



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL E BIOLÓGICA DE UMA LECTINA
DE SEMENTES DE *Dioclea reflexa* HOOK F.**

FORTALEZA
2014

FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL E BIOLÓGICA DE UMA LECTINA
DE SEMENTES DE *Dioclea reflexa* HOOK F.**

Tese de Doutorado submetida 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.
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Kyria Santiago do Nascimento.

**FORTALEZA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

P491c Pereira Junior, Francisco Nascimento.
Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa*
Hook F. / Francisco Nascimento Pereira Junior. – 2014.
103 f. : il., color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Ciências Biológicas II.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago Nascimento.

1. Espectrometria de massa. 2. Cristalografia de raios X. 3. Toxicidade. I. Título.

CDD 574.192

FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PARCIAL E BIOLÓGICA DE UMA LECTINA
DE SEMENTES DE *Dioclea reflexa* HOOK F.**

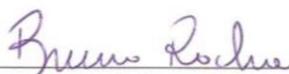
Tese submetida à coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 07/08/2014.

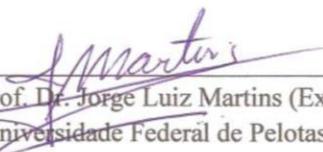
BANCA EXAMINADORA



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



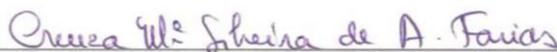
Prof. Dr. Bruno Anderson Matias Rocha (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Jorge Luiz Martins (Examinador)
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)



Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano
Departamento de Engenharia de Pesca
Universidade Federal do Ceará



Prof.^a Dr.^a Creuza Maria Silveira de Araújo Farias (Examinadora)
Universidade de Fortaleza (Unifor)

*Aos meus pais, Lena e Pereira, que nunca
mediram esforços para que eu pudesse realizar
meus sonhos e objetivos, me ajudando e
apoiando em todos os momentos da minha vida,
a meu irmão, Jonas, pelo apoio e
companheirismo e a minha namorada, Janaína,
por estar sempre ao meu lado.*

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido paciência, paz, saúde e felicidades a mim e aos meus familiares, dando-me forças para seguir sempre em frente.

A meu orientador, Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada por ter me recebido em seu laboratório e acreditado em meu potencial e ter confiança no meu trabalho, pelo apoio no meu crescimento profissional e pessoal.

A Professora Dr.^a Kyria Santiago do Nascimento, pela co-orientação na realização deste trabalho e pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante o convívio no laboratório.

Ao Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante a graduação, durante o mestrado e agora no doutorado, pela amizade e ensinamentos dentro e fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano pelo suporte nos dados de espectrometria de massas e pelos valiosos ensinamentos.

A Professora Ana Maria Sampaio Assereuy, Alana de Freitas Pires e toda equipe do LAFFIN pela colaboração para a realização dos testes de atividade biológica.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC, pelos valiosos ensinamentos que me proporcionaram ao longo da minha pós-graduação.

A minha orientadora durante a iniciação científica na URCA, a Professora Dr.^a Beatriz Tupinambá Freitas, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse entrar no mundo da ciência.

Aos meus grandes amigos, companheiros e colegas de trabalho, Helton, Rafael, Eduardo, Ito, Rômulo, Mayron, Alysson, Jefferson, Joana, Camila, Maria Júlia e Raquel, pelo convívio, amizade e aprendizado, dentro e fora do laboratório, no decorrer desses anos.

Aos amigos do BioMol-Lab, Willian, Tiago, Cecília, Mayara, Vinicius, Vanir, Alfa, Suzete, Guilherme, Fernando, Batista, Emílio, Thaiz, Sâmia, em especial a Jorge, Roniere e Claudener pela valiosa ajuda na realização deste trabalho e a todos os demais que compõe o

BioMol-Lab e Biomol-DEP que contribuíram durante esta caminhada e a quem aprendi a ter um grande carinho.

A minha mãe Lena, meu pai Pereira e meu irmão Jonas pelo amor que constrói o nosso lar. E a toda minha família que amo tanto.

A minha namorada Janaína, pela amizade, pelo carinho, pela compreensão e ajuda em todos os momentos importantes. Sem sua ajuda a caminhada teria sido bem mais difícil, o que me torna eternamente grato.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro durante o meu período de doutoramento.

Por fim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

“A vida de cada um de nós, que é feita e guiada mais pelos outros do que por nós mesmos, mais pelos acontecimentos fortuitos do que por qualquer plano traçado de antemão, arrasta-nos, às vezes, nos seus pontapés e repelões, até onde nunca julgaríamos chegar.”

(A matemática não falha. Lima Barreto)

RESUMO

Lectinas são proteínas que possuem no mínimo um domínio não catalítico capaz de se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos. As lectinas são amplamente distribuídas em muitas plantas, bem como em animais e outros organismos. Geralmente, as lectinas são muito abundantes em sementes de plantas, especialmente na família Leguminosae. Centenas de lectinas já foram isoladas e caracterizadas de plantas pertencentes a diferentes famílias dessa divisão. A família das lectinas de leguminosas representa o grupo desta classe proteica mais bem estudada, em especial destaque a subtribo Diocleinae. As lectinas de Diocleinae apresentam um alto grau de similaridade estrutural, porém o mesmo não se observa quanto às atividades biológicas. Esta variabilidade reside em detalhes que podem ser analisados em estudos baseados em estruturas. Neste contexto, o presente trabalho descreve a caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina presente em sementes de *Dioclea reflexa* Hook F., pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae. A lectina de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL) foi purificada em uma única etapa através de cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-50. A lectina aglutinou fortemente eritrócitos de coelho e foi inibida por D-manose e α -metil-D-manosídeo. A atividade hemaglutinante da DrfL é ótima nos pH 5,0;6,0 e 7,0, e estável a uma temperatura de 50 °C. Semelhante a outras lectinas da subtribo Diocleinae, a análise por espectrometria de massas indicou que a lectina de *D. reflexa* possui três cadeias (α , β e γ) com massas de 25.562, 12.874 e 12.706 Da, respectivamente, e não possui ligações dissulfeto ou glicosilações. A sequência primária da DrfL apresenta grande similaridade com outras lectinas de espécies do mesmo gênero. A proteína foi cristalizada pelo método de difusão de vapor na presença do ligante X-man e foi resolvida a uma resolução de 1,76 Å. DrfL apresentou efeito relaxante em músculo liso de aortas endotelizadas de rato e apresentou atividade inflamatória no modelo de edema de pata de rato. A lectina de *D. reflexa* exibiu baixa citotoxicidade contra náuplios de *Artemia* sp.

Palavras Chave: Lectina, *Dioclea reflexa*, espectrometria de massas, cristalografia de raios X, vasorrelaxamento, atividade pró-inflamatória, toxicidade.

ABSTRACT

Lectins are proteins that have at least one non-catalytic domain capable of reversibly bind to specific mono-or oligosaccharides. Lectins are widely distributed in many plants as well as animals and other organisms. In general, lectins are very abundant in plant seeds, especially in the Leguminosae family. Hundreds of lectins have been isolated and characterized from plants belonging to different families of this division. The legume lectin family is the group of this protein class further studied, in particular highlighted the subtribe Diocleinae. Lectins Diocleinae have a high degree of structural similarity, but the same was not true about the biological activities. This variability lies in details that can be analyzed in studies based structures. In this context, this paper describes the partial structural and biological characterization of a lectin present in seeds *Dioclea reflexa* Hook F. belonging to the family Leguminosae, subfamily Papilionoideae, tribe Phaseoleae, subtribe Diocleinae. The seed lectin *Dioclea reflexa* (DrfL) was purified in a single step by affinity chromatography on Sephadex G-50 column. The lectin strongly agglutinated rabbit erythrocytes and was inhibited by D-mannose and methyl- α -D-manoside. The hemagglutinating activity of the DrfL is optimum pH 5.0, 6.0 and 7.0, stable at a temperature of 50 ° C. Similar to other lectins of the subtribe Diocleinae, analysis by mass spectrometry indicated that the lectin *D. reflexa* has three chains (α , β and γ) with masses of 25,562; 12,874 and 12,706 Da, respectively, and has no disulfide bonds or glycosylation. The primary sequence of DrfL shows great similarity with other lectins from species of the same genus. The protein was crystallized by vapor diffusion bonding method in the presence of X-man and was determined to a resolution of 1.76 Å. DrfL presented relaxing effect on smooth muscle and endothelial aortas rat and showed inflammatory activity in the rat paw edema model. The lectin *D. reflexa* exhibited low cytotoxicity against *Artemia* sp.

Key words: Lectin, *Dioclea reflexa*, mass spectrometry, X-ray crystallography, vasorelaxation, pro-inflammatory activity, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação estrutural das lectinas vegetais.....	23
Figura 2. Classificação das lectinas vegetais.....	25
Figura 3 – Monômero típico de uma lectina de leguminosa.....	27
Figura 4 – Modificações pós-traducionais durante a biossíntese da Concanavalina A (ConA).....	30
Figura 5 – Reação esquemática da química derivativa de Edman.....	32
Figura 6 – Esquema de um espectrômetro de massa híbrido do tipo triplo quadrupolo.....	34
Figura 7 – Cristalização por difusão de vapor.....	38
Figura 8 – Naúplio de <i>Artemia</i> sp.....	46
Figura 9 – Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50.....	55
Figura 10 – Eletroforese em SDS-PAGE.....	57
Figura 11 – Efeito da temperatura e pH na atividade da lectina da DrfL.....	58
Figura 12 – Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de DrfL.....	59
Figura 13 - Espectro de massa das cadeias de DrfL.....	63
Figura 14 – Sequência de aminoácidos da DrfL.....	64
Figura 15 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de <i>Dioclea reflexa</i> (DrfL) com lectinas do gênero <i>Dioclea</i>	66
Figura 16 – Cristais de DrfL.....	70
Figura 17 – Estrutura do monômero de DrfL.....	73
Figura 18 – Estrutura geral de DrfL.	74
Figura 19 – Gráfico de Ramachandran das coordenadas da DrfL.....	75
Figura 20 – Coordenação dos metais na estrutura de DrfL.....	76
Figura 21 – Representação da interação do X-man no sitio de ligação a carboidratos...	77
Figure 22 – <i>Dioclea reflexa</i> (DrfL) induz relaxamento dependente do endotélio em aorta isolada de rato.....	82
Figure 23 – Relaxamento induzido por DrfL em aorta isolada de rato é bloqueado por L-NAME.....	83
Figure 24 – DrfL estimula edema de pata.....	84
Figura 25 - Efeito tóxico de DlyL em diferentes concentrações contra <i>Artemia</i> sp.....	85
Figura 26 – Inibição do efeito tóxico de DrfL contra <i>Artemia</i> sp.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de atividades biológicas descritas para lectinas extraídas a partir de espécies de leguminosas.....	40
Tabela 2 – Atividade hemaglutinante no extrato total das sementes de <i>D. reflexa</i>	54
Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total de sementes de <i>D. reflexa</i> por carboidratos.....	55
Tabela 4 – Tabela de purificação da lectina de sementes de <i>D. reflexa</i>	56
Tabela 5 – Estatística da coleta de dados de difração de raios x, refinamento e qualidade da estrutura.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABU: ácido aminobutírico	m/z: Relação massa/carga
BSA: Albumina Sérica Bovina	MIC: Concentração Mínima Inibitória
CE: Concentração efetiva	MS/MS: Espectrometria de massas em sequencial
CFL: Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>	MS: Espectrometria de massas
CGL: Lectina de <i>Canavalia gladiata</i>	NCBI - <i>Nacional Center of Biotechnology Information</i>
CID: Dissociação induzida por colisão	NO: Óxido Nítrico
ConA: Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>	NOS: Enzimas Óxido Nítrico Sintases
CL₅₀: Concentração letal mediana	PAL: Lectina de <i>Pterocarpus angolensis</i>
ConBr: Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	PDB: Protein Data Bank
ConBol: Lectina de <i>Canavalia boliviana</i>	PEG: Polietilenoglicol
ConM: Lectina de <i>Canavalia maritima</i>	PEL: Lectina de <i>Platypodium elegans</i>
CRD: Domínio de reconhecimento de carboidrato	pH: Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
DGL: Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>	PHA: Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Dgui: Lectina de <i>Dioclea guianensis</i>	PPL-1: Lectina 1 de <i>Parkia platycephala</i>
Dvir: Lectina de <i>Dioclea virgata</i>	PPL-2: Lectina 2 de <i>Parkia platycephala</i>
DVL: Lectina de <i>Dioclea violacea</i>	RIP: Proteína inativadora de ribossomo
Da: Dalton	SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
DDA: Análise Direta de Dados	s.c.: Injeção Subcutânea
DrfL: Lectina de <i>Dioclea reflexa</i>	SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
EDTA: Ácido Etilenodiaminotetraácido	TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
ESI: Ionização por Eletrospray	TxLCI: Lectina do bulbo de tulipa
GNA: Lectina de <i>Galanthus nivalis</i>	U.H.: Unidade Hemaglutinante
IFN-γ: Interferon gama	VML: Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
i.v.: Intravenoso	
kDa: Kilodalton	
kV: Kilovolt	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 Aspectos históricos e definição	18
3.2 Generalidades sobre lectinas de plantas	20
3.3 Classificação estrutural das lectinas vegetais	22
3.4 Lectinas de plantas	24
3.5 Lectinas de leguminosas	26
3.6 Lectinas da subfamília Papilionoideae	29
3.7 Lectinas da subtribo Diocleinae	29
3.8 Aspectos gerais da espectrometria de massas	30
3.9 Cristalização de proteínas	35
3.10 Atividades biológicas de lectinas vegetais	39
3.11 Atividade vasorrelaxante de lectinas vegetais	40
3.11.1 Aspectos Gerais da Contratilidade	40
3.11.2 Lectinas vegetais com efeito vasorrelaxante	41
3.11.3 Atividade anti-inflamatória de lectinas vegetais	42
3.12 Ensaio de toxicidade com <i>Artemia</i> sp.	45
4 CAPÍTULO II: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LECTINA DE <i>Dioclea reflexa</i> .	49
4.1 Purificação da lectina de sementes <i>Dioclea reflexa</i>	49
4.1.1 Extração proteica	49
4.1.2 Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex-G50	49
4.1.3 Dosagem de proteínas solúveis	49
4.1.4 Detecção da Atividade Hemaglutinante	50
4.1.5 Cálculo da atividade hemaglutinante específica	50
4.1.6 Especificidade por Carboidratos	50
4.1.7 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS	51
4.2 Caracterização físico-química	52
4.2.1 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante	52
4.2.2 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante	52

4.2.3 Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante	53
4.2.4 Análise da presença de carboidratos estruturais	53
4.3 Resultados e discussão	53
4.3.1 Purificação da lectina de sementes de <i>D. reflexa</i>	53
4.3.2 Caracterização físico-química da DrfL	56
5 CAPÍTULO III: ANÁLISE DA MASSA INTACTA E SEQUÊNCIA DE DrfL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	61
5.1 Determinação da massa molecular de DrfL por espectrometria de massas	61
5.2 Digestão <i>in gel</i> e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas	61
5.3 Análises da sequência primária por bioinformática	62
5.4 Resultados e discussão	63
5.4.1 Determinação da massa de DrfL	63
5.4.2 Sequenciamento de DrfL	64
6 CAPÍTULO IV: RESOLUÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE DrfL POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X	68
6.1 Cristalização da lectina de sementes de <i>Dioclea reflexa</i>	68
6.2 Coleta de dados e resolução da estrutura cristalográfica de DrfL	68
6.3 Resultados e discussão	70
6.3.1 Cristalização da DrfL	70
6.3.2 Estrutura geral de DrfL	73
7 CAPÍTULO V: ANÁLISE DAS ATIVIDADES INFLAMATÓRIAS, VASORELAXANTES E TOXICIDADE CONTRA <i>Artemia</i> sp. DE DrfL	79
7.1 Teste de contratilidade em aortas isoladas	79
7.2 Participação do sítio de ligação de carboidratos no relaxamento provocado por DrfL	79
7.3 Modelo de edema de pata	80
7.4 Análise estatística	80
7.5 Teste de letalidade de <i>Artemia</i> sp.	80
7.6 Determinação do CL ₅₀	81
7.7 Resultados e discussão	81
7.7.1 O efeito vasorrelaxante de DrfL	81
7.7.2 Atividade inflamatória de DrfL	83
7.7.3 Teste de letalidade de <i>Artemia</i> sp.	85
8 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos os carboidratos foram vistos apenas como macromoléculas envolvidas em processos de geração de energia, na forma de monossacarídeos ou oligossacarídeos, ou, ainda, como material estrutural, como a celulose nas plantas e a quitina dos exoesqueletos de insetos.

O interesse pelo estudo dos carboidratos como moléculas de reconhecimento celular só surgiu por volta de 1968. Antes disso, pouco era pesquisado e divulgado, em grande parte devido à complexidade estrutural dos mesmos e das inúmeras possibilidades de interligações dos carboidratos, o que dificultava o controle estereosseletivo nas reações de síntese e a caracterização estrutural dos produtos obtidos (SHARON; LIS, 1993).

Os carboidratos localizados sobre a superfície das células contribuem com a maioria das interações entre as células e o ambiente. Por formarem uma camada que recobre as células, o glicocálice, os carboidratos são as primeiras moléculas a serem encontradas e reconhecidas por outras células, anticorpos e microrganismos invasores, como vírus e bactérias, podendo atuar também como receptores para hormônios e toxinas. Em função do já conhecido papel da glicosilação na comunicação celular, padrões de glicosilação anormais são conhecidos como marcadores, ou em alguns casos até mesmo a causa, de certas doenças como, por exemplo, o câncer (DENNIS *et al.*, 1999).

Carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (GABIUS, 2000).

As lectinas, por serem moléculas capazes de “decifrar os glicocódigos” codificados na estrutura dos glicoconjugados que compõem as membranas celulares, desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como comunicação celular, resposta imunológica, fertilização, desenvolvimento de infecções parasitárias e metástase de tumores (GABIUS; GABIUS, 1997).

A habilidade para o reconhecimento e ligação a carboidratos específicos distinguem as lectinas de todas as outras proteínas de plantas. Elas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo de proteínas, pois apresentam propriedades bioquímicas e

atividades biológicas acentuadamente diferentes, distintas estruturas moleculares e especificidades (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas, tais como proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

Atualmente estas proteínas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas científicas, abrangendo aplicações que vão da medicina à agricultura, sendo muitas destas proteínas consideradas como ferramentas básicas para áreas de ponta como a biotecnologia, tendo em vista suas várias propriedades, tais como: atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (FREIRE *et al.* 2003, BENJAMIN *et al.*, 1997, ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 2005), atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; OHIZUMI *et al.*, 2009, BENETEAU *et al.*, 2010), efeito tóxico para moluscos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* (SANTOS *et al.*, 2010), agentes em *drug delivery* (MAKHLOF *et al.*, 2010), efeito vasodilatador (ASSEREUY *et al.*, 2009), e indução do fenômeno de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001).

Nos vegetais as lectinas têm sido encontradas em organismos mais simples como musgos (MOLINA; VINCENTE, 1995) até os mais complexos como gimnospermas (HAN *et al.*, 2005) e angiospermas (WONG; NG, 2005; KAUR *et al.*, 2005). De todos esses grupos, as angiospermas têm sido as mais investigadas, sendo que algumas centenas de lectinas já foram isoladas e caracterizadas de plantas pertencentes a diferentes famílias dessa divisão.

Embora lectinas apresentem a propriedade comum de se ligar, reversivelmente, a carboidratos específicos, elas apresentam características próprias, principalmente no que diz respeito a aplicações biológicas. Isto faz com que, via de regra, cada lectina tenha as suas potencialidades de aplicação, o que justifica que cada uma delas, por mais semelhante que possa parecer com outra lectina estruturalmente, mereça ser estudada separadamente.

Fica evidente, então, que a descoberta, o isolamento e a caracterização química, físico-química e biológica de novas lectinas se revestem de grande importância, na medida em que novas lectinas com diferentes aplicabilidades podem ser encontradas. A descoberta de novas lectinas com especificidades diferentes torna-se atrativa, uma vez que podem servir como novos modelos para o entendimento destes processos dinâmicos de comunicação célula-molécula, célula-célula e célula-microrganismo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo purificar uma nova lectina de sementes de *Dioclea reflexa*, caracterizá-la físico-quimicamente e determinar suas estruturas primária e tridimensional, bem como testar a sua capacidade de causar inflamação e vasorrelaxamento, e determinar sua citotoxicidade, abrindo assim, possibilidades para sua utilização como ferramenta biotecnológica nas mais diversas áreas da ciência.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Purificar uma lectina presente em sementes de *Dioclea reflexa*;
- ✓ Verificar a especificidade da lectina por hemácias nativas e tratadas com enzimas proteolíticas;
- ✓ Determinar a especificidade da lectina por açúcares através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante;
- ✓ Determinar a massa aparente da lectina por SDS-PAGE;
- ✓ Caracterizar a lectina DrfL quanto a estabilidade a variação de pH e de temperatura e verificar a interferência de cátions divalentes;
- ✓ Determinar a massa intacta de DrfL por espectrometria de massas;
- ✓ Determinar a estrutura primária de DrfL e analisá-la quanto à similaridade entre outras lectinas;
- ✓ Cristalizar a lectina DrfL pelo método de difusão de vapor;
- ✓ Difratar o cristal de DrfL e obter o conjunto de padrões de difração;
- ✓ Resolver e refinar a estrutura DrfL;
- ✓ Avaliar o efeito vasorrelaxante de DrfL em segmentos de aortas de ratos;
- ✓ Determinar atividade inflamatória de DrfL em modelo de edema de patas;
- ✓ Avaliar a toxicidade da lectina contra náuplios de *Artemia* sp.

Capítulo I:
Fundamentação Teórica

3 CAPÍTULO I: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos históricos e definição

No final do século XIX, várias evidências indicavam a existência na natureza de proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas foram denominadas inicialmente de hemaglutininas, ou fitoaglutininas por terem sido originalmente encontradas em plantas (SHARON; LIS, 2004).

A primeira descrição do que agora conhecemos como lectinas vegetais data de antes de 1888, quando Stillmark publicou sua dissertação intitulada “Ricina, um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de euforbiáceas”. Embora, agora esteja evidente que a ricina de Stillmark era uma complexa mistura de moléculas tóxicas de ricina e aglutininas não tóxicas, seu trabalho pioneiro foi um marco na biologia, pois foi o primeiro a unir a toxicidade da mamona à ocorrência de um fator protéico hemaglutinante. Além disso, sua descoberta foi também um marco na bioquímica de plantas porque a ricina foi à primeira proteína vegetal cuja atividade biológica pôde ser determinada (VAN DAMME *et al.*, 1998, SHARON; LIS, 2004).

Posteriormente, substâncias tóxicas similares a ricina foram identificadas em sementes de *Croton tiglium* (crotina), *Abrus precatorius* (abrina) e em casca de *Robinia pseudoacacia* (robina). Em 1898, Elfstrand introduziu pela primeira vez o termo “hemaglutinina” como um nome comum a todas as proteínas vegetais capazes de aglutinar células. Este termo foi inspirado na similaridade entre a visível atividade macroscópica das proteínas vegetais e a das aglutininas do soro humano e animal, primeiramente descrito por Landois em 1875 (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Ricina e Abrina foram amplamente utilizadas como modelos de antígenos em estudos imunológicos. Isto permitiu a Paul Ehrlich, do Instituto Real de Terapia Experimental (Frankfurt), estabelecer no final da década de 1890, vários dos princípios fundamentais da imunologia, dentre estes, a especificidade da relação antígeno/anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral de mãe para filho (SHARON; LIS, 2004).

