

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

EMMANUEL SILVA MARINHO

**CRISTALIZAÇÃO, ANÁLISE PRELIMINAR DE DIFRAÇÃO DE
RAIOS X, DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR E
SEQUÊNCIA PROTÉICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE
UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea virgata***

**FORTALEZA
2010**

EMMANUEL SILVA MARINHO

**CRISTALIZAÇÃO, ANÁLISE PRELIMINAR DE DIFRAÇÃO DE
RAIOS X, DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR E
SEQUÊNCIA PROTÉICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DE
UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea virgata***

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA
2010

M290c Marinho, Emmanuel Silva

Cristalização, análise preliminar de difração de raios x, determinação da massa molecular e sequência protéica por espectrometria de massa de uma lectina de sementes de *Diolea virgata* / Emmanuel Silva Marinho, 2010.

64 f. ;il. enc.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Área de concentração: Bioquímica vegetal

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências.
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular, Fortaleza, 2010.

1. Lectinas 2. Espectrometria de massa 3. Leguminosa I. Cavada,
Benildo Sousa (orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação
em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

EMMANUEL SILVA MARINHO

**CRISTALIZAÇÃO, ANÁLISE PRELIMINAR DE DIFRAÇÃO DE
RAIOS X, DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR E
SEQUÊNCIA PROTÉICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA
DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea virgata***

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 16 de Agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA



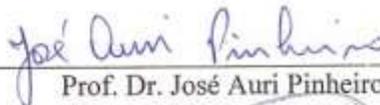
Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC



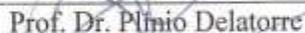
Prof. Dr. Jorge Luiz Martins
Universidade Federal de Pelotas - UFPel



Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. José Auri Pinheiro
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof. Dr. Plínio Delatorre
Universidade Federal da Paraíba - UFPb

Aos meus pais Manoel e Luiz

A minha mãe Germana

A minhas filhas Emanuelle e Germana (in memoriam)

A Gerardo (in memoriam)

A minha linda Márcia

Dedico

AGRADECIMENTOS

Professor Doutor Benildo Sousa Cavada, tudo o que eu possa vir a escrever, será sempre pouco para exprimir toda a gratidão que sinto, o senhor me estendeu a mão e me segurou no momento mais difícil que já vivi até hoje, me amparou, me segurou, me guiou, foi mais que um orientador, foi um PAI; eu me considero muito abençoado por Deus ter colocado o senhor na minha vida. É muito difícil expressar em palavras o significado que o senhor tem na minha vida, pois aprendi a admirá-lo, a ter o senhor como uma fortaleza, que me faz muita falta... um amigo eterno, pois acredito que o que Deus uniu na terra está unido nos céus..., estarei sempre do seu lado, pois o senhor tem minha lealdade e apoio eterno. Muito obrigado!

Ao meu querido Professor Doutor Jorge Martins, sou muito grato pela honra, amizade e sabedoria.

Aos meus amigos Professor Doutor Ricardo Santos e Cíntia, pela amizade e apoio nos momentos difíceis que vivemos juntos, pelo companheirismo, apoio incondicional e por se tornarem parte de minha família, muito obrigado de coração.

Ao meu amigo Professor Doutor Edson Holanda pelo reconhecimento, apoio e conselhos sensatos.

À Professora Doutora Tatianne Santi-Gadelha, pelos ensinamentos que me iniciaram nesse mundo lindo que é a Bioquímica, serei sempre grato minha querida “chefe”.

Ao meu amigo professor Doutor Carlos Alberto Gadelha, pela paciência e dedicação nos ensinamentos de Bioquímica.

Aos companheiros de Laboratório Rolando Rivas, Celso Nagano, Pepeu, Kyria Santiago, Batista Cajazeiras, Victor, Taianá, Gustavo, Georg, Emmanuel Prata, Creusa, Luciana Melo, Bruno, Raniere, Alfa, Maria Julia, Junior, Ito e Plínio por todos os momentos juntos, que ajudaram no meu crescimento profissional.

À minha amiga Raquel Benevides, por todo apoio e incentivo, fundamentais a conclusão deste trabalho.

Aos meus queridos amigos “*Turtles Fighter*” Eduardo, Rafael e Helton, por tanto apoio, dedicação, que fizeram o sonho de ser Doutor uma realidade, muito obrigado.

Ao meu amigo prof. Ms.Francisco Eudásio Ferreira Batista, por acreditar em mim, ser sempre um amigo que me escuta e me aconselha, muito obrigado.

Ao professor Dr. Augusto Ferreira Neto, pelo apoio e pela confiança no meu trabalho.

Aos meus amigos e companheiros de FAK, Carlos e Angelina, pela compreensão e apoio em momentos difíceis.

Ao meu amigo professor João Bosco Ribeiro, pela amizade, pelo apoio e ajuda, os quais tornaram essenciais a conclusão desse trabalho.

Aos meus sobrinhos Igor, Yuri “o Bem”, Bruna, Clomilinho, pelos momentos de descontração e pela admiração que vocês tem por mim, muito obrigado.

Ao meu sobrinho Davi “tessis”, que trouxe vida e esperança a essa família tão marcada por perdas irreparáveis, um beijo.

A Dona Rita, pela torcida e apoio, e por ter me dado aquela que traz luz ao meu dia, minha linda Márcia; e por amar tanto a razão do meu viver, Emanuelle.

A “6são” e Adriana, Danilo, Renata e Gerardo “Tatá” Júnior pelo apoio, pela união nesse barco tão complexo chamado família.

Aos meus afilhados Irven, Mirela e Larinha que representam o carinho e amor que seus pais tem por mim, unindo nossas famílias.

Aos meus grandes irmãos Rodrigo Marroquim e Batista, pelos momentos de desabafo e apoio incondicional.

A Tia Djanira de Moraes Pinho, pelo grande apoio, essencial para o meu crescimento intelectual.

A Sylvania, pela dedicação incondicional e apoio espiritual em todos os momentos desta jornada. Muito obrigado!

À minha filha Emanuelle, por ser minha grande companheira, estar sempre ao meu lado e apesar da pouca idade, demonstrar tanta maturidade em compreender essa vida corrida que vivemos, por ser tão carinhosa, por saber ceder os momentos de lazer em prol de um objetivo maior, por sempre estar disposta a me beijar, independente da hora e do momento. Valeu Manu! Foi por você e para você.

A minha filha Germana (*in memorian*), por nos mostrar o quão frágil é a nossa existência e nos fazer refletir sobre os verdadeiros valores dessa vida, por ser uma saudade constante e um amor eterno. Um beijo minha filha.

Aos meus pais Manoel, Luiz e Germana por todo o carinho, dedicação, amor e orientação que fazem de mim a pessoa que sou.

Márcia, minha amada guerreira, linda com seus cabelos negros, seu jeito decidido e ao mesmo tempo frágil, minha companheira, que aprendeu a viver, sobreviver, lutar, a levantar, sempre para frente, sempre buscando apenas paz para poder viver, sempre buscando ajudar, disposta, incansável. Você é o meu sonho de consumo, o meu tudo, a você eu entreguei o meu coração, e você tem cuidado dele melhor do que eu. Você me faz querer estar em casa, me faz ter vontade de acordar de um sonho lindo, pois você torna a realidade muito mais linda, você me faz um pessoa melhor. Márcia, você é um exemplo de amiga, filha, mãe, esposa, mulher, você é tudo, sem você não sou nada, e só vale a pena viver enquanto eu puder sentir você perto de mim, olhar para os seus olhos castanhos, e me encantar com sua beleza, ficando extasiado, totalmente apaixonado, nas nuvens, pois esse efeito em mim, só você consegue causar, te amo, e espero estar aqui somente enquanto você estiver, pois sem você, não existe o hoje, nem o amanhã. Te amo minha coisinha.

Professor Doutor José Auri Pinheiro, o senhor sempre acreditou em mim, desde a graduação, sempre estando ali, bem pertinho, calmo, tranquilo, me observou sempre, mesmo quando estava longe da faculdade, e nunca desistiu de mim, quando eu, em desespero lhe procurei, o senhor me ouviu, e me entregou ao professor Benildo, me encaminhou para a luz, me ajudando a descobrir quem eu realmente era, a aprender o significado de ser professor, cuidou de mim, sempre a espreita, olhando, mesmo em silêncio, aconselhando, me orientando. Peço a Deus todo dia me tornar um homem tão honrado e sábio quanto o senhor, pois para mim o senhor é o meu espelho, um exemplo de vida, um homem honrado que mesmo nos momentos mais difíceis, soube agir com dignidade, honra, independente das consequências, sempre verdadeiro, um pai apaixonado, um mestre carinhoso, um amigo sábio e fiel, como é difícil falar o que o senhor é para mim,

pois vocês, o senhor e o professor Benildo, são o que há de melhor , e o mais nobre que o homem pode ser, aprendi muito, aprendi a amá-los e admirá-los; Sou muito sortudo por poder estar perto de vocês. Do seu eterno aprendiz, Emmanuel Marinho.

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXILIO DAS SEGUINTEs INSTITUIÇÕES:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos convênios estabelecidos com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT/CNPq), pelos constantes auxílios de pesquisa concedidos ao BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará).

Universidade Federal do Ceará pelo apoio oferecido para as viagens de coleta de sementes e de material botânico.

Laboratório de Moléculas Biologicamente ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, onde este trabalho foi realizado.

Confia no Senhor de todo o teu coração, e não confies em tua prudência.

Reconhece-o em todos teus caminhos, e ele consertará tuas veredas.

Não sejas sábio a teus próprios olhos, teme ao Senhor e deixa o mal.

Isso será saúde para o teu corpo e refrigério para teus ossos.

*Feliz é o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire entendimento;*

*Pois é melhor que sua mercadoria,
que os artigos de prata e seu ouro mais fino”.*

Provérbios 3:5-8, 13-14.

RESUMO

A lectina de sementes de *Dioclea virgata* (Dvir) foi purificada e submetida a experimentos de cristalização, determinação da massa molecular e sequência protéica por espectrometria de massa. Os cristais da proteína foram obtidos complexados com *X-man* e utilizando o método de difusão de vapor a uma temperatura constante de 293 K, e cresceu em uma condição contendo 0,5 M de sulfato de amônio, 0,1 M de citrato de sódio tribásico dihidratado pH 5,6 e 1,0 M de sulfato de lítio monohidratado. Um completo conjunto de dados foi coletado em 1,8 Å de resolução usando uma fonte de radiação síncrotron. O cristal de Dvir pertence a um grupo espacial I222 ortorrômbico centrado, com parâmetros de célula unitária $a = 647.5 \text{ \AA}$, $b = 86.6 \text{ \AA}$, $c = 90.2 \text{ \AA}$ e os ângulos $\alpha = 90.0^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90.0^\circ$. A melhor solução para a pesquisa de substituição molecular teve um coeficiente de correlação de 77,1% e um *Rfactor* de 44,6%. A lectina possui massa molecular de 25412 Da \pm 2 (cadeia α) em pH 6,5 ou superior, se encontra em um arranjo tetramérico e se apresenta como dímero na unidade assimétrica sugerindo um empacotamento cristalino similar a outra lectina da subtribo *Diocleinae*, *D. guianensis*, *D. rostrata*, a respeito do sítio de ligação a carboidrato e os contatos diméricos

Palavras Chave: Lectina, Espectrometria de massa, leguminosa.

ABSTRACT

The lectin from *Dioclea virgata* (Dvir) was purified and subjected to crystallization experiments, determination of protein molecular weight and sequence by mass spectrometry. The crystals of the protein complexes were obtained by X-ray and using the vapor diffusion method at a constant temperature of 293 K and grew in a condition containing 0.5 M ammonium sulphate, 0.1 M sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6 and 1.0 M lithium sulphate monohydrate. A complete data set was collected at 1.8 Å resolution using a synchrotron radiation source. Dvir The crystal belongs to a centered orthorhombic space group I222, with unit cell parameters $a = 647.5 \text{ \AA}$, $b = 86.6 \text{ \AA}$, $c = 90.2 \text{ \AA}$ and angles $\alpha = 90.0^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90.0^\circ$. The best solution for the detection of molecular replacement had a correlation coefficient of 77.1% and 44.6% of rfactor. The lectin has a molecular mass of $25\,412 \text{ Da} \pm 2$ (α chain) at pH 6.5 or higher, is in a tetrameric arrangement and presents as a dimer in the asymmetric unit suggests a crystal packing similar to other lectin subtribe Diocleinae, *D. guianensis*, *D. rostrata*, regarding the carbohydrate-binding site and contacts dimeric.

