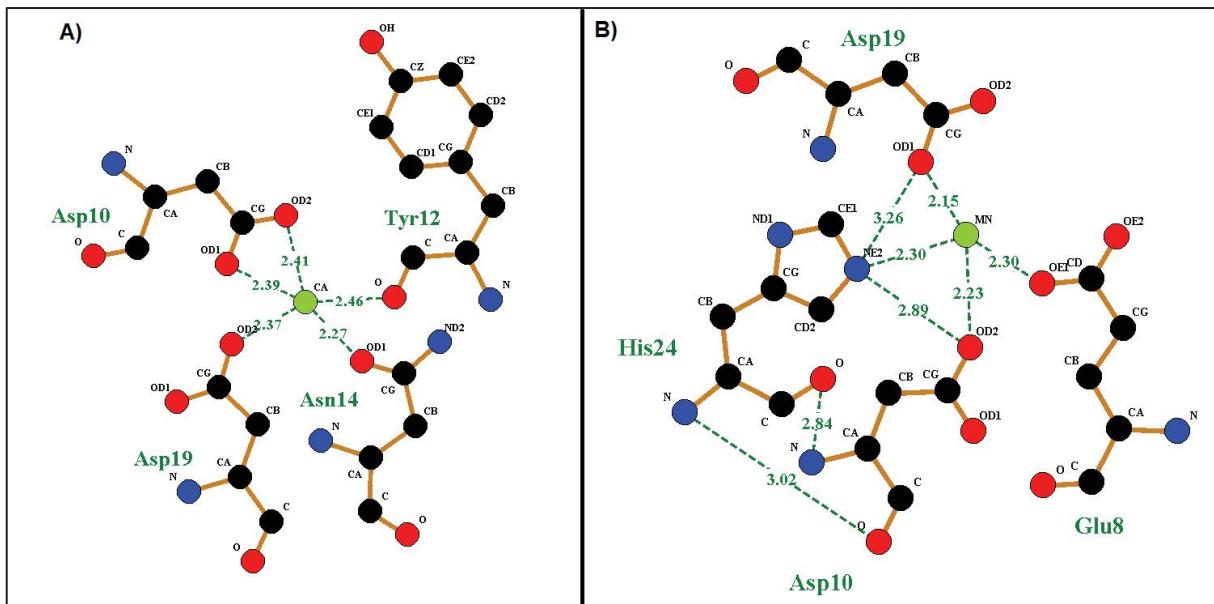
Figura 22 - Representação do sítio de ligação a metais de ConV.



Fonte: Elaborado pelo autor. As esferas representam os íons metálicos (verde- Ca / roxo – Mn).

No caso da ConV o manganês é coordenado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19 e His24; e o cálcio é coordenado pelos resíduos Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19 (Figura 23). Além desses, as moléculas de água ligam indiretamente os resíduos de Ile32 e Ser34 ao manganês e Asp208 e Arg228 ao cálcio. A ligação peptídica entre Ala207-Asp208 é isomerizada pela presença dos metais divalentes que provocam a mudança da orientação da cadeia lateral e estabilizam a ligação cis não usual (DELATORRE *et al.*, 2007; GARCIA-PINO *et al.*, 2006; LORIS *et al.*, 1998).

Figura 23 – LigPlots do sítio de ligação a metais de ConV



Fonte: Elaborado pelo autor. A) LigPlot da coordenação do cálcio pelos resíduos: ASP10, TYR12, ASN14 e ASP19, B) LigPlot da coordenação do manganês pelos resíduos: GLU8, ASP10, ASP19, HIS24.

Da mesma forma que outras lectinas de Diocleinae, o sítio hidrofóbico na estrutura de ConV está posicionado na interface de contato dos monômeros que formam o dímero canônico. Esse sítio foi primeiramente descrito para a lectina de *Canavalia gladiata* (DELATORRE *et al.*, 2007) e já foi descrito para diversas lectinas de Diocleinae como por exemplo: ConBr, CRL I, ConBol, DRL entre outras (BARROSO-NETO, 2010). Os resíduos deste sítio são conservados nas lectinas de Diocleinae (ASN124, ALA125, LEU126, GLN137, ASP139 e VAL179) e estão todos presentes na estrutura de ConV, porém diferentemente do que foi visto para algumas lectinas como a CGL, ConGF e ConBr não foi visto a presença de aminoácidos não-proteicos como o ácido α -amino butírico (BARROSO-NETO *et al.*, 2014; BEZERRA *et al.*, 2011; DELATORRE *et al.*, 2007).

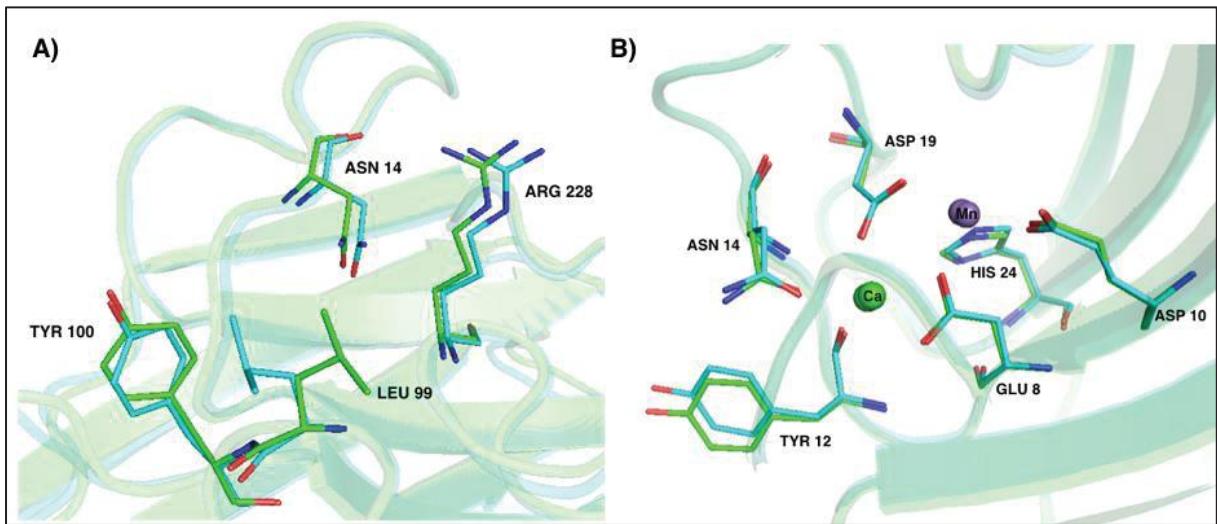
Foram realizadas sobreposições da estrutura do monômero de ConV com os monômeros das lectinas com maior escore de alinhamento que foram extraídas de: *Canavalia maritima* (ConM), *Canavalia ensiformes* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia gladiata* (CGL), *Canavalia boliviensis* (ConBol), *Dioclea guianensis* (DGui), *Dioclea rostrata* (DRL), *Dioclea violacea* (DVL) e *Canavalia grandiflora* (ConGF). Os resultados estão mostrados na tabela 02.