A ideia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada no início do século XX, depois que Ladsteiner e Raubitschek em 1907 relataram pela primeira vez a presença de uma lectina não tóxica nas leguminosas *Phaseolus vulgaris*

(feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa*. Após esse trabalho muitas outras hemaglutininas vegetais não tóxicas foram descobertas. Tornou-se, a partir de então, evidente que lectinas estão difundidas no reino vegetal e que a toxicidade atribuída às mesmas, é exceção, e não regra (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Em 1919, James Sumner isolou a partir das sementes de *Canavalia ensiformes*, utilizando a técnica de cristalização, uma proteína que ele próprio nomeou de concanavalina A (ConA) e obteve dessa forma a primeira lectina pura. Contudo, somente em 1936, Sumner e Howell demonstraram que a concanavalina A aglutinava células tais como eritrócitos e também precipitava glicogênio de soluções. Eles demonstraram também que a hemaglutinação era inibida pela sacarose da cana-de-açúcar, demonstrando pela primeira vez a especificidade das lectinas por açúcares (SHARON; LIS, 2004). Mas só em 1952 é que foi demonstrado que as propriedades hemaglutinantes de lectinas eram baseadas em uma atividade específica de ligação a carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952).

O marco seguinte na história das lectinas vegetais foi a descoberta realizada por Renkonen em 1948 e Boyd e Reguera em 1949 de que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência a eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO. Observou-se que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de plantas podiam reconhecer um grupo específico e aglutiná-lo, onde hemácias do sistema ABO respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta, umas aglutinando e outras não (VAN DAMME *et al.*, 1998). A habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a propor em 1954 o termo “lectina” (do latim *legere*, que significa selecionar ou escolher) para nomear essas proteínas (SHARON; LIS, 2004).

Outro grande marco na história das lectinas ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell, demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui atividade mitogênica sobre linfócitos. Essa descoberta teve um impacto revolucionário sobre a imunologia, pois até aquele momento acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se dividirem ou de se diferenciarem em outros tipos celulares (SHARON; LIS, 2004).

Com o avanço do conhecimento, as definições referentes às lectinas foram ampliadas, ressaltando aspectos de sua atuação em sistemas biológicos, pois são proteínas capazes de reconhecer e de se ligarem reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados. Deve ser observado que as lectinas se diferenciam de enzimas ligadoras de carboidratos como as glicosidases, as glucanases e as quitinases, porque não modificam a estrutura do carboidrato ao qual se ligam, o que ocorre em processos enzimáticos, apesar de haver lectinas

que, além do sítio de ligação lectínico, possuem um sítio enzimático. Também deve ser observado que a origem não imune destas proteínas vegetais as distingue de anticorpos, os quais possuem carboidratos como antígenos, agindo como aglutininas (LORIS, 2002; SINGH *et al.*, 1999; CUMMINGS, 1997).

Ao serem reconhecidas como proteínas ligantes de carboidratos, as lectinas puderam ser distinguidas de outras proteínas com base em um critério funcional bem definido. Goldstein *et al.* (1980) conceituou lectinas como sendo proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune ligantes a carboidratos que são capazes de aglutinar células e/ou precipitar polissacarídeos ou glicoconjugados.

Uma das mais recentes e aceitas definições de lectinas de plantas, foi apresentada por Peumans e Van Damme (1995), que define lectinas como sendo proteínas de origem não imune, que aglutinam células e glicoconjugados e são capazes de se ligar reversível e especificamente a carboidratos e substâncias que contenham açúcar, sem alterar a estrutura covalente de nenhum ligante glicídico.

3.2 Generalidades sobre lectinas de plantas

As lectinas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas variando em tamanho, estrutura, organização molecular e entre os sítios de ligação a carboidratos.

Em relação às cadeias polipeptídicas, as lectinas vegetais são caracteristicamente ricas em aminoácidos ácidos e hidroxilados e, encontram-se associadas por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e em alguns casos pontes de dissulfetos (KENNEDY *et al.*, 1995; RÜDIGER; GABIUS, 1993).

Pelo número de cadeias polipeptídicas, as lectinas são denominadas monoméricas quando apresentam apenas uma cadeia, como a lectina de *Solanum tuberosum* L., com 50 kDa (ALLEN; NEUBERGER, 1973), a heveína, com apenas 43 aminoácidos e 4 pontes de dissulfeto (SOEDJANAATMADJA *et al.*, 1995), e a arceína de *Phaseolus vulgaris* L. (LORIS, 2002). Quando as lectinas apresentam duas cadeias polipeptídicas elas são denominadas diméricas, com cadeias semelhantes ou diferentes entre si, ganhando respectivamente a denominação de lectinas homodiméricas ou heterodiméricas. *Erythrina speciosa* Andr. possui uma lectina homodimérica com 27,6 kDa por subunidade (KONOZY *et al.*, 2003). Em *Ricinus communis* L. a lectina é heterodimérica, com uma subunidade de 32 kDa e outra de 34 kDa (FRIGERIO; ROBERTS, 1998), bem como a lectina de *Erythrina*

indica Lam. com 65 kDa que é heterodimérica, com uma cadeia polipeptídica de 30 kDa e outra de 35 kDa (KONOZY *et al.*, 2002).

Lectinas compostas por quatro subunidades são denominadas tetraméricas, como a lectina JCA, também denominada jacalina, com 66 kDa (PRATAP *et al.*, 2002; KABIR, 1998). Também a SBA, com massa molecular de 120 kDa, é tetramérica e cada uma de suas subunidades possui massa molecular de 30 kDa, (CARVALHO, 1990). Ocorrem outros tipos estruturais de lectinas, como as triméricas, pentaméricas, hexaméricas ou poliméricas. Uma lectina trimérica ocorre em *Geodia cydonium* com cadeias de massa molecular 12,2, 13,0 e 13,8 kDa, conforme Müller *et al.* (1983). Em *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze ocorre, nas sementes, uma lectina com 10 subunidades de 20 kDa, totalizando 200 kDa, e uma segunda lectina com massa molecular relativa de 204 kDa, hexamérica, com subunidades de 34 kDa, conforme Datta *et al.* (1991).

Lectinas estão amplamente distribuídas em plantas, vírus, bactérias e animais (GERLACH *et al.*, 2005). Dentre estes grupos, as lectinas de plantas podem ser definidas como sendo proteínas de origem não imune, que aglutinam células e glicoconjugados e são capazes de se ligar reversível e especificamente a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente de nenhum ligante glicídico (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Por serem moléculas capazes de “decifrar os glicocódigos” codificados na estrutura dos glicoconjugados que compõem as membranas celulares, as lectinas desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos, tais como comunicação celular, resposta imunológica, fertilização, desenvolvimento de infecções parasitárias e metástase de tumores (GABIUS; GABIUS, 1997).

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas, tais como proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991).

Atualmente estas proteínas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas científicas, abrangendo aplicações que vão da medicina à agricultura, sendo muitas destas proteínas consideradas como ferramentas básicas para áreas de ponta como a biotecnologia, tendo em vista suas várias propriedades, tais como: efeito citotóxico e indução de apoptose em células tumorais (NUNES *et al.*, 2012), atividade anti-helmíntica (RÍOS-DE-ÁVAREZ *et al.*, 2012), atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (FREIRE *et al.*, 2003), atividade inseticida (BENETEAU *et al.*, 2010; NAGHDI), efeito tóxico para moluscos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* (SANTOS *et al.*, 2010), agentes em *drug delivery* (MAKHLOF *et al.*,

2010), efeito vasodilatador (ASSEREUY *et al.*, 2009), e indução do fenômeno de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001).

Nos vegetais as lectinas têm sido encontradas em organismos mais simples como algas (LIMA *et al.*, 2005) e musgos (MOLINA; VINCENTE, 1995) até os mais complexos como gimnospermas (HAN *et al.*, 2005) e angiospermas (KAUR *et al.*, 2005; WONG; NG, 2005). De todos esses grupos, as angiospermas tem sido as mais investigadas, sendo que algumas centenas de lectinas já foram isoladas e caracterizadas de plantas pertencentes a diferentes famílias dessa divisão.

A localização das lectinas em vegetais é muito ampla. Elas podem existir em vários tecidos da mesma planta e têm diferentes localizações celulares e propriedades moleculares. As lectinas são mais abundantes nas sementes, porém podem facilmente ser encontradas em partes vegetativas. Em sementes de leguminosas estão prevalentemente nos tecidos cotiledonares (PUSZTAI, 1991).

3.3 Classificação estrutural das lectinas vegetais

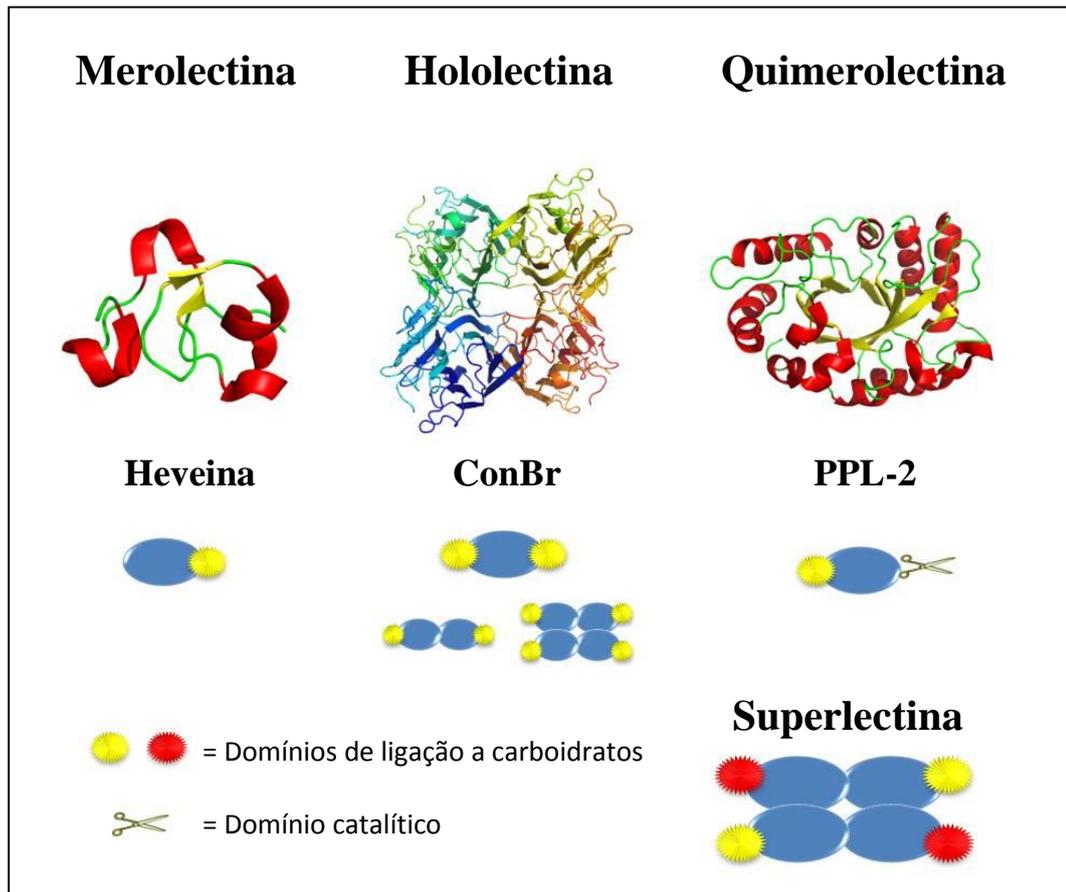
Consideradas um grupo de proteínas muito heterogêneas e amplamente distribuídas na natureza, durante o processo evolutivo, as lectinas conservaram uma característica em comum que as distingue de todas as outras proteínas por um critério funcional bem definido, que consiste na sua habilidade para reconhecer e ligar-se de forma reversível a carboidratos específicos sem alterar estruturalmente os mesmos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Van Damme e colaboradores (1998) subdividiu as lectinas vegetais de acordo com os tipos estruturais em quatro classes principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (FIGURA 1).

As merolectinas são proteínas que consistem exclusivamente de único domínio de ligação a carboidrato. Devido seu caráter monovalente, as merolectinas são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. A heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é uma típica merolectina (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As hololectinas também são compostas exclusivamente de domínios de carboidratos ligantes, mas com dois ou mais sítios ligantes que são idênticos ou parecidos. Devido à hololectinas serem divalentes ou multivalentes, elas podem aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas comportam-se como verdadeiras aglutininas e compreendem a maioria das lectinas de plantas e representam a classe de lectinas mais bem

estudada. São exemplos típicos de hololectinas as lectinas encontradas em sementes de plantas pertencentes à subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001).

Figura 1 – Classificação estrutural das lectinas vegetais.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Peumans e Van Damme,1999. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (ConBr; PDB: 3JU9), quimerolectinas (PPL-2; PDB: 2GSJ) e superlectinas, estas últimas não possuem representantes com estrutura tridimensional elucidada.

As quimerolectinas são a fusão de proteínas compostas de um ou mais domínios de carboidratos ligantes e de um domínio não relacionado, com uma atividade catalítica bem definida, e que age independentemente dos domínios de carboidratos ligantes. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas. Um representante deste grupo são as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP tipo 2), como por exemplo a ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina e um domínio para a inativação do ribossomo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Outro exemplo é a PPL-

2, uma lectina quitina-ligante isolada de sementes de *Parkia platycephala* que possui, além do sítio ligante a carboidrato, um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

As superlectinas consistem de no mínimo dois domínios de ligação para carboidratos. Diferente das hololectinas os domínios de ligação para carboidratos das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como exemplo, a lectina do bulbo de tulipa (TxLCI) que são formados por dois domínios de ligação a carboidrato, que reconhecem manose e N-acetil-galactosamina, respectivamente (VAN DAMME *et al.*, 1996).

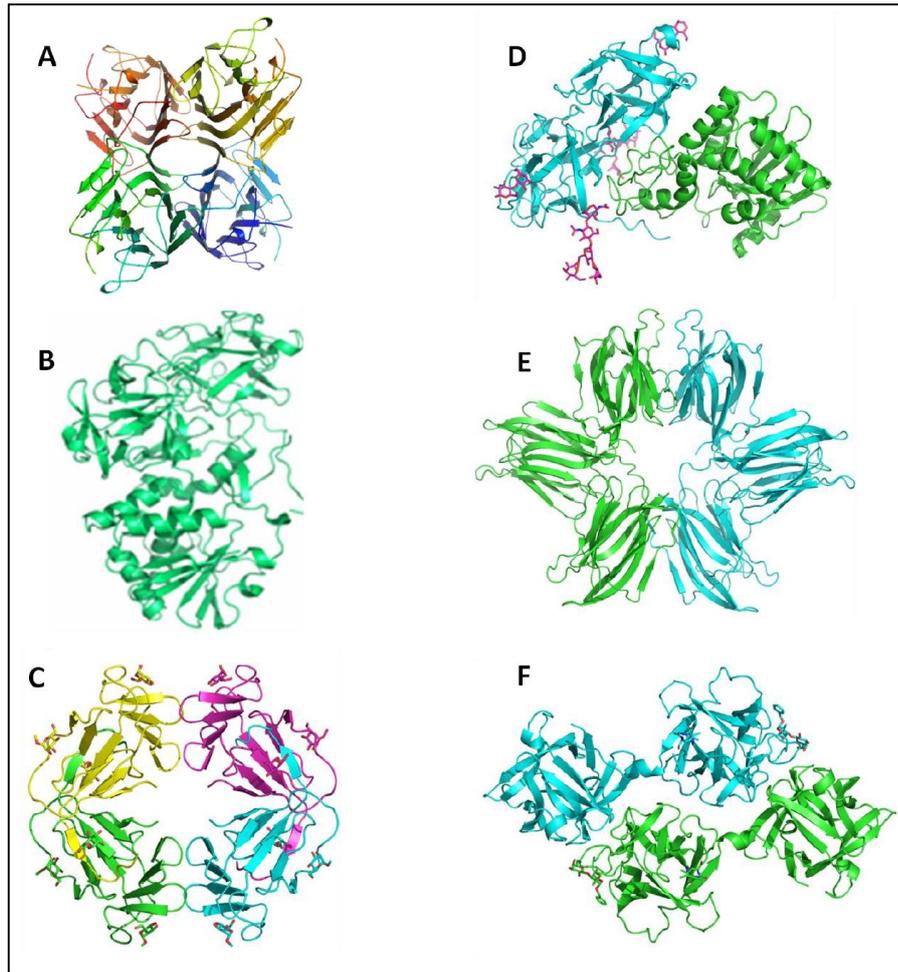
3.4 Lectinas de plantas

Nos vegetais, as lectinas foram detectadas em centenas de espécies, sendo que a maioria das lectinas vegetais estudadas foram obtidas de sementes, principalmente em leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação. As lectinas constituem cerca de 10% das proteínas totais de semente, porém a quantidade isolada é pequena: varia entre 0,1-1% deste total (LORIS, 2002; SHARON; LIS, 2004).

Apesar das lectinas serem amplamente distribuídas no reino vegetal, abrangendo principalmente as famílias Leguminosae, Gramineae, Euphorbiaceae, entre outras, a família Leguminosae é a que apresenta o maior número de lectinas isoladas e destas destacam-se principalmente as de sementes (LORIS *et al.*, 1998; PRAKASHKUMAR *et al.*, 1998; SHARON, 1993), embora possam ser encontradas também em outras partes das plantas, como folhas (RATANAPO *et al.*, 2001), frutos (SAMPIETRO *et al.*, 2001), raízes de algumas Convolvulaceae (PEUMANS *et al.*, 1997; VAN DAMME *et al.*, 1997) e tubérculos (SUSEELAN *et al.*, 2002).

Várias tentativas foram feitas para organizar esse grupo tão heterogêneo de proteínas vegetais. Van Damme e colaboradores (1998) classificaram as lectinas de plantas em sete grupos, ou famílias, o qual foi elaborado levando em consideração todos os dados de sequência que estavam disponíveis nas últimas décadas. Estes diferentes domínios ligantes de carboidratos foram chamados: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos, lectinas de monocotiledôneas que se ligam a manose, proteínas inativadoras de ribossomo tipo II (RIP tipo II), lectinas de floema de Cucurbitaceae, lectinas relacionadas à jacalina e lectinas de Amaranthaceae (FIGURA 2).

Figura 2. Classificação das lectinas vegetais.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Lectinas de leguminosas, *Canavalia brasiliensis* (ConBr); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína; (C) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, *Galanthus nivalis* agglutinina (GNA); (D) RIP's do tipo II, Ricina; (E) Lectinas relacionadas às Jacalinas, *Parkia platycephala* (PPL-1); (F) Lectina da família da amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA).

Apesar de parecer clara, esta classificação das lectinas vegetais tende a deixar de ser baseada em aspectos evolutivos e passam a levar em conta somente os aspectos estruturais. Isso se dá pelo fato de que, à medida que novas lectinas vão sendo descobertas e caracterizadas, deixa de existir um limite taxonômico bem definido entre as famílias de lectinas vegetais. Além disso, a maioria destes domínios está distribuída por todo reino vegetal. Recentemente, uma análise dos genomas totalmente sequenciados de soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis* revelou a presença de pelo menos centenas de genes putativos de lectinas pertencentes a todas as principais superfamílias de lectinas (JIANG *et al.*, 2010). Outro exemplo claro deste fato é a lectina específica para glicose e manose extraída de sementes da leguminosa *Parkia platycephala*, cuja estrutura é composta por três

domínios repetidos relacionados à jacalina (GALEGO DEL SOL *et al.*, 2005; MANN *et al.*, 2001).

3.5 Lectinas de leguminosas

O termo lectina de leguminosa refere-se a uma família particular de lectinas de plantas estreitamente relacionadas, encontradas exclusivamente em vegetais pertencentes à família Leguminosae (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A maioria das lectinas de dicotiledôneas estudadas foi isolada de plantas de tribos da família das Leguminosae. As lectinas de leguminosas constituem uma ampla família de proteínas estreitamente relacionadas, encontradas em espécies representativas da família Leguminosae. Elas estão presentes em sementes, folhas, caules e raízes (SHARON; LIS, 1990).

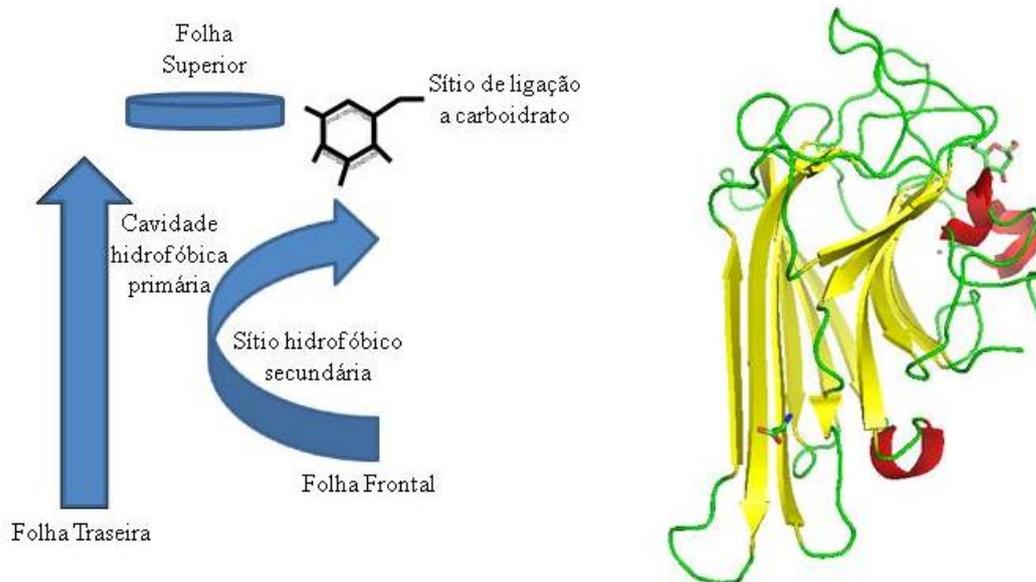
Até o momento, dezenas de lectinas desta família já foram isoladas e caracterizadas, principalmente lectinas de sementes, onde o percentual pode variar de 1 a 10% do total de proteínas solúveis, embora algumas espécies possam apresentar concentrações acima de 50%, ou abaixo de 0,1% do total de proteínas solúveis presentes nas sementes. (SHARON; LIS, 1990; VAN DAMME, *et al.*, 1998).

Este grupo de lectinas requer cátions divalentes para manutenção de atividade biológica. Os íons Ca^{+2} e Mn^{+2} estabilizam o sítio de ligação a carboidrato bem como fixam as posições dos aminoácidos que interagem com os carboidratos ligantes. Os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são bastante conservados (WEIS; DRICKAMER, 1996).

As estruturas cristalinas de um grande número de lectinas de leguminosas já foram resolvidas (210 estruturas disponíveis de 35 lectinas diferentes) (VARROT *et al.*, 2011). As estruturas dos monômeros de diferentes lectinas de leguminosas são extremamente similares. Aproximadamente 20% dos resíduos de aminoácidos são invariantes em todas as lectinas de leguminosas e outros 20% são similares. Entre os aminoácidos conservados incluem-se aqueles envolvidos na interação com o carboidrato e quase todos os resíduos que coordenam íons metais (BANERJEE *et al.*, 1996; HAMELRYCK *et al.*, 1998). A resolução de estruturas tridimensionais de lectinas de leguminosas tem mostrado que cada subunidade é constituída de cerca de 60% de fitas-beta antiparalelas arranjadas em duas ou mais folhas beta interconectadas por voltas, mais conhecido como enovelamento do tipo “ β -sanduíche”. Para todas as lectinas de leguminosas conhecidas, a estrutura terciária é constituída de duas folhas-

β anti-paralelas, uma com seis fitas β (atrás) e outra com sete fitas β (frente), conectadas por uma outra folha- β de 5 fitas (superior), gerando o conhecido motivo *jellyroll*, também referido como *lectin fold* (HAMELRYCK *et al.*, 1998; SRINIVASAN *et al.*, 1996) (FIGURA 3).