Key words: Lectin, mass spectrometry, leguminosae.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Classificação estrutural das lectinas vegetais.....	17
FIGURA 2	Estrutura tetramérica da ConBr.....	20
FIGURA 3	Gel de eletroforese em presença de 2-mercaptoetanol da lectina purificada de <i>Dioclea virgata</i> (DvirL).....	31
FIGURA 4	Fluxograma de extração da lectina presente em semente de <i>Dioclea virgata</i>	36
FIGURA 5	Cristal da lectina de <i>D. virgata</i>	43
FIGURA 6	Alinhamento (N-terminal) de lectinas extraídas de sementes de <i>D. virgata</i> (DvirL), <i>D. guianensis</i> (Dgui), <i>D. rostrata</i> (DRL) e <i>D. grandiflora</i> (DGL).....	43
FIGURA 7	Espectro multi carregado da lectina de <i>D. virgata</i> mostrando o número de carga dos íons correspondentes a cadeia β	45
FIGURA 8	Espectro deconvoluído da lectina de <i>D. virgata</i> mostrando as massas correspondentes à cadeia α	46
FIGURA 9	Espectro deconvoluído da lectina de <i>D. virgata</i> mostrando as massas correspondentes à cadeia β e γ	47
FIGURA 10	Sequência da lectina de <i>Dioclea virgata</i>	49
FIGURA 11	Alinhamento das lectinas de <i>Dioclea wilsonii</i> (DWL), <i>Dioclea virgata</i> (DVL), <i>Dioclea grandiflora</i> recombinante (rDGL), <i>Dioclea virgata</i> (Dvir), <i>Diocela guianensis</i> (Dgui) e <i>Dioclea rostrata</i> (DRL).....	50
FIGURA 12	Peptídeo T8 mostrando a série de íons Y.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Estruturas do BioMol-Lab depositadas no PDB.....	27
TABELA 2	Composição de aminoácidos da <i>D. virgata</i> e de outras lectinas de <i>Diocleinae</i>	30
TABELA 3	Atividades imunológicas relativas <i>in vitro</i> de lectinas de <i>Diocleinae</i>	32
TABELA 4	Atividade inseticida e probiótica de lectinas de <i>Diocleinae</i>	33
TABELA 5	Estatísticas da coleta de dados.....	42
TABELA 6	Lista de Peptídeos determinados por espectrometria de massa.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BSA = Albumina Sérica Bovina

CABO = Lectina de *Canavalia bonariensis*

CFL = Lectina de *Cratylia floribunda*

ConA = Lectina de *Canavalia ensiformis*

ConBr = Lectina de *Canavalia. brasiliensis*

CRML = Lectina de Sementes de *Cratylia mollis*

DGL = Lectina de *Dioclea grandiflora*

Dgui = Lectina de *Dioclea guianensis*

DRL = Lectina de *Dioclea rostrata* Benth

DvirL = Lectina de *Dioclea virgata*

DVL = Lectina de *Dioclea violacea*

EDTA = Ácido Etilenodiaminotetraacético

ESI = Electro Spray Ionization

KDa = QuiloDalton

m/v = Relação Massa /Volume

MALDI = Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization

ND = Atividades não determinadas

Nm = Nanômetro

PAGE = Eletroforese Em Gel de Policriamida

PHA = Lectina de Sementes de *Phaseolus vulgaris*

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

TOF = Time of Flight

Tris = Tris- Hidroxiaminometano

UPSL = Lectina de Sementes de *Urtica pilulifera*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 LECTINAS	14
1.1.1 Ocorrência	15
1.1.2 Classificação Estrutural.....	15
1.1.3 Famílias de Lectinas de Origem Vegetal	17
1.1.4 Detecção e Isolamento de lectinas.....	23
1.1.5 Propriedades Biológicas.....	24
1.1.6 Estrutura Tridimensional.....	26
1.1.7 A relação atividade-estrutura das lectinas da subtribo Diocleinae.....	28
1.1.8 A lectina da <i>Dioclea virgata</i>	29
2. OBJETIVO	34
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA.....	35
3.2 CRISTALIZAÇÃO	37
3.3 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO	37
3.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	38
3.5 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA PROTÉICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	38
3.5.1 Digestão das proteínas e aquisição de dados.....	38
3.5.2.Processamento dos espectros.	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO.....	40
4.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	44
4.3 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	48
5.CONCLUSÃO.....	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS

Em 1888 *Stillmarck*, ao publicar sua dissertação intitulada “*Über ricin ein giftiges Ferment aus den samen Von Ricinus communis L. und einigen anderen euphorbiacean*” (ricina, um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de euforbiáceas), observou que as preparações dos extratos de sementes de mamonas possuíam uma proteína que tinha capacidade de aglutinar hemácias e era tóxica para animais. Outras proteínas presentes no extrato também apresentavam propriedades tóxicas, porém, sem apresentarem a atividade hemaglutinante detectada na ricina. Posteriormente, a toxicidade da ricina foi associada a um fator protéico.

Em 1948 Boyd observou que algumas proteínas exibiam uma preferência para determinadas hemácias do sistema ABO humano, e esse fato foi fundamental para que em 1954 BOYD & SHAPLEIGH introduzissem o termo “Lectina” (do latim *Legere* que significa selecionar, escolher).

GOLDSTEIN *et al.* (1980) definiram lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que interagem com carboidratos de maneira específica, aglutinando células e/ou precipitando glicoconjugados.

Em 1981 KOCOUREK & HOREJSI definiram lectinas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não imune que possuem um ou mais sítios de reconhecimento a carboidratos e/ou glicoconjugados capazes de se ligar específica e reversivelmente a terminais contendo carboidratos sem alterar a estrutura química dos mesmos, podendo eventualmente aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.

KENNEDY *et al.* (1995) definiram lectinas como proteínas que se ligam hidrofobicamente a carboidratos com características específicas, tendo habilidade de induzir a aglutinação de células.

A definição mais utilizada atualmente é a de PEUMANS e VAN DAMME (1995), que propõe que lectinas são glicoproteínas de origem não imune que contêm pelo menos um domínio não catalítico capaz de ligar-se de maneira reversível a mono ou

oligossacarídeos específicos, podendo ou não apresentar em sua estrutura domínios catalíticos.

1.1.1 Ocorrência

As lectinas são encontradas amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo tanto no reino vegetal como no animal (vertebrados e invertebrados) e também em microorganismos e vírus (SHARON & LIS, 2003).

As lectinas já foram detectadas em mais de mil espécies de plantas, muitas já tendo sido isoladas, purificadas e caracterizadas (SHARON & LIS, 2003).

Em vegetais superiores, a maior parte das lectinas estudadas pertence à divisão *Angiospermae* que é constituída pelas classes *Monocotyledoneae* e *Dicotyledoneae*. A classe das dicotiledôneas apresenta o maior número de lectinas já isoladas e caracterizadas, principalmente na família *Leguminosae* (PEUMANS *et al.*, 1986; LIENER *et al.*, 1986). Nestas, as lectinas estão localizadas nas sementes, que se acumulam na maturação e diminuem na germinação principalmente nos cotilédones, dentro de organelas conhecidas como corpos protéicos, onde perfazem até dez por cento do conteúdo protéico total, embora sejam usualmente isoladas em baixa quantidade, 0,1-1% (RÜDIGER, 1998). Em sementes de leguminosas, a maioria das lectinas está localizada nos cotilédones, lisossomos (RÜDIGER, 1998).

Atividade hemaglutinante tem sido detectada em muitas espécies de algas marinhas, particularmente em algas vermelhas (HORI *et al.*, 2000), no entanto poucas têm sido purificadas e caracterizadas, com alga vermelha *Ptilota filicina* (SAMPAIO *et al.*, 1998), *Bryothamnion triquetrum* (CALVETE *et al.*, 2000) e *Ptilota plumosa* (SAMPAIO *et al.*, 2002).

1.1.2 Classificação Estrutural

A especificidade das lectinas para determinados carboidratos tem dado base a diferentes classificações dessas proteínas. De acordo com a ligação específica a carboidrato, as lectinas podem ser divididas nas que se liga a monossacarídeos, oligossacarídeos, e as que reconhecem polissacarídeos. (WU *et al.*, 2001).

As lectinas específicas por monossacarídeos são usualmente classificadas em cinco grupos denominados: glicose/manose específico, galactose/n-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina, fucose e ácido sialico (GOLDESTEIN & PORETZ). No entanto, esta classificação, bastante utilizada para uma classificação inicial, se torna ambígua, pois a inibição de lectinas, às vezes, exige altas concentrações de açúcares, quando comparadas a concentrações inibitórias de oligossacarídeos ou glicanos complexos (PEUMANS *et al.* 2000), dando falsas idéias sobre a especificidade real.

PEUMANS e VAN DAMME (1998), fundamentados na estrutura dessas moléculas, dividiram-nas em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1).

As **merolectinas** são proteínas que são lectinas monovalentes, ou seja, possuem um único domínio de ligação a carboidratos, sendo incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados, sendo um exemplo clássico a Heveína, uma proteína quitina-ligante encontrada na seringueira, *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As **hololectinas** compreendem todas as lectinas que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos e devem se ligar ao mesmo açúcar ou a açúcares estruturalmente similares, podendo, frequentemente, aglutinarem células ou precipitarem glicoconjugados.

As **quimerolectinas** são proteínas que possuem um ou mais domínios carboidratos-ligantes, além de apresentarem um ou mais domínios não relacionados a ligação com carboidratos, que agem independentemente dos mesmos, podendo ser domínios relacionados com atividade enzimática ou qualquer outra atividade biológica.

Superlectinas são aquelas constituídas por dois ou mais sítios de ligação a carboidratos que, no entanto, reconhecem açúcares estruturalmente diferentes.

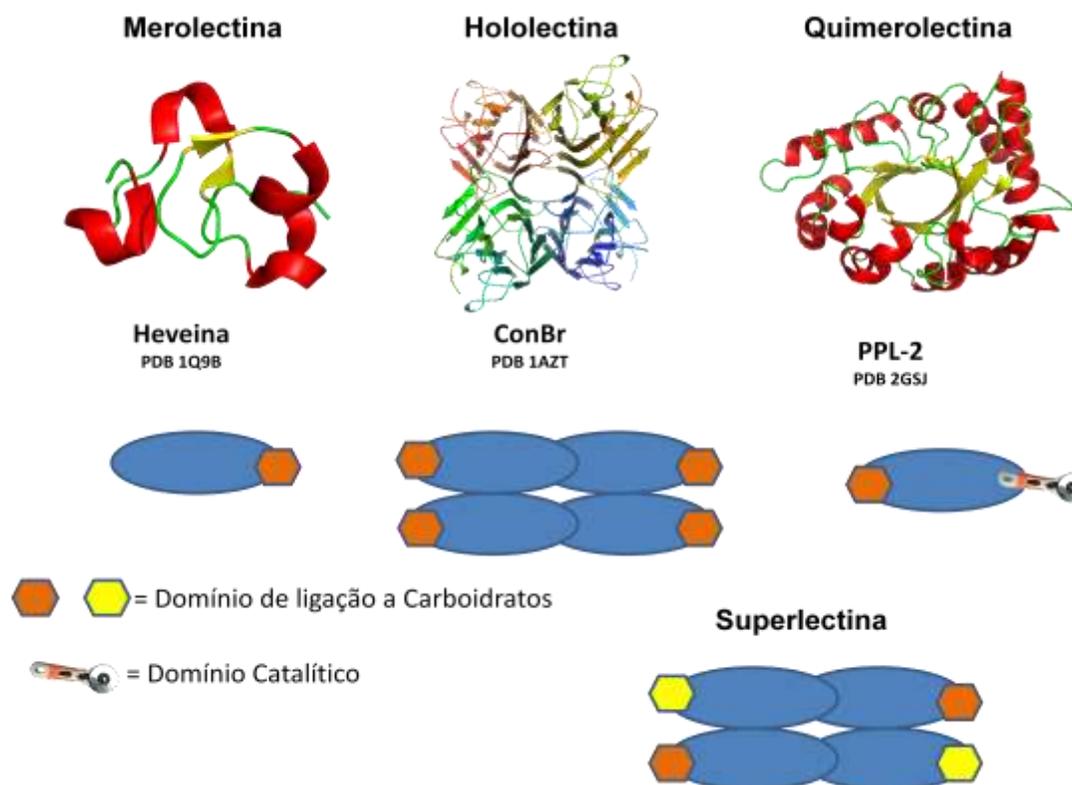


Figura 1. Classificação estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (ConBr; PDB: 1AZT), quimerolectinas (PPL-2; PDB: 2GSJ) e superlectinas (não possuem representantes com estrutura tridimensional elucidada). Adaptada de Van Damme (1998).

1.1.3 Famílias de Lectinas de Origem Vegetal

Baseando-se na similaridade exibida por suas propriedades estruturais e de sequência de aminoácidos em suas cadeias polipeptídicas estas proteínas podem ser agrupadas em famílias distintas como é o caso de algumas da família *Leguminosae*, onde encontramos lectinas com alto grau de homologia tanto na sequência de aminoácidos, como na estrutura secundária e conformação tridimensional, evidenciando assim, uma linha taxonômica bem definida (CAVADA *et al.*, 1993; SHARON e LIS, 1995).

Quatro famílias, chamadas lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledônea que se ligam a manose, lectinas que se ligam a quitina compostas de domínios heveínicos e RPs tipo 2, compreendem os membros mais numerosos de lectinas. Diferentemente, os

grupos de lectinas relacionadas à jacalina, lectinas da família Amaranthina e lectinas do floema de *Curcubitaceae* constituem, até o momento, pequenas famílias de proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.1.3.1 Lectinas compostas por domínios semelhantes ao da Heveína que se ligam à quitina

São consideradas dessa família todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio semelhante ao domínio da proteína isolada da *Hevea brasiliensis*, uma proteína formada por uma unidade estrutural de cerca de 40 resíduos de aminoácidos que reconhece quitina (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.1.3.2 Lectinas do tipo RIP

Constituem uma família de quimerolectinas constituídas por protômeros formados de um domínio na extremidade N-Terminal da cadeia A com atividade n-glicosidase e um domínio na extremidade C-Terminal da cadeia B com atividade lectínica (BARBIERI, *et al.*, 1993). Possuem capacidade de inativarem cataliticamente ribossomos (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.1.3.3 Lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose

Constituem uma super família que apresentam especificidade restrita por manose; apresentam certa heterogeneidade no que diz respeito a suas estruturas moleculares, podendo ser divididas em dois grupos, um com lectinas que possuem um, dois ou quatro protômeros com um domínio de 11-14 KDa e um segundo com lectinas compostas por um, dois ou quatro protômeros com dois domínios de cerca de 30 KDa (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.1.3.4 Lectinas relacionadas a jacalina

Esta família compreende todas as lectinas de plantas que são relacionadas estruturalmente e evolutivamente a jacalina, uma lectina galactose específica encontrada nas sementes de *Artocarpus integrifolia*, e dividem-se em subgrupos específicos por galactose e outro por manose. As lectinas relacionadas a jacalina que são específicas por galactose são constituídas por 4 protômeros idênticos consistindo de uma cadeia α e de uma pequena cadeia β de 133 e 20 resíduos, respectivamente (VAN DAMME *et al*, 1998).

1.1.3.5 Lectinas do floema de *Cucurbitaceae*

Constituem uma pequena família de aglutininas que se ligam a quitina que até agora só foram encontradas em floema das plantas da família *Cucurbitaceae*; são proteínas específicas para oligômeros de GlcNac, apresenta sua estrutura composta por dímeros de subunidades não glicosiladas de cerca de 25 KDa.