Tabela 2 – RMSD resultante da sobreposição da estrutura resolvida de ConV com outras lectinas de Diocleinae.

Proteína	RMSD
ConV (Estrutura resolvida)	0.0
ConM (PDB: 2CWM)	0,310
ConA (PDB: 2CTV)	0,332
ConBr (PDB 1AZD)	0,340
CGL (PDB: 1WUV)	0,359
ConBol (PDB: 4K1Y)	0,365
DGui (PDB: 1H9W)	0,369
DRL (PDB:2ZBJ)	0,374
DVL (PDB 2GDF)	0,382
ConGF (PDB: 4L8Q)	0,476

Como observado na tabela acima ConV apresentou maior similaridade estrutural com a lectina de *Canavalia maritima* confirmando a escolha que havia sido feita para a substituição molecular. Como esperado a sobreposição de ConV com lectinas de *Canavalia* obteve valores de RMSD menores do que com as lectinas de *Dioclea*. Diferentemente do que se esperava, a lectina de *Canavalia gladiata* ficou abaixo das lectinas ConM, ConA e ConBr isso indica que, apesar da alta homologia entre essas duas lectinas, o posicionamento de alguns aminoácidos difere sutilmente nas duas estruturas (SOUZA *et al.*, 2003; DELATORRE *et al.*, DELATORRE *et al.*, 2007). Outro dado observado foi o elevado RMSD entre as estruturas de ConV e a da lectina de *Canavalia grandiflora* comparativamente com as outras lectinas testadas, isso se deve, possivelmente, ao fato que que a estrutura de ConGF possui diferenças estruturais significativas dentro da subtribo *Diocleinae* (BARROSO-NETO *et al.*, 2014). A sobreposição do DRC e do sítio de ligação a metais de ConV e ConM pode ser vista na figura 24.

Figura 24 – Sobreposição do DRC e do sítio de ligação a metais de ConV e ConM

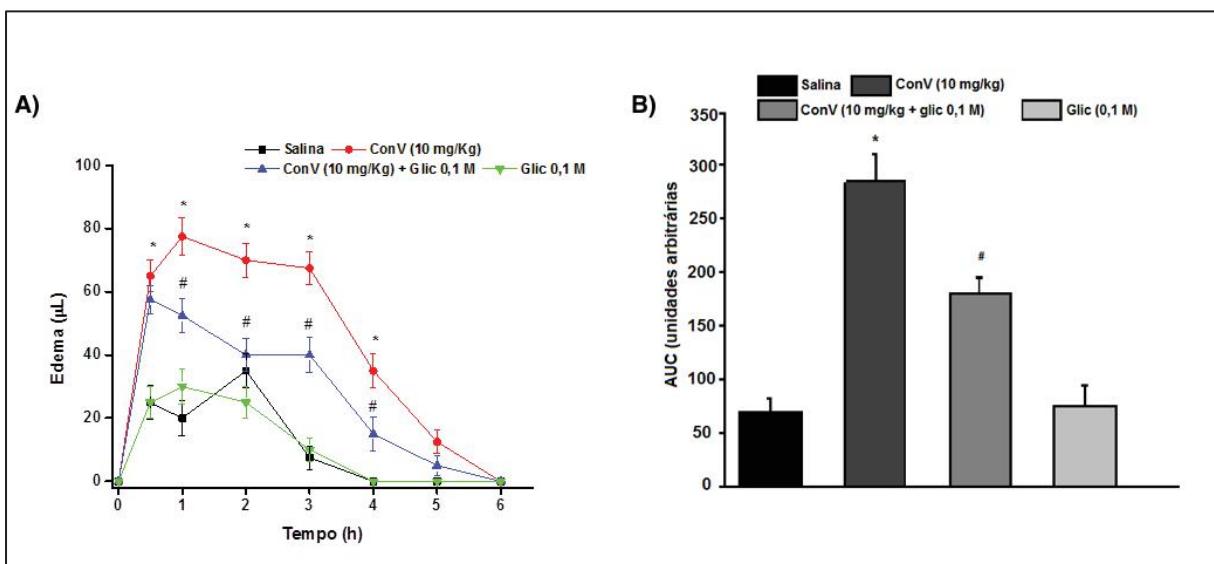


Fonte: Elaborado pelo autor. Os aminoácidos estão representados como sticks, ConV – carbonos em verde e ConM – carbonos em azul. A) Sobreposição do DRC de ConV e ConM e B) Sobreposição do sítio de ligação a metais das duas lectinas.

4.5 Atividades biológicas

Verificando-se o efeito edemato-gênico de ConV injetada por via subcutânea intraplantar na concentração de 10 mg/Kg, observou-se que a lectina, na dose testada, induziu um efeito edemato-gênico que se iniciou com 30 min ($65 \pm 5.06 \mu\text{L}$) e durou 4 h ($35 \pm 5.31 \mu\text{L}$). O efeito edemato-gênico de ConV (285 ± 26.95 ; AUC) foi parcialmente inibido por sua associação com glicose (180 ± 16.7 ; AUC). Tanto a glicose (75.62 ± 19.07 ; AUC) quanto a salina (70 ± 12.99 ; AUC) isoladamente não tiveram efeito considerável no processo inflamatório (Figura 25).