Figura 3 – Monômero típico de uma lectina de leguminosa.



Fonte: Adaptado de Benevides, 2011. À esquerda, diagrama esquemático da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas. Do lado direito, estrutura terciária do monômero da lectina de *Canavalia gladiata* (CGL) complexada com α -metil-manosídeo e ácido aminobutírico (Abu) (ambos em verde) (PDB: 2D7F).

O sítio de ligação a carboidratos está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, próximo ao sítio de ligação a metais. O sítio de reconhecimento a carboidratos consiste de diversas voltas com diferentes graus de variabilidade (SHARMA; SUROLIA, 1997). As conformações destas voltas são determinadas pela presença na estrutura de íons de metais de transição, como o cálcio e o manganês (LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 2000). O sítio de ligação a íons é amplamente conservado nestas proteínas. Sabe-se que a atividade de reconhecimento a açúcar depende da presença do íon cálcio e de um outro íon, geralmente o manganês. Esses metais se localizam a uma distância de aproximadamente 4,5 Å e ambos são coordenados por cadeias laterais de pelo menos quatro aminoácidos e duas moléculas de água. O reconhecimento das lectinas de leguminosas por íons é reversível e a remoção desses metais resulta em importantes mudanças conformacionais. Em ConA, por exemplo, com a falta dos íons cálcio e manganês, o peptídeo Ala207-Asp208, que para participar efetivamente do reconhecimento ao seu carboidrato específico necessita estar na conformação trans, passa a assumir uma conformação do tipo cis (BOUCKAERT *et al.*, 1995). A ausência desses metais,

portanto, resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

O sítio primário de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas consiste em uma região na superfície da molécula composto por quatro voltas que proporcionam a formação de uma cavidade na superfície da mesma, onde o reconhecimento específico de carboidratos se dá por intermédio de ligações de hidrogênio entre a lectina e o açúcar. Nestas voltas encontram-se três resíduos altamente conservados, Asp, Asn e Gly/Arg, os quais são responsáveis pela formação de quatro ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos carbonos três e quatro presentes em monossacarídeos como manose ou glicose. Também participam do processo de reconhecimento interações de Van der Waals estabelecidas entre o anel aromático do açúcar e as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos: a estabilização dos monossacarídeos ocorre também através de interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácido como Phe, Tyr, Trp ou Leu (MORENO *et al.*, 2008). Contatos adicionais entre o carboidrato e a superfície da proteína (diretos ou mediados por moléculas de água) contribuem para a alta seletividade (WEIS; DRICKAMER, 1996; ELGAVISH; SANAN, 1997).

Quanto a organização oligomérica, as lectinas de leguminosas são geralmente compostas de 2 ou 4 subunidades, iguais ou diferentes com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa. Cada uma destas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade. Frequentemente, suas subunidades são compostas de uma única cadeia polipeptídica e sua união é estabelecida por forças não-covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, que formam dímeros canônicos e estabilizam o tetrâmero pela união destes dímeros. Entretanto, algumas lectinas possuem subunidades formadas por 2 cadeias polipeptídicas, entre elas as lectinas da tribo Viciaeae, gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus*, e *Lens*. Estas lectinas são dímeros formados por subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α (5 a 7 kDa) e uma β (15 a 19 kDa) mantidas por ligações não-covalentes (SHARON; LIS, 1989).

Algumas lectinas de leguminosas podem ser encontradas em diferentes isoformas, como por exemplo, a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que é formada por duas subunidades gênicas diferentes, denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), que combinadas dão origem a uma família de cinco isolectinas tetraméricas: E4, E3L, E2L2, EL3, L4 (FELDSTED *et al.*, 1977). Além da heterogeneidade genética, ou seja, mais de um gene codificando uma lectina, a ocorrência de isoformas pode ser atribuída a processamentos pós-traducionais incompletos (YOUNG *et al.*, 1995).

Outras lectinas de diferentes partes vegetais existem como uma complexa mistura de isoformas, como por exemplo, as lectinas de *Robinia pseudoacacia* (VAN DAMME *et al.*, 1995), do gênero *Erythrina* (BONNEIL *et al.*, 2004), de *Acacia constricta* (GUZMAN-PARTIDA *et al.*, 2004) e de *Amaranthus leucocarpus* (HERNANDEZ *et al.*, 2001). A presença de isoformas têm alto impacto sobre a função biológica de lectinas, e a existência de várias isoformas poderia oferecer uma estratégia alternativa ou uma adaptação evolutiva para compensar a baixa especificidade.

3.6 Lectinas da subfamília Papilionoideae

As lectinas de Leguminosas representam o grupo mais bem estudado dentre as lectinas de plantas, sendo a maioria dos estudos de lectinas extraídas de membros da subfamília Papilionoideae, principalmente da tribo Phaseoleae (MANN *et al.*, 2001).

A subfamília Papilionoideae está representada por 483 gêneros e 13.800 espécies divididas em 28 tribos. No Brasil são 88 gêneros e 180 espécies nativas (BARROSO *et al.*, 1991; LEWIS *et al.*, 2005). Muitas lectinas de espécies desta subfamília foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente. São alguns exemplos as lectinas de *Sesbania aculeata* (BISWAS *et al.*, 2009), *Cajanus cajan* (NAEEM *et al.*, 2001) e *Camptosema ellipticum* (BATISTA *et al.*, 2010).

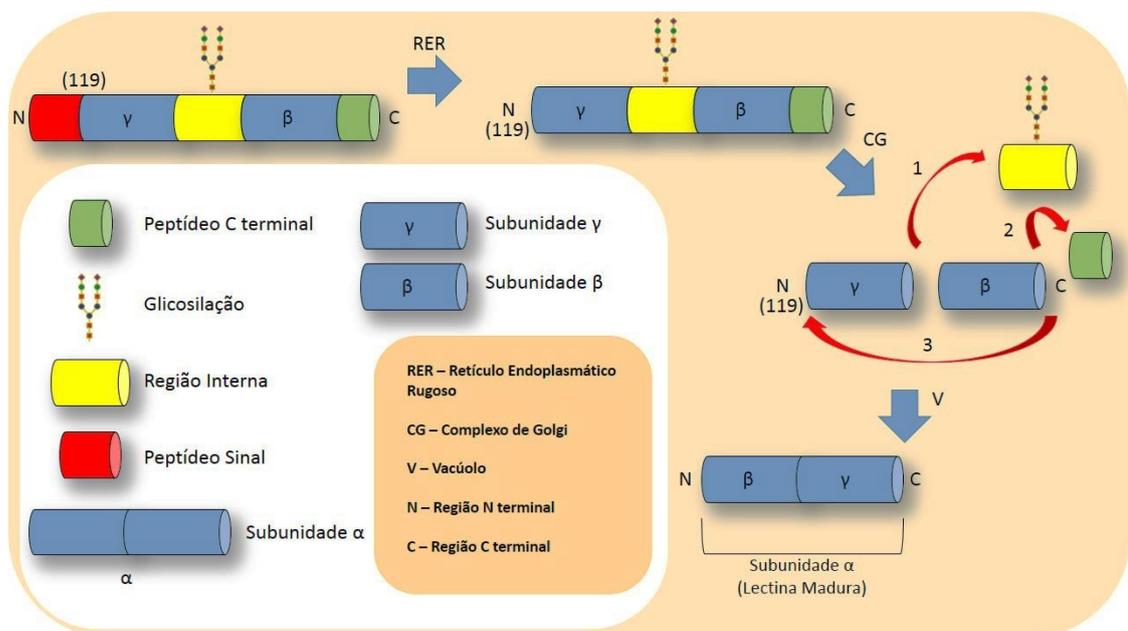
3.7 Lectinas da subtribo Diocleinae

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

Sabe-se que lectinas da subtribo Diocleinae, são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas ou pro-lectina glicosilada (FIGURA 4). A região correspondente ao cDNA contém 29 resíduos de uma sequência sinal, que é removido posteriormente durante o transporte da pré-pro-lectina para o lúmen do retículo endoplasmático, originando uma pró-lectina. Em seguida encontra-se uma região codificante

referente aos aminoácidos 119-237 da Concanavalina A, e uma outra região codificante correspondente aos aminoácidos 1-118 da lectina, seguida por último por uma extensão C-terminal de 9 resíduos. Além disso, há entre os dois peptídios uma unidade oligomanose *N*-ligada a uma pentadecapeptídeo interno, o qual é excisado durante a maturação, produzindo os dois peptídios. Acredita-se que a presença da glicosilação iniba a atividade de ligação a carboidrato da lectina. A lectina madura e ativa, portanto, é não-glicosilada. A maior parte dos dois peptídios formados são então covalentemente ligados por uma reação de transpeptidação, concomitante com a clivagem da extensão C-terminal, formando a lectina madura, onde o alinhamento dos resíduos 1-118 e 119-237 é o inverso de como se apresenta no precursor (SHARON; LIS, 1990; SHARON, 2007).

Figura 4 – Modificações pós-traducionais durante a biossíntese da Concanavalina A (ConA).



Fonte: Santiago, 2013.

3.8 Aspectos gerais da espectrometria de massas

Desde que foi descoberto que as proteínas são formadas por aminoácidos, existe o interesse de desvendar a sequência das proteínas relacionadas a diversas funções. Existem diversas técnicas para desvendar a sequência de uma cadeia peptídica, porém a mais difundida foi a degradação de Edman, desenvolvida por Pehr Edman (EDMAN, 1950). Esta técnica consiste na reação do Fenilisotiocianato em condições alcalinas com a região N-terminal de uma cadeia peptídica para formar um feniltiocarbamil cíclico derivativo em condições

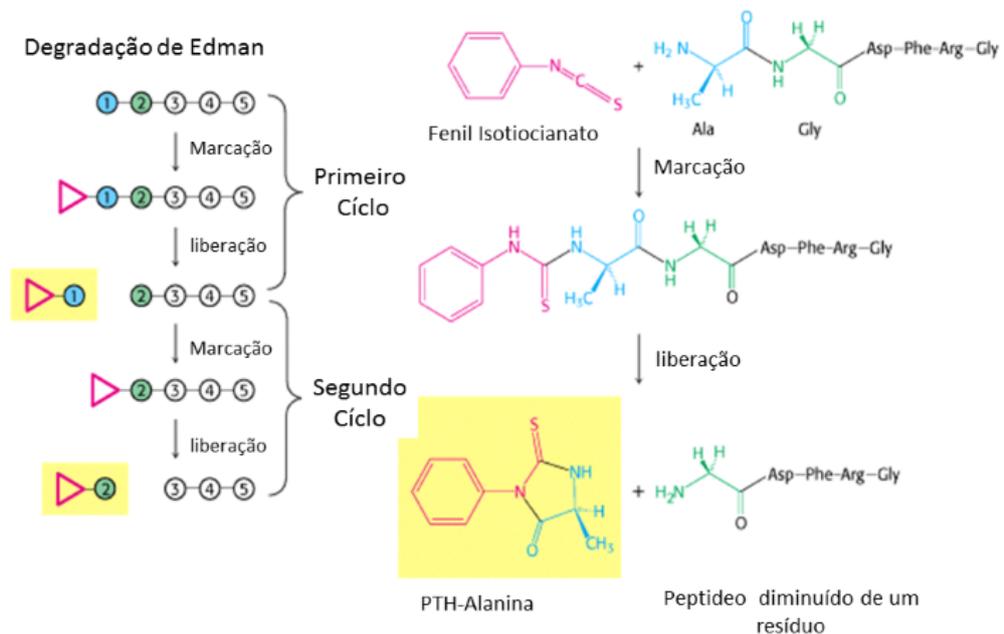
alcalinas. Em condições ácidas, esse aminoácido N-terminal derivatizado é clivado como uma tiazolinona. Este é então extraído seletivamente em um solvente orgânico e tratado com ácido para a forma mais estável chamada de aminoácido derivatizado de feniltiohidationa ou PHT aminoácido, que pode ser identificado por cromatografia ou eletroforese (FIGURA 5). Esse procedimento pode ser repetido novamente para determinar o próximo aminoácido da sequência, porém não é possível determinar mais do que 50 a 60 resíduos (na prática, geralmente o máximo são 30 resíduos). Essa limitação é devido ao fato de que a derivatização cíclica não é 100% eficiente. (NIAL, 1973). Para obter então a sequência completa de aminoácido de uma proteína é necessário que esta seja digerida utilizando diversas endoproteinasas a fim de gerar fragmentos com quantidades suficientes de aminoácidos que possa ser analisado pela técnica.

A técnica de degradação de Edman foi amplamente difundida e até hoje é utilizada nos sequenciadores automatizados de proteínas. Por se tratar de uma técnica baseada em características químicas, é muito eficiente para determinação de aminoácidos com composição atômica idêntica como leucina e isoleucina, porém por precisar de um alto grau de pureza da amostra e uma grande quantidade de amostra, nem sempre a aplicação desta técnica é possível.

A espectrometria de massa sequencial surge então como ferramenta viável para a análise de sequência de peptídeos, porém não descartando as outras.

Em linhas gerais, a espectrometria de massas (MS) é uma técnica capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003). Um espectrômetro de massas consiste fundamentalmente de três partes: uma fonte de ionização, que é fundamental para gerar os íons das moléculas de interesse a ser analisadas, um analisador, que separa as moléculas pela sua m/z e um detector que converte os íons em sinais eletrônicos capaz de serem interpretados por um computador. As fontes de ionização empregadas em MS aplicada à análise proteômica são *Electrospray* (ESI) (FENN *et al.*, 1989) e MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) (KARAS; HILLENKAMP, 1988) tendo a função de ionizar (de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica) e transferir as espécies a serem analisadas para a fase gasosa.

Figura 5 – Reação esquemática da química derivativa de Edman.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2005. A amina livre do primeiro aminoácido da proteína (N-terminal) é induzida a reagir com o Fenil isotiocianato a fim de formar um PTH-Aminoácido. Esse então é clivado do restante da sequência protéica e identificado. Essa reação é feita ciclicamente a fim de identificar uma sequência de aminoácidos.

A ionização por MALDI possui características muito importantes que a fazem uma fonte de ionização importante na caracterização de proteínas como a alta sensibilidade (amostras em baixíssima concentração e quantidade podem ser analisadas por esta técnica) e tolerância a contaminação das amostras com sais, tampões, detergentes etc. (CHEN *et al.*, 1998; STUMP *et al.*, 2002).

Dentro da fonte e sob vácuo, a mistura de matriz e amostra será irradiada por um laser pulsado durante um determinado período de tempo. O mecanismo pelo qual os íons são formados no MALDI não é completamente elucidado, porém postula-se que a irradiação pelo laser induz um rápido aquecimento do cristal formado pela matriz pela acumulação de uma grande quantidade de energia na fase condensada pela excitação da matriz. Este rápido aquecimento causa a sublimação dos cristais da matriz, ablação de uma porção da superfície cristalina e expansão da matriz para a fase gasosa, levando o analito intacto na pluma em expansão (DREISEWERD, 2003).

A ionização por electrospray (ESI) é um método de ionização brando, muito utilizado para análise de proteínas e diversas moléculas polares e possui capacidade de análise de moléculas com menos de 100 Da até maiores de 1.000.000 Da e é desenvolvida a pressão

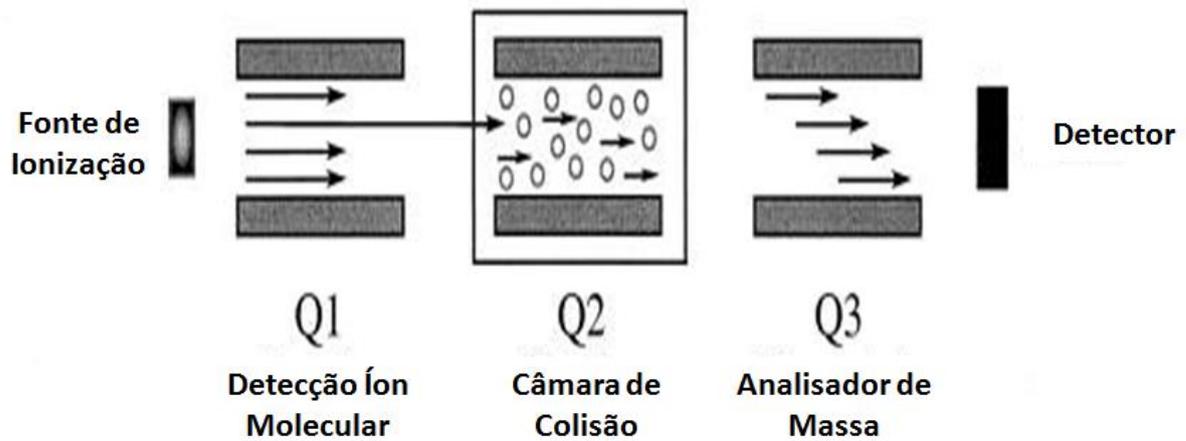
atmosférica. Neste método, a amostra é dissolvida em um solvente polar e volátil e bombeada através de um capilar de aço inoxidável em um fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 1 mL/min . Uma alta voltagem é aplicada a ponta do capilar (3 a 4 kV) formando um alto campo elétrico, a amostra sai da ponta do capilar dispersa em forma de aerossol com gotas altamente carregadas. Esse processo é auxiliado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente nitrogênio) por fora do capilar. Este gás auxilia o direcionamento do spray para o espectrômetro de massa e a evaporação do solvente (HOFFMAN, 2007).

À medida que o solvente é evaporado e as gotas vão diminuindo de tamanho, a repulsão eletrostática entre as moléculas carregadas vai se tornando altíssima. Nesse mecanismo vão ocorrendo sucessivas explosões coulômbicas de modo que gotas contendo apenas um íon são formadas. Paralelo a isso a diminuição da gota também faz com que a tensão superficial não suporte tantas cargas (limite de Rayleigh) e induz a transferência dos íons para a fase gasosa (CANTU *et.al.*, 2008).

Diversos analisadores de massas, tais como, quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *Time-of-Flight* (ToF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap*, entre outros, são comercialmente disponíveis e cada um possui aspectos positivos e negativos, de acordo com o experimento planejado e o resultado experimental requerido. Estes analisadores podem ser usados “sozinhos” e de maneira independente ou acoplados entre si, dando origem a equipamentos classificados como híbridos, os quais fazem uso das vantagens inerentes a cada analisador. Tais equipamentos permitem que experimentos em sequência (*tandem*) sejam realizados, isto é, sendo possível detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação. Uma vez separados, esses íons são detectados por eletromultiplicadoras que constituem os detectores mais largamente usados (CANTU *et al.*, 2008).

A possibilidade da criação de espectrômetros de massas que contém mais de um analisador de massa iguais ou diferentes foi um grande marco da evolução das tecnologias em MS, dando início a geração de equipamentos híbridos. A análise de dados por mais de um analisador de massa é chamada de espectrometria de massa sequencial. O primeiro aparelho híbrido comercialmente disponível e mais popularmente utilizado foi o Triplo Quadrupolo, que é constituído de três analisadores quadrupolo em sequência, como é mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema de um espectrômetro de massa híbrido do tipo triplo quadrupolo.



Fonte: Adaptado de Hoffman, 2007. Q1 é o quadrupolo responsável por detectar o íon molecular ou filtrar o íon precursor. Q2, pode ser um quadrupolo ou hexapolo, e é responsável pela colisão das moléculas contra um gás inerte. Q3 é o analisador que separa o produto da fragmentação em Q2.

A utilização de analisadores de massa em sequência possibilita utilizá-los para desvendar a estrutura química de diversos compostos como peptídeos e proteínas. Diversas técnicas são utilizadas nestes equipamentos, porém a mais popular e de melhor resposta é a dissociação induzida por colisão (CID). Essa técnica consiste em selecionar o íon a ser fragmentado utilizando o primeiro analisador de massa e em seguida enviá-lo a uma célula de colisão, onde este íon irá colidir com um gás inerte. Em seguida, a energia cinética irá ser transferida parcialmente em energia vibracional e os fragmentos resultantes serão analisados por um segundo analisador de massa (HOFFMAN, 2007).

A inserção de reflectrons nos analisadores ToF foi um incremento significativo à resolução desse analisador. O acoplamento de um analisador quadrupolo como filtro de íons e um analisador do tipo ToF com reflectron (gerando os equipamentos do tipo Q-ToF) foi um salto de qualidade nas análises de estrutura de peptídeos, possibilitando diferenciar aminoácidos que possuem diferenças de milidaltos em sua massa monoisotópica (HOFFMAN, 2007).

Calvete e colaboradores (1998) utilizaram a espectrometria de massa para avaliar a massa dos peptídeos oriundos da digestão da proteína VML com diversas endoproteinases e confirmar a sequência de aminoácidos. Nagano e colaboradores (2005) utilizaram MS para confirmação da sequência dos peptídeos, na quantificação de cisteínas e na determinação da sequência n-terminal (bloqueado) das lectinas das algas marinhas *Hypnea cervicornis* e *H. musciformis*. Já Chambery e colaboradores (2008) utilizaram a espectrometria de massas

sequencial para confirmar a sequência de aminoácidos e desvendar a sequência de glicanos ligados.

Como técnica analítica das mais versáteis e das mais sensíveis, a espectrometria de massas é atualmente uma das ferramentas analíticas valiosas em diversos estudos nas áreas de Biologia, de Ciências Médicas e de Ciências Tecnológicas. Por MS é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação.

O potencial de aplicação de MS em estudos biológicos tem sido bastante estendido, em razão dos impressionantes avanços observados nos últimos anos nas áreas de genômica, de transcriptômica, de metabolômica, de proteômica, de lipidômica e de outras plataformas “omics”, e do desenvolvimento extraordinário dos equipamentos (FENG *et al.*, 2008; HOFFMANN; STROOTBART, 2007). A MS é atualmente uma técnica bastante utilizada para identificação de proteínas e para estudo de modificações pós-traducionais em diferentes condições fisiológicas. Além disso, a MS vem sendo utilizada no monitoramento e na caracterização de diversos processos industriais, tais como processos fermentativos e até mesmo análise de microrganismos intactos (CLAYDON *et al.*, 1996; FENSELAU; DEMIREV, 2001).

3.9 Cristalização de proteínas

A biologia estrutural teve seu início em 1930 quando os pesquisadores Linus Pauling e Robert Corey estudaram sobre a ligação peptídica e descobriram que a forma mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir é a estrutura de α -hélice. Essa descoberta possibilitou a elucidação da estrutura tridimensional de diversas proteínas permitindo estudos detalhados sobre diversos mecanismos de reações enzimáticas assim como processos de respostas imunológicas e de sinalização celular (ROPER, 2000; BARRE; 2001).

A principal técnica usada para a determinação de estrutura tridimensional de moléculas biológicas é a cristalografia de raios X, porém o uso desta técnica requer a existência de um bom cristal da molécula de interesse, ou seja, um cristal que difracte a alta resolução.