1.1.3.6 Lectinas de amarantina

Exclusivamente identificadas em sementes do gênero *amaranthus*, essa família de lectinas são proteínas homodiméricas consistindo de subunidades não glicosiladas idênticas de aproximadamente 33 KDa (VAN DAMME *et al*, 1998).

1.1.3.7 Lectinas de Leguminosas

Estas lectinas fazem parte de uma ampla família que ocorre exclusivamente em espécies da família *Leguminosae*. São lectinas que possuem semelhantes propriedades bioquímicas e estruturais, apresentam um variado e amplo grau de similaridade, mas se diferenciam na sua especificidade a carboidratos. Estas proteínas, geralmente, consistem de 2 ou 4 protômeros com massa molecular de 30 KDa, e possuem cerca de 250 resíduos de aminoácidos. (PEUMANS *et al*, 2000).

Geralmente, estas lectinas são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, no entanto algumas lectinas possuem subunidades formadas por duas cadeias, como as lectinas

da tribo *vicieae* que apresentam as suas estruturas diméricas formadas de duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída por uma cadeia α e uma cadeia β , mantidas unidas por ligações não covalentes (SHARON e LIS, 2004).

1.1.3.8 Lectinas de Leguminosas com estrutura tipo ConA

Algumas lectinas de leguminosas, principalmente as lectinas pertencentes aos gêneros *Dioclea* e *Canavalia*, necessitam de íons metálicos divalentes (geralmente Ca^{++} e Mn^{++}) para exercerem a atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos. Estes íons se ligam a sítios específicos na estrutura protéica, que confere estabilidade a ligação com carboidratos, e dando estabilidade a molécula, protegendo-a contra a inativação e viabilizando a formação do sítio de ligação a carboidratos (CAVADA *et al.*, 1993; CAVADA *et al.*, 1996).

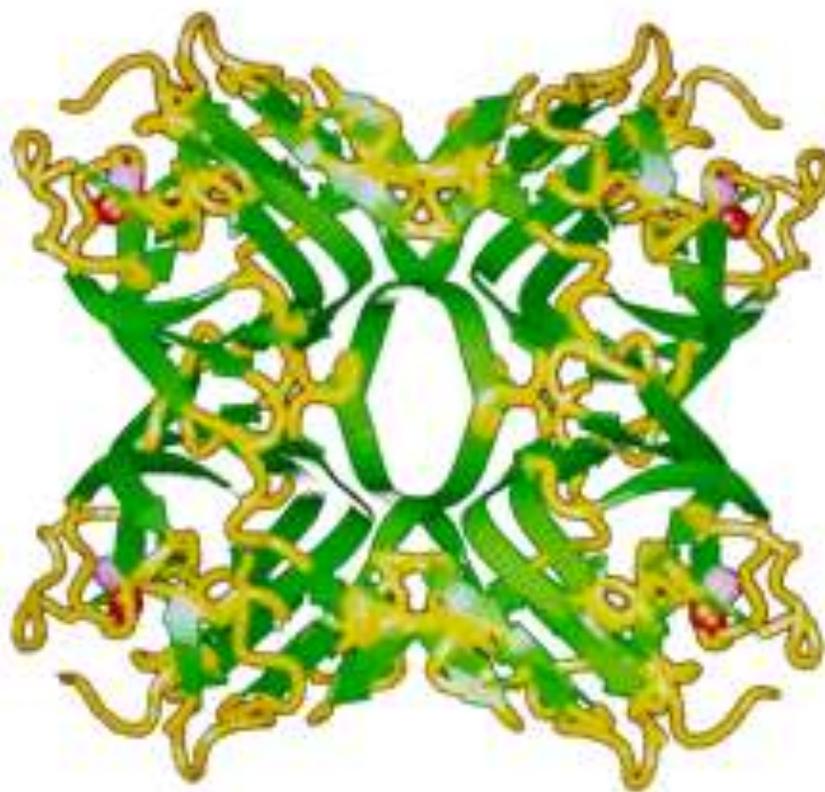


Figura 2: Estrutura tetramérica da *ConBr*, lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis*. Em magenta e vermelho estão destacados, para cada monômero, os íons Ca^{++} e Mn^{++} (adaptado de SANZ-APARÍCIO *et al.*, 1997).

A subtribo *Diocleinae* é dividida em 13 gêneros: *Canavalia*, *Cleobulia*, *Pachyrhizus*, *Collea*, *Camptosema*, *Dioclea*, *Cratylia*, *Galactia*, *Cymbosema*, *Herpiza*, *Calopogonium*, *Macropsicanthus* e *Luzonia*.

A lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA) foi a primeira lectina da subtribo *Diocleinae* que foi isolada e teve sua estrutura primária determinada e estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios-x (HARDMAN e AINSWORTH, 1972; BECKER *et al.*, 1975; DEREWENDA *et al.*, 1989). A ConA é uma lectina específica por glicose/manose e seu monômero apresenta 237 resíduos de aminoácidos, a maioria arranjados em 2 *loops* folhas β e poucos segmentos desordenados (VIJAYAN e CHANDRA, 1999); a mesma cadeia polipeptídica principal (cadeia α) está dividida em dois fragmentos (fragmentos β e γ), todos resultantes do processamento pós-tradução da pré-pro-lectina obtida a partir da tradução gênica (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Estes fragmentos somados formam a cadeia principal, mas apesar de não estarem ligados covalentemente, são ativos por serem mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é a mesma da subunidade íntegra, sem descontinuidade na sua estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975; SHARON & LIS, 1989).

A ConA é sintetizada na forma de um precursor (34KDa) que é glicosilado co-traducionalmente pela ligação covalente de um oligossacarídeo rico em manose ao resíduo ASN153 localizado na porção mediana da pro-ConA (CHRISPEELS *et al.*, 1986; HERMAN *et al.*, 1985). Durante o transporte para corpos protéicos, via Complexo de Golgi, o glicopeptídeo central é removido originando dois polipeptídeos; Estes dois polipeptídeos (metade N- e C-terminal da pro-ConA) são então processados pela remoção de peptídeos C-terminais com 11 e 9 resíduos de aminoácidos. Após processamento C-terminal, os polipeptídios sofrem uma transposição, são religados, e mais uma clivagem proteolítica ocorre removendo um peptídeo com quatro resíduos das extremidades N-terminal da cadeia já religada, originando a lectina madura não glicosilada com 30 KDa.

A ConA apresenta uma estrutura multimérica com interconversões na forma dímero-tetrâmero dependente de pH.

Fato observado para as lectinas pertencentes a outras espécies de *Diocleinae*, com propriedades físicas similares que apresentam estruturas multiméricas constituídas de monômeros idênticos em cada uma destas lectinas, cada monômero apresenta valores em

torno de 25,5 KDa. Exibindo equilíbrio entre a forma dímero-tetrâmero dependente do pH do meio e são metaloproteínas, pois requerem íons divalentes (Ca^{+2} e Mn^{+2}) para desempenharem máxima atividade biológica (RAMOS *et al.*, 2001).

Cada subunidade tem um sítio de ligação a metais e uma cavidade hidrofóbica com a qual se liga alguma molécula hidrofóbica como fitohormônios (EDELMAN e WANG, 1978).

Quanto à interação com carboidratos, *Canavalia ensiformis* (ConA), foi à primeira lectina estudada (MOOTHOO *et al.*, 1999). Após o isolamento e caracterização de outras lectinas desse grupo, foi possível realizar estudos comparativos dessas proteínas (CAVADA *et al.*; 2001). Estudos posteriores concluíram que estas possuíam sítios de interação a carboidratos idênticos a ConA, o que nos dariam a idéia de que estas proteínas poderiam possuir similaridades bioquímicas, estruturais e funcionais. Após vários estudos, apresentavam diferenças significativas na potência de várias atividades biológicas.

Utilizando a análise comparativa de sequência de resíduos de aminoácidos, modelamento molecular e inibição por diferentes açúcares e glicoconjugados, demonstrou-se que todas as lectinas possuíam os mesmos aminoácidos presentes no sítio de interação por monossacarídeos, mas exibiam diferentes potências de interação (CALVETE *et al.*, 1999). As diferenças na intensidade das atividades biológicas induzidas por lectinas de sementes de espécies da subtribo *Diocleinae* são, provavelmente, ao menos em parte, fruto das diferenças em sua especificidade fina de interação a carboidratos (DAM *et al.*, 1998).

Outro fator importante com relação as atividades biológicas das lectinas de sementes de espécies da subtribo *Diocleinae* é que elas apresentam diferenças significativas no equilíbrio dímero/tetrâmero e CALVETE e colaboradores (1999) mostraram que este distinto equilíbrio dependente do pH onde a lectina se encontra, é devido as mutações em aminoácidos chaves ao longo de sua estrutura primária. Estas diferenças, ao alterarem a estrutura terciária, se refletem, certamente, na potência das atividades biológicas.

As lectinas de *Canavalia brasilienses*, ConBr (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997), *Dioclea grandiflora*, DGL (ROZWARSKI *et al.*, 1998) e *Dioclea guianensis*, Dgui (WAH *et al.*, 2001) demonstraram por cristalografia, apresentarem estrutura consideravelmente semelhante a da ConA.

As lectinas de *Diocleinae* apresentam diferenças quanto a várias atividades biológicas, tais como indução a liberação de histamina (Gomes *et al.*, 1994, Ferreira *et al.*, 1996), mitogenicidade (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), induzem a produção de interferon gama *in vitro* (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), induzem a produção de interferon gama *in vivo* (BARRAL-NETO *et al.*, 1996), provocam a formação de edemas de patas (Bento *et al.*, 1993), ativam macrófagos (RODRIGUES *et al.*, 1992), conferem proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonenses* (BARRAL-NETO *et al.*, 1996), efeito edematogênico (ASSREUY *et al.*, 1997) proliferação de linfócitos (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), atividade pró-inflamatória (ALENCAR *et al.*, 1999), indução a produção de óxido nítrico (ANDRADE *et al.*, 1999), propriedades imunológicas *in vivo*, *in vitro* (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; BARRAL-NETO *et al.*, 1996) e em fisiologia renal (HAVT *et al.*, 2002).

Dioclea virgata é uma espécie pertencente à Subtribo *Diocleinae* (CAVADA *et al.*, 1996b) que é encontrada na região nordeste do Brasil.

1.1.4 Detecção e Isolamento de lectinas

Durante as últimas décadas, as lectinas tem se mostrado largamente distribuídas na natureza por serem isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos (plantas, algas, vertebrados, invertebrados e microorganismos, incluindo fungos e bactérias) e até mesmo em vírus (LIENER *et al.*, 1986). O procedimento mais utilizado para a detecção de lectinas está baseado na sua capacidade de aglutinar células, onde extratos são submetidos à extração com soluções tampões a diferentes pH, os extratos obtidos por centrifugação são submetidos a diluições seriadas, as quais recebem posteriormente volumes idênticos de soluções de hemácias a 2 %, tanto de hemácias humanas do sistema ABO como hemácias de coelho (SHARON & LIS, 1989).

Este método, no entanto se torna ineficaz para identificar a presença de lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos, as merolectinas, como por exemplo, a heveína.

A inibição da atividade hemaglutinante por açúcares é o método amplamente utilizado para se determinar, inicialmente, a especificidade de uma lectina (RÜDIGER, 1998).

O isolamento de lectinas começa com a extração do tecido ou órgão nos quais está presente, isto é, bastante simples, já que na maioria das vezes estas são extraídas de sementes (GOLDESTEIN & PORETZ, 1986, RÜDIGER & SCHECHER, 1993). Este procedimento utiliza, normalmente, uma solução tampão ou simplesmente salina (NaCl 0,15 mol/L), seguida opcionalmente por fracionamento protéico baseado na solubilidade ou precipitação por sulfato de amônio. O extrato ou a fração obtida, rica na atividade hemaglutinante, pode então ser submetida a diversos tipos de cromatografia: afinidade, exclusão molecular, troca iônica, interação hidrofóbica, etc. O tipo de cromatografia mais utilizado, entretanto, é a cromatografia de afinidade, onde se utiliza uma matriz que contenha o açúcar para o qual a lectina seja específica. No procedimento cromatográfico em coluna de afinidade, após a eluição de todo o material não retido (sem atividade hemaglutinante), segue-se a eluição do material retido (lectina) utilizando-se uma solução do próprio açúcar específico, ou uma mudança de pH ou de força iônica.

Os passos de purificação podem ser monitorados pelo aumento da atividade hemaglutinante, acoplado com eletroforese em gel de poliacrilamida.

1.1.5 Propriedades Biológicas

Inicialmente Stillmark (1888) observou que estas moléculas possuíam capacidade de aglutinar células, mas foi somente na segunda metade do último século que pesquisadores retomaram os estudos de atividades biológicas das lectinas. Apesar das lectinas não apresentarem função endógena elucidada, estas proteínas devido às suas propriedades de ligação específica a carboidratos, tem sido alvo de intensos estudos, por causa da sua grande aplicabilidade nas diversas áreas do conhecimento científico. Desta forma, elas são utilizadas em diversas áreas da ciência como ferramentas biológicas, como, por exemplo, na caracterização de glicoproteínas e glicopeptídeos, no estudo de diferenciação celular de células normais e cancerígenas, no estudo de mecanismos e vias de ação de células no sistema imune (RUDGER & GABIUS, 2001), no diagnóstico e nível de

malignidade tumoral, na tipagem sanguínea, no fracionamento de linfócitos e células da medula óssea para transplante de medula, na citologia genética e imunohistoquímica de células e tecidos, na estimulação de linfócitos de pacientes imunossuprimidos (RÜDIGER & GABIUS, 2001), etc. Podemos enfatizar ainda a sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos B de murinos (FRIER & RUDIGER, 1990) e linfócitos humanos (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), na estimulação de macrófagos a liberação de histamina (FERREIRA *et al.*, 1996), a indução a liberação de peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ *et al.*, 1992) e de óxido nítrico tanto *in vivo* como *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 1999), de induzir migração de leucócitos e provocar edema de pata (Bento *et al.*, 1993), indução apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001).