Figura 25 – Resultados do modelo de edema de pata utilizando ConV.



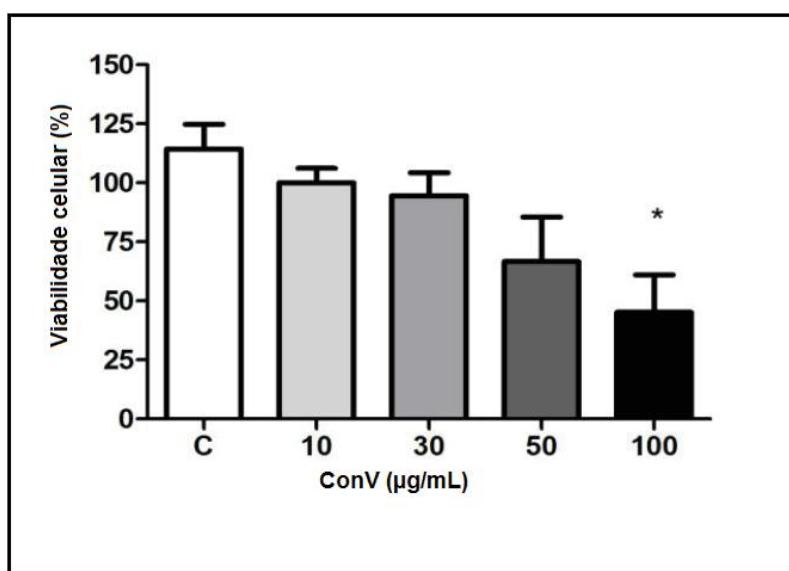
Fonte: Elaborado pelo autor. A) Dados expressos como o aumento do volume da para em μL e B) Dados expressos como área sob a curva (AUC) (Unidades Arbitrarias). Média \pm média do erro padrão ($n=6$). $p<0,05$ comparado a salina (*) ou ConV (#).

ConV apresenta efeito inflamatório que foi parcialmente reduzido pelo açúcar inibitório glicose mostrando a importância do DRC na atividade inflamatória de ConV.

Adicionalmente, o efeito edemato-gênico foi de curta duração (30 min – 4 h), diferentemente da carragenana, agente flogístico clássico, que gera um efeito edemato-gênico através de uma resposta bifásica: uma resposta inflamatória inicial que dura 6 h e uma resposta tardia com pico em 72 h, diminuindo com 96 h (HENRIQUES *et al.*, 1987; POSADAS *et al.*, 2004). Mediadores inflamatórios com origem nos mastócitos, como histamina, serotonina e óxido nítrico tem papel importante nas fases iniciais do edema induzido por carragenana (DI ROSA *et al.*, 1972). Porém, as fases tardias envolvem infiltração de neutrófilos e é mantida pela produção de prostaglandina E2, citocinas e óxido nítrico (SALVEMINI *et al.*, 1996; VINEGAR; SHREIBER; HUGO, 1969; WELDMORE; WILLIAMS, 1981). Então é possível que ConV ative diferentes cascatas de liberação de mediadores da inflamação. Já se foi visto que a aplicação local de lectinas isoladas do gênero *Canavalia* elicitam inflamação local induzindo edema de pata e/ou migração de neutrófilos como as lectinas de: *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia gladiata*, *Canavalia maritima* (ASSREUY *et al.*, 2009) e *Canavalia grandiflora* (SIMÕES *et al.*, 2012). Um outro dado importante é que o tempo do efeito inflamatório dessas lectinas varia enormemente. Para efeito de comparação o efeito edemato-gênico de ConBr e CGL durou 32 h enquanto ConM durou 5 h (ASSREUY *et al.*, 2009).

O teste do MTT baseia-se no princípio da conversão do substrato de cor amarela (MTT) em cristais de formazan, de cor violeta pelas desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Como resultado deste teste se verificou que ConV é capaz de reduzir significativamente a viabilidade celular dos gliomas de forma dose-dependente (Figura 26). O IC₅₀ calculado para a lectina foi 58,8 µg/mL. A redução da viabilidade celular induzida por ConV ocorre provavelmente porque a lectina é capaz de induzir um processo autófágico nessas células.

Figura 26 - Gráfico de concentração x viabilidade celular mostrando os resultados dos testes de citotoxicidade.



Fonte: Elaborado pelo autor. Média ± média do erro padrão (n=3). p<0,05 comparado ao controle (*).

Estudos anteriores mostraram a capacidade de ConA de induzir morte de células de glioma na linhagem de células de glioma humano U87. Foi mostrado que essa atividade se deve a regulação da proteína MT1-MMP (proteína de membrana – metaloproteinase tipo 1), uma glicoproteína fortemente expressa em gliobastomas radio- e quimioresistentes. Essa proteína é responsável por mediar a sinalização pró-apoptótica e autófágica em células de câncer do cérebro. Acredita-se que ConV induza o processo autófágico pelo mesmo mecanismo (BELKAID *et al.*, 2007; GINGER *et al.*, 2000; PRATT; ROY; ANNABI, 2012).

Considerando os resultados do teste de edema de pata e citotoxicidade para células de glioma pode-se sugerir que o processo inflamatório agudo elicitado pela lectina se correlaciona positivamente com o potencial anticâncer da mesma visto que durante o processo inflamatório há expressão de genes que podem inibir o processo cancerígeno bem como há uma participação do sistema imune que também atua nesse processo.

4.7 Docking molecular

O primeiro passo da realização do docking foi a validação do protocolo. Para esse processo foi feito o *docking* do ligante da estrutura cristalina (α -metil-D-manosídeo) no intuito de se tentar reproduzir o modo de ligação original. Como resultado se verificou que o alfa-metil-manosídeo ligou da mesma forma no qual foi vista na estrutura cristalográfica validando, desta forma, as configurações para o *docking*.

O segundo passo foram as simulações com os carboidratos. Como resultado se verificou que todos os açúcares testados se ligaram de forma favorável ao domínio de reconhecimento a carboidrato. Os scores obtidos estão mostrados na tabela 03.