A cristalografia de raios X é uma ciência relativamente nova. A primeira difração protéica de raios X foi feita em 1934 por Bernal e Crowfoot em cristais de pepsina. Em 1937, M. F. Perutz obteve a estrutura cristalográfica da hemoglobina (BLUNDELL; JOHNSON,

1976). Nos quinze anos seguintes foram desenvolvidas novas técnicas de análise da difração de moléculas por raios X e atualmente o número de proteínas resolvidas por difração de raios X tem aumentado rapidamente. Com o uso de computadores mais sofisticados e softwares com maiores capacidades de resolução ocorreu uma redução dramática no tempo gasto para resolver uma estrutura, assim como aumentou a precisão dos resultados (AZEVEDO, 2004).

Essa análise estrutural já deu origem a diversos prêmios Nobel, desde a descoberta dos raios X por Röntgen que ganhou o prêmio Nobel de Física em 1901, ao prêmio Nobel de Química mais recente, também envolvendo cristalografia, na descoberta da estrutura e função dos ribossomos por V. Ramakrishnan, em 2009, o que valida à extrema aplicabilidade desta técnica.

O principal objetivo da cristalização de proteínas é o estudo estrutural, por métodos de difração de raios X. Através desta técnica pode-se determinar espacialmente a posição atômica de todos os átomos que constituem uma macromolécula biológica como uma proteína. Esse estudo estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos (DELATORRE, 2006).

Cristais são caracterizados por apresentarem alto grau de ordenação interna, ou seja, são formados por repetições translacionais de moléculas ou átomos em todas as direções. A periodicidade interna é descrita por uma pequena unidade de volume uniforme da qual o cristal pode ser considerado um derivado, chamada de cela unitária. Cada cela unitária é caracterizada por três vetores a , b e c que definem suas arestas e pelos ângulos α , β e γ existentes entre elas (DELATORRE *et al.*, 2000). Muitas vezes a forma externa do cristal é consequência do arranjo das moléculas no seu interior (DUCRUIX; GIÉGE, 1992).

Cristais de proteínas são bem diferentes de cristais de pequenas moléculas, como os sais, e isso se deve principalmente ao alto conteúdo de solvente, que acaba por preservar o caráter bioquímico da molécula, permitindo o acesso de ligantes e dando alguma liberdade dinâmica à molécula. Estes cristais são estabilizados por contatos intermoleculares, e tanto a aderência intermolecular quanto a integridade da rede são asseguradas pelas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e a rede cristalina. Cristais de proteínas podem ter conteúdo de solvente de até 75% do volume em alguns cristais, como da Purina Nucleosídeo Fosforil Humana (DE AZEVEDO *et al.*, 2003).

Uma das partes mais críticas na resolução da estrutura de uma macromolécula biológica é a sua cristalização. A cristalização de macromoléculas é um processo de múltiplos parâmetros, que envolve três passos: nucleação, crescimento e cessação do crescimento. Para

obtenção de um bom cristal, que sirva para a coleta de dados de difração de raios X, é necessário certificar-se da pureza do material.

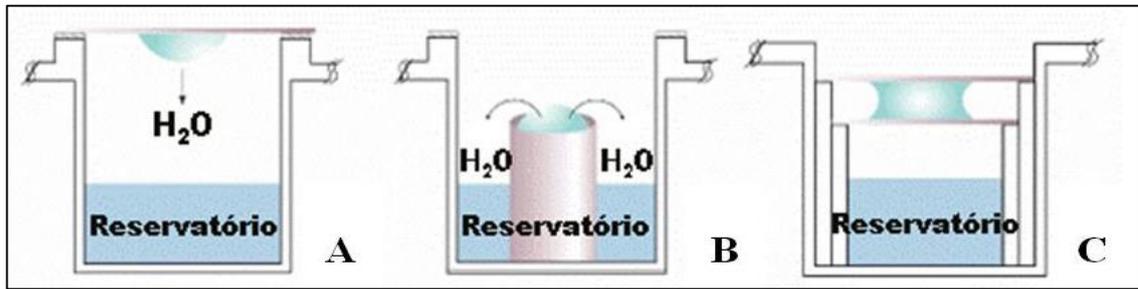
O que torna o processo de cristalização de proteínas e de outras macromoléculas biológicas diferente do processo para pequenas moléculas é a quantidade de parâmetros envolvidos. As proteínas possuem valores de pH e força iônica definidas para a sua estabilidade e função, portanto os cristais de macromoléculas biológicas têm de ser crescidos a partir de soluções aquosas complexas. Mas a principal diferença é a flexibilidade conformacional e a versatilidade apresentada por moléculas como as proteínas e, conseqüentemente, sua maior sensibilidade às condições externas.

A formação de núcleos cristalinos de moléculas protéicas quase sempre ocorre a níveis extremamente altos de supersaturação, porém nesses níveis a formação de precipitados amorfos é cineticamente mais favorável. A cristalização de uma solução é semelhante à formação de gelo, ou seja, representa uma mudança de fase. Isso ocorre porque a barreira energética é superada e a transição de fase é dirigida a um estado do sistema mais favorável energeticamente. Em processos de cristalização de macromoléculas biológicas a transição de fase está próximo do nível energético mais favorável para a disposição destas moléculas em solução, causando uma situação de desequilíbrio energético que só é melhorada no estado sólido (DELATORRE, 2001).

Para que o processo de cristalização seja efetivo é necessário, primeiramente, perturbar as interações entre as macromoléculas e os componentes da solução e para que isso seja possível à solução deve ser preferencialmente composta de água e íons. Em segundo plano, a estrutura do solvente deve ser também perturbada para que a macromolécula fique em situação desconfortável, promovendo a separação de fases e a uma provável formação cristalina (DELATORRE, 2006).

A técnica de difusão de vapor é, atualmente, a técnica de cristalização mais utilizada. Uma gota contendo a proteína a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota (FIGURA 7). O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota seja igual à pressão de vapor do reservatório. Uma vez que o equilíbrio ocorre através da troca de vapor d'água (da gota para o reservatório), o volume da gota diminui e há um aumento das concentrações de todos os constituintes da gota de cristalização.

Figura 7 – Cristalização por difusão de vapor.



Fonte: Elaborado pelo autor. Métodos de montagem de gota suspensa (A), gota sentada (B) e gota sanduíche (C).

A proposição de métodos de cristalização onde um número limitado de condições de cristalização é tentado, usando-se pequenas quantidades de proteínas, foi possível à medida que aumentaram o número de proteínas cristalizadas com sucesso, uma vez que as condições de cristalização se assemelhavam e o número de precipitantes, tampões e aditivos é limitado.

Nesta perspectiva, foi proposto o método da matriz esparsa (JANCARICK; KIM, 1991), onde diversas condições diferentes são testadas com o objetivo de encontrar a condição de cristalização de proteínas. Apenas três categorias de parâmetros que afetam a cristalização (tampões com suas possíveis variações de pH, aditivos e agentes precipitantes) foram escolhidas como variáveis principais no processo de cristalização, já que considerar todas as possibilidades para cristalização seria inviável dado o número elevado de variáveis e a sua natureza combinatória.

No campo da farmacologia, a cristalografia é atualmente de extrema importância para a indústria farmacêutica, pois permitiu que a produção de fármacos mudasse da tentativa e erro, onde milhares de compostos são sintetizados com o intuito de produzir alguns poucos eficazes, para uma produção racional, que utiliza essas informações estruturais para direcionar a produção de novos fármacos. Dessa forma é feita uma análise molecular do sítio ativo da enzima que atua em determinada doença para que esta seja inibida ou ativada por uma droga desenhada por métodos *in silico*. O composto sintetizado possui interação muito mais específica diminuindo assim os efeitos colaterais nos pacientes assim como os custos econômicos na síntese dos fármacos.

O estabelecimento da estrutura tridimensional de uma proteína é de fundamental importância, não só por esclarecer aspectos funcionais da proteína em questão, mas também por fornecer informações relevantes ao problema do enovelamento, que permanece como um dos problemas mais intrigantes na bioquímica.

3.10 Atividades biológicas de lectinas vegetais

As lectinas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas, abrangendo desde a medicina até a agricultura, vários estudos tem demonstrado que as lectinas, sejam de origem vegetal ou de outras fontes, exibem uma gama de atividades biológicas desencadeadas pela interação dessas proteínas com a porção glicídica dos glicoconjugados da superfície celular.

Demonstrou-se já que lectinas de especificidades semelhantes por carboidratos podem, em alguns casos, apresentar afinidade pelo ligante específico de maneira diferenciada, como se alguma pequena diferença estrutural entre as lectinas pudesse ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectina-ligante, e isto se referir na potência das atividades biológicas desempenhadas por estas proteínas (CAVADA *et al.*, 2001).

Dentre as atividades biológicas podemos citar a proliferação de linfócitos com produção de interferon γ (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992), produção de óxido nítrico (ANDRADE *et al.*, 1999) e indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), reconhecimento específico e atividade antiproliferativa sobre células cancerígenas (SAKER *et al.*, 1994; WU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008), atividade anti (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999; SANTTI-GADELHA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2007) ou pró-inflamatória (ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2009), atividade vasorrelaxante (GADELHA *et al.*, 2005; ASSREUY *et al.*, 2009), atividade antinociceptica (HOLANDA *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2013), atividade cicatrizante (NASCIMENTO-NETO, 2012), agentes em *drug delivery* (BIES *et al.*, 2004), atividade inseticida (ZHU *et al.*, 1996; MACEDO *et al.*, 2007), atividade antifúngica (CIOPRAGA *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2011), atividade antiviral (FAVACHO *et al.*, 2007) e antibacteriana (COSTA *et al.*, 2010).

As possibilidades do uso de lectinas vegetais como ferramentas biotecnológicas são consideradas devido ao grande número de trabalhos científicos exibindo atividades biológicas relevantes para essas moléculas (KITADA *et al.*, 2010; KIMBLE *et al.*, 2010). A propriedade que muitas lectinas possuem de aglutinar células talvez seja seu aspecto imunológico mais importante. Devido à multivalência de reconhecimento de carboidratos, muitas lectinas fazem ligações cruzadas entre células e seus receptores (DUBOIS *et al.*, 1998). Exemplos importantes advindos dessa propriedade, dentre outras, vêm sendo descritas para lectinas extraídas de espécies da subtribo Diocleinae (Tabela 1).

Tabela 1 – Exemplos de atividades biológicas descritas para lectinas extraídas a partir de espécies de leguminosas

Lectina	Atividade Biológica	Referência
Dgui (<i>Dioclea guianensis</i>)	Atividade antifúngica	ARAUJO-FILHO, <i>et al.</i> , 2010
ConBr (<i>Canavalia brasiliensis</i>), CFL (<i>Cratylia floribunda</i>), Dgui, DGL (<i>D. grandiflora</i>), Dvir (<i>Dioclea virgata</i>)	Efeito tóxico sobre moluscos	SANTOS <i>et al.</i> , 2010
CGL (<i>Canavalia gladiata</i>)	Atividade antiinflamatória e analgésica	NUNES <i>et al.</i> , 2009
ConBol (<i>Canavalia boliviana</i>)	Atividade antinociceptiva	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2009
ConBr, CGL, ConM (<i>Canavalia marítima</i>)	Efeito vasodilatador	ASSREUY <i>et al.</i> , 2009
ConM	Relaxação da aorta e liberação de óxido nítrico	GADELHA <i>et al.</i> , 2005
ConBr, DGL, DVL (<i>D. Violacea</i>)	Ativação de linfócitos	BARBOSA <i>et al.</i> , 2001
ConBr	Atividade antidepressiva	BARAUNA <i>et al.</i> , 2006
ConA, ConBr, CFL, DVL, DGL	Interferências no processo de formação de biofilmes bacterianos	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2006

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.11 Atividade vasorrelaxante de lectinas vegetais

3.11.1 Aspectos Gerais da Contratilidade

O mecanismo contrátil do músculo liso vascular é de grande importância para o conhecimento dos papéis funcionais, fisiológicos e fisiopatológicos do mesmo. O músculo liso vascular, geralmente, opera em um estado de tensão devido a pressão que o sangue exerce sobre a parede dos vasos. Este estado é conhecido como tônus, a partir do qual ele pode

contrair ou relaxar, induzindo assim o aumento ou redução da pressão no interior dos vasos (MONCADA *et al.*, 1991; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1996).

O estado contrátil do músculo liso é regulado pela concentração de cálcio livre no citosol. Uma variedade de estímulos que induzem a contração do músculo liso, como despolarização da membrana, α -adrenérgicos, e agonistas muscarínicos ativam um aumento no nível de Ca^{2+} (ALESSI *et al.*, 1992; KARAKI *et al.*, 1997).

Várias substâncias (fatores) que são produzidas pelas células endoteliais difundem-se ou são liberadas, tanto para o sangue como para as outras camadas do vaso. Dessa forma, elas podem controlar funções das células musculares lisas e das células circulantes que participam das funções regulatórias. Dentre os fatores produzidos, destacam-se o óxido nítrico (NO), a prostaciclina, o tromboxano, as endotelinas, a angiotensina II, o fator hiperpolarizante do endotélio, a bradicinina, a serotonina, a histamina e os radicais livres de oxigênio, dentre outros (VANE, *et al.*, 1990; LUSHER; BARTON, 1997; VAPAATALO; MERVAALA, 2001).

Uma dessas funções regulatórias consiste no controle do tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o NO, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a prostaciclina (CARVALHO *et al.*, 2001).

Dentre os fatores relaxantes, o NO é o mais potente e é produzido no endotélio a partir da ação da enzima NO sintase sobre o substrato L-arginina, com formação de NO e L-citrulina. O NO difunde-se para o interior das células musculares lisas, onde interage com o átomo de ferro do grupo heme da molécula de guanilato ciclase, levando à ativação dessa enzima; essa enzima ativada, por sua vez, atua sobre o trifosfato de guanosina (GTP), transformando-o no composto ativado monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento da concentração de GMPc nas células musculares leva à diminuição da Ca^{+2} e ao conseqüente relaxamento do vaso. Sob condições basais, o NO é continuamente liberado pelas células endoteliais saudáveis (SILVA, 2006).

3.11.2 Lectinas vegetais com efeito vasorrelaxante

Na superfície das células, inclusive nas células endoteliais, existem glicoproteínas e podem funcionar como receptores para lectinas. Este fato se torna relevante, uma vez que tem sido mostrado que varias lectinas de plantas induziram o relaxamento dose-dependente de aortas contraídas *in vitro* (KLEHA *et al.*, 1991; LIMA *et al.*, 2004; GADELHA *et al.*, 2005,

ASSREUY *et al.*, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2013).

Os primeiros estudos demonstrando o efeito vasorrelaxante causado por lectinas vegetais foram realizados com as lectinas do germe do trigo (WGA) e a Concanavalina A (ConA) produzem relaxamento dependente de endotélio em aorta de coelhos (KLEHA *et al.*, 1991). Posteriormente, foi demonstrado que o tratamento de coelhos com ricina (lectina extraída da planta *Ricinus communis*, conhecida vulgarmente como mamona) potencializa as contrações induzidas por serotonina e histamina em artérias coronárias (ZHANG *et al.*, 1994).

A atividade vasorrelaxante não é exclusiva de lectina vegetais. Lectinas purificadas de outras fontes, tais como, as algas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii* lectinas também mostraram o efeito relaxante de aortas intactas, (LIMA *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, alguns estudos utilizando o modelo de contratilidade de aorta isolada de ratos *in vitro* foram realizados com lectinas específicas para glicose e manose purificadas de vegetais da subtribo Diocleinae. Este relaxamento mostrou ser estritamente dependente de endotélios intactos, foi inibido pela incubação prévia da lectina com seus açúcares específicos, ressaltam a importância do sítio de reconhecimento a carboidratos de lectinas e ocorreu via que envolve a enzima óxido nítrico sintase, responsável pela síntese de óxido nítrico (GADELHA *et al.*, 2005, ASSREUY *et al.*, 2009; NÓBREGA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2013).

3.11.3 Atividade anti-inflamatória de lectinas vegetais

3.11.3.1 Aspectos gerais do processo inflamatório

O processo inflamatório é uma sequência complexa de eventos que ocorre em tecidos vascularizados, em resposta a agressão por agentes lesivos. Esta reação tem como principal objetivo livrar o organismo do agente causador da injúria e também desencadear processos que tendem a reparação do tecido lesado (McGEER; McGEER, 2000). Uma característica importante deste processo é que, independente da natureza do estímulo, a resposta inflamatória segue um padrão característico, podendo ser observadas modificações discretas no padrão de resposta, inerente ao agente etiológico, ao tecido ou órgão lesado e ao estado patológico do hospedeiro (RANG *et al.*, 2001).

A inflamação possui como sinais clínicos característicos: calor, tumor, rubor, dor e perda de função (ABBAS *et al.*, 2010), sendo dividida em uma fase aguda e uma fase

crônica. A primeira das fases da reação inflamatória – fase aguda – depende do estímulo ser ou não persistente, esta reação pode tornar-se crônica, podendo, muitas vezes, ser prejudicial ao organismo. Frequentemente, após a fase aguda, ocorre a resolução do processo, em razão da eliminação dos agentes causadores.

Vários tipos de células estão envolvidos no processo inflamatório e estas podem ser classificadas em três tipos:

- Células endoteliais;
- Células próprias do tecido (mastócitos, fibroblastos e macrófagos residentes);
- Células migratórias (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos sanguíneos, plasmócitos e macrófagos livres).

A resposta inflamatória aguda envolve fenômenos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade celular) e celulares (infiltração celular) decorrentes da liberação local de mediadores químicos formados e liberados concomitantemente ou sequencialmente no local da lesão. Estes mediadores podem ser divididos nas seguintes categorias: Aminas vasoativas, metabólitos do ácido araquidônico, fator ativador plaquetário, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, radicais livres derivados de oxigênio e neuropeptídeos (FERENCÍK; STVRTINOVÁ, 1996; ABBAS *et al.*, 2010).

A vasodilatação é um fenômeno que corresponde a alterações no calibre vascular, que conduz a um aumento do fluxo sanguíneo, decorrente da ação de mediadores principalmente em arteríolas. O aumento da permeabilidade vascular se deve a ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais venulares, induzindo a contração das mesmas. Isto permite a passagem de proteínas plasmáticas para o interstício, as quais não seriam filtradas em condições fisiológicas. O aumento da permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, por consequência da vasodilatação, leva à formação do edema inflamatório (ABBAS *et al.*, 2010).

A migração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco da agressão é uma das etapas fundamentais para a defesa do organismo. Os leucócitos ingerem os agentes agressores, destroem as bactérias e outros micróbios e degradam o tecido necrótico e os antígenos estranhos. Porém, os leucócitos podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual mediante a liberação de enzimas, de mediadores químicos e de radicais livres do oxigênio (ABBAS *et al.*, 2010).

A mobilização adequada dos leucócitos, da microcirculação para o foco inflamatório (tecido intersticial), é também uma etapa fundamental para a defesa do organismo e é denominada de extravasamento. Pode ser dividida nas seguintes etapas: (1) intraluminais: marginação, rolamento e adesão; (2) transmigração através do endotélio (também denominada de diapedese); e (3) migração nos tecidos intersticiais na direção do estímulo quimiotático (ABBAS *et al.*, 2010).

3.11.3.2 Lectinas vegetais com atividade anti-inflamatória

Lectinas de leguminosas *in vitro* estimulam a proliferação de linfócitos e produção de interferon- γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), a liberação de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994), a ativação de macrófagos peritoneais de camundongos que liberam H_2O_2 (RODRIGUEZ *et al.*, 1992), a apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001) e a produção de óxido nítrico por células peritoneais murinas (ANDRADE *et al.*, 1999). Estudos *in vivo* demonstram ainda que lectinas, quando administradas por via subcutânea, ativam a migração de leucócitos e formação do edema de pata (BENTO *et al.*, 1993; SILVA, *et al.*, 2011), sendo estes processos decorrentes da liberação de vários mediadores inflamatórios (ANDRADE *et al.*, 1999).

Embora inicialmente as pesquisas se direcionassem predominantemente aos efeitos pró-inflamatórios das lectinas (ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; ASSREUY *et al.*, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2009) vem sendo demonstrando que, dependendo da via de administração utilizada, algumas lectinas podem induzir respostas estimulatórias ou inibitórias do processo inflamatório, estas últimas ocorrendo quando a injeção da lectina se dá por via intravenosa. O efeito de lectinas na inflamação frequentemente está relacionado ao domínio de ligação à carboidratos (domínio lectínico), a maioria inibindo a migração celular para os sítios inflamados, provavelmente via inibição da adesão ente leucócito e endotélio (ASSREUY *et al.*, 1997; 1999; ALENCAR *et al.*, 1999; SANTTI-GADELHA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2006; NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011).

As lectinas da subtribo Diocleinae, cujo açúcar ligante é glicose-manose, tem mostrado atividade pró-inflamatória por via subcutânea, mas anti-inflamatória por via intravenosa. No tocante ao efeito anti-inflamatório, as lectinas de *Dioclea guianensis*, *D. violacea*, *D. virgata*, *Cratylia floribunda* inibem edema de pata e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999). Além disso, a *D. guianensis* e *D. violacea* previnem alterações inflamatórias oriundas da cistite

hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999). Nunes *et al.*, 2009 demonstrou que a lectina de *Canavalia grandiflora* apresenta atividade anti-inflamatória evidenciado pela redução dos níveis de mieloperoxidase no macerado de patas inflamadas, do rolamento e adesão de leucócitos e do nível de citocinas, além de inibir hipernocicepção mecânica. Recentemente, Rocha *et al.*, 2011 demonstrou que a lectina de *Cymbosema roseum* apresenta ações pró ou anti-inflamatória dependendo da via de administração, reforçando esse perfil de ação na subtribo Diocleinae.

A lectina de sementes *Lonchocarpus sericeus*, específica para N-acetil-D-glicosamina, apresenta efeito na peritonite infecciosa, mesmo não sendo bactericida, é capaz de reduzir o número de bactérias viáveis no sítio infeccioso, além de reduzir migração celular (ALENCAR *et al.*, 2005), inibe edema de pata (ALENCAR *et al.*, 1999). É ainda capaz de inibir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em inflamação de origem imune e não-imune, também reduz rolamento e adesão de neutrófilos no endotélio e a atenuar a hipernocicepção mecânica, sendo estes efeitos associados a redução nos níveis de citocinas próinflamatórias (TNF- α e IL1- β) e quimiocinas (CCL3 e CXCL1) (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

3.12 Ensaios de toxicidade com *Artemia* sp.

Artemia sp. (FIGURA 8) é uma espécie de microcústáceo pertencente ao filo Artropoda, classe Crustacea, subclasse Branchiopoda, ordem Anostrocata, família Artemidae e gênero *Artemia*. As artêmias são organismos de fácil aquisição, possui fácil cultivo em laboratório e são sensíveis a diversos tipos de substâncias. Essas características fazem com que esses animais sejam viáveis para testes de toxicidade (VEIGA *et al.*, 2002).

O teste de toxicidade consiste em avaliar os efeitos sofridos por esses animais quando expostos a alguma substância, geralmente em um período entre 24 a 96 horas, não havendo troca da solução-teste neste período. Nestes testes é verificado o número de animais vivos e mortos, como também algum tipo de comportamento incomum apresentado pelos animais devido à exposição com a substância testada (BIRGE *et al.*, 1985). Após essa observação é calculado o CE (Concentração Efetiva) ou CL₅₀ (Concentração Letal Mediana), que consiste no valor de concentração da substância capaz de matar 50% da população de animais expostos (BURATINI *et al.*, 2004).

Figura 8 – Náuplio de *Artemia* sp.



Fonte: Google imagens (<https://www.flickr.com/photos/chenhowen/2209391548/lightbox/>). Acesso em: 28/07/2014.