ASSREUY *et al.* (1997) demonstraram que lectinas que se ligam a glicose-manose, quando injetadas endovenosamente inibem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, em modelo de peritonite. ALENCAR *et al.* (1999), utilizando três lectinas que se ligam à glicose-manose e N-Acetilglicosamina, também demonstraram que a atividade antiinflamatória dessas lectinas pode ser devido a um bloqueio dos sítios ligadores das selectinas presentes nos neutrófilos. ALENCAR e colaboradores (2002), demonstraram que a lectina de *Caesalpinea echinata* é capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, de maneira dose dependente. Usando um modelo de cistite hemorrágica ASSREUY *et al.* (1999), demonstraram que lectinas vegetais são capazes de inibir os eventos inflamatórios celulares e vasculares e da lesão endotelial por ciclofosfamida em camundongos.

Tem sido demonstrado ainda o envolvimento de lectinas em mecanismos parasitários (JACOBSON E DOYLE, 1996).

No âmbito vegetal o envolvimento dessas proteínas no processo de defesa vegetal tem gerado muito interesse, e vários trabalhos mostram que estas proteínas estão envolvidas na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal e na defesa contra pragas e patógenos. Um bom exemplo é o caso da *Arabidopsis thaliana* transgênica, que expressando o gene da lectina isolada de *Galanthus nivalis* (GNA), mostrou-se parcialmente resistente ao nematóide *Meloidogyne incognita* (RIPOLL, 2003).

1.1.6 Estrutura Tridimensional

Sumner obteve a ConA purificada a partir de sua cristalização e, assim, além de ter sido a primeira a ser purificada, ela também foi a primeira lectina a ser cristalizada (SUMNER, 1919). Apesar disso, não foi dada muita importância a sua purificação até que em 1936 Sumner e Howell reportaram propriedades relevantes dessa proteína que era capaz de aglutinar eritrócitos. Desde essas descobertas passaram-se trinta e seis anos até que sua estrutura tridimensional fosse resolvida por cristalografia de raios X em 1972 (EDELMAN, *et al.*, 1972; HARDMAN, *et al.*, 1972). Subsequentemente, outras lectinas de sementes foram cristalizadas e tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas. Hoje no banco de dados do Cermav (*Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales*) há no total 301 estruturas de lectinas, dessas 110 são lectinas vegetais. Dentre as lectinas vegetais, 69 são lectinas de leguminosas, demonstrando quão importante é o estudo de tais proteínas. Em meio as inúmeras lectinas de leguminosas isoladas e caracterizadas no BioMol-Lab, podemos destacar a lectina presente nas sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), como a primeira a ser cristalizada e tridimensionalmente resolvida pelo grupo (SANZ-APARICIO, *et al.*, 1997). O grupo já tem vinte e três depósitos de estruturas no PDB, entre estruturas nativas, recombinantes, mutantes e com ou sem ligantes. Esse estudo de estruturas torna o grupo uma importante célula para tais estudos.

Tabela 1: Estruturas do BioMol-Lab depositadas no PDB

LECTINA	PDB	ANO DEPÓSITO	REFERÊNCIA
ConBr	1AZD	1998	Sanz – Aparicio et al., 1997
DGL	1H9W/1H9P	2001	Wah, et al., 2001
PPL	1ZGS/1ZGR	2005	Del Sol, et al., 2005
CFL	2D3R/2D3P	2005	Del Sol, et al., 2005
ConM	2CWM	2006	Gadelha, et al., 2005
CGL	1WUV	2006	Delatorre et al., 2007
DVL	2GDF	2006	Não Publicado
CGL+Abu	2D7F	2006	Delatorre et al., 2006
PPL-2	2GSJ	2007	Cavada et al., 2006
DGL – Recombinante	2JE9	2007	Nagano et al., 2008
DGL – Mutante	2JEC	2007	Nagano et al., 2008
Dgui – Recombinante	2JDZ	2007	Nagano et al., 2008
Dgui – Mutante	2JE7	2007	Nagano et al., 2008
CGL+MAN1-2MAN	2OVU	2007	Bezerra, et al., 2007
CGL+MAN1-3MAN	2EF6	2007	Bezerra, et al., 2007
CGL+MAN1-4MAN	2P2K	2007	Bezerra, et al., 2007
CML+MAN1-2MAN	2OW4	2007	Bezerra, et al., 2007
CML+MAN1-3MAN	2P37	2007	Bezerra, et al., 2007
CML+MAN1-4MAN	2P34	2007	Bezerra, et al., 2007
LTL	2EIG	2008	Moreno, et al., 2008
DRL	2ZBJ	2008	Oliveira, et al., 2008
CRL-Manose	3AOK	2010	Não Publicado
ConBr+Abu	3JU9	2010	Não Publicado

1.1.7 A relação atividade-estrutura das lectinas da subtribo *Diocleinae*

Dentre os 13 gêneros que a subtribo *Diocleinae* possui, três apresentam lectinas purificadas de sementes das espécies: *Dioclea*, *Cratylia* e *Canavalia* (CAVADA *et al.*, 2001). Essas lectinas da subtribo *Diocleinae* são tetrâmeros formados por uma mistura de subunidades intactas (compostas por uma cadeia polipeptídica α com 237 resíduos de aminoácidos) e de subunidades fragmentadas (β e γ), obtidas pela divisão da cadeia em duas partes, por não haver formação de uma ligação peptídica entre os resíduos 118 e 119 (CHRISPEELS *et al.*, 1986).

Os fragmentos são mantidos juntos por ligações não covalentes formando um protômero (sua estrutura tridimensional é igual a da subunidade obtida pela cadeia intacta α), não havendo descontinuidade da estrutura primária (BECKER *et al.*, 1975). Da mesma forma que outras lectinas de leguminosas, as lectinas da subtribo *Diocleinae* são metaloproteínas que precisam de íons (cálcio e manganês) para se tornarem ativas. Essas lectinas, particularmente, são multiméricas formadas por protômeros de 25,5KDa, apresentando equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH; também possuem especificidade primária por glicose e manose. Alguns estudos, como inibição de hemaglutinação e microcalorimetria isotermal, demonstraram que essas lectinas apresentam diferentes especificidades por carboidratos complexos (CAVADA *et al.*, 2001).

Na investigação comparativa da estrutura tridimensional da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) e de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) encontraram dados que apontam as mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação a carboidratos das referidas lectinas como bases estruturais responsáveis pela diferença de atividade biológica das mesmas, que exibem 99% de identidade. A diferença no número de pontes de hidrogênio e de interações de Van der Waals entre as subunidades (formação de dímeros) e entre as subunidades dos dímeros (formação de tetrâmeros), explica as diferentes orientações relativas nos sítios de ligação a carboidratos. Vale salientar que o único resíduo diferente entre as lectinas ConA e ConBr que está envolvido na formação do tetrâmero é o aminoácido na posição 58 (aspártico na ConA e glicina na ConBr). Quando substituímos o aspártico 58 da ConA pela glicina da ConBr, a ConBr passa a ter uma ponte de hidrogênio a menos com o resíduo serina 62

de outra subunidade, permitindo que os carbonos α destes resíduos na ConBr estejam 1,5 Å mais próximos do que na ConA (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

A substituição do resíduo His 131 por Asn em estudos comparativos entre *Dioclea guianensis* e *Dioclea grandiflora* (não possui equilíbrio dímero-tetrâmero), reduz drasticamente contatos inter-dímeros e desordena o “loop” 117-123, que, na forma ordenada, estabiliza a associação tetramérica pH-independente na lectina de *Dioclea grandiflora* (WAH *et al.*, 2001).

1.1.8 A lectina da *Dioclea virgata*

A lectina presente em sementes de *Dioclea virgata* foi purificada por Cavada e colaboradores (1996), onde foi determinada sua composição de aminoácidos demonstrando ser semelhante a lectinas do mesmo gênero (tabela 2), trata-se de uma metaloproteína, com atividades hemaglutinante dependente de Ca^{+2} e Mn^{+2} , apesar de ter sido isolada utilizando coluna cromatográfica Sephadex, um polímero de glicose, vários açúcares simples como glicose, manose e alguns derivados não foram capazes de inibir sua atividade hemaglutinante, indicando que a lectina interage mais fortemente com carboidratos complexos (CAVADA *et al.*, 1996b), comportamento semelhante ao de outras lectinas como PHA (PUSZTAI & WATT, 1974).

A lectina quando submetida à eletroforese na presença de 2-mercaptoetanol, apresentou três bandas, indicando três subunidades uma de 30900 Da e outras duas subunidades de 16200 Da e 1200 Da, respectivamente (Figura 3), perfil característico de outras lectinas da subtribo *Dioclenae* (uma subunidade intacta (α) e dois fragmentos naturais (β e γ) tais como, lectina *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.* 1983) e *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Esta característica estrutural é semelhante a da Concanavalina A (WANG *et al.*, 1971; HAGUE, 1975).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos da *D. virgata* e de outras lectinas de *Diocleinae*.(CAVADA *et al.*, 1996).

Aminoácido	Resíduos/Mol			
	DvirL	DGL ¹	ConA ²	Dgui ³
Asx	36	31	32	44
Thr	21	18	19	29
Ser	29	33	31	48
Glx	12	13	12	13
Pro	13	11	11	13
Gly	19	17	16	27
Ala	20	18	19	26
Cys	ND	0	0	0
Val	15	16	16	10
Met	ND	1	2	0
Ile	14	14	15	9
Ieu	18	18	18	20
Tyr	7	7	7	9
Phe	12	11	11	13
Lys	10	12	12	9
His	4	4	6	3
Arg	7	7	6	9
Trp	ND	5	4	ND

ND – não determinado

1- Moreira *et al.*, 1983; 2- Carrington *et al.*, 1985; 3 - Vasconcelos *et al.*, 1991.

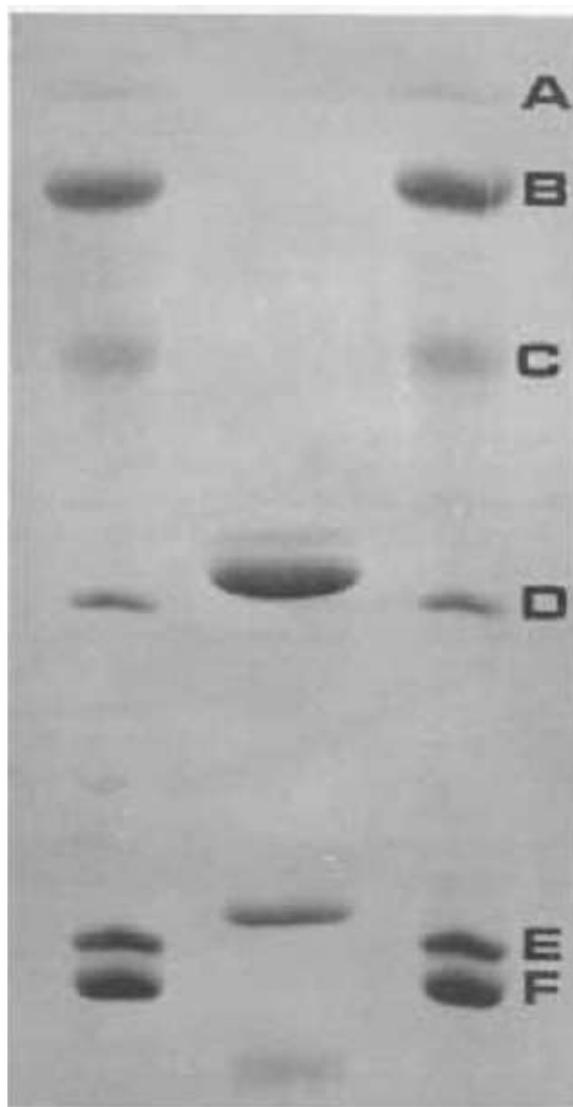


Figura 3 – Gel de eletroforese em presença de 2-mercaptoetanol da lectina purificada de *Dioclea virgata* (DvirL) - Coluna 1 e 3 marcador molecular(A, Fosforilase B, 94400 Da; B,Albumina sérica bovina, 66000 Da; C, Ovalbumina,45000 Da; D, Anidrase ;Coluna 2: *D.virgata* lectin. (CAVADA *et al.*; 1996).

Embora existam muitas características semelhantes entre a lectina *D. virgata* e outras lectinas *Diocleinae*, diferenças têm sido encontradas em alguns dos seus aspectos biológicos. Podemos citar atividades como estimulação de linfócitos e produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), efeitos edematogênicos (BENTO *et al.*, 1993), experimentos de liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994).

A Tabela 3 mostra o efeito relativo das lectinas de *Diocleinae*, incluindo a DvirL, em atividades imunológicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2001).

Tabela 3. Atividades imunológicas relativas *in vitro* de lectinas de *Diocleinae*. Dados em porcentagem se referem as atividades em relação a maior atividade apresentada por uma lectina no teste. Os valores em azul são os menores obtidos. Os vermelhos são os maiores.

Indução de...	ConA	ConBr	CABO	DGL	DVL	DRL	<u>DvirL</u>	Dgui	CFL
Ativação de PMBC humana	50%	100%	20%	80%	70%	75%	90%	35%	75%
Síntese de GM-CSF	7%	38%	ND	86%	12%	100%	6%	29%	ND
Síntese de IFN- γ	35%	70%	30%	60%	60%	100%	30%	60%	75%
Síntese de TNF- α	34%	100%	ND	14%	14%	27%	45%	43%	ND
Síntese de IL-10	100%	83%	ND	51%	36%	26%	17%	79%	ND
Secreção de Histamina	100%	100%	10%	10%	50%	100%	100%	50%	10%
Produção de óxido nítrico	63%	100%	60%	62%	2%	ND	21%	34%	ND

ND são atividades não determinadas. A coluna com valores referentes à lectina de *D. virgata* se encontra em negrito. Legendas: ConA – lectina de *Canavalia ensiformis*, ConBr – lectina de *C. brasiliensis*, CABO – lectina de *C. bonariensis*, DGL – lectina de *Dioclea grandiflora*, DVL – lectina de *D. violacea*, DRL – lectina de *D. rostrata* Benth, DvirL – lectina de *D. virgata*, Dgui – lectina de *D. guianensis* e CFL – lectina de *Cratylia floribunda*. PMBC – Célula mononucleada de sangue periférica, GM-CSF – fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos, IFN- - interferon gama, TNF- fator de necrose tumoral alfa, IL-10 – interleucina 10. 1. Testes em modelo humano.