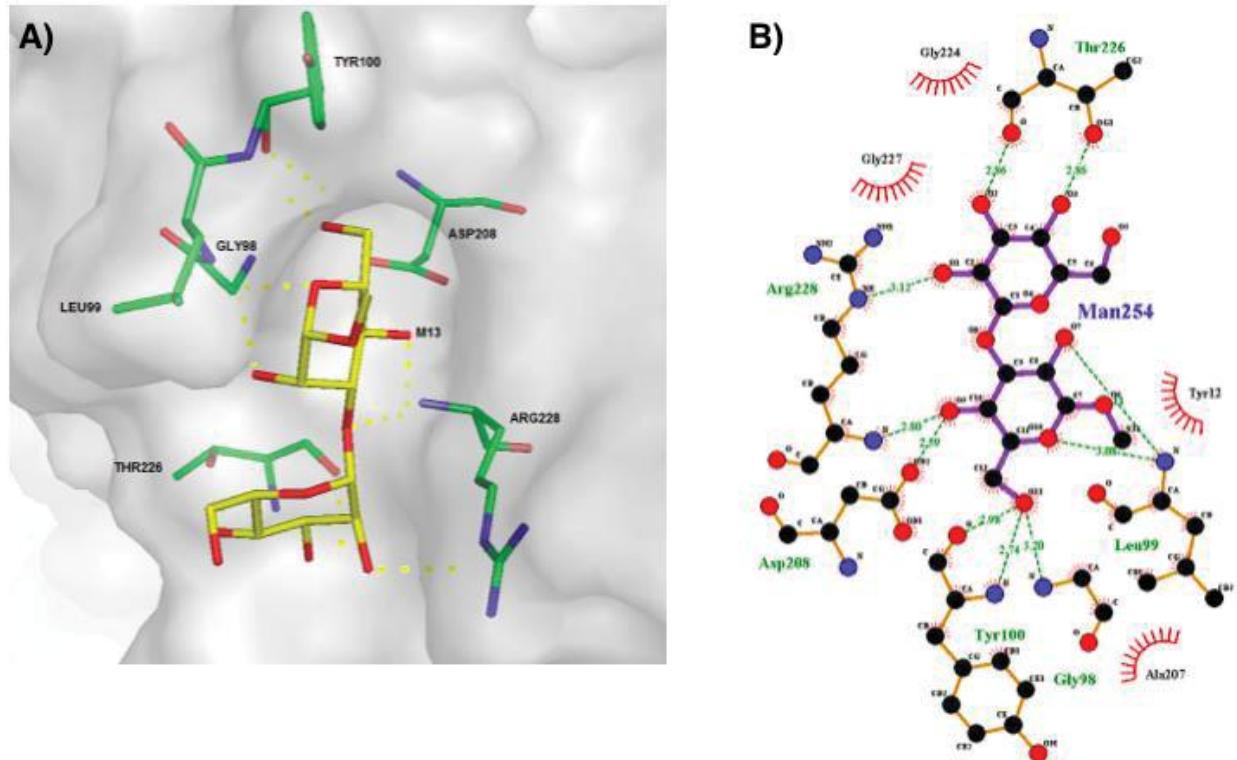
Tabela 3 – Escores obtidos no docking de ConV com diversos carboidratos.

Carboidrato	Escore
<i>N</i> -acetil-D-manosamina	-47,98
Trealose	-47,42
α -metil-D-manosídeo	-43,68
α -metil-D-glicosídeo	-43,27
Maltose	-43,11
D-manose	-40,75
D-glicose	-40,56
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	-37,19
D-Manose- α -1,2-D-manose	-54,34
D-Manose- α -1,3-D-manose	-58,24
D-Manose- α -1,4-D-manose	-45,31
D-Manose- α -1,6-D-manose	-53,27
D-Man- α -1,3-D-man- α -1,6-D-manose	-56,08

Em geral os valores de score obtidos correlacionam bem com os dados que se tem na literatura sobre a afinidade de lectinas de Diocleinae (DAM *et al.*, 2011; OSTERNE *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014). Como mostrado na tabela acima, ConV possui alta afinidade por di- e trimanosídeos, principalmente pelo dimanosídeo- α 1,3 que

obteve score de -58,24 e o trimanosídeo com score -56,08. A representação do CRD e o LigPlot de ConV com o dimanosídeo α -1,3 são mostrados na figura 27.

Figura 27 – Representação e LigPlot do DRC de ConV ligado ao dimanosídeo manose- α -1,3-manose como mostrado pelo docking molecular.



Fonte: Elaborado pelo autor. A) Representação do DRC ligado ao dimanosídeo (M13), os aminoácidos participantes da ligação (LEU99, GLY98, TYR100, ASP208, THR226, ARG 228) estão representados como sticks com carbonos em verde, o M13 está representado com carbonos em amarelo e B) LigPlot da interação entre a lectina e o M13.

Estas análises suportam a hipótese que a lectina é capaz de interagir com os *N*-glicanos presentes nas glicoproteínas envolvidas no processo inflamatório desencadeando os efeitos observados tanto no teste do edema de pata quanto no teste de citotoxicidade (OSTERNE, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2014). Sugere-se que as interações de ConV com *N*-glicanos contendo *high-manose* são responsáveis pela atividade biológica da lectina.

5 CONCLUSÃO

Através da realização desse trabalho foi possível obter a estrutura primária e tridimensional da lectinas extraída de sementes de *Canavalia virosa*. ConV apresentou alta homologia sequencial com as lectinas manose/glicose da mesma subtribo. A estrutura tridimensional de ConV também mostrou alta similaridade com lectinas de Diocleinae com alta conservação tanto no domínio de reconhecimento a carboidratos quanto no sítio de ligação a metais. A interação de ConV com o α -metil-D-manosídeo também foi elucidada e parece seguir os mesmos princípios de outras lectinas similares. Mas apesar da alta similaridade estrutural dessas lectinas a mudança na posição de certos resíduos poderia ser a causadora dos diferentes resultados de atividades biológicas entre essas lectinas tão similares.