Em 1985 o Centro de Pesquisas e Desenvolvimento (CENPES) da PETROBRAS aderiu a testes de toxicidade usando *Artemia* sp. para avaliar a toxicidade de produtos derivados do petróleo. Em 1992 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) definiu que os fabricantes de dispersantes de óleos só receberiam registro se apresentassem laudo de avaliação de toxicidade de seus produtos contra *Artemia* sp., devido a capacidade deste ensaio de selecionar os produtos que possuem maior e menor toxicidade (VEIGA *et al.*, 2002).

Uma fator que deve ser considerado para os testes com *Artemia* sp. é em qual estágio de desenvolvimento dos náuplios esses organismos devem ser expostos a substância-teste. Na fase de náuplios I possuem reserva de vitelo e não se alimentam com substâncias presentes no meio, o que os tornam resistentes a substância-teste e não fornece resultados confiáveis. A fase de náuplios II é a que deve ser utilizada nos testes de toxicidade, pois nesta fase os indivíduos já se alimentam dos nutrientes do meio e ficam susceptíveis a substância-teste (VEIGA *et al.*, 2002).

Ensaio de toxicidade com *Artemia* sp. se tornou um bom modelo para avaliação de toxicidade de diferentes substâncias, não somente de efluentes industriais (PIMENTEL *et al.*, 2009), mas também de amostras biológicas. Exemplos de amostras biológicas testadas, temos extrato de diatomáceas (CALDWELL *et al.*, 2003), extratos de *Terminalia brownii* (MBWAMBO *et al.*, 2007), extratos de *Euphorbia conspicua* (Euphorbiaceae) (SANTOS *et al.*, 2007), extratos de nim utilizados na medicina, cosmética e agricultura (BEVILACQUA *et*

al., 2008), extratos de folhas de *Cassia grandis* (AWAL *et al.*, 2009), agentes terapêuticos (NUNES *et al.*, 2006), lectinas de Leguminosae (SANTOS *et al.*, 2010).

Esses trabalhos mostram que o modelo de ensaio de toxicidade com *Artemia* sp. é um método confiável para avaliação de toxicidade de amostras biológicas.

CAPÍTULO II:
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA
LECTINA DE *Dioclea reflexa*

4 CAPÍTULO II: PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA LECTINA DE *Dioclea reflexa*

4.1 Purificação da lectina de sementes *Dioclea reflexa*

4.1.1 Extração proteica

As sementes de *D. reflexa* foram descascadas e moídas até obtenção de um pó fino em um moinho de café (Cadence MDR301 Monovolt). As proteínas solúveis foram extraídas em NaCl 0,15 M com CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM relação 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C durante 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em um papel de filtro (WhatmanTM). O sobrenadante resultante foi denominado de extrato total.

4.1.2 Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex-G50

A lectina de sementes de *D. reflexa* foi purificada através de uma única etapa de cromatografia de afinidade. Para isso, o extrato total foi aplicado em coluna de afinidade Sephadex[®] G-50 (6,5 × 1,8 cm) previamente equilibrada com solução de extração com fluxo de 1 mL/min. O material não ligado (P1), foi lavado com a mesma solução, e a lectina foi eluída com D-glucose 0,1 M na solução de equilíbrio. Frações eluídas foram coletadas em frações de aproximadamente 2 mL e foram monitoradas por absorbância a 280 nm. O material eluído foi recolhido, dialisado contra água destilada e liofilizado. A homogeneidade da amostra foi monitorada por SDS-PAGE e a proteína pura foi utilizada para os ensaios de caracterização.

4.1.3 Dosagem de proteínas solúveis

A concentração de proteínas totais solúveis no extrato e nas diferentes frações foi verificada pelo método descrito por Bradford (1976). A cada 100 µL de amostra, diluída ou não, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi então deixada em repouso por cerca de 10 minutos e em seguida teve sua absorbância determinada a 595nm em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec II, Pharmacia). A concentração de

proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

4.1.4 Detecção da Atividade Hemaglutinante

Os testes para detecção de atividade hemaglutinante nos extratos e nas diferentes frações protéicas foram realizados em tubos, a partir de uma adaptação ao protocolo descrito por Moreira e Perrone (1967) como descrito a seguir:

As amostras, em duplas seriadas, foram diluídas em tubos (1:2, 1:4, 1:8...) em NaCl 150 mM. A 100 uL de cada diluição adicionou-se 100 uL de uma suspensão de hemácias de coelho ou dos tipos sanguíneos A, B e O, normais ou tratadas com enzimas proteolíticas (papaína ou tripsina) a 3% em NaCl 150 mM. O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 minutos e, após esse período, deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A presença ou não de hemaglutinação foi então detectada macroscopicamente.

Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

4.1.5 Cálculo da atividade hemaglutinante específica

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da concentração de proteínas solúveis, a atividade específica para cada uma das frações foi calculada, com o objetivo de se monitorar avanços na concentração/purificação da lectina em estudo.

O cálculo foi feito pela divisão do título de hemaglutinação (UH/mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP/mL), cujo quociente foi expresso em UH/mgP (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína). Esses resultados poderão ser comparados, levando à escolha da melhor condição/fração purificadora ou concentradora da atividade hemaglutinante.

4.1.6 Especificidade por Carboidratos

A especificidade por carboidratos da lectina de sementes de *D. reflexa* foi determinada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples,

os quais foram realizados segundo protocolo adaptado a partir daquele descrito por Ramos *et al.*, (1996).

Para tal propósito, 50 μ L de soluções estoques, a uma concentração de 0,1 mol/L de cada carboidrato, foram diluídos serialmente em Tris-HCl 100 mM com NaCl 150 mM. Em seguida, foi adicionada a cada tubo 50 μ L de uma solução de lectina em uma concentração capaz de provocar uma aglutinação de 4 U.H. O ensaio foi então incubado a 37 °C por 30 minutos, e, após isso, mantido em repouso à temperatura ambiente por mais trinta minutos. Após este período, foram acrescidos 100 μ L de uma suspensão a 2% de eritrócitos de coelho tripsinizados a todos os tubos do ensaio. A mistura foi novamente incubada a 37 °C, durante 30 minutos, e depois, deixada em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A inibição da atividade hemaglutinante pelos açúcares foi então determinada.

Para aqueles carboidratos que se mostraram capazes de inibir a atividade hemaglutinante foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC), a qual corresponde a maior diluição, ou a menor concentração, do açúcar em que permaneceu a ausência de atividade hemaglutinante.

4.1.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

O acompanhamento do processo de purificação e a estimativa da massa molecular aparente das subunidades da lectina purificada foram feitos através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), realizada segundo uma adaptação ao método descrito por Laemmli (1970).

O gel superior ou gel de empilhamento foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 4% em tampão Tris/HCl 500 mM, pH 6,8, SDS 1%, persulfato de amônio (100 mg/mL) e TEMED concentrado. O gel de separação da amostra foi preparado em tampão Tris/HCl 1.500 mM, pH 8,8 contendo SDS 1%, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100 mg/mL).

A amostra liofilizada foi solubilizada a uma concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris/HCl 62,5 mM pH 6,8, 10% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol e 1% de SDS.

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada em um sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad; Milão, Itália) com a voltagem variando até 150 V e amperagem de 25 mA. O tampão de corrida utilizado conteve Tris 25 mM, Glicina 192 mM e SDS 0,1%. Proteínas de massa molecular conhecidas foram utilizadas como padrão (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66

kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrate Carbônica 29 kDa, Inibidor de Tripsina 20,1 kDa e α -lactoalbumina 14,4 kDa).

Após a corrida eletroforética, o gel de separação foi fixado em uma solução contendo 25% isopropanol e 10% ácido acético, por no mínimo 1 hora. O gel fixado foi então corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 4:1:6 (v/v/v). A retirada do excesso do corante (descoramento) foi feita em água destilada aquecida.

A presença de ligações dissulfeto foi avaliada pela adição de 2% β -mercaptoetanol na amostra, antes da corrida de eletroforese.

4.2 Caracterização físico-química

4.2.1 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

Alíquotas da lectina de sementes de *D. reflexa* solubilizadas em NaCl 150 mM (0,5 mg/mL), foram preparadas em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70, 80, 90, e 100 °C) por 60 minutos. Após a incubação, as soluções foram arrefecidas até atingirem a temperatura ambiente e em seguida, realizou-se teste de atividade hemaglutinante para verificar a manutenção ou não da atividade.

4.2.2 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

O efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da lectina foi avaliado através de testes de atividade hemaglutinante. Para isto, a lectina de sementes de *D. reflexa* solubilizada em NaCl 150 mM (0,5 mg/mL) foi dialisada por 24 horas contra diferentes soluções tampão com pH variando de 4,0 a 10,0 contendo NaCl 150 mM. Os seguintes tampões foram utilizados: Citrato de sódio 100 mM pH 4,0 e 6,0; acetato de sódio 100 mM pH 5,0; fosfato de sódio 100 mM pH 7,0; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; glicina-NaOH 100 mM pH 9,0 e 10,0.

4.2.3 Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante

O requerimento de cátions divalentes para a atividade da lectina foi investigado. Para tal propósito, a lectina de sementes de *D. reflexa* solubilizada em NaCl 150 mM (0,5 mg/mL) foi inicialmente dialisada contra uma solução de EDTA 100 mM contendo NaCl 150 mM por 24 horas, seguida pela diálise exaustiva contra NaCl 150 mM para retirada de excesso de EDTA. Após isto, a atividade hemaglutinante foi testada adicionando-se soluções de NaCl 150 mM contendo CaCl₂ e MnCl₂ 10 mM.

4.2.4 Análise da presença de carboidratos estruturais

A lectina de sementes de *D. reflexa* solubilizada em NaCl 150 mM (1,0 mg/mL) foi submetida ao método de Dubois *et al.* (1956) para a determinação do conteúdo de carboidratos, utilizando-se lactose como padrão. A presença de carboidratos covalentemente ligados à estrutura da proteína foi analisada por coloração utilizando o método do ácido periódico - reagente de Schiff após SDS-PAGE (ZACHARIUS *et al.*, 1969).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Purificação da lectina de sementes de *D. reflexa*

O extrato total preparado com a farinha de sementes de *D. reflexa* apresentou alto título de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho nativos ou tratados com enzimas proteolíticas, e contra eritrócitos humanos dos grupos sanguíneos A, B e O (TABELA 2), sendo que o maior título de hemaglutinação foi observado contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina. Vários estudos envolvendo lectinas mostram que muitas vezes estas proteínas têm sua atividade hemaglutinante potencializada pelo tratamento dos eritrócitos com enzimas proteolíticas (NAGANO *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2008), isto ocorre pelo fato destas enzimas atuarem clivando certas proteínas da superfície da membrana celular dos eritrócitos expondo ainda mais os carboidratos que compõem o glicocálice. Isso permite que as lectinas tenham um maior acesso a estes, aumentando assim os títulos de hemaglutinação.

Tabela 2 – Atividade hemaglutinante no extrato total das sementes de *D. reflexa*.

Tipo de Eritrócito	Tratamento Enzimático		Nativos
	Tripsina	Papaína	
Coelho	524.288	131.072	65.536
Humano tipo A	4.096	1.024	1.024
Humano tipo B	1.024	1.024	256
Humano tipo O	16.384	16.384	4.096

Fonte: elaborado pelo autor. *Valores expressos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.).

A atividade hemaglutinante presente nos extratos de sementes de *D. reflexa* foi totalmente inibida por D-manose, D-glicose e derivados, tais como, α -metil-D-manopiranosídeo e N-acetil-D-glicosamina. Contudo não foi inibida pelos demais carboidratos utilizados nos ensaios de inibição (TABELA 3), demonstrando que a atividade hemaglutinante presente no extrato é realmente causada pela presença de uma lectina. Além disso, nesse estudo de inibição também foi observado que a lectina possui uma afinidade para α -metil-D-manopiranosídeo (3,125 mM) quatro vezes maior do que para D-manose (12,5 mM), apresentando também afinidade por D-glicose (50 mM). Estes resultados indicam que a presença um substituinte mais hidrofóbico no C-1 do α -metil-D-manopiranosídeo pode favorecer o estabelecimento de interações adicionais com regiões hidrofóbicas do sítio de ligação a carboidratos da lectina, aumentando assim a afinidade por estes carboidratos em relação a D-manose e D-glicose, respectivamente. Este perfil de especificidade de ligação a carboidratos é característico de outras lectinas glicose/manose isoladas da subtribo Diocleinae e de outras espécie de leguminosas (NASCIMENTO *et al.*, 2012; CAVADA *et al.*, 1994; RAMOS *et al.*, 1996).

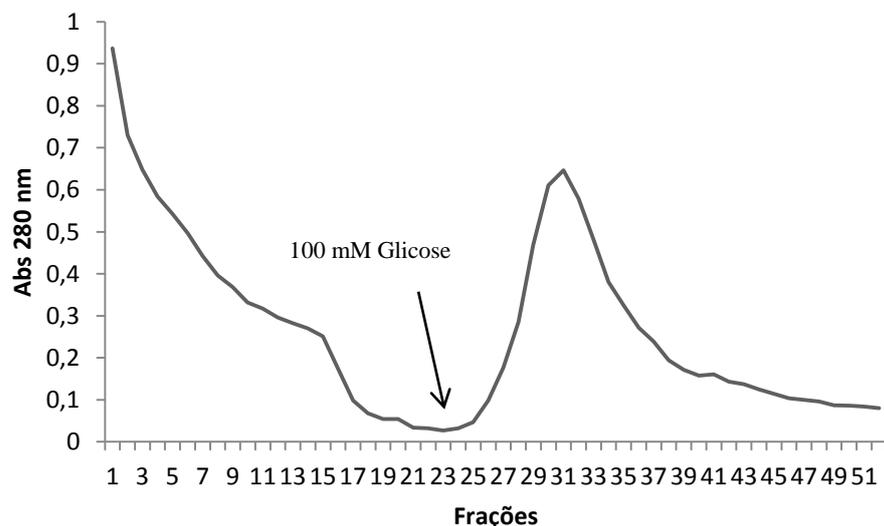
A lectina de sementes de *D. reflexa* (DrfL) foi purificada por um único passo de cromatografia de afinidade em uma matriz de Sephadex G-50, na qual, após a remoção das proteínas que não interagiram com a matriz (PI), a lectina purificada (PII) foi eluída utilizando uma solução de glicose (FIGURA 9). O processo de purificação de DrfL mostrou-se ser semelhante a de outras lectinas glicose/manose da subtribo Diocleinae, como também seu perfil cromatográfico (CAVADA *et al.*, 2001).

Tabela 3 – Inibição da atividade hemaglutinante no extrato total de sementes de *D. reflexa* por carboidratos.

Carboidrato	MIC* (mM)
D-Glicose	50
D-Galactose	NI
D-Frutose	NI
D-Fucose	NI
D-Manose	12,5
D-Xilose	NI
D-Arabinose	NI
N-Acetil- D-glicosamina	NI
α -metil- D-galactopiranosídeo	NI
α -metil- D-manopiranosídeo	3,125
Lactose	NI
Lactulose	NI

Fonte: Elaborado pelo autor. * Concentração Mínima Inibitória em mM; **O carboidrato não inibiu a uma concentração de 50 mM.

Figura 9 – Cromatografia de afinidade em Sephadex G-50.



Fonte: Elaborado pelo autor. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em Sephadex G-50. Aproximadamente 10 mL do extrato total foram aplicados em uma coluna de Sephadex G-50 (6,5 × 1,8 cm) previamente equilibrada com a solução de extração NaCl 150 mM com CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM. A fração não retida (PI) foi removida com o tampão de equilíbrio, enquanto que, a fração retida (PII) foi eluída com solução de equilíbrio contendo D-glicose 100 mM. Frações de aproximadamente 2 mL foram coletadas manualmente e analisadas por espectrofotometria com leitura a 280 nm.

O conteúdo de proteínas solúveis totais e a atividade hemaglutinante específica no extrato total foram 2,39 mg/mL e 524.288 U.H./mg, respectivamente. Para a DrfL purificada estes valores foram 0,06 mg/mL e 65.536 U.H./mg, respectivamente. Esse procedimento de purificação resultou na lectina purificada com um grau de pureza de 4,98 vezes em relação ao extrato total (TABELA 4).

Tabela 4 – Tabela de purificação da lectina de sementes de *D. reflexa*.

Fração	^{a)} Proteínas (mg/mL)	^{b)} U.H Total	^{c)} Atividade Específica (U.H/mg)	^{d)} Purificação
Extrato Total	2,39	524.288	219.367,4	1
PII Sephadex G-50	0,06	65.536	1.092.266,7	4,98

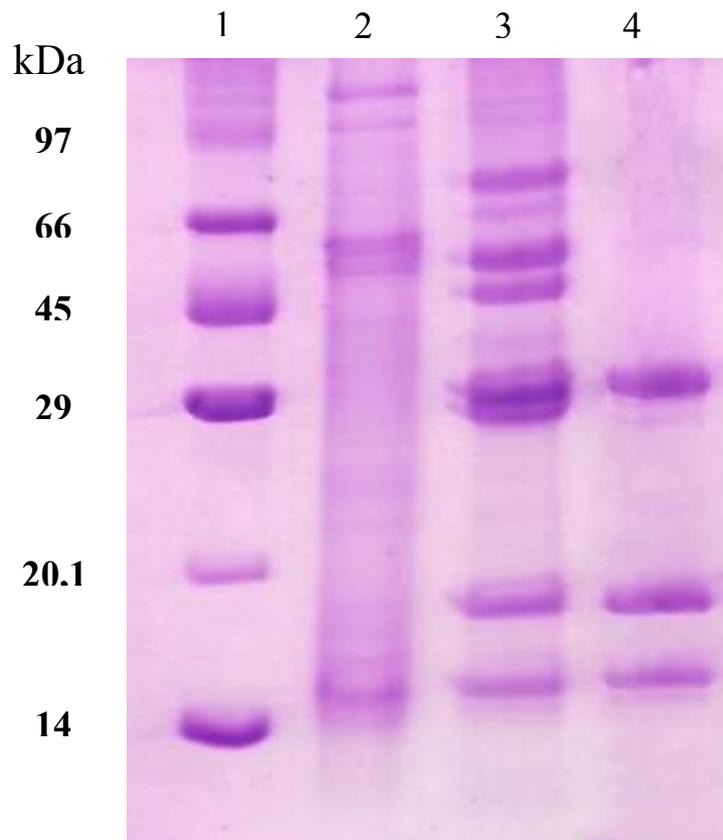
Fonte: Elaborado pelo autor.

- a) Concentração de proteínas determinada pelo método de Bradford (1976);
- b) Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, expressa em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.);
- c) Atividade Hemaglutinante Específica calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas;
- d) Purificação, calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante específica do extrato total e aquela de cada passo de purificação subsequente.

4.3.2 Caracterização físico-química da DrfL

O processo de purificação de DrfL foi monitorado por SDS-PAGE. O perfil eletroforético (FIGURA 10) de DrfL corresponde a uma banda com peso molecular aparente de 29 kDa (cadeia alfa) e outras duas entre 20-14 kDa (cadeias beta e gama). Na presença do agente redutor (β -mercaptoetanol) não houve mudanças no perfil eletroforético, o que indica que a proteína não apresenta pontes dissulfetos intercadeias. Esse resultado nos mostra que DrfL possui alta similaridade com outras lectinas da subtribo Diocleinae, sofrendo o mesmo processamento pós-traducional inicialmente descrito por Carrington *et al.* (1985).

Figura 10 – Eletroforese em SDS-PAGE.

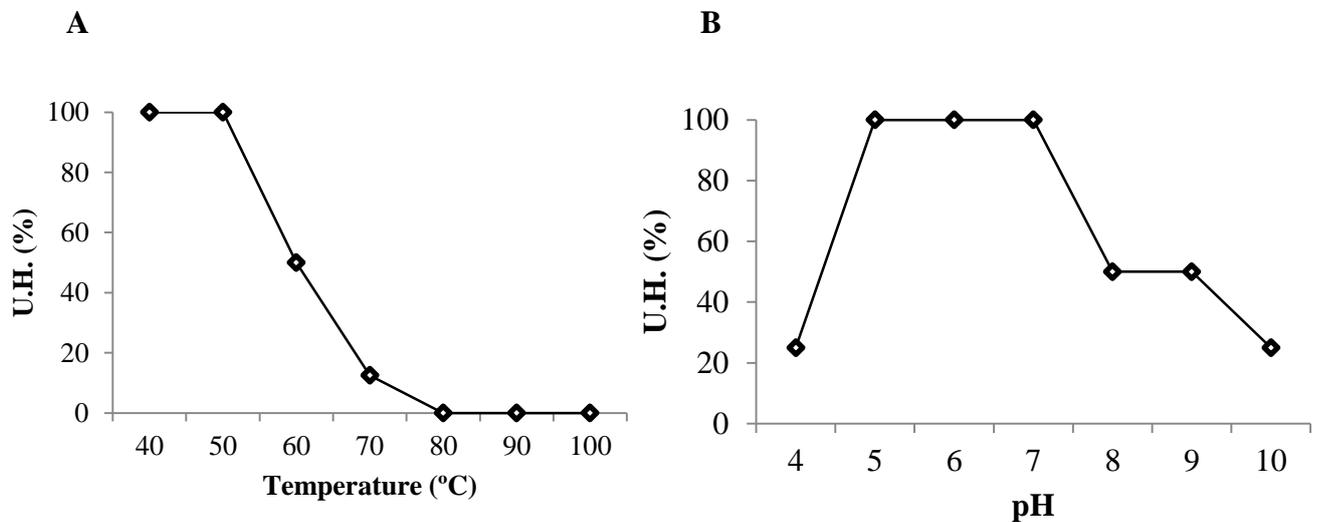


Fonte: Elaborado pelo autor. Poços: 1- Marcadores moleculares (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrate Carbônica 29 kDa, Inibidor de Tripsina 20,1 kDa e α - lactoalbumina 14,4 kDa), 2- Extrato total, 3- Fração não retida na Sephadex G-50 (PI), 4- Fração retida na Sephadex G-50 (PII) correspondente a DrfL.

DrfL demonstrou ser uma proteína razoavelmente termoestável e manteve sua atividade hemaglutinante inalterada após incubação a 50 °C por 1 hora. Contudo, a lectina teve sua atividade hemaglutinante reduzida para 50% após a incubação a 60 °C, sendo esta atividade perdida quando exposta a temperaturas iguais ou superiores a 80 °C (Figura 11A).

DrfL também manteve a sua atividade hemaglutinante em uma ampla faixa de pH. Os títulos de hemaglutinação alcançaram seus valores mais altos no pH de 5, 6 e 7, indicando que esta é a faixa de pH ótimo para a atividade dessa proteína. A atividade hemaglutinante foi reduzida quando realizada em valores extremos de pH (Figura 11B).

Figura 11 – Efeito da temperatura e pH na atividade da lectina da DrfL.

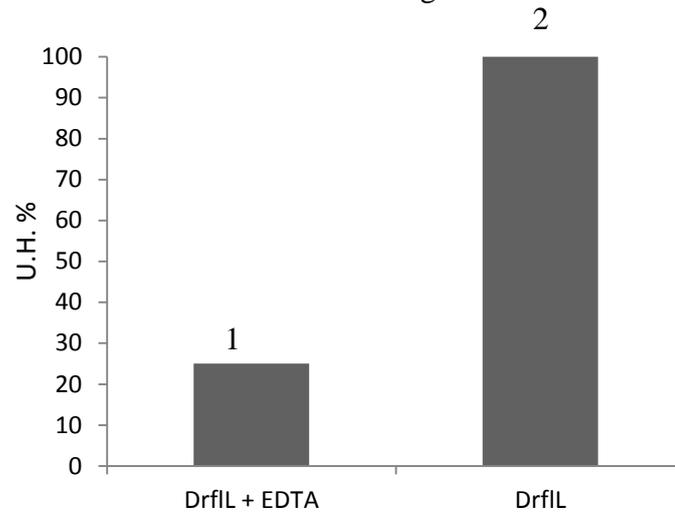


Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Estabilidade térmica. (B) Estabilidade a variações de pH.