A Tabela 4 mostra as atividades probiótica e inseticida de lectinas de *Diocleinae*, incluindo a DvirL.

Tabela 4. Atividade inseticida e probiótica de lectinas de *Diocleinae*. Dados em porcentagem se referem as atividades em relação a maior atividade apresentada por uma lectina no teste. Os vermelhos são os maiores obtidos nos testes.

	DvirL	DGL	DRL	DVL	Dgui	CABO	CFL	ConBr	ConA
atividade inseticida**	50%	50%	50%	50%	50%	100%	30%	100%	100%
efeito probiótico***	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100%

ND são atividades não determinadas. A coluna com valores referentes à lectina de *D. virgata* se encontra em negrito. Legendas: ConA – lectina de *Canavalia ensiformis*, ConBr – lectina de *C. braziliensis*, CABO – lectina de *C. bonariensis*, DGL – lectina de *Dioclea grandiflora*, DVL – lectina de *D. violacea*, DRL- lectina de *D. rostrata* Benth, DvirL – lectina de *D. virgata*, Dgui – lectina de *D. guianensis* e CFL – lectina de *Cratylia floribunda*. ** - Atividade inseticida contra ninfas de *Nilaparvata lugens*, *** - efeito em ninfas de *Aulacorthum solani*.

2. OBJETIVO

A presente tese teve como objetivo principal a caracterização de uma lectina purificada de sementes de *Dioclea virgata*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de cristais de uma lectina presente em sementes de *Dioclea virgata* (DvirL);
- Obtenção de dados preliminares por difração de raios X;
- Determinação da massa molecular da proteína por espectrometria de massa;
- Determinação da sequência protéica por espectrometria de massa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA

Sementes de *Dioclea virgata* foram finamente triturados em um moinha de café, e extraído em 0,15 Mol/L NaCl (1,10, m/v) em temperatura ambiente por 4 h. O extrato foi centrifugado (10.000 g, 20 min, 5°C) e o sobrenadante resultante aplicado a uma coluna cromatográfica Sephadex G-50 (coluna 400 x 25 mm) equilibrados com 0,15 mol/L NaCl contendo 5 mM de CaCl₂ e 5 mMol/L MnCl₂. A lectina foi eluída com a solução de equilíbrio contendo 0,1 M de glicose. A lectina foi dialisada, liofilizada para ser armazenada (CAVADA *et al.*,1996b).

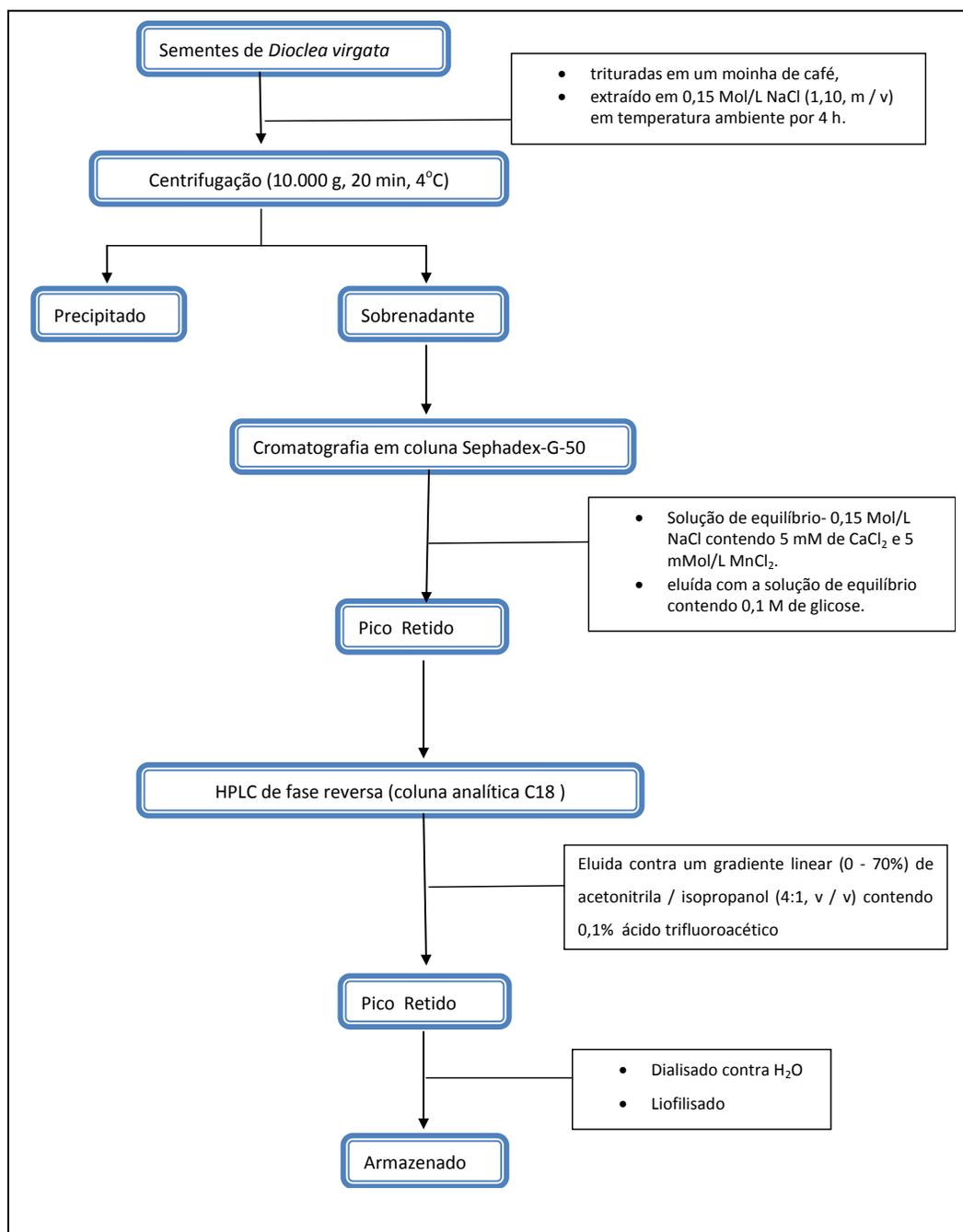


Figura 4 :Fluxograma de extração da lectina presente em semente de *Dioclea virgata* (Cavada *et. al.*,1996b).

3.2 CRISTALIZAÇÃO

A lectina purificada segundo Cavada e colaboradores (1996b) e liofilizada foi ressuspendida em água Milli-Q™ contendo 3 mM de X-Man (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-mannose, em uma solução estoque 12 mM de DMSO) para uma concentração final de 12,5 mg.mL⁻¹ ficando em contato a 310 K por uma hora antes do experimento de cristalização. Os cristais cresceram em placas limbrotm de 24 poços a temperatura ambiente (293 K) pelo método da difusão de vapor usando a técnica da matriz esparsa (JANCARIK & KIM, 1991) com gota suspensa no Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research, Riverside, CA, USA). Cada poço contendo 300 μ L da solução de cristalização e as gotas foram compostas de volumes iguais de (1 μ L) de solução de proteína e condição de cristalização.

3.3 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO

Os dados da difração de raios X foram coletados de um único cristal congelado a 100 K. Os cristais foram preservados em uma solução crioprotetora feita de água (70%) e glicerol (30%) para que fosse evitada a formação de gelo, então a coleta de dados é submetida a um comprimento de onda de 1.5 Å usando a fonte de radiação síncrotron [Estação MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil]. Um conjunto completo de dados foi coletado utilizando um detector CCD (MAR Research) contemplando 249 imagens com oscilações de 1°. O conjunto de dados foi indexado e integrado usando o MOSFLM (LESLIE, 1992). As intensidades reduzidas através do SCALA (EVANS, 1997). O problema das fases foi resolvido pelo método da substituição molecular, utilizando o programa MolRep (VARGIN & TEPLYAKOV, 1997). O modelo inicial foi submetido a diversos ciclos de refinamento de corpo rígido, usando o programa REFMAC5 e monitorando usando os valores de RFree e RFactor (BRÜNGER, 1992). Todos os programas citados pertencem ao pacote CCP4 (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT, Number 4, 1994). O alinhamento da lectina foi feito utilizando o ClustalW (THOMPSON *et al.* 1994).

3.4 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Foi preparado uma solução da proteína purificada numa concentração de 4 mg/mL em água e a partir desse estoque foi feito uma solução de 10 pmol em Acetonitrila:Água (50:50) contendo 0,1% de ácido fórmico. Esta solução então foi injetada em uma fonte de ionização do tipo eletro spray num fluxo de 10 µL/min acoplada em um espectrômetro de massa SYNAPT HDMS (Waters Corp., Milford, USA) operando em modo positivo, com energia do capilar de 3 kV, temperatura da fonte de 90° C e fluxo de nitrogênio de 200 L/H. Os dados foram coletados pelo software Masslynx (Waters) e o espectro multi carregado foi deconvoluído utilizando técnicas de maximização de entropia (FERRIGE *et. al.*, 1992).

3.5 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA PROTÉICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

3.5.1 Digestão das proteínas e aquisição de dados

A proteína purificada foi submetida a eletroforese SDS-PAGE. O gel de separação foi preparado contendo 12% de acrilamida. As bandas foram excisadas do gel em fragmentos de 1 mm, em seguida descoradas em solução de bicarbonato de amônio 50 mM em 50% de acetonitrila. As bandas descoradas foram desidratadas em acetonitrila 100% e secas em fluxo de gás nitrogênio. O gel foi reidratado com uma solução de bicarbonato de amônio 50 mM contendo a enzima tripsina (Promega) ou Quimiotripsina (Sigma) na proporção de 1:50 (enzima:proteína) e submetida a digestão a 37° C *overnight*. Os peptídeos foram então, extraídos por agitação dos fragmentos de gel em solução de acetonitrila 50% com ácido fórmico 5% e posteriormente, concentrados em *speedvac* (LABCONCO). Estes foram então injetados em um sistema *nanoacquity* conectado a uma fonte nano *elektrospray* de um espectrômetro de massa Synapt HDMS (Waters Corp., Milford, USA). A amostra foi aplicada a uma coluna cromatográfica C18 (75 µM x 100 µM) e eluída com um gradiente

de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila de 10 a 85%. O espectrômetro de massa operou em modo positivo, utilizando a temperatura da fonte de 80° C e a energia do capilar de 3,5 kV. O instrumento foi calibrado com o íon duplamente protonado do glucofibrinopeptídeo B $(M+2H^+)_2^+ = 785,84$. Para realizar o experimento de LC-MS/MS foi utilizada a função DDA (Análise Direta de Dados) selecionando para os experimentos de MS/MS íons precursores duplamente ou triplamente carregados, que foram fragmentados por decomposição induzida por colisão (CID) utilizando uma rampa de energia de colisão que variou de acordo com o estado de carga e a relação massa/carga do íon precursor. Foram coletados espectros de MS/MS de m/z 50 até m/z 3000. Os dados foram coletados pelo programa *Masslynx* (Waters).

3.5.2. Processamento dos espectros

Os espectros de MS obtidos durante a cromatografia dos peptídeos e os espectros de MS/MS gerados a partir da fragmentação dos íons precursores selecionados foram processados e analisados utilizando o programa *Proteinlynx* (Waters) a partir da busca pela massa dos íons precursores (PMF) e pelo padrão de fragmentação dos mesmos. Os peptídeos não encontrados em banco de dados foram sequenciados manualmente por sequenciamento *de novo*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO

Cristais foram obtidos depois de duas ou três semanas usando as condições nº 15, 17 e 32 do *Crystal Screen II* da Hampton. A condição 15 foi escolhida para ser otimizada. Esta contém 0.5 M de sulfato de amônio, 0.1 M de citrato de sódio tribásico dihidratado pH 5.6 e 1.0 M de sulfato de lítio monohidratado. Para otimizar as condições de cristalização, a concentração do sulfato de amônio foi modificado de 0.1 para 0.3 M e o pH do tampão citrato de sódio foi variado dentro de uma faixa de 5.6 a 6.0. Cristais adequados para os experimentos de difração foram obtidos diretamente da condição nº 15 do *Crystal Screen II* da Hampton (Figura 5).

Os cristais obtidos proveram um conjunto de dados com a resolução de 1.8 Å, o qual foi escalonado a uma faixa de resolução de 21.33 – 1.80 Å. O cristal da lectina de *D. virgata* pertence a um grupo espacial I222 ortorrômbico centrado, com parâmetros de célula unitária $a = 647.5 \text{ \AA}$, $b = 86.6 \text{ \AA}$, $c = 90.2 \text{ \AA}$ e os ângulos $\alpha = 90.0^\circ$ $\beta = 90^\circ$ $\gamma = 90.0^\circ$. O valor do coeficiente de Matthews ($V_m = 2.48$) (MATTHEWS, 1968) foi calculado baseado no peso molecular 25.4 KDa (CALVETE *et al.*, 1999), indicando um conteúdo de solvente de 50.36%, o que representa a presença de um monômero na unidade assimétrica. A estatística da coleta de dados está presente na tabela 5.

A estrutura preliminar do cristal de *D. virgata* foi determinada pelo método padrão de substituição molecular usando o programa MOLREP (VAGIN & TEPLYAKOV, 1997). Vários monômeros foram testados para a substituição e o melhor resultado foi obtido com o modelo estrutural da lectina de *Dioclea rostrata* (Código do PDB 2ZBJ) (OLIVEIRA *et al.*, 2008). A melhor solução teve um coeficiente de correlação final de 0.771 e um *Rfactor* de 0.446.