Em relação a participação no processo inflamatório, ConV apresenta atividade pró-inflamatória de curta duração em comparação com outras lectinas de Diocleine. Esse efeito foi parcialmente inibida por D-glicose indicando que essa atividade depende do DRC da lectina. Propõe-se que ConV é capaz de ativar diferentes cascatas de liberação de mediadores da inflamação. A atividade citotóxica de ConV para células de glioma de rato demonstraram que a lectina possui atividade citotóxica o que se deve, possivelmente, a ligação da lectina com a proteína de membrana – metaloproteinase tipo 1. O docking molecular revelou que ConV possui alta afinidade por manosídeos e é proposto que a lectina exerça sua atividade pela ligação com *N*-glicanos presentes nas glicoproteínas e em outras estruturas celulares.

Esses resultados sugerem que ConV pode ser utilizada como ferramenta no estudos de estrutura-função de lectinas, mecanismos da inflamação e como potencial agente anticâncer. Como próximos passos se espera conseguir elucidar os alvos moleculares e os mecanismos pelo qual a lectina atua nesses processos.

REFERÊNCIAS

- ABERGEL, C. Molecular replacement: tricks and treats. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 69, p. 2167-2173, 2013.
- ADAMS, P.D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Cryst.**, v. 66, p. 213-221, 2010.
- AGRAWAL, B.B.L.; GOLDSTEIN, I.J.. Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochem. J.**, v. 96, p. 23-25, 1965.
- AHMED, K.B.A.; MOHAMMED, A.S.; VEERAPPAN, A. Interaction of sugar stabilized silver nanoparticles with the T-antigen specific lectin, jacalin from *Artocarpus integrifolia*. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 145, p.110-116, 2015.
- ALMEIDA, A.C. *et al.* Purification and Partial Characterization of a New Mannose/Glucose-Specific Lectin from *Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth Seeds Exhibiting Low Toxicity on Artemia sp. **Int. J. Ind. Med. Plant**, v. 47, p. 1567-1577, 2014.
- ALVES, A.C. *et al.* A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of **Clathrotropis nitida**: partial characterization and immobilization in chitosan beads. **Archs. Biochem. Biophys.**, v. 588, p.33-40, 2015.
- AMERICAN CANCER SOCIETY **Glioma**. 2014. Disponível em: <http://www.cancer.org/>. Acesso em: 23/01/2016.
- ASSREUY, A.M.*et al.* Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v. 6(3), p. 201-10, 1997.
- ASSREUY, A.M.S. *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 380, p. 509-521, 2009.
- AUB, J.C.; SANFORD, B.H.; COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **PNAS- Biol. Sciences.**, v. 54 (2), p. 396-399, 1965.
- AZEVEDO, W.F. **Cristalização de macromoléculas biológicas**, São José do Rio Preto. SP, 2004.
- BALLIANO, T.L. **Estudos em biologia estrutural e química medicinal no planejamento de novos inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***. 2010. Tese (Doutorado em Física Aplicada) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. **Int. J. Anal. Chem.**, v. 2012, p.1-40, 2012.

BARROSO NETO, I.L. **Resolução da estrutura de uma lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. com efeitos sobre mecanismos inflamatórios.** 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, 2010.

BARROSO-NETO, I.L. *et al.* Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 82, p.464-470, 2016.

BARROSO-NETO, I.L. *et al.* Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 543, p.31-39, 2014.

BELKAID, A. *et al.* Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new "bioswitch" function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. **Neoplasia.**, v. 9, p. 332-340, 2007.

BENEVIDES, R.G. **Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina recombinante de sementes de *Platypodium elegans* Vogel**, 2011. 292 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.** v. 21, p. 167-223, 2000.

BEZERRA, E.H.S. *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 408, n. 4, p.566-570, 2011.

BEZERRA, E.H.S. *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 408, p. 566-570, 2011.

BEZERRA, G.A. *et al.* Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure–biological activity relationship in legume lectins. **J. Struct. Biol.**, v. 160, n. 2, p.168-176, 2007.

BEZERRA, M.J.B. *et al.* Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 45, p.807-815, 2013.

BOUCKAERT, J. *et al.* The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **J. Biol. Chem.**, 275, 19778–19787. 2000.

CALVETE, J.J. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Lett.**, v. 27, p. 286-292, 1998.

CARNEIRO, P.S. **Análise Da Expressão Diferencial Dos Genes Envolvidos Na Resposta Inflamatória Aguda E Crônica E Sua Influência Na Carcinogênese Química Cutânea Em Camundongos Geneticamente Selecionados Para Alta Ou Baixa Reatividade Inflamatória Aguda.** 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Universidade de São Paulo, 2009.

CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A., HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64-67, 1985.

CARVALHO, A.S. *et al.* Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 75, p.402-408, 2015.

CASTILHO, P.V. *et al.* Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. **FEBS J.** v. 275, p. 948-959, 2008.

CAVADA, B. S. *et al.*, cDNA cloning and 1.75 Å° crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS J.**, v. 273, p. 3962–3974, 2006.

CAVADA, B.S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci.** v. 2, p. 123-35, 2001.

CHAMBERY, A.; DI MARO, A.; PARENTE, A. Primary structure and glycan moiety characterization of PD-Ss, type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. seeds, by precursor ion discovery on a Q-TOF mass spectrometer. **Phytochem.**, v. 69, p. 1973–1982, 2008.

CHARUNGCHITRAK, S. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chem.**, v. 126, p.1025-1032, 2011.

CHEN V.B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 66, p. 12-21, 2010.

CHIAL, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. **Nat. Education.**, v.1, p. 33, 2008.

CHO, J. *et al.* Lectin-Tagged Fluorescent Polymeric Nanoparticles for Targeting of Sialic Acid on Living Cells. **Biomacromol.**, v. 15, p.2012-2018, 2014.

COLEMAN, R.G. *et al.* Ligand Pose and Orientational Sampling in Molecular Docking. **Plos One.** v. 8, 2013.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Crystallography. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 50, p. 760–763, 1994.

COON, J.J. *et al.* Tandem Mass Spectrometry for Peptide and Protein Sequence Analysis. **BioTechniques.**, v. 38, p. 519-523, 2005.

COOPER, D.R. *et al.* X-ray crystallography: Assessment and validation of protein-small molecule complexes for drug discovery. **Expert. Opin. Drug. Discov.**, v. 6, p. 771-782, 202.