Uma das características principais das lectinas de leguminosas é o fato de que estas possuem sítios de ligação a cátions divalentes, principalmente cálcio e manganês, em suas estruturas. Esses íons atuam estabilizando a estrutura do sítio de ligação a carboidratos e sua ausência resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004). A atividade hemaglutinante da lectina de sementes de *D. reflexa* foi afetada após diálise da proteína contra solução de EDTA 100 mM. A atividade hemaglutinante de DrfL decresceu cerca de 75% (FIGURA 12). Este resultado é semelhante a outras lectinas da subtribo Diocleinae, como por exemplo, a lectina de sementes de *Dioclea rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996).

A análise da presença de carboidratos na estrutura de DrfL realizada pelo método de Dubois *et al.* (1956) mostrou que DrfL não possui carboidratos em sua estrutura. Corroborando com este resultado, DrfL também não foi corada pelo método do ácido periódico - reagente de Schiff.

Figura 12 – Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante de DrfL.



Fonte. Elaborado pelo autor. 1- Atividade hemaglutinante de DfrL após diálise da proteína contra solução de EDTA 100 mM. 2- Atividade hemaglutinante de DfrL nativa. U.H. % (porcentagem da Unidade de hemaglutinação comparada a atividade da lectina sem tratamento).

CAPÍTULO III:
ANÁLISE DA MASSA INTACTA E SEQUÊNCIA DE DrfL POR
ESPECTROMETRIA DE MASSAS

5 CAPÍTULO III: ANÁLISE DA MASSA INTACTA E SEQUÊNCIA DE DrfL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

5.1 Determinação da massa molecular de DrfL por espectrometria de massas

A massa molecular da proteína em estudo foi determinada por ionização do tipo electrospray acoplada a um espectrômetro de massa híbrido (Synapt HDMS system – Waters Corp). Foi preparada uma solução da proteína a ser analisada na concentração de 10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ em 50% de acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico. Esta solução foi infundida no sistema num fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. A voltagem do capilar e do cone foram ajustadas para 3 kV e 40 V respectivamente. A temperatura da fonte foi mantida a 90 °C e o fluxo de nitrogênio ajustado para 150 L/h. A aquisição de dados foi realizada pelo software MassLynx v4.1 (Waters Corp) e o espectro multicarregado foi deconvoluído utilizando técnicas de maximização de entropia (FERRIGE *et. al*, 1992).

5.2 Digestão *in gel* e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas

A proteína a ser analisada foi aplicada em um gel de 12% de poliacrilamida (SDS-PAGE). A banda referente à proteína foi retirada do gel e recortada com auxílio de uma ponteira plástica. O gel contendo a proteína de interesse foi descorado em uma solução de 50% de acetonitrila contendo 25 mM de bicarbonato de amônio, desidratado em 100% de acetonitrila e seco em Speedvac (LabConco). O gel foi então reidratado em uma solução de 50 mM de Bicarbonato de amônio contendo a enzima tripsina (Promega), quimiotripsina (Sigma-Aldrich) ou pepsina (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:50 (peso / peso; enzima:substrato). Para digestão da amostra com a enzima termolisina, o gel foi reidratado numa solução de Tris-HCl 50mM pH 7,5 com NaCl 5mM e CaCl₂ 5mM nas mesmas proporções que as demais enzimas. A reação de digestão permaneceu 12 h a 37 °C, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico a 2%.

Os peptídeos oriundos da digestão foram extraídos do gel em utilizando uma solução de 5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila sob agitação durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes, o sobrenadante contendo os peptídeos extraídos foram unidos e concentrados em Speedvac e ressuspensos com 25 μL com ácido fórmico 0,1%. Estes peptídeos foram injetados em um sistema nanoAcquity (Waters Corp) conectado a uma fonte de nano electrospray de um espectrômetro de massas (SYNAPT HDMS – Waters Corp).

O espectrômetro foi calibrado na faixa de m/z 50 a 1600 com os fragmentos do íon de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. A amostra foi aplicada a uma coluna de fase reversa C18 (75 μm x 100 mm) e eluída com um gradiente linear partindo de 10% a 85% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

O espectrômetro de massa operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 90 °C e a voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados de acordo com a função DDA (Direct Data Acquisition – Aquisição Direta de Dados) os íons precursores com carga entre 2⁺ e 4⁺ foram selecionados para análise de MS/MS sendo fragmentados através de CID (Collision Induced Decomposition – Decomposição induzida por colisão), utilizando argônio como gás de colisão. Os dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp). Os peptídeos com sequência de aminoácidos comuns a outras proteínas foram identificados por buscas em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos. Foram utilizados os programas ProteinLynx 2.4 (Waters Corp) e MASCOT (Matrix Science). Os demais peptídeos tiveram suas sequências determinadas através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (sequenciamento *De novo*) utilizando a ferramenta PepSeq.

5.3 Análises da sequência primária por bioinformática

Uma vez obtida a sequência primária de DrfL, esta foi submetida à análise por bioinformática, onde foram utilizados programas de alinhamento para análise de similaridade e homologia entre as sequências de aminoácidos obtidas e todo o banco não redundante de proteínas depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI). Inicialmente, a sequência primária de DrfL foi submetida ao programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e as proteínas com maior score foram selecionados para os alinhamentos de sequências utilizando o ESPript 2,2 (GOUET *et al.*, 2003) e os dados filogenéticos foram gerados no programa ClustalW.

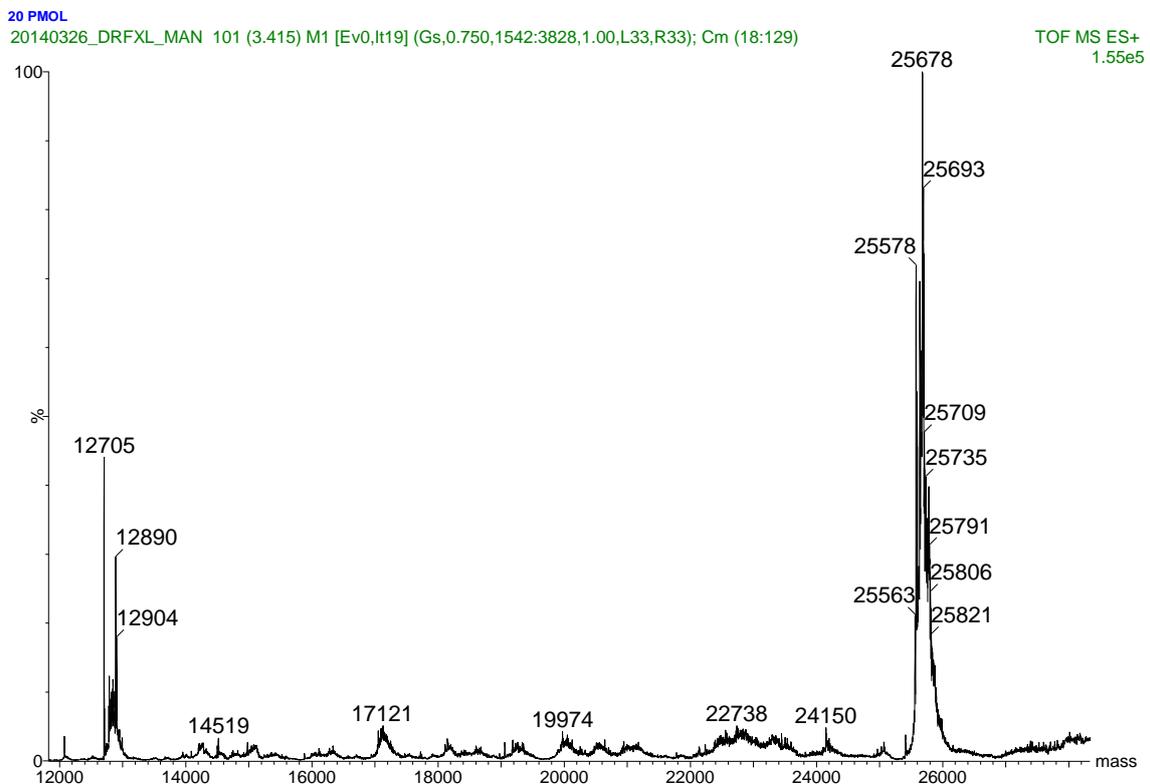
As informações de ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular média teórica da sequência de aminoácidos da lectina foram calculada usando a ferramenta PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/) (GASTEIGER *et al.*, 2005). A presença de sítios de N-glicosilação foi avaliada usando a ferramenta NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (GUPTA *et al.*, 2004).

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Determinação da massa de DrfL

Espectrometria de massas é um método eficaz para determinação da massa molecular de proteínas. A massa molecular de uma lectina purificada de sementes de *Dioclea reflexa*, a DrfL, foi determinada por ionização do tipo electrospray (ESI). Com a análise dos dados obtidos (FIGURA 13), foi possível observar que DrfL é composta por três cadeias, uma de 25.562 ± 2 Da, que corresponde a cadeia α , e outras duas de 12.874 ± 2 Da e 12.706 ± 2 Da, que correspondem as cadeias γ e β respectivamente. Este perfil demonstra que DrfL deve sofrer processamento pós-traducional semelhante a de outras lectinas da subtribo Diocleinae, como as lectinas de *Dioclea sclerocarpa* (CORREIA *et al.*, 2011) e *Dioclea lasiocarpa* (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Figura 13 - Espectro de massa das cadeias de DrfL.



Fonte: Elaborado pelo autor. O espectro foi adquirido por eletrospray numa concentração de 10 pmol/ μ L de amostra e deconvolvido utilizando o programa MaxEnt 1 disponível no pacote de softwares MassLynx 4.1 da Waters.

5.4.2 Sequenciamento de DrfL

DrfL foi digerida com as enzimas Tripsina, Quimiotripsina, Pepsina e Termolisina. O resultado da digestão pode ser observado na Figura 14 abaixo. Foram sequenciados 12 peptídeos de tripsina, 15 de quimiotripsina, 10 de pepsina e 8 de termolisina, totalizando 237 aminoácidos com uma massa de 25.562,38 Da e PI teórico de 5,68, não possuindo sítios para glicosilações.

Figura 14 – Sequência de aminoácidos da DrfL.

```

1  ADTIVAVELD SYPNTDIGDP NYPHIGIDIK SVRSKSTARW NMQTGKVGTV HISYNSVSKR
  |-----T12-----|                                     |-----T8-----|
    |-----Q12-----|                                     |-----Q1-----|
  |-----Q14-----|
    |-----Q15-----|
      |-----P6-----|           |-----Th3-----|           |-----P9-----|
      |-----Th4-----|           |-----Th11-----|           |-----P10-----|
    |-----Th9-----|

61  LSAVVSYSGS SSTTVSYDVD LNNVLPEWVR VGLSATGLY KQTNTILSWS FTSKLTNSI
                                     |-----T1-----| |-----T2-----| |-----
                                     |-----T7-----| |-----
          |-----Q10-----|           |-----Q9-----|           |-----Q7-----|
        |-----Q11-----|
  --||-----P11-----|                                     |-----P6-----|
  ----|                                     |-----Th7-----|

121 ADENSLHFSF HKFSQNPDKL ILQGDASTDS DGNLQLTKVS SSGDPQGNSV GRALFYAPVH
-----T6-----|           |-----T9-----| |-----T3-----| |-----T4-----|
-----T5-----|
-----|                                     |-----Q2-----| |-----
          |-----Q8-----|
-----| |-----P4-----|           |-----P5-----| |-----
          |-----P7-----|
                                     |-----Th5-----|

181 IWEKSAVVAS FDATAFTFLIK SPDREPADGI TFFIANTDTT IPSGSGRLL GLFPDAN
---|                                     |-----T10-----| |-----T11-----|
  |-----Q5-----| |-----Q4-----| |-----Q3-----|
  ---Q6-----|           |-----Q13-----|
  --P3---|           |-----P2-----| |-----P1-----|
          |-----Th8-----|           |-----Th1-----|

```

Fonte: Elaborado pelo autor. A sequência de aminoácidos de DrfL foi montada pela sobreposição das sequências de aminoácido de peptídeos, oriundos de digestões proteolíticas com Tripsina (T), Quimiotripsina (Q), Pepsina (P) e Termolisina (Th), determinadas por espectrometria de massas sequencial (MS/MS).

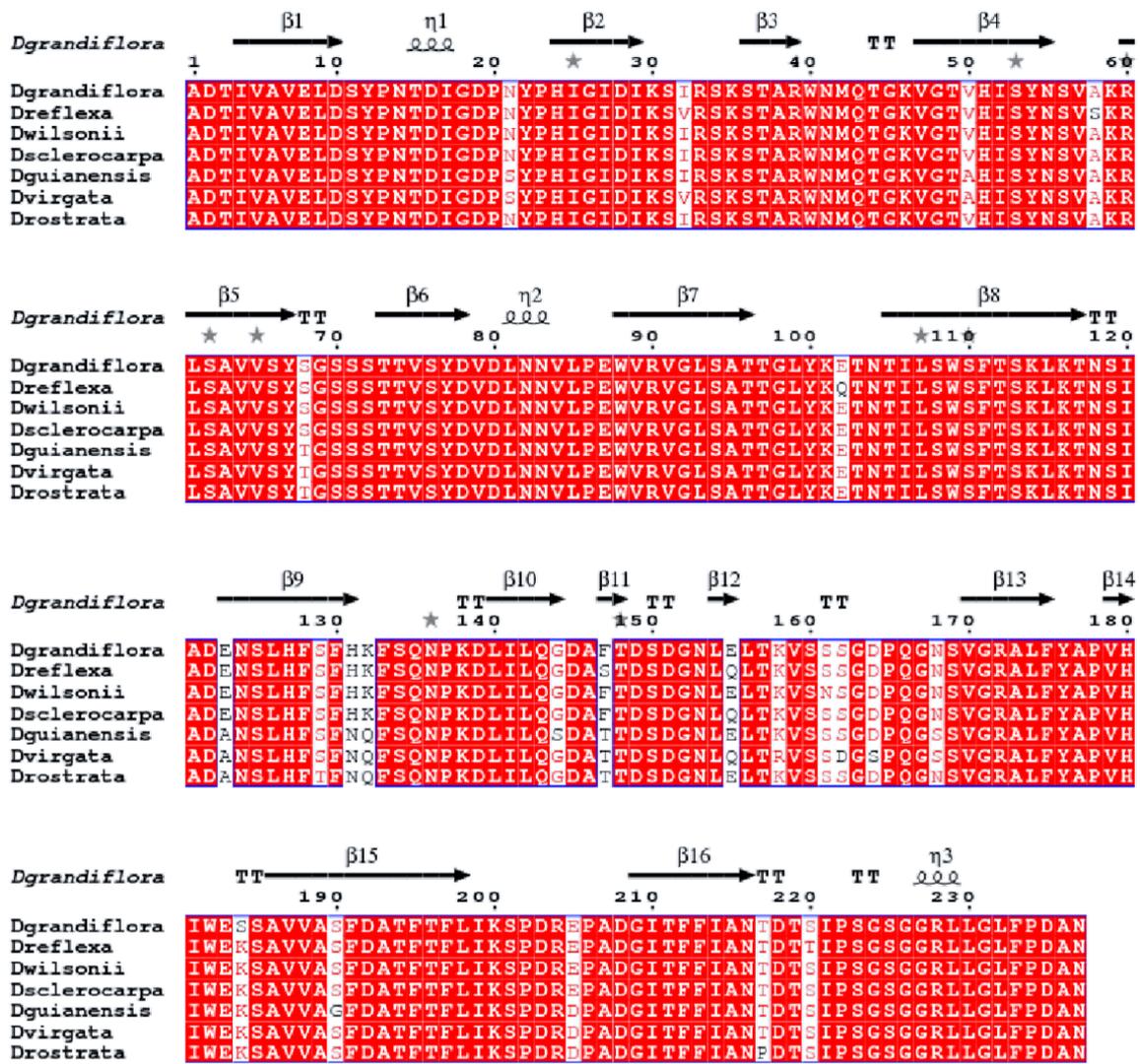
Comparando a sequência primária da lectina de *Dioclea reflexa* (DrfL) com outras lectinas do gênero *Dioclea* sp., podemos observar uma alta similaridade entre suas sequências (FIGURA 15). A sequência de DrfL apresentou 97,05% de similaridade com a lectina de *D. grandiflora*, 97,89% com a lectina de *D. sclerocarpa*, 97,05% com a lectina de *D. wilsonii*, 94,51% com a lectina *D. rostrata*, 93,25% com a lectina de *D. guianensis* e 93,67% com a lectina de *D. virgata*.

A sequência de DrfL apresenta 3 modificações únicas (S58, Q102 e S147). Apesar destas lectinas vegetais possuírem alta similaridade entre si, pequenas diferenças na estrutura primária resultam em distinções em suas propriedades físico-químicas e biológicas, assim, cada lectina deve ser estudada isoladamente e ter seu potencial de aplicação determinado (DELATORRE *et al.*, 2006). Distintas atividades biológicas já foram descritas para lectinas da subtribo Diocleinae, como por exemplo, a produção de interferon γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), efeitos edematogênicos (BENTO *et al.*, 1993; ASSREUY *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2011), liberação de histamina (GOMES *et al.*, 1994), dentre outras.

Trabalho realizado por Wah e colaboradores (2001) sobre a comparação estrutural entre as lectinas provenientes de *Dioclea guianensis* e *Dioclea grandiflora* (que não apresenta equilíbrio dímero tetrâmero dependente de pH), indicaram que a substituição da histidina na posição 131 por asparagina reduz drasticamente os contatos interdiméricos e desordena a alça 117-123, que na forma ordenada estabiliza a associação tetramérica independente de pH na lectina isolada de *Dioclea grandiflora*. Podemos notar que a estrutura primária de DrfL (FIGURA 15) apresenta uma histidina na posição 131, o que nos permite supor que DrfL trata-se de uma lectina cujo equilíbrio dímero-tetrâmero independe do pH do meio.

Sabe-se que uma das principais características das lectinas de plantas da subtribo *Diocleinae* é a conservação de resíduos de aminoácidos em várias regiões de suas estruturas primárias, principalmente aqueles envolvidos no sítio de reconhecimento a carboidratos (Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228), sítio de ligação a metais (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) (CAVADA *et al.*, 2001). Conservações estas, que podem ser encontradas também na sequência de DrfL.

Figura 15 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Dioclea reflexa* (DrfL) com lectinas do gênero *Dioclea*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Dioclea reflexa* (DrfL) com lectinas do gênero *Dioclea* usando o programa ESPript 2.1 (GOUET *et al.*, 2003). *D. grandiflora* (Uniprot: P08902), *D. wilsonii* (Uniprot: P86624), *D. sclerocarpa* (Uniprot: B3EWJ2), *D. guianensis* (Uniprot: 81637), *D. virgata* (Uniprot: P58907), *D. rostrata* (Uniprot: P58908).

**CAPÍTULO IV: RESOLUÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA
TRIDIMENSIONAL DE D_{rfl} POR CRISTALOGRAFIA DE
RAIOS X.**

6 CAPÍTULO IV: RESOLUÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE DrfL POR CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X.

6.1 Cristalização da lectina de sementes de *Dioclea reflexa*

A lectina de *Dioclea reflexa*, DrfL, previamente purificada em cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 como descrito no capítulo II, foi dissolvida em água Milli-Q na concentração final de 10 mg/mL. A suspensão da proteína foi então centrifugada a 4.000 x g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para os passos futuros. Para experimento com o ligante, a proteína em solução foi encubada com X-man na concentração final de 5 mM por uma hora antes dos experimentos de cristalização. A proteína foi então submetida ao *screen* de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM,1991). Os kits utilizados foram os *crystal screen I e II* (Hampton) onde as variáveis iniciais foram pH, sal e precipitantes.

O método utilizado foi o de difusão de vapor e gota suspensa com uso de placas de microtitulação de 96 poços (fundo reto); estes foram manuseados no robô TTP Labtech's mosquito® Crystal. Foram adicionados 100 µL da condição de cristalização e a gota foi composta por 100 nL da solução de proteína e 100 nL da condição de cristalização. Os poços foram vedados com ViewDrop™ II para placa de 96 poços para até 3 gotas suspensas. Após a obtenção de cristais foi feita a otimização dessas condições de cristalização, variando a concentração de precipitante e o pH da solução, repetindo o método da difusão de vapor. Essa otimização visou melhorar a condição de formação do cristal, produzindo assim, um cristal com características necessárias para ser difratado quando submetido aos feixes de raios X.

6.2 Coleta de dados e resolução da estrutura cristalográfica de DrfL

Os dados de difração de raios X foram coletados a temperatura de 100 K. Para evitar formação de gelo, os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora composta de 70% da solução de cristalização e 30% de PEG 400. Os cristais laçados com uso de *loops* foram alinhados utilizando-se o goniômetro e então submetidos à coleta de dados. Os dados de difração de raios X de DrfL foram coletados em um comprimento de onda de 1,42 Å usando uma fonte de luz de radiação síncrotron (estação MX2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil), utilizando um detector MarMosaic 225 (CCD com área de 225 x 225 mm²).

Inicialmente foram coletadas cinco imagens para realização da estratégia de coleta de dados que resultou em um total de 120 imagens com oscilação de 1°. O grupo espacial, parâmetros de cela, mosaicidade, e integração das intensidades foram obtidos a partir do programa MOSFLM (LESLIE; POWELL, 2007), as intensidades foram reduzidas utilizando o programa SCALA (EVANS, 1993). Ambos fazem parte do pacote CCP4 (WINN *et al.*, 2011).

O problema da fase foi solucionado utilizando o método de substituição molecular. As coordenadas moleculares de alguns monômeros de lectinas similares foram selecionadas a partir dos alinhamentos, e testadas como modelos usando o programa MolRep® (VARGIN; TAPLYAKOV, 1997). Os modelos passam por movimentos de rotação e translação para serem posicionados juntos às moléculas reais na rede cristalina. Rotação e translação são operações usadas em cristalografia, onde a rotação gira a molécula para a orientação correta e a translação move para a posição correta.

O refinamento da estrutura inicial da DrfL foi realizado mediante a utilização do programa Refmac® (MURSHODOV *et al.*, 1996). Primeiramente, foi realizado o refinamento de corpo rígido para verificar a posição relativa de grupos rígidos seguido de refinamento de restrição, os valores de Rfactor e Rfree foram, utilizados como referenciais da qualidade da estrutura respeitando o limite de 5% entre os dois parâmetros (BRÜNGER, 1992).

As densidades eletrônicas foram visualizadas no programa COOT (EMSLEY *et al.*, 2010), onde foram feitos ajustes manuais no modelo (refinamento posicional), posicionando corretamente as moléculas de X-man, bem como as moléculas de água. Todos os passos manuais foram seguidos de ciclos de refinamentos posicionais e os valores do Rfactor e Rfree foram monitorados. As análises estereoquímicas, dos ângulos de ligação, distâncias interatômicas e interações foram checadas manualmente com ajuda do gráfico de Ramachandran e a análise final realizada através do programa Prochek (LASKOWSKI *et al.*, 1993). As análises estruturais e figuras foram feitas utilizando o programa PyMol (DELANO, 2002).