O alinhamento do N-terminal de lectinas de sementes de *D. virgata* (Dvir; CALVETE *et al.*, 1999), *D. guianensis* (Dgui; Código PDB 1H9P, WAH *et al.*, 2001), *D. grandiflora* (DGL; Código PDB 1DGL, ROZWARSKI *et al.*, 1998) e *D. rostrata* (DRL; Código PDB 2ZBJ; OLIVEIRA *et al.*, 2008) (Figura 6) indica um alto grau de similaridade e que *D. virgata* é mais similar a lectina das sementes de *D. guianensis*. De acordo com Dan

e colaboradores (1998), as lectinas da subtribo *Diocleinae* podem se dividir em dois grupos correspondentes a suas afinidades por complexos de carboidratos biantenados, onde *D. grandiflora* e *D. rostrata* se encontram em um (Baixa afinidade por carboidratos biantenados com terminal Glc-NAc) e *D. virgata* e *D. guianensis* no outro (afinidade por análogos monodeoxi e tetradeoxi trimanosídeos), corroborando com o alinhamento. A respeito do comportamento oligomérico em diferentes pH's determinados por ultracentrifugação analítica, *D. virgata* se comporta como *D. rostrata* no qual um arranjo tetramérico é observado quando em pH 6.5 ou superior. *D. grandiflora* apenas arranja seus monômeros como homotetrâmero em um pH maior que 4.5, mas *D. guianensis* se comporta como uma proteína transiente em relação seu equilíbrio dímero-tetrâmero pH dependente.

Comparando as unidades assimétricas dos cristais, *D. virgata*, *D. guianensis* e *D. rostrata* estão apresentadas como monômeros, apenas *D. grandiflora* se apresenta como dímero na unidade assimétrica. Esses resultados sugerem que *D. virgata* tem empacotamento cristalino similar a ambas *D. grandiflora* e *D. rostrata*, a respeito do sítio de ligação a carboidrato e os contatos interdiméricos.

Tabela5: Estatísticas da coleta de dados.

COLETA DE DADOS	
R_{merge}	5.6 (38.9)
Limite de Resolução (Å)	21.33 (1.80)
$I/\sigma(I)$	8.5 (1.8)
Completeza (%)	99.7 (99.3)
Multiplicidade	9.9
Parâmetros da cela unitária	a = 64.5 Å, b = 86.6 Å, c = 90.2 Å
Ângulos da cela unitária	$\alpha = 90.0^\circ$ $\beta = 90.0^\circ$ $\gamma = 90.0^\circ$
Coefficiente Mathews Å³.Da⁻¹	2.48
Conteúdo de solvente (%)	50.36
Grupo espacial	I222
Comprimento de onda (Å)	1.52 Å
Número total de reflexões	444,008
Número total de reflexões únicas observadas	23,748

*Valores em parênteses correspondem a camada de maior resolução.



Figura 5: Cristal da lectina de *D. virgata*.

Dvir	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHI	25
Dgui	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHI	25
DRL	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHI	25
DGL	ADTIVAVELNSYPNTDIGDPNYPHI	25
	***** : ***** . *****	

Figura 6. Alinhamento (N-terminal) de lectinas extraídas de sementes de *D. virgata* (DvirL), *D. guianensis* (Dgui), *D. rostrata* (DRL) e *D. grandiflora* (DGL).

(*) - resíduos conservados

(:) - resíduos semi conservados

4.2. DETERMINAÇÃO DA MASSA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A massa molecular da proteína foi determinada por espectrometria de massa com ionização do tipo eletro *spray*. O espectro multi carregado pode ser observado na figura 7. Após deconvolução deste espectro, chegou-se a conclusão de que a cadeia alfa da lectina possui 25412 Da \pm 2 (Figura 8). Esta proteína, como outras lectinas da mesma subtribo, incluindo a Concanavalina A extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, possui um processamento pós traducional chamado de permutação circular onde a cadeia polipeptídica expressa (Pré Pró Proteína contendo as cadeias γ e β , respectivamente) é clivada em duas cadeias (γ e β) e em seguida religadas de forma inversa, tornando então a região expressa como C terminal na cadeia peptídica em N terminal na proteína madura (Chamada de cadeia α), sendo o contrário também verdadeiro. Apesar do processo de religar as cadeias não seja 100% eficientes, estas interagem de forma não covalente dando origem também a lectina ativa. Devido a não eficiência total após religarem, os fragmentos β e γ são também visualizados tanto por eletroforese SDS-PAGE quanto na espectrometria de massa, portanto, sendo possível também a determinação da massa molecular desses fragmentos. Conforme mostra a figura 9, e como podemos identificar mais adiante pela sequência de aminoácidos, a cadeia β possui massa de 12817 Da \pm 2 e a cadeia γ massa de 12612 Da \pm 2.

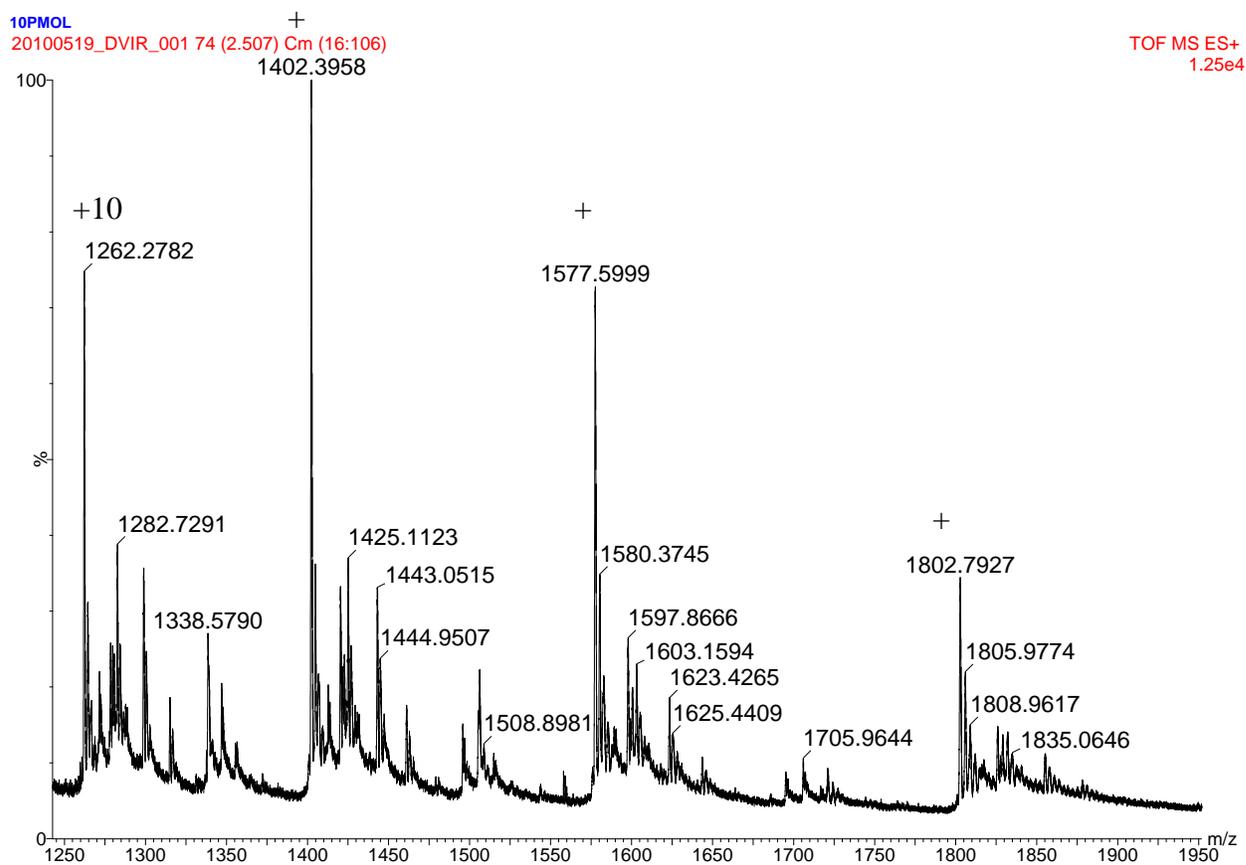


Figura 7 – Espectro multi carregado da lectina de *D. virgata* mostrando o número de carga dos íons correspondentes a cadeia β .

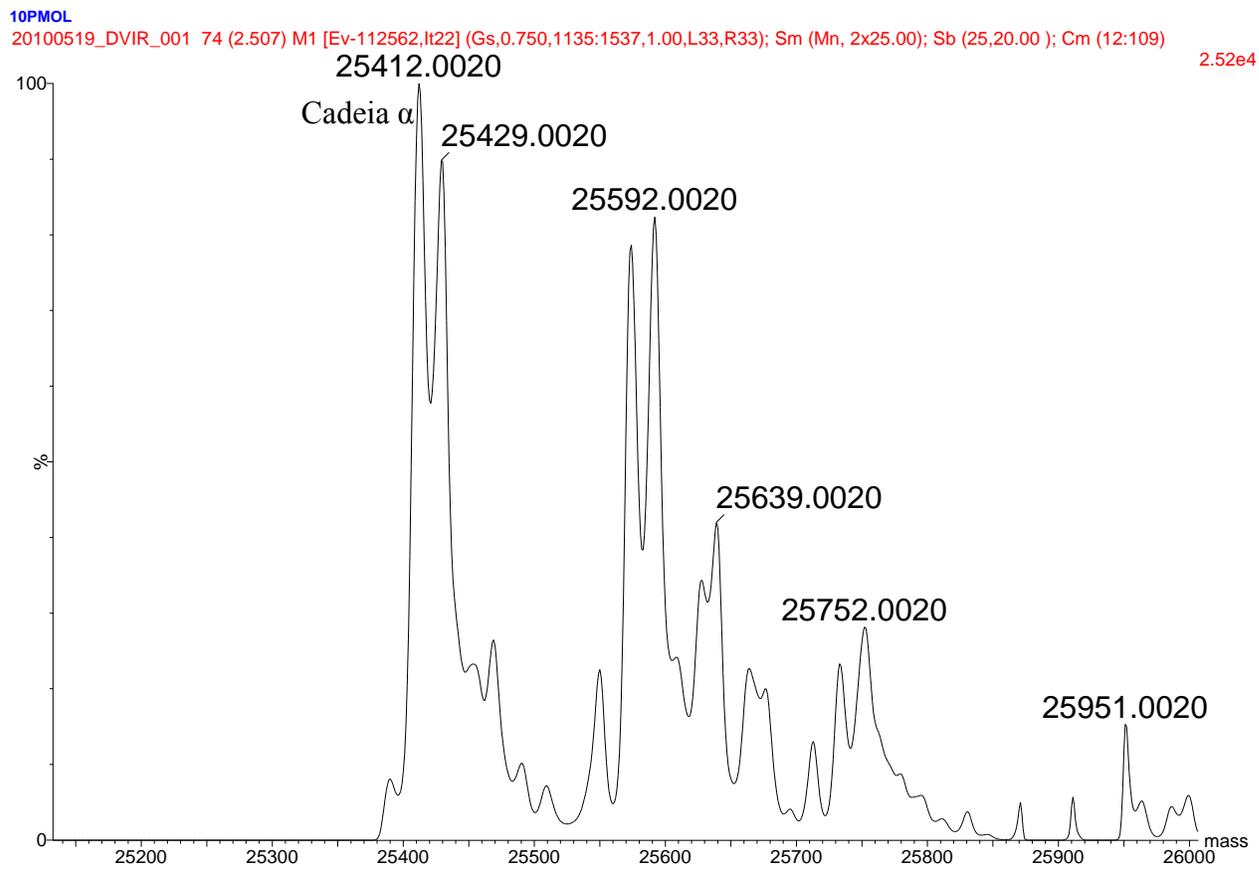


Figura 8 – Espectro deconvoluido da lectina de *D. virgata* mostrando as massas correspondentes à cadeia α .

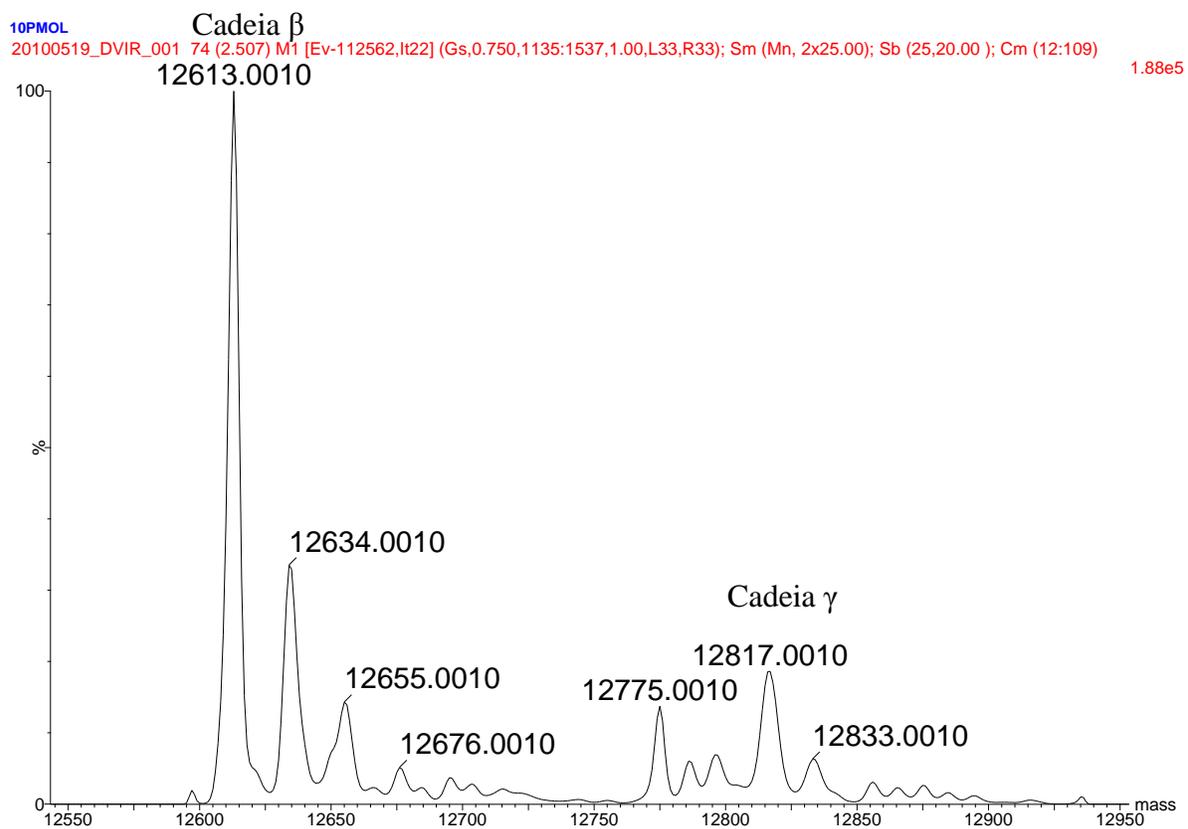


Figura 9 – Espectro deconvoluido da lectina de *D. virgata* mostrando as massas correspondentes à cadeia β e γ .