CORNER, J.; BAILEY, C. **Cancer nursing : care in context**, 2^a ed. Oxford, Wiley-Blackwell, 2008.

CORREIA, J.L. *et al.* Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules.** v. 16, p. 9077-89, 2011.

- DAM, T.K. *et al.* Fine specificities of two lectins from *Cymbosema roseum* seeds: a lectin specific for high-mannose oligosaccharides and a lectin specific for blood group H type II trisaccharide. **Glycobiology**, v. 21, p. 925-933, 2011.
- DAS, A. *et al.* Characterization of a Highly Potent Insecticidal Lectin from *Colocasia esculenta* Tuber and Cloning of Its Coding Sequence. **Ajps**, v. 04, p. 408-416, 2013.
- DELATORRE, P. *et al.* Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **J. Struct. Biol.**, v. 154, p. 280-286, 2006.
- DELATORRE, P. *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct. Biol.**, v. 7:52, p. 1-9, 2007.
- DESSAU, M.A.; MORDIS, Y. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. **J. Vis. Exp.**, v. 47, p. 2285, 2011.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 24, p. 89–102, 1972.
- EMSLEY, P. *et al.* Features and Development of Coot. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 66, p. 486-501, 2010.
- ENDO Y. *et al.* The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 5908–5912, 1987.
- FELDSTED, R. *et al.* Recombination of subunits of *Phaseolus vulgaris* isolectins. **J Biol Chem.**, v. 252, p. 2967–2971. 1977.
- FISHER, J. *et al.* Characterisation of glycoconjugates of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastric neoplasms. **J. Histochem. Cytochem.**, V. 32, p. 681-689, 1984.
- FORD-HUTCHINSON, A. W. Activation of leukotriene production in granulocytes: effects on cell activation. **Immunol. Ser.**, v. 57, p. 87-106, 1992.
- FRANZ, S. *et al.* Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. **Cytometry A**. v. 69, p. 230-9, 2006.
- FURNARI, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. **Genes Dev.**, v. 21, p. 2683-2710, 2007.
- GAIKWAD, S.M., KHAN, M.I. Binding of T-antigen disaccharides to *Artocarpus hirsuta* lectin and jacalin are energetically different. **Photochem Photobiol.** v. 82, p. 1315-8, 2006.

- GARCIA-PINO, A. *et al.* Interplay between metal binding and cis/trans isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of *P. angolensis* lectin. **J. Mol. Biol.**, v. 361, p. 153-167, 2006.
- GILROY, D.W. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev. Drug. Discov.**, v. 3(5), p. 401-16, 2004.
- GINGER, D. *et al.* Rapid activation of matrix metalloproteinase-2 by glioma cells occurs through a posttranslational MT1-MMP-dependent mechanism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1497, p. 341-350, 2000.
- HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J.R. Mass spectrometry for proteomics. **Curr. Opinion Chem. Biol.**, v. 12, p.483-490, 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- HE, X. *et al.* Lectin-Conjugated Fe 2 O 3 @Au Core@Shell Nanoparticles as Dual Mode Contrast Agents for in Vivo Detection of Tumor. **Mol. Pharmaceutics**, v. 11, p.738-745, 2014.
- HEGI, M. E. *et al.*, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, p. 997-1003, 2005.
- HENRIQUES, M.G. *et al.* Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol.**, v. 20, p. 243–249, 1987.
- HOFFMAN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: principles and applications**. England: John Wiley & Sons, 2007.
- HOLLINGSWORTH, S.A.; KARPLUS, P.A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. **Biomol. Concepts.**, v. 1, p. 271-883, 2011.
- HOLTON, J.M. *et al.* The R-factor gap in macromolecular crystallography: an untapped potential for insights on accurate structures. **Febs J.**, v. 281, p. 4046-4060, 2014.
- IRWIN, J.J.; SHOICHE, B.K. ZINC -a free database of commercially available compounds for virtual screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 45, p. 177-182, 2005.
- JANCARIK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J Appl Crystallogr**, v. 24, p. 409-411. 1991.
- JOHNSON, G. G., WHITE, M. C.; GRIMALDI, M. Stressed to death: targeting endoplasmic reticulum stress response induced apoptosis in gliomas. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, p. 284-292, 2011.
- KARPLUS, P.A.; DIEDERICHS, K. Acessing and maximizing data quality in macromolecular crystallography. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 34, p. 60-68, 2015.

- KAUR, A. *et al.* Purification of 3 monomeric monocot mannose-binding lectins and their evaluation for antipoxviral activity: potential applications in multiple viral diseases caused by enveloped viruses. **Biochem. Cell Biol.**, v. 85, p. 88-95, 2007.
- KAUR, N. *et al.* A Novel Antiproliferative and Antifungal Lectin from *Amaranthus viridis* Linn Seeds. **Protein Pept. Lett.**, v. 13, p. 897-905, 2006.
- KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica**, v. 1572, p. 187-197, 2002.
- KLAFKE, G.B. *et al.* Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. **Mycopathologia**. v. 175, p.147-51, 2013.
- KOCOUREK, J.; HOREKSI, V. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". In **lectins biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** v. 3, p 3-6, 1983.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins Basic Pathology**. 9^aed. Philadelphia: Elsevier. 2015.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p.45-55, 2010.
- LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 9, p. 674-682, 1997.
- LANDUCCI, E.C.T. *et al.* Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 578-583, 1995.
- LANOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front. Plant. Sci.**, v. 5, p. 1-16, 2014.
- LESLIE, A. G. W.; POWELL, H. R. Processing Diffraction Data with Mosflm. In: LESLIE, A. G. W.; POWELL, H. R. **Evolving Methods for Macromolecular Crystallography**. Erice: Springer Link, 2005.
- LI, H.; HE, M.; ZHANG, Z. Image definition evaluation functions for X-ray crystallography: a new perspective on the phase problem. **Acta Cryst.**, v. 71, p.526-533, 2015.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 55, p. 35-67, 1986.
- LIU, J. *et al.* Preparation and characterization of lectin-conjugated chitosan fluorescent nanoparticles. **Mol Biosyst.**, v. 6(6), p. 954-7, 2010.
- LORIS, R. *et al.* Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