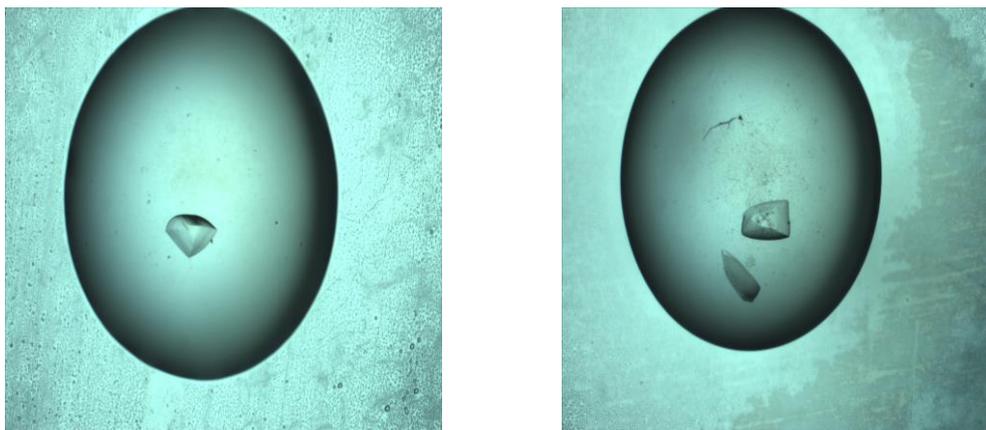
6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Cristalização da DrfL

Um dos paradoxos na cristalização é que uma solução que oferece as condições ótimas para a nucleação de cristais nem sempre é ideal para favorecer o subsequente crescimento do mesmo. Isto porque a nucleação espontânea ocorre facilmente em níveis elevados de supersaturação, enquanto que o crescimento ordenado de cristais é favorecido por baixos níveis de supersaturação (BERGFORS, 2003).

A proteína DrfL liofilizada, previamente purificada foi submetida ao *screen* de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa inicialmente descrito por Jancarik e Kim (1991). Os kits utilizados foram o *Crystal Screen I* e *Crystal Screen II* (Hampton Research) onde as variáveis iniciais foram pH, sal e precipitantes. Em duas semanas foram obtidos cristais de DrfL complexada com X-Man na condição 34 do *Crystal Screen II* (HEPES 100 mM pH 7,5; sulfato de cádmio 50 mM e acetato de sódio 1 M), foram realizadas otimizações desta condição em placas de 24 poços variando o pH e a concentração do agente precipitante. Após uma semana foram obtidos cristais na condição com HEPES 100 mM pH 8,0; sulfato de cádmio 50 mM e acetato de sódio 1 M (FIGURA 16).

Figura 16 – Cristais de DrfL.



Fonte: Elaborado pelo autor. Cristais obtidos a partir da otimização da condição condição 34 do *Crystal Screen II*.

Os cristais da DrfL foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, São Paulo, para realização da difração de raios X e difratados a 1,76

Å. Antes de posicionar o cristal no goniômetro foi preparada uma solução crio protetora para evitar a formação de gelo ao redor do cristal, o que poderia prejudicar a coleta dos dados.

Foram coletadas 120 imagens com a placa de imagens distante de 80 mm, com tempo de exposição de 20 segundos e com oscilação de 1°. Os dados coletados foram indexados, processados e escalonados pelos programas MOSFLM (LESLIE; POWELL, 2007), e SCALA (EVANS, 1993) respectivamente.

A substituição molecular foi realizada utilizando como modelo as coordenadas da estrutura da lectina de *Dioclea grandiflora*, código PDB 2JE9 (NAGANO *et al.*, 2008). O coeficiente de Matthews foi calculado como $2,64 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$ com base em um peso molecular de 25,5 kDa, indicando a presença de um tetrâmero na unidade assimétrica e um teor de solvente de 53,43% (MATTHEWS, 1968) (TABELA 5).

Tabela 5 – Estatística da coleta de dados de difração de raios x, refinamento e qualidade da estrutura.

Parâmetros	Valores
Coleta de dados	
Comprimento de onda	1,42 Å
Grupo espacial	P212121
Parâmetros da cela unitária Å	
A	72,45
B	85,17
C	174,53
Número de reflexões torais	70342
Número de reflexões únicas	12012
Número de moléculas por unidade assimétrica	4
Limite de resolução	20,43 – 1,76
Rmerge (%)	0,52 (23,9) ^d
Completeza (%)	92,1 (92,1) ^d
Multiplicidade	5,9 (5,9) ^d
I/(σ)	8,3 (3,2) ^d
Substituição molecular	
Coeficiente de correlação	62,4
Rfactorb (%)	42,1
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	20,31 – 1,76
Rfactorb (%)	21,32
Rfreec (%)	26,21
Número de resíduos em unidade assimétrica	948
Número de moléculas de água	852
R.M.S.D	
Comprimento de ligação (Å)	0,019
Ângulos de ligação (graus)	2,08
Média do B fator para toda a cadeia da proteína (Å)	32,45
Gráfico de Ramachandran	
Resíduos em regiões mais favorecidas (%)	95,5
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	4
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0,5

^a $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl) \rangle}$ where $I(hkl)_i$ is the intensity of i^{th} measurement of the reflection h and $\langle I(hkl) \rangle$ is the mean value of the $I(hkl)_i$ for all I measurements.

^b $R_{factor} = \frac{|F_{obs}| - |F_{calc}|}{|F_{obs}|}$

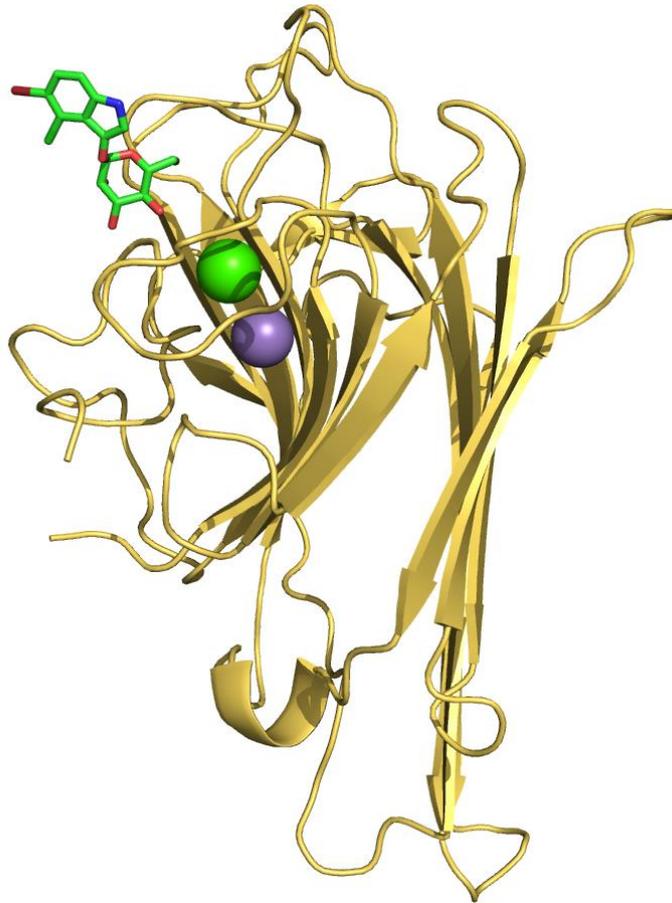
^cCalculada com 5% dos valores omitidos no refinamento.

^dValores em parenteses representam a resolução da ultima camada.

6.3.2 Estrutura geral de DrfL

A estrutura geral do monômero de DrfL complexada com X-Man (FIGURA 17) foi refinada a uma resolução de 1,76 Å. Esta estrutura refinada de DrfL apresenta 237 resíduos de aminoácidos, 213 moléculas de água, 1 íon de cálcio e 1 íon de manganês por monômero.

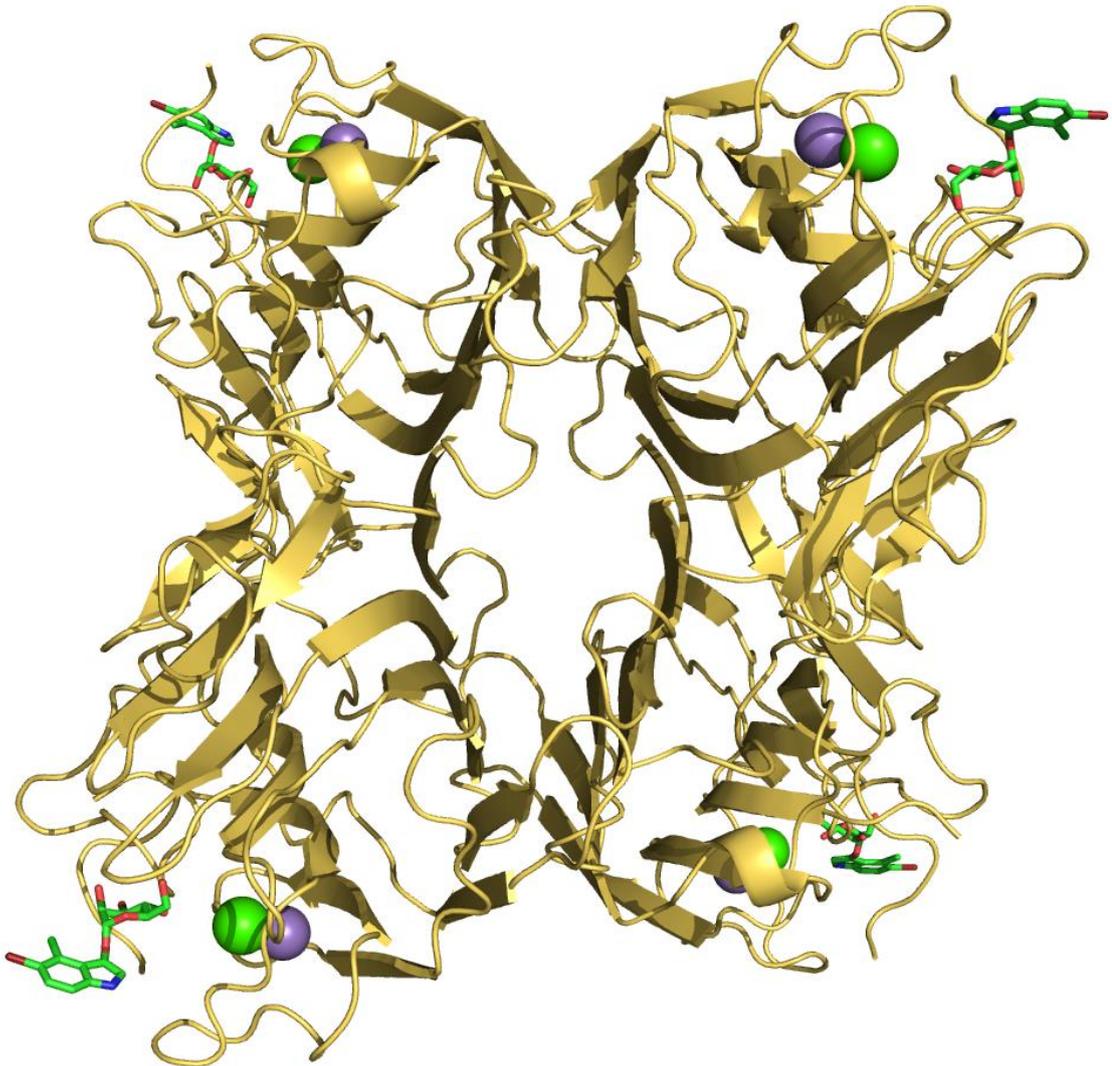
Figura 17 – Estrutura do monômero de DrfL.



Fonte: Elaborado pelo autor. Monômero de DrfL representado em amarelo, seus ligantes estão representados em *sticks* e os íons Ca (verde) e Mn (roxo) em esferas. Os carbonos de X-Man estão coloridos de verde.

Uma molécula de X-Man foi modelada no domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD). O Rfactor foi de 21,32% e o Rfree foi de 26,21%. O modelo apresenta estequiometria aceitável com base na gráfico de Ramachandran e uma estrutura geométrica bem definida. O desvio quadrático médio calculado (RMSD) mostra desvios comprimento de ligação de 0,019 e desvios de ângulo de ligação de 2,08. Os principais desvios se encontram nas regiões das alças, incluindo as envolvidas no CRD. O arranjo tetramérico de DrfL foi confirmado pela análise PISA e sua estrutura com ligantes pode ser vista na Figura 18.

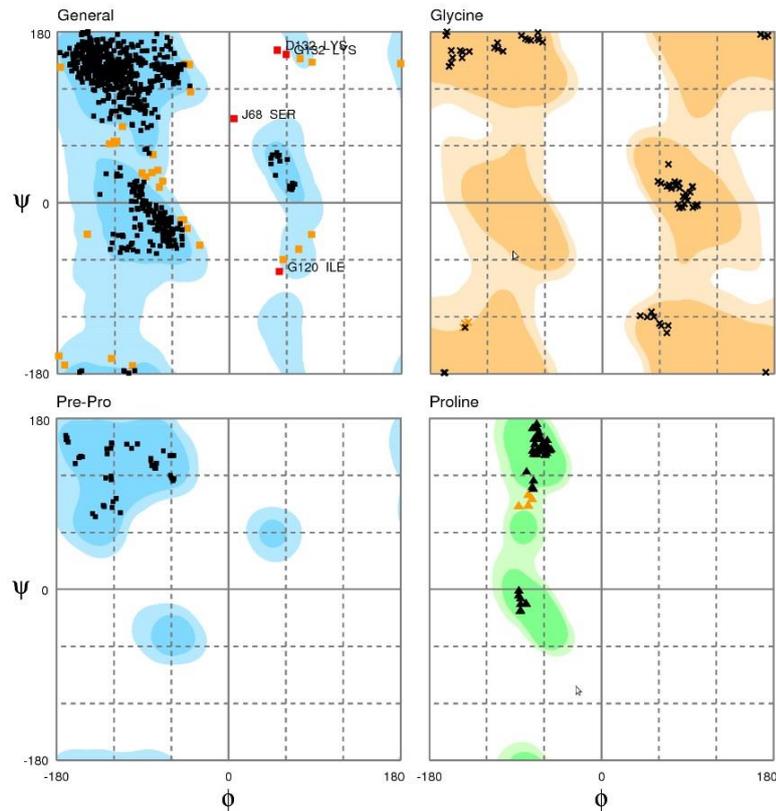
Figura 18 – Estrutura geral de DrfL.



Fonte: Elaborado pelo autor. As cadeias do arranjo tetramérico de DrfL estão em representação de *cartoon* (amarelo). As esferas representam os íons de cálcio (verde) e manganês (roxo), as moléculas de X-Man estão representadas em *sticks* (carbonos em verde).

A qualidade estereoquímica da estrutura foi avaliada no programa PROCHECK baseado nas torções psi (ψ) e phi (ϕ) das ligações do carbono- α , com 95,7% dos resíduos em regiões mais favorecidas, 4,3% dos resíduos em regiões adicionalmente permitidas e nenhum resíduo em regiões não permitidas, mostrando que a estrutura final da DrfL apresentou bons parâmetros estereoquímicos vistos na Figura 19 e fatores de vibração térmica vistos na Tabela 5.

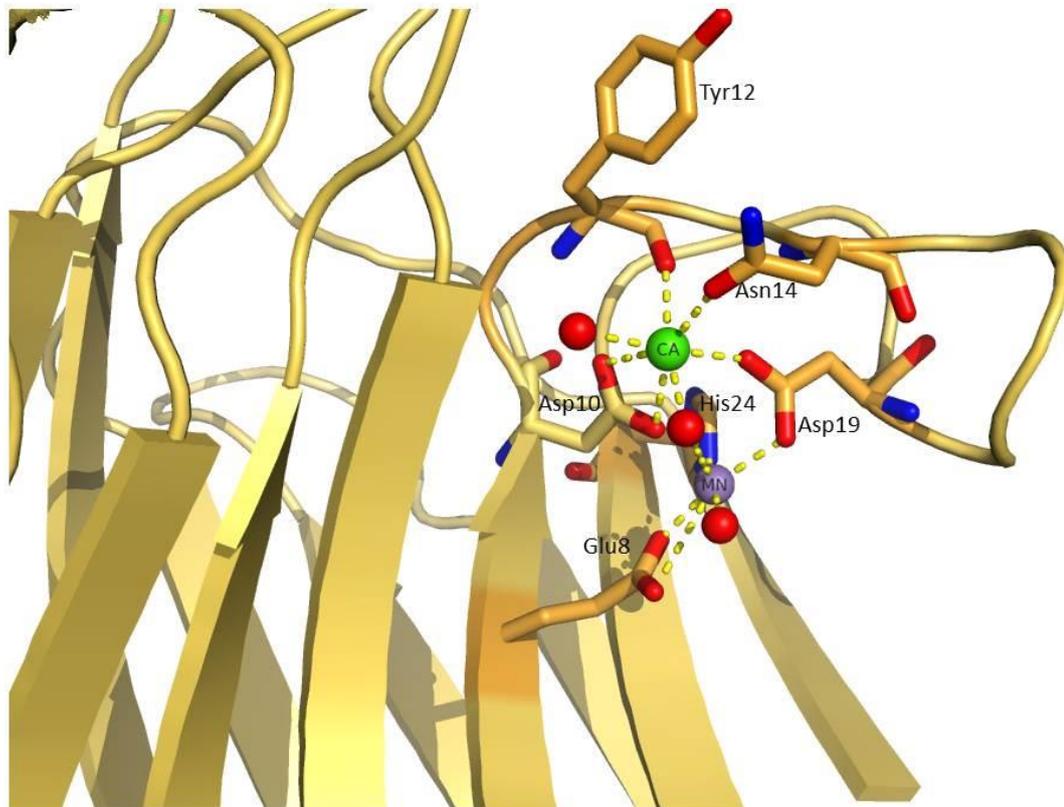
Figura 19. Gráfico de Ramachandran das coordenadas da DrfL.



Fonte: Elaborado pelo autor. Nos gráficos as regiões em azul, verde, e laranja escuro e claro, representam regiões permitidas e generosamente permitidas de ocupação por resíduos discriminados em cada gráfico, respectivamente.

A estrutura de DrfL possui um sítio de ligação a metal contendo resíduos conservados. Este sítio é semelhante aos presentes nas outras lectinas de leguminosas que fazem a coordenação dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} (DELATORRE *et al.*, 2007) (FIGURA 20). O sítio de ligação a metal presente na estrutura monomérica situa-se na proximidade do CRD e a ligação aos íons favorecem interações que auxiliam na estabilização do sítio de ligação a carboidratos. Quatro aminoácidos, principalmente através de suas cadeias laterais, e duas moléculas de água coordenam cada íon metálico. Neste caso o Mn^{2+} é coordenado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19 e His24; e o Ca^{2+} é coordenado pelos resíduos Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19. Além disso, moléculas de água ligam indiretamente Ile32 e Ser34 ao manganês; e os resíduos Asp208 e Arg228 ao cálcio. A ligação peptídica entre Ala207 e Asp208 na configuração cis é isomerizada pela presença de metais bivalentes que provocam a mudança da orientação da cadeia lateral e estabilizam a ligação não usual cis-peptídica Ala207-Asp208 por uma ponte formada entre um íon cálcio, uma molécula de água e o grupo carbonil da cadeia principal de Asp208.

Figura 20 – Coordenação dos metais na estrutura de DrfL.

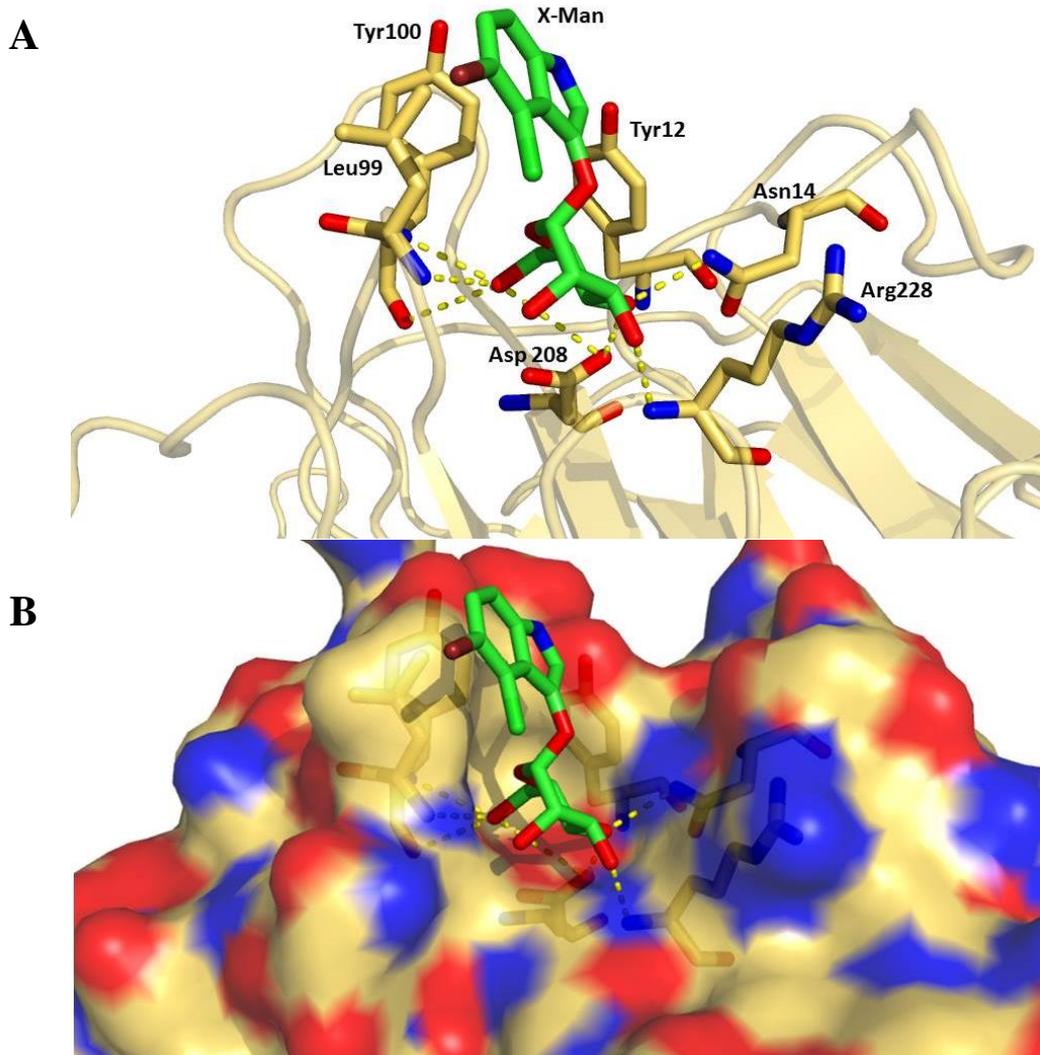


Fonte: Elaborado pelo autor. A esfera verde representa o íon de cálcio e a roxa o de magnésio; traços amarelos indicam as interações polares.

Lectinas de leguminosas podem estabelecer interações com ligantes diferentes dos carboidratos. A literatura mostra a presença de sítios de ligação com características hidrofóbicas, e a associação de moléculas, como hormônios, ácidos nucléicos e aminoácidos não-naturais (BABOSHA, 2008; DELATORRE *et al.*, 2007; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983). Sítios de ligação podem ser localizados na superfície de lectinas, por exemplo, o CRD, bem como em cavidades, que são por vezes formados pelas associações diméricas e tetraméricas (DELATORRE *et al.*, 2007).