4.3 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A sequência da lectina de *Dioclea virgata* foi determinada por espectrometria de massa a partir da digestão da proteína por endopeptidases, sequenciamento desses peptídeos (Tabela 6) e posterior sobreposição destes (Figura 10).

A lectina sequenciada apresenta 97% de identidade com a lectina de *D. guianensis*, 94% com a de *D. grandiflora*, 95% com a de *D. rostrata* e 93% com a de *D. wilsonii*. Apesar de não ter sido possível encontrar peptídeos equivalentes à região 30 – 40 e 114 a 116, a sequência desta região pode ser inferida devido à alta identidade de sequência (Figura 11) e a alta homologia entre as lectinas das espécies desse gênero. Ao calcular a massa teórica da sequência determinada para a cadeia β , que compreende dos resíduos 1 ao 119, verifica-se que esta confere com a massa aferida pelos experimentos de ionização por eletro spray, corroborando e validando a sequência determinada.

Tabela 6 – Lista de Peptídeos determinados por espectrometria de massa.

PEPTÍDEO	MASSA Aferida (Da)	Massa Teórica (Da)	Diferença de Massa (Da)	SEQUÊNCIA
T1	3227.5645	3227.5874	0.02	ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIK
T2	1345.7043	1345.6990	-0.01	VGTAHISYNSVAK
T3MS	3258.583	3258.6164	0.03	LSAVVSYTGSSSTTVSYDVDLNNVLPWVVR
T4	1108.5844	1108.6128	0.03	VGLSATTGLYK
T5	1512.7444	1512.7460	0.00	ETNTILSWSFTSK
T6	2466.1643	2466.1565	-0.01	TNSIADANSLHFSFNQFSQNP
T7	2145.0444	2145.0549	0.01	DLILQGDATTDSDGNLQLTR
T8	1318.6843	1318.6113	-0.07	VSSDGSPQGSSVGR
T9	1472.7844	1472.7816	0.00	ALFYAPVHIWEK
T10MS	1716.9226	1716.9206	0.00	SAVVASFDATFTFLIK
T11	2850.2844	2850.3420	0.06	SPDRDPADGITFFIANTDTSIPSGSGGR
T12	958.5044	958.5123	0.01	LLGLFPDAN
Q1	1505.6843	1505.7296	0.05	NMQTGKVGTAHISY
Q2	1392.7644	1392.7725	0.01	NSVAKRLSAVVS
Q3	1836.9044	1836.9743	0.07	DVDLNNVLPWVVRVGL
Q4	1416.6843	1416.9997	0.02	KTNSIADANSLHF
Q5	2000.9766	2001.0239	0.05	QLTRVSSDGSPQGSSVGRALF
Q6	1639.8444	1639.8722	0.03	APVHIWEKSAVVAS
Q7	1530.7244	1530.7678	0.04	IKSPDRDPADGITF
Q8	1657.8043	1657.8635	0.06	IANTDTSIPSGSGRLL

```

1 ADTIVAVELD SYPNTDIGDP SYPHIGIDIK SVRSKSTARW NMQTGKVGTA HISYNSVAKR
  |-----T1-----| |-----T2-----|
  |-----Q1-----| |-----Q2-----|
61 LSAVVSYTGS SSTTVSYDVD LNNVLPWVVR VGLSATTGLY KETNTILSWS FTSKLKTNSI
  |-----T3MS-----| |-----T4-----| |-----T5-----| |-----
  |-----Q3-----| |-----Q4-----| |-----Q5-----| |-----
121 ADANSLHFSF NQFSQNPDKL ILQGDATTDSDGNLQLTRVSDSGSPQGSSV GRALFYAPVH
  |-----T6-----| |-----T7-----| |-----T8-----| |-----T9
  |-----Q4-----| |-----Q5-----| |-----Q6-----| |-----
181 IWEKSAVVAS FDATFTFLIK SPDRDPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLL GLFPDAN
  |-----T10MS-----| |-----T11-----| |-----T12-----|
  |-----Q6-----| |-----Q7-----| |-----Q8-----|

```

Figura 10 – Sequência da lectina de *Dioclea virgata*. Os peptídeos com regiões marcadas em vermelho e iniciados por T foram peptídeos gerados por Tripsina. Os com regiões marcadas em azul e começando com Q foram gerados por Quimiotripsina.

```

DWL      ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTGKVGTVHISYNSVAKR 60
DVL      ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTGKVGTVHISYNSVAKR 60
rDGL     ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTGKVGTVHISYNSVAKR 60
Dvir     ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTGKVGTAHISYNSVAKR 60
Dgui     ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTGKVGTAHISYNSVAKR 60
DRL      ADTIVAVELDSYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKSTARWNMQTGKVGTVHISYNSVAKR 60
          *****:*****:*****:*****

DWL      LSAVVSYSGSSSTTVSYDVDLNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI 120
DVL      LSAVVSYSGSSSTTVSYDVDLNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI 120
rDGL     LSAVVSYSGSSSTTVSYDVDLNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI 120
Dvir     LSAVVSYTGSSSTTVSYDVDLNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI 120
Dgui     LSAVVSYTGSSSTTVSYDVDLNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI 120
DRL      LSAVVSYTGSSSTTVSYDVDLNVLPEWVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKTNSI 120
          *****:*****:*****:*****

DWL      ADENSLHFSFHKFSQNPKDLILQGDAFTDSDGNLELTKVSNSSGDPQGNVGRALFYAPVH 180
DVL      ADENSLHFSFHKFSQNPKDLILQGDAFTDSDGNLELTKVSSSGDPQGNVGRALFYAPVH 180
rDGL     ADENSLHFSFHKFSQNPKDLILQGDAFTDSDGNLQLTKVSSSGDPQGNVGRALFYAPVH 180
Dvir     ADANSLHFSFNQFSQNPKDLILQGDAFTDSDGNLQLTRVSSDGPQSSVGRALFYAPVH 180
Dgui     ADANSLHFSFNQFSQNPKDLILQGDAFTDSDGNLELTKVSSSGDPQSSVGRALFYAPVH 180
DRL      ADANSLHFTFNQFSQNPKDLILQGDAFTDSDGNLELTKVSSSGDPQGNVGRALFYAPVH 180
          ** *****:*:*****:*****:***:*.*.***:*****

DWL      IWEKSAVVASFDATFTFLIKSPDREPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
DVL      IWEKSAVVASFDATFTFLIKSPDREPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
rDGL     IWEKSAVVASFDATFTFLIKSPDREPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Dvir     IWEKSAVVASFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Dgui     IWEKSAVVASFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
DRL      IWEKSAVVASFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFIANPDTIPSGSGRLLGLFPDAN 237
          *****:*****:*****:*****

```

Figura 11 – Alinhamento das lectinas de *Dioclea wilsonii* (DWL), *Dioclea violace* (DVL), *Dioclea grandiflora* recombinante (rDGL), *Dioclea virgata* (Dvir), *Diocela guianensis* (Dgui) e *Dioclea rostrata* (DRL). Legenda: "*" "indicam resíduos idênticos em todas as seqüências analisadas," ":" indicam a existência de substituições conservativas e "." indicam a existência de substituições semi-conservativas. Os aminoácidos em vermelho são aqueles pequenos ou hidrofóbicos, incluindo a tirosina, os em azul são os aminoácidos ácidos, os em magenta são os básicos e os em verde são os que possuem grupamentos hidroxila ou amina (exceto os básicos).

Os peptídeos que não apresentaram identidade e que não tiveram suas seqüências determinadas por comparação com banco de dados foram sequenciados manualmente por sequenciamento *de novo*. Pode-se verificar na figura 12 a série de íons Y que determinam a seqüência do peptídeo T8 que apresenta diferença na seqüência primária e que foi sequenciado por sequenciamento *de novo*. A seqüência desta proteína foi depositada no banco de dados Uniprot Knowledgebase (www.uniprot.org) com o número de acesso P58907.

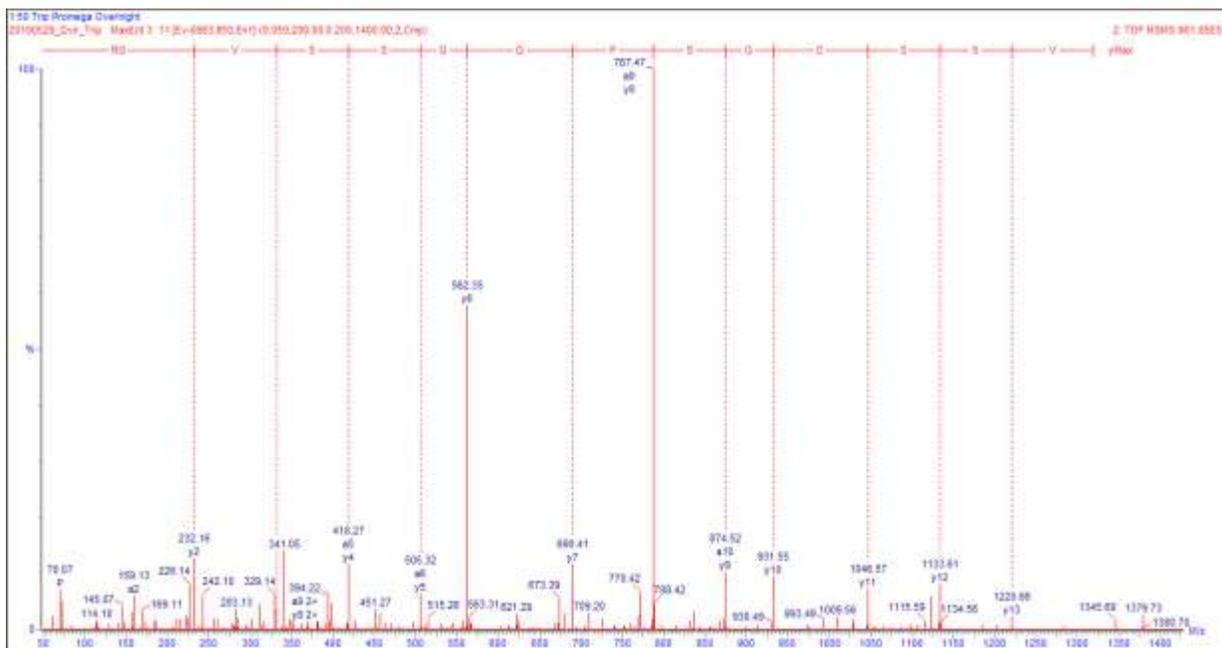


Figura 12: Peptídeo T8 mostrando a série de íons Y.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo reporta a caracterização e a cristalização de uma lectina purificada de sementes de *Dioclea virgata* (família Leguminosae, sub-família Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae). Trata-se de uma lectina com massa molecular de $25412 \text{ Da} \pm 2$ (cadeia alfa) em pH 6,5 ou superior, se encontra em um arranjo tetramérico e se apresenta como dímero na unidade assimétrica sugerindo um empacotamento cristalino similar a outras lectinas da subtribo Diocleinae, *D. grandiflora* e *D. rostrata*, a respeito do sítio de ligação a carboidrato e os contatos interdiméricos. Para confirmar esta hipótese mais estudos são necessários. Esta informação pode também esclarecer o entendimento do equilíbrio dímero- tetrâmero dependente de pH e o reconhecimento de carboidratos em lectinas da subtribo Diocleinae.

Os cristais difrataram a 1.8 \AA , sendo estes pertencentes ao grupo espacial ortorrômbico centrado e pertencem ao grupo espacial I222.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N.M.N., TEIXEIRA, E.H., ASSREUY, A.M.S., CAVADA, B.S., FLORES, C.A. & RIBEIRO, R.A. (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leucocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**. 8, p.107-113.

ALENCAR, V.B.M. MELO, S.C. ALBUQUERQUE, K.F. FIGUEREDO, I.S.T. TUPINANBÁ, D.D.; FREITAS, B.T.; ALNCAR, N.M.N.; SAMPAIO, A.H., RIBEIRO, R.A. and CAVADA, B.S.; (2002). .Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from *caesalpineae echinata lam* seeds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical biochemistry**, v,16,(disponível em <http://plab.ku.dk/tcbh/lectins16/alencar/paper.htm>).

ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M.V., CAVADA, B.S. & BARRAL-NETTO, M. (1999). Lectins-induced nitric oxide production **Celular Immunology**. 194,98-112.

ASSREUY, A.M.S., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G.J., DE SOUZA, M.L.P., CAVADA, B.S. & MOREIRA, R.A. (1997). Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian been. **Mediators of Inflammation**, 6, p. 201-210.

ASSREUY, A. M.; MARTINS, G J; MOREIRA, M. E. F.; BRITO, G A C; Cavada, B.S.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.(1999). Prevention Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis By Glucose-Mannose Binding Plant Lectins. **The Journal of Urology**, v. 161, p. 1988-1993.