- LORIS, R. *et al.* Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **J. Mol. Biol.**, v. 335, p. 1227-40, 2004.
- LOVELL, S.C. *et al.* Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. **Proteins: Struct. Func. Genet.**, v. 50 p. 437-450, 2002.
- MACEDO, M.L.; OVIVEIRA, C.F.R.; OLIVEIRA, C.T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v. 20, p. 2014-2033, 2015.
- MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation. I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v. 11, p. 571- 605, 1961.
- MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Eng. Des. Sel.**, v. 14, n. 10, p.735-745, 2001.
- MATHEW, R., KARANTZA-WADSWORTH, V. AND WHITE, E. Role of autophagy in cancer. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 7, p. 961-967, 2007.
- MCPHERSON, A. Current approaches to macromolecular crystallization. **Eur. J. Biochem.**, v. 189, p. 1-23, 1990.
- MCPHERSON, A.; GAVIRA, J.A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallogr. F Struc. Biol. Comm.**, v. 70, p. 2-20, 2014.
- MEAGHER, J. L. *et al.* Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiol.**, v. 15, p. 1033-42, 2005.
- MELENDEZ, A.; LEVINE, B. **Autophagy in C. elegans**. The *C. elegans* Research Community., 2009.
- MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes Dev.**, v. 21, p. 2861-2873, 2007.
- MONDAL, H.A. *et al.* Exploring the Insecticidal Potentiality of *Amorphophallus paeonifolius* Tuber Agglutinin in Hemipteran Pest Management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 780-790, 2012.
- MOREIRA, R. *et al.* Plant Lectins chemical and biological aspects; **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 86, p. 211-28, 1991.
- MORENO, F.B.M.B. *et al.* Identification of a new quaternary association for legume lectins. **J Struct Biol.**, 161,133–143, 2008.
- MORRIS, A.L. *et al.* Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins: struc, funct. bioinf.**, v. 12, p. 345-364, 1992.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to

- proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 16, p. 55-63, 1983.
- MURSHDOV, G.N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 67, p. 355-367, 2011.
- MURSHID, A. *et al.* Investigating receptors for extracellular heat shock proteins. **Methods Mol. Biol.**, v. 786, p. 289-302, 2011.
- NAGANO, C.S. *et al.* Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J.**, v. 409, p. 417-428, 2008.
- NAGANO, C.S. *et al.* Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J.**, v. 15, p. 417-428, 2008.
- NASCIMENTO, A.S. *et al.* Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **J Mol Recognit.** v. 25, p. 657-64, 2012.
- OLIVEIRA, M.D. *et al.* Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p.371-376, 2008.
- OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon.** v. 44(4), p. 361-70, 2004.
- OSTERNE, V.J.S. **Aspectos estruturais do reconhecimento de carboidratos por uma lectina manose-específica de sementes de Dolichos lablab com atividade pró-inflamatória e hipernociceptiva.** 2013. 53 f. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, 2013.
- OSTERNE, V.J.S. *et al.* Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 172, p. 3342-3353, 2014.
- PEREIRA JUNIOR, F.N. **Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* hook f.** 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- PEREIRA, P.R. *et al.* Structural analysis and binding properties of isoforms of tarin, the GNA-related lectin from *Colocasia esculenta*. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, v. 1854, p. 20-30, 2015.
- PEREZ, G. *et al.* Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 843-853, 1998.
- PEREZ, G., HERNANDEZ, M., MORA, E. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochem.**, v. 29, p. 1745-1749, 1990.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**,

v. 109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v. 33, p.209-58, 1998.

PINTO-JUNIOR, V.R. *et al.* Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. *J. Mol. Recognit.*, 2015 (Epub).

PINTO-JUNIOR, V.R. *et al.* Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart.. *Molecules*, v. 18, p. 10857-10869, 2013.

PIRES, A.F. **Lectinas isoladas de sementes de Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae): modelo para estudos de relações estrutura/função de proteínas.** 150 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual do Ceará, 2011.

POLANSKY, A.; KIMMEL. M. **Bioinformatics**. Berlin: Springer-Verlag, 2007.

PORTILLO-TÉLLEZ, M.C. *et al.* Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin. *Biophysical Journal*, v. 101, p. 1423-1431, 2011.

POSADAS, I. Carrageenan-induced mouse paw edema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.*, v. 142, p. 31–338, 2004.

PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. *Glycobiol.*, v. 22, p.1245-1255, 2012.

RANGEL, T.B.A. Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of *Dioclea wilsonii*. *Molecules*, v.16, p. 5087–5103, 2011.

RAVIKUMAR, B. *et al.* Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, v. 90, p. 1383-1435, 2010.

READ, R.J. *et al.* New generation of crystallographic validation tools for the protein data bank. *Structur.*, v. 19, p. 1395-1412, 2011.

REEF, S. *et al.* A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol. Cell.*, v. 22, p. 463-475, 2006.

REGO, F.O.R. **Análise in silico de proteínas: modelo baseado na Apolipoproteína-e relacionada à doença de Alzheimer.** 2012. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Bahia, 2012.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new

ENDscript server. **Nucl. Acids Res.**, v. 42, p. 320-324, 2014.

ROCHA, K.B. *Virtual screening e dinâmica molecular para identificação de inibidores da enzima corismato sintase de *Mycobacterium tuberculosis**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2011.

ROSSITER, H., ALON, R., KUPPER, T.S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Mol. Med. Today**. v. 3(5), p. 214-22, 1997.

ROY, A. *et al.*, Binding of insecticidal lectin *Colocasia esculenta* tuber agglutinin (CEA) to midgut receptors of *Bemisia tabaci* and *Lipaphis erysimi* provides clues to its insecticidal potential. **Proteomics**, v. 14, p. 1646-1659, 2014.

SAHLY, H. *et al.* Recognition of Bacterial Surface Polysaccharides by Lectins of the Innate Immune System and Its Contribution to Defense against Infection: the Case of Pulmonary Pathogens. **Infect. Immun.**, v. 76, p.1322-1332, 2007.

SALVEMINI, D. *et al.* A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. **Science**, v. 286, p. 304-306, 1999.

SANTIAGO, M. Q. *et al.* Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **J. Mol. Recognit.**, v. 27, p. 117–123, 2014.

SANTIAGO, M.Q. **Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina extraída de sementes de *Canavalia oxyphylla* standl. & l. o. Williams**. 2013. 46 f. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, 2013.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. *et al.* A method for integrative structure determination of protein-protein complexes. **Bioinformatics**. V. 28, p. 3282-3289, 2012.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. *et al.* PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, 2005.

SCHROT, J.; WENG, A.; MELZIG, M. Ribosome-Inactivating and Related Proteins. **Toxins**, v. 7, p.1556-1615, 2015.

SEENA, S.; SRIDAR, R. Nutritional and microbiological features of little known legumes of the southwest coast of India. **Curr. Sci.**, v. 90, p. 1658-1670, 2006.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 2753-2764, 2007.

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 18, p. 385-405, 2004.

- SHOICHT, B.K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**. v. 16, p. 862-865, 2004.
- SIEVERS, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p.1-6, 2011.
- SILVA, H.C. *et al.* Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochem.**, v. 47, p. 2347-2355, 2012.
- SIMÕES, R.C. *et al.* Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. **Rapid. Comm. Mass Spectrometry.**, v. 26, p. 811–818, 2012.
- SŁOMIŃSKA-WOJEWÓDZKA, M.; SANDVIG, K. Ricin and Ricin-Containing Immunotoxins: Insights into Intracellular Transport and Mechanism of action in Vitro. **Antibodies**, v. 2, p.236-269, 2013.
- SMYTH, M.S.; MARTIN, J.H.J. x Ray crystallography. **Mol. Pathol.**, v. 53, p. 8-14, 2000.
- SOUZA, B.L. High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 59, p. 103-110, 2014.
- SOUZA, G.A. *et al.* Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin., **Glycobiology**, v. 13, p. 961-972, 2003.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 827-872, 1995.
- STEPHEN, F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402,1997.
- STEWART, P.D.S. *et al.* Random Microseeding: A Theoretical and Practical Exploration of Seed Stability and Seeding Techniques for Successful Protein Crystallization. **Cryst. Growth Des.**, v. 8, p. 3432-3441, 2011.
- SULÁK, O. *et al.* *Burkholderia cenocepacia* BC2L-C Is a Super Lectin with Dual Specificity and Proinflammatory Activity. **Plos Pathog.**, v. 7, 2011.
- TABASSUM, D.P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 15, p. 473-483, 2015.
- TEIXEIRA, C.S. *et al.* Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice. **Process Biochem.**, v. 49, n. 3, p.529-534, 2014.
- THALLER, C. *et al.* Repeated seeding technique for growing large single crystals of proteins. **J. Mol. Biol.**, v. 147; p. 465-469, 1981.

- TOPIN, J. *et al.* Deciphering the Glycan Preference of Bacterial Lectins by Glycan Array and Molecular Docking with Validation by Microcalorimetry and Crystallography. **PLOS One.**, v. 19, 2013.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **J. Appl. Cryst.**, v. 30, p. 1022-1025, 1997.
- VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.17, p.575-692, 1998.
- VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. Distribution and Evolution of the Lectin Family in Soybean (Glycine max). **Molecules**, v. 20, p.2868-2891, 2015.
- VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., & PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258–262, 1991.
- VASCONCELOS, M.A. *et al.* Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **Biomed Res. Int.**, v. 2014, p.1-9, 2014.
- VASCONCELOS, M.A. *et al.* Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 81, p. 600-607, 2015.
- VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. **Scand. J. Immunol.**, v. 59, p. 25-33, 2004.
- VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 166, p. 96-103, 1969.
- WAH, D.A. *et al.* Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. **Journal of Molecular Biology**, Cary, v. 310, p. 885- 894, 2001.
- WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Eng.**, v. 8, p. 127-134, 1996.
- WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature.**, v. 289, p. 646-650, 1981.
- WILKINS, M.R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods Mol. Biol.**, v. 112, p. 531-552, 1999.
- WILLIAMS, A.; WESTHEAD, D. Sequence relationships in the legume lectin fold and other jelly rolls. **Protein Eng. Des. Sel.**, v. 15, p.771-774, 2002.

- WLODAWER, A. *et al.* Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. **FEBS J.**, v. 280, p. 5705-5736, 2013.
- WOOH, J.W. *et al.* Comparison of three commercial sparse-matrix crystallization screens. **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.**, v. 59, p. 769-772, 2003.
- XU, H.L. *et al.* Molecular modeling, docking and dynamics simulations of GNA-related lectins for potential prevention of influenza virus (H1N1). **J. Mol. Model.**, v. 18(1), p. 27-37, 2012.
- YAU, T. *et al.* Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules.**, v. 20, p.3791-3810, 2015.
- YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; THIBAULT, P. Mass spectrometric analysis of genetic and post-translational heterogeneity in the lectins jacalin and *Maclura pomifera* agglutinin. **Glycoconj J.**, v. 12, p. 135-141. 1995.
- ZAMORA-CABALLERO, S. *et al.* Quaternary structure of Dioclea grandiflora lectin assessed by equilibrium sedimentation and crystallographic analysis of recombinant mutants. **FEBS Lett.**, v. 19, p. 2290-2296, 2015.
- ZHU, K. *et al.* Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. **BMC Genom.** v. 16, p. 1-11, 2015.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet.**, v. 357, p. 539–545, 2002.
- COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature.**, v. 420, p. 860–867, 2002.
- KUPER, H.; ADAMI, H.O.; TRICHOPOULOS, D. Infections as a major preventable cause of human cancer. **J. Intern. Med.**, v. 248, p. 171–183, 2000.
- CHANG, H.Y. *et al.* Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol.**, v. 2, p. E7, 2004.
- WANG, W.S. *et al.* Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. **Carcinogenesis.**, v. 27, p. 1113–1120, 2006.
- GALON, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science.**, v. 313 p. 1960–1964, 2006.

ULRICH, C.M.; BIGLER, J.; POTTER, J.D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 6, p. 130–140, 2006.

SMYTH, M.J.; DUNN, G.P.; SCHREIBER, R.D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Adv. Immunol.**, v. 90, p. 1–50, 2006.