BARBIERI, L. BATELLI, G. B. & STIRPE, F. (1993). Ribosome-inactivating protein of plants. **Biochemistry Biophysics Acta**, 1154: p. 237-282.

BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R. & BARRAL-NETTO, M. (2001). In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of diocleinae subtrib. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 96(5), p.673-678.

BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S.B., BARRAL, A., MOREIRA, L.I., SANTOS, C.F., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T. & CAVADA, B.S. (1992) Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the diocleinae tribe. **Immunology Investigations**, 21, p.297-303.

BARRAL-NETTO, M., VON SOHSTEN, R.L., TEIXEIRA, M., DOS SANTOS, W.L., POMPEU, M.L., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T., CAVADA, B.S., FALCOOFF, E. & BARRAL, A. (1996). In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/C mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta trop.**, 60, p.237-250.

BECKER, J.W.; REEKE, G.N.J.R.; WANG, J.L.; CUNNINGER, B.A.; EDELMAN, G.M.. (1975). The covalent and three-dimensional structure of concavalin a. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Journal Biological Chemistry.** 250(4): p.1513-24.

BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. & BARJA-FIDALGO, C. (1993). Rat paw edema and leukocyte emmigration induced by plant lectins. **Agents and Actions.** 38, p. 48-54.

BEZERRA, G. A.; OLIVEIRA, T. M.; MORENO, F. B. M. B.; SOUZA, E. P.; ROCHA, B. A. M.; BENEVIDES, R. G.; DELATORRE, P.; AZEVEDO JUNIOR, W. F.; CAVADA, B. S. (2007). 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. **Journal of Structural Biology**, 160, p. 168-176.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, (1954) E. Antigenic relations of blood group antigens suggested by tests with lectins. In: *Plant Lectins: Molecular and Biological aspects*. **Plant Physiology**, v. 36, p. 209-234.

BRUNGER, A.T., 1992. "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures", **Nature**, 355, 472-475.

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

CALVETE, J.J., THOLE, H.H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., ALMEIDA-DA-ROCHA, I.M., GUIMARAES, F.N., and CAVADA, B.S., (1999). Molecular Characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochemistry Biophysic Acta** 1430, p. 367-375.

CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of Concanavalin A. **Nature**, v. 313, n. 3 p. 64-67, 1985.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T., GRANGEIRO, T.A., and BARRAL-NETO, M., (2001). 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.** (2), p.123-135.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A. and MOREIRA, R.A.. (1996). Isolation and partial characterization of a lectin from the *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 8(1), p.31-36.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A., CARVALHO, A. F. N. U. and MOREIRA, R. A. (1996b). Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 8(1)p.37-42.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. A and GRANGEIRO, T. B., (1993). Primary structures and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 5(2)p.193-201.

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

CAVADA, B. S., MORENO, F. B. B., ROCHA, B. A. M. da, AZEVEDO, J.R., W. F. de, CASTELLÓN, R. E. R., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., SOUZA, E. P. de, NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P. T., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J. J. & SANZ, L. (2006). cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and Nacetylglucosaminebinding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal**, 273: 3962–3974.

CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.M.; STURM, A. and FAYE, I, (1986). Characterizatin of the endoplasmic reticulum-associated precursor of Concanavalin A. **Journal Chemistry**, 261(22),p.1021-1024.

COLLABORATIVE COMPUTACIONAL PROJECT, NUMBER 4. (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. **Acta Crystallographica**, D50, 760-763.

DAN, T.K., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., SANTOS, C.F., SOUSA F.A.M., OSCARSON, S. & BREWER C.F. (1998) Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities form complex carbohydrates. **Journal Biology Chemistry**. 273 (20), p.12082-12088.

DELATORRE, P. ROCHA, B. A., GADELHA, C.A.A., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., SOUZA, E.P., NASCIMENTO, K.S., FREIRE, V.N., SAMPAIO, A.H., AZEVEDO JR, W.A., CAVADA, B.S. (2006) Crystal Structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals a random mutagenesis in ConA-like lectins. **Structural Biology** (SUBMETIDO).

DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., MORENO, F.B., FREITAS, B.T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F. & CAVADA, B. S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct. Biol.**, 7: 52.

DEREWENDA, Z. YARIV, J.; HELLIWELL, J.R. KALB, A.J. DODSON, E.J. PAPIZ, M.Z.; WAN, T.; CAMPBELL, J. (1989). The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. **EMBO J.** 8(8),p. 2189-93.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE, G. N.; et al. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 69: 2580–2584. 1972.

EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. (1978). Binding and functional properties of concanavalin a. and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **Journal Biology Chemistry**. 253(9) ,p.3016-22.

EVANS, P. R. (1997) *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography*, **33**, 22-24, Daresbury Laboratory, Warrington, UK.

FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. & GOMES, J.G. (1996) Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamm. Res.** 45, p. 442-447.

FERRIGE, A.G., SEDDON, M.J., GREEN, B.N., JARVIS, S.A., SKILLING, J., 1992. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6,p. 707–711..

FRIER, T. and RUDIGER, H. B., (1990).Lectin-binding proteins from lentil seeds as mitogens for murine B lymphocytes. **Phytochemistry**, v.29, p.1461-1461.

GADELHA, C. A. A., MORENO, F. B. M. B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J. B., ROCHA, B. A. M., RUSTIGUEL, J. K. R., FREITAS, B. T., CANDURI, F., DELATORRE, P., DE AZEVEDO, W. F. JR. & CAVADA, B. S. (2005). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a lectin from *Canavalia maritima* seeds. **Acta Crystallograph.** F61, p.87-89.

GALLEGO DEL SOL, F., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J. (2005). Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. New insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **J. Mol. Biol.**

GOLDESTINEIN, I.J. PORETZ, R.D. (1986).isolation and chemical properties of lectins in: LIENER,I.E.; SHARON, N. and GOLDESTIEN,I.J. eds. The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. **Academic Press**, London, p.33-247.

GOLDSTEIN, I. J. *et al.* (1980). What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p.66.

GOMES, J.C., ROSSI, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. & OLIVEIRA, J.T.A. (1994). histamine release induced by glucose(mannose) specific lectins isolated Brazilian plants Comparison with concanavalin A. **Agent Actions**. 41,p. 132-135.

HAGUE, D.R. (1975). Studies of storage proteins of high plants. I. Concanavalin A from three species of the genus *Canavalia*, **Plant Physiology**. 55, p. 636-642.

HARDMAN, K.D. and AINSWORTH, C. F., (1972).Structure of concanavalin A. at 2,4 Å resolution. **Biochemistry**. 11, pp.4910-4919.

HAVT, A., TEIXEIRA, E.H., MARTINS, A.M.C., NASCIMENTO, K.S., GRANGEIRO, M.B., MORENO, F.B.M. B, SAMPAIO, A.H., MENESES, D.B., FONTELES, M.C., CAVADA, B.S. & MONTEIRO, H.S. A (2002). Throug its specific sugar inhibitor. **The Electronic Lectin Journal, Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, p.16.

HERMAN, E.M. SHANNON, L.M. & CRISPEELS, M.J. (1985). Concanavalin A. is synthesized as a glycoproteins precursor. **Planta**. 165, p.23-29.

HORI, K., MATSUBARA, K., MIYAZAWA, K. (2000). Primary structures of two hemagglutinins from the red alga *Hypnea japonica*. **Biochemistry Biophysics. Acta**, v. 1474, p. 226-236.

JACOBSON, R. L.; DOYLE, R. J. (1996). Doyle Lectin-parasite interactions. **Parasitology Today**. V. 12, nº 2, p. 55-61.

JANCARIK, J. & KIM, S. H. (1991) Sparce matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal. Applications Crystallographic**, 24, p 409-411.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**. V. 26, p. 219-230.

KOCOUREK, J. HOREJSI, V. (1981). A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". **Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry**. Nova Iorque: Bog-Hansen e G. A. Spenger. V. 3, p. 3-6.

LESLIE AGW. (1992) Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Jnt CCP4/ESF-EACBM Newsl. Protein Crystallogr.*, No. 26.

LIENER, I. E., SHARON, N., GOLDSTEIN, I. J. (1986). The lectins-properties, functions, and applications in biology and medicine. New York: **Academic Press**, p.600.

MATTHEWS, B.W. (1968). The Solvent Content of Protein Crystals. **J. Mol. Biol.** **33**, 491-487.

MOOTHOO, D. N.; CANAN, B.; FIELD, R. A.; NAISMITH, J. H. (1999) Man alpha 1-2 Man alpha-OMe-concanavalin A complex reveals a balance of forces involved in carbohydrate recognition. **Glycobiology**. Jun; 9(6)p. 539-45.

MOREIRA, R.A., BARROS, A.C.H., STEWART, J.C., PUSZTAI, A. (1983) Isolation and characterization of alectin from the seeds of *Dioclea glandiflora* (Mart.), **Planta** 158 p.63-69.

MORENO, F.; DEOLIVEIRA, T.; MARTIL, D.; VICOTI, M.; BEZERRA, G.; ABREGO, J.; CAVADA, B.; FILGUEIRADEAZEVEDOJR, W.(2008) Identification of a new quaternary association for legume lectins. *Journal of Structural Biology*, v. 161, p. 133-143.

NAGANO, C.S., CALVETE, J.J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B.S., SANZ, L. (2008). Insights in to the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer Equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J.**, 409: 417 – 428.

OLIVEIRA, T. M., DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., BEZERRA, G. A., MOURA, T. R., BENEVIDES, R. G., BEZERRA, E. H. S., MORENO, F. B. M. B., FREIRE, V. N., AZEVEDO JR, W. F., CAVADA, B. S. (2008). Crystal structure of *Dioclea rostrata* lectin: insights into understanding the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium and the structural basis for carbohydrate recognition in Diocleinae lectins. **J. Struct. Biol.** 164 (2), 177-182.

PEUMANS, W. J., BARRE, A., HAO, Q., ROUGÉ, P. & VAN DAME, E. J. M. (2000) Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. **Trends in Glycoscience and Glycotech**, 12(64)p.83-101.

PEUMANS, W. J.; ALLEN, A. K.; CAMMUE, B. P. A. (1986). A new lectin from meadow saffron (*Colchicum autumnale*). **Planta Physiology**, v.82, p. 1036-1039.

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

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J. (1998). **Critical Revista Biochemistry Molecular Biology**. 33 (3) p.209-58. Review.

PUSZTAI, A., WATT, W.B. (1974). The dependence of biological activity of *Phaseolus vulgaris* isolectins on molecular charge and other structural features. **Abstr. 9th FEBS Meeting**, Budapest, p. 304.

RAMOS, M. V., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S., CALVETE, J. J., GRANGEIRO, T. B., DEBRAY, H. (2001) Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectins isolated from *Abrus pulchellus* seeds. **Glycoconjugate Journal**, 18, p.391-400.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LCONTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. (2003). Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**. Nº 4, p. 1-7.

RODRIGUEZ, D., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A., MOREIRA, R. A. and RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose-binding plant lectins. **Brazilian Journal Medicine Biology**, v. 25, p. 823-826, 1992.

ROZWARSKI, D. A., SWAMI, B. M., BREWER, C. F., SACCHETTINI, J. C.: (1998). Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. **Journal Biological Chemistry**. , 273 pp. 32818

RÜDIGER, H. & SCHECHER, G. (1993). The protein body membrane of soybean seeds as a possible lectin-binding component. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 8: 101-104.

RÜDIGER, H. (1998) Plant Lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomy**. 161, p. 130-132.

RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjug. J.**, v.18, p.589– 613, 2001.

SAMPAIO, A. H., ROGERS, D. J., BARWELL, C. J. (1998). Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca*. **Bot. Marina**, v. 41, p. 765-769.

SAMPAIO, A. H., ROGERS, D. J., BARWELL, C. J. SAKER-SAMPAIO, S., NASCIMENTO, K. S., NAGANO, C. S., FARIAS, W. R. L. (2002) New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **Journal Applications Phycology**, 14, p.489-496.

SANZ-APARICIO, J, HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETE, J.J., CAVADA, B.S. (1997) the crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggest a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties comparing with con A. **FEBS letts.**v.405,n.1,p. 114-118.

SHARON, N.; LIS, H. (1989) **Lectins**. London-New York: Chapman and Hall, 126p.

SHARON, N.; LIS, H. (1995) Lectins-proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochemistry**, v. 30, p. 59-75.

SHARON, N.; LIS, H. (2003). **Lectins**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

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

STILLMARK, H. (1888). *Über Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen*, Thesis, Dorpat.

SUMNER, J.B. (1919) The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*, **J. Biol. Chem.**, v.37, p.137-42.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A. & ROUGÉ, P. (1998). Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, 17(6): 575-692.

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., and PEUMANS, W. J. (1991) Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) **Planta** 183, p.258-262.

VARGIN, A., TEPLYAKOV, A., (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. **J. Appl. Crystallog.** 30, 1022–1025.

VASCONCELOS, I.M., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., DE OLIVEIRA, T.A.,(1991) Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*, **Journal Food Biochemistry**. 15 p. 137-154.

VIJAYAN, M., and CHANDRA, N. (1999) Lectins. **Structural Biology**, 9, p.707–714.

WAH, D. A., ROMERO, A., GALLEGO DEL SOL, F., CAVADA, B.S., RAMOS, M.V., GRANGEIRO, T.B., SAMPAIO, A.H. & CALVETE, J.J. (2001). 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 Molecular Biology**. 310, 885-894.

WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A., EDELMAN, G. (1971) Unusual fragments in the subunits structure of concanavalin A, **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 68 p. 1130-1134.

WU, A. M., SONG, S., TSAI, M. & HERP, A. (2001) A guide to the carbohydrate specificities of applied lectins-2 (updated in 2000). In the Molecular Immunology of complex Carbohydrates 2 (**Adv Explt. Medicene Biology**) (Wu, A. M., ed.), vol 491, pp 551-585.