Na estrutura de DrfL, o CRD está ocupado por X-man, que foi modelado na lectina utilizando o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc (Figura 21A). O resíduo de manose da molécula de X-Man foi conduzido ao CRD e estabilizado por uma rede de ligações de H conectando os resíduos Asn14, Gly98, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 aos átomos de oxigênio O-3, O-4, O-5 e S-6 manosídeo. O grupo indol de X-Man é estabilizado por uma interação com o grupo hidroxil de Tyr12 e várias interações de van der Waals com o subsítio hidrofóbico. A representação da área de superfície do sítio de ligação a carboidratos de DrfL pode ser vista na Figura 21B.

Figura 21 – Representação da interação do X-Man no sitio de ligação a carboidratos.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) interação do Xman com resíduos do sitio de ligação. (B) representação da área de superfície do sitio de ligação a carboidratos. As linhas em amarelo representam as pontes de hidrogênio. As regiões em vermelho e azul representam regiões negativas e positivas respectivamente.

**CAPÍTULO V: ANÁLISE DAS ATIVIDADES
INFLAMATÓRIAS, VASORELAXANTES E TOXICIDADE
CONTRA *Artemia* sp. DE DrfL**

7 CAPÍTULO V: ANÁLISE DAS ATIVIDADES INFLAMATÓRIAS, VASORELAXANTES E TOXICIDADE CONTRA *Artemia* sp. DE DrfL

7.1 Teste de contratilidade em aortas isoladas

Ratos Wistar machos (250-300 g) foram criados e mantidos (n = 6 por gaiola) em salas com um ciclo controlado luz/escuro 12/12 h a 25 °C com comida e água *ad libitum*. Protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética institucional da Universidade Estadual do Ceará para uso de animais (CEUA n ° 10130208-8/40).

A aorta torácica foi rapidamente removida e limpa e os segmentos em anel (3-5 mm) foram preparados para a gravação da tensão (2 g) em banhos para órgãos de 10 mL preenchidos com solução de Tyrode modificada (NaCl 136 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,98 mM, CaCl₂ mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, NaHCO₃ 11,9 mM) e 5,5 mM de glucose, pH 7,4 (a 37 °C, 95% de O₂ e 5% de CO₂). Em todos os experimentos a aorta foi testada com KCl (60 mM) após 45 minutos de equilíbrio para assegurar a viabilidade do tecido. A resposta contrátil foi medida usando um transdutor de força ligado a um pré-amplificador e um sistema de aquisição de dados computadorizado (Chart 7.0 PowerLab ADInstruments, Inc., Australia).

Para avaliar o efeito relaxante da lectina DrfL, foram realizadas curvas de concentração cumulativa de lectina (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) em um platô de concentração induzido pela fenilefrina (Phe, 0,1 µM) em segmentos de aorta com endotélio intacto ou desnudo. Aorta de controle recebeu o mesmo volume de solução de Tyrode. A remoção do endotélio foi realizada por meio de fricção mecânica da superfície da íntima da aorta. O endotélio intacto foi considerado para respostas relaxantes a acetilcolina (ACh, 1 µM) 75 % maior que induzido por Phe (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

Para investigar a participação de fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF) no efeito relaxante induzido pela lectina, foi realizada a incubação da aorta endotelizada com um inibidor da oxido nítrico sintase (NOS), metil éster de N-nitro-L-arginina (L-NAME, 100 µM) 30 min antes da adição da lectina no platô de contração induzida por fenilefrina.

7.2 Participação do sítio de ligação de carboidratos no relaxamento provocado por DrfL

Para avaliar a participação do sítio de ligação de carboidratos de DrfL na atividade vasorelaxante deflagrada por esta lectina, foi realizada a reversão por açúcar. DrfL na foi pré-

incubada com 100 mM de α -metil-D-manosídeo por 1 h a 37 °C para permitir a interação lectina-açúcar antes do experimento de relaxamento. Controles de lectina e de açúcar foram preparados e incubados individualmente sob condições semelhantes. Ao final de cada experimento, os tecidos foram banhados em solução de Tyrode seguido pela adição de fenilefrina para verificar a recuperação da capacidade de resposta do tecido.

7.3 Modelo de edema de pata

O volume da pata foi medido imediatamente antes (tempo zero) da injeção por via subcutânea (s.c.) de estímulos inflamatórios na pata traseira de ratos ($n = 24$) e depois no intervalo de tempo seleccionado (0,5, 1-10 h) através de hidropletismometro. Os resultados foram calculados como a variação do volume da pata (mL) ou a área sob a curva do curso-tempo (AUC, em unidades arbitrárias) em relação ao tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). Os ensaios foram: a) Avaliação do efeito edematogênico da lectina: edema de pata foi induzido por injeção s.c. da lectina DrfL (0,1; 1,0 e 10 mg/kg) em um volume final de 0,5 mL/g de massa corporal. b) Investigação do domínio de lectínico: A lectina (10 mg/kg) foi incubada com o açúcar (alfa-metil-D-manosídeo 100 mM) durante 60 min a 37 °C antes do protocolo experimental. Lectina e o açúcar também foram incubados em soluções separadas utilizando as mesmas condições como controles. c) modulação farmacológica: L-NAME (25 mg/kg, intravenoso (i.v.)) foi injetado antes da lectina DrfL (10 mg/kg).

7.4 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), seguida de teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

7.5 Teste de letalidade de *Artemia* sp.

Para avaliar o efeito citotóxico da DrfL, cistos contra *Artemia* sp. foram submetidos à eclosão sob luz aeração e temperatura controlada, como descrito a seguir: 20 mg de cistos de artêmia foram pesados, adicionados em um frasco de PVC contendo 200 mL de água do mar artificial e incubados durante 48 h, período ideal de crescimento dos náuplios

para experimentos de toxicidade. Após isto, uma solução de DrfL foi preparada a uma concentração de 200 µg/mL em água do mar artificial.

Em uma placa de Linbro de 24 poços adicionou-se uma alíquota da solução de proteína a fim de atingir as concentrações finais de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, e, em seguida, acrescentou-se mais uma alíquota da solução de água do mar artificial contendo 10 exemplares de náuplios, totalizando, ao final, 2 mL de solução por poço. O experimento foi conduzido em triplicatas, para cada condição, e o controle negativo foi feitos da mesma forma, com água do mar artificial, 10 exemplares de náuplio, volume final 2 mL, porém sem a adição da lectina. Para inibir o efeito da lectina, a DrfL (100 µg/mL) foi incubada em água do mar artificial contendo 100 mM de D-manose, durante 1 h a 37 °C. Uma alíquota da DrfL (100 µg/mL) também foi submetida a desnaturação térmica, onde foi mantida a 100 °C por 1 h. Ao final, as análises foram conduzidas por comparação das condições testadas com as condições controle.

7.6 Determinação do CL₅₀

Após um período de 24 h, os dados obtidos no teste de letalidade foram processados usando-se um software simples, Microsoft Excel 2013, e os valores de LC₅₀ foram computados a partir da porcentagem de morte e logaritmo das concentrações por análise probit, como descrito por Finney (1971).

7.7 Resultados e discussão

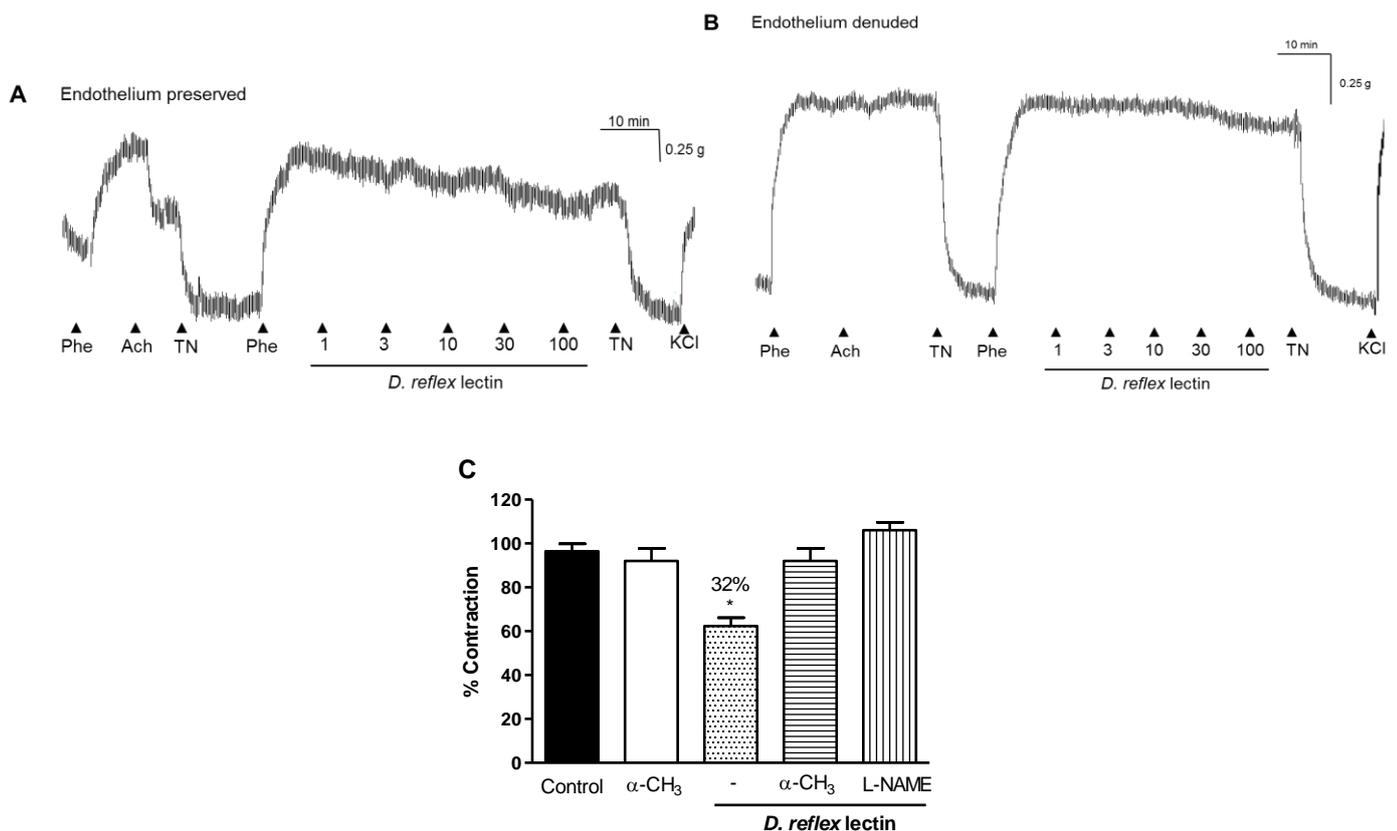
7.7.1 O efeito vasorrelaxante de DrfL

Fenilefrina, Phe, (0,1 µM) induziu contrações tônicas estáveis em aortas de rato com amplitude de $0,73 \pm 0,08$ g na presença de endotélio (FIGURA 22A) e de $0,10 \pm 0,92$ g na ausência de endotélio (FIGURA 22B). A adição cumulativa de DrfL relaxou os segmentos de aorta endotelizadas pré-contraídas nas doses de 30 µg/mL (16%) e 100 µg/mL (32%; IC₅₀ = $64,21 \pm 3,46$ µg/mL). Em contrapartida, o efeito relaxante da lectina não foi observado no endotélio desnudo (FIGURA 22B e 22C). O L-NAME bloqueiou completamente o efeito da lectina (FIGURA 23).

A influência de óxido nítrico derivado do endotélio, o principal factor relaxante derivado do endotélio, no efeito de DrfL também foi avaliada. Em aortas previamente

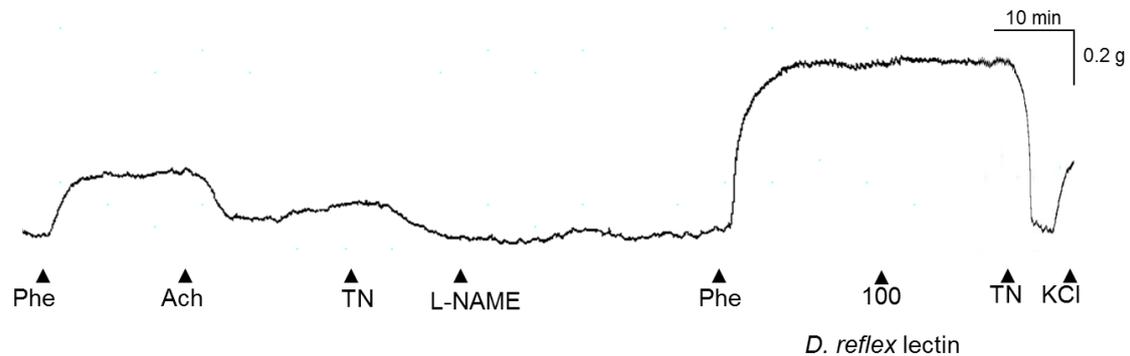
incubadas com L-NAME, a Phe induziu contrações com amplitude de $1,87 \pm 0,18$. L-NAME bloqueou o efeito relaxante do DrfL a $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ (FIGURA 22C e FIGURA 23), o que indica um papel potencial do NO como um mediador do relaxamento de vasos provocado pela lectina. O envolvimento de NO na resposta vasorrelaxante tem sido evidenciado por várias lectinas da subtribo Diocleinae, como ConBr, ConM, ConA, DVL e DvirL (ASSREUY *et al.*, 2009; BEZERRA *et al.*, 2013; GADELHA *et al.*, 2005; NÓBREGA *et al.*, 2012). DrfL não alterou a capacidade de resposta do tecido uma vez que, ao final de cada experimento, a resposta contrátil a KCl foi semelhante a inicial. A solução de DrfL incubada com o açúcar α -metil-D-manosídeo reverteu o efeito de relaxamento, por outro lado, o açúcar por si só não apresentou efeito.

Figure 22 – *Dioclea reflexa* (DrfL) induz relaxamento dependente do endotélio em aorta isolada de rato.



Fonte: Elaborado pelo autor. Traços típicos que mostram os efeitos de DrfL (30 e $100 \mu\text{g}/\text{mL}$) em anéis de aorta pré-contraídas com fenilefrina a $0,1 \mu\text{M}$ (Phe) com o endotélio intacto (A) ou sem o endotélio. (B). TN indica a lavagem da preparação com solução de Tyrode. (C) Reversão da resposta relaxante de DrfL ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) por L-NAME ($100 \mu\text{M}$) e incubação com alfa-metil-D-manosídeo (α -CH₃; 100mM) em anéis de aorta endotelizada pré-contraídas com Phe. A lectina foi incubada com α -CH₃, antes da adição. Os valores são expressos como \pm média S.E.M. % das alterações da contração inicial induzida pelo Phe; * $P < 0,05$, endotélio intacto vs tecidos desnudos.

Figure 23 – Relaxamento induzido por DrfL em aorta isolada de rato é bloqueado por L-NAME.



Fonte: Elaborado pelo autor. Traço típico mostrando a ausência de um efeito relaxante da DrfL em anéis de aorta com endotélio pre-contraidos com 0,1 µM de fenilefrina (Phe) na presença de L-NAME (100 µM).

7.7.2 Atividade inflamatória de DrfL

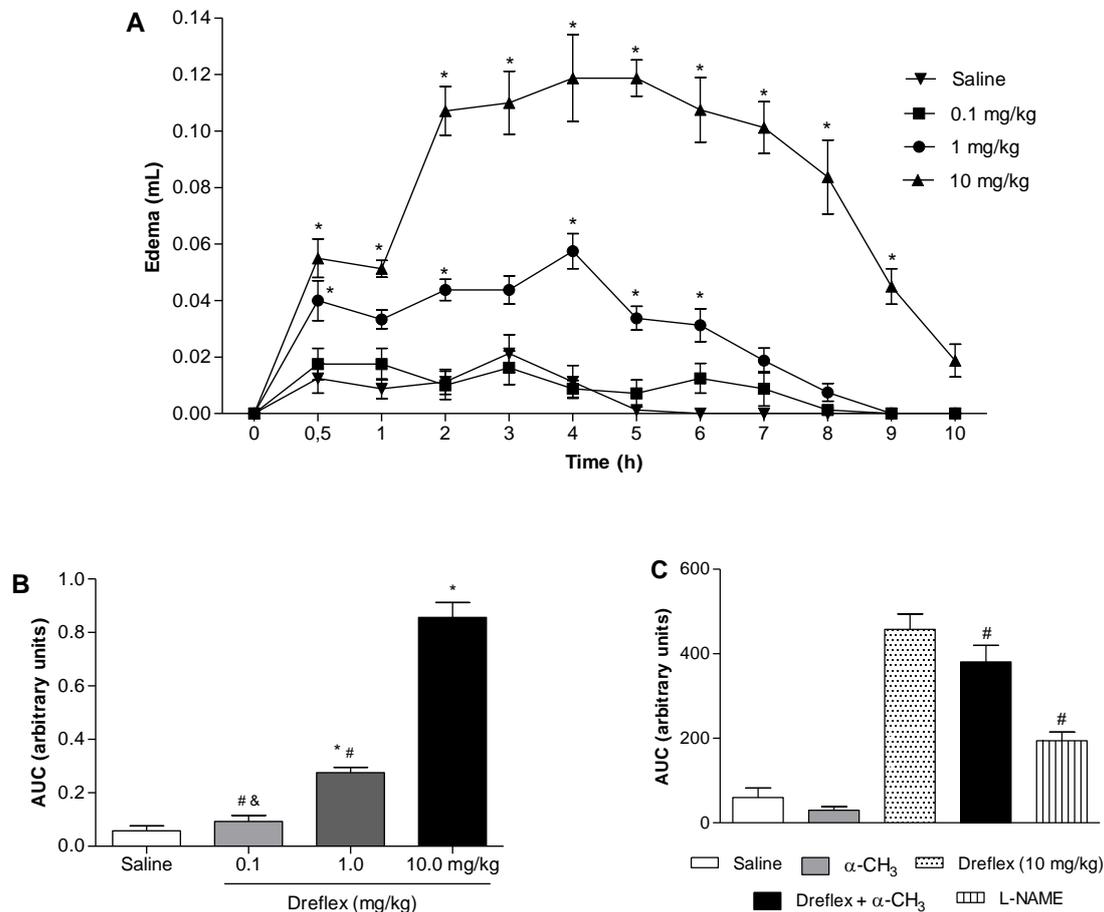
A resposta inflamatória aguda envolve fenômenos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade celular) e celulares (infiltração celular) decorrentes da liberação local de mediadores químicos formados e liberados concomitantemente ou sequencialmente no local da lesão (FERENCÍK; STVRTINOVÁ, 1996).

Diversos estudos tem demonstrado a capacidade das lectinas de plantas em ativar o sistema imunológico por meio de diferentes mecanismos. Dessa forma, as lectinas podem ser consideradas ferramentas para o estudo do processo inflamatório (ASSREUY *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2001; CAVADA *et al.*, 2001; PELLETIER *et al.*, 2001). Isso posto que, seja por meio de indução ou inibição da inflamação, lectinas podem modular manifestações celulares do fenômeno, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, formação de edema, recrutamento leucocitário, dentre outros.

A subcutânea injeção de edema de pata induzido DrfL em doses 1 e 10 mg/kg. Na dose mais concentrada (10 mg / kg), o efeito edematogênico de DrfL começou em 30 min, foi máxima pela segunda hora após a injeção (de $0,09 \pm 0,01$ mL) em comparação com a solução salina ($0,01 \pm 0,03$ mL) e manteve-se significativa até nona hora (FIGURA 24A). A variação do volume do edema de pata pode ser vista na Figura 24B. O efeito edematogênico da lectina a 10 mg/kg ($0,09 \pm 0,01$ mL) foi abolido pela combinação de DrfL com o açúcar alfa-metil-D-manosídeo ($0,01 \pm 0,03$ mL). Por outro lado, o açúcar por si só não induziu o

edema. L-NAME, um inibidor não selectivo da enzima óxido nítrico sintase, reduziu significativamente o efeito edematogênico DrfL (FIGURA 24C).

Figure 24 – DrfL estimula edema de pata.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os animais foram injetados s.c. com DrfL ou solução salina e o edema foi medido antes (tempo zero) e a 0,5, 1-10 horas após a injeção e expresso como o aumento no volume da pata (mL) em relação ao tempo zero. Os controles negativos receberam solução salina estéril (0,1 mL/100 g de peso corporal; s.c.). (A) DrfL (0,1; 1 e 10 mg/kg; s.c.); (B) AUC DrfL (0,1; 1 e 10 mg / kg; s.c.); (C) L-NAME (25 mg/kg; i.v.), injectado 1 hora antes DrfL (10 mg/kg) ou DrfL + açúcar (alfa-metil-D-manosídeo, 100 mM) ou solução salina. A média \pm S.E.M. (n = 8). *p <0,05 em comparação com a solução salina; # p <0,05 em comparação com 10 mg/kg; e p <0,05 em comparação com DrfL 1 mg/kg.

Considerando-se as lectinas da subtribo Diocleinae, há relatos de deflagração de resposta inflamatória aguda por *Dioclea rostrata* (FIGUEIREDO *et al.*, 2010), *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* (BENTO *et al.*, 1993), sugerindo que esta parece ser uma atividade biológica conservada nesta subtribo.

Algumas lectinas de leguminosas apresentam tanto efeito anti-inflamatório quanto pró-inflamatório, sendo esses dependentes da via de administração. Um exemplo é a lectina

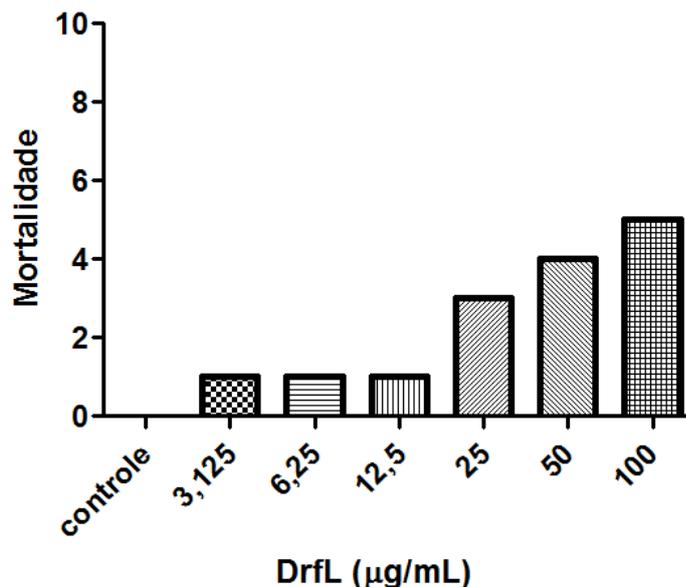
de sementes de *Canavalia grandiflora* (ConGF). Essa lectina quando administrada via intravenosa é capaz de reduzir o edema causado por carragenana e quando administrada de forma subcutânea é capaz de causar edema de duração de 24 h e de ordem de 4 x maior que o controle (NUNES *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2012).

7.7.3 Teste de letalidade de *Artemia* sp.

O teste de letalidade de artêmia tem sido utilizado com sucesso para determinar a toxicidade de moléculas biológicas que possuem uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo agentes anticancerígenos, antivirais, inseticidas, pesticidas, e anti-HIV (CARBALLO *et al.*, 2002; PERVIN *et al.*, 2006; HO *et al.*, 2007).

DrfL apresentou baixa atividade tóxica contra náuplios de *Artemia* sp., exibindo CL_{50} de 450,9 $\mu\text{g/mL}$, mesmo com baixa atividade tóxica, o seu efeito mostrou ser dose dependente e foi observado em uma faixa de concentrações entre 25-100 $\mu\text{g/mL}$ (FIGURA 25).

Figura 25 - Efeito tóxico de DrfL em diferentes concentrações contra *Artemia* sp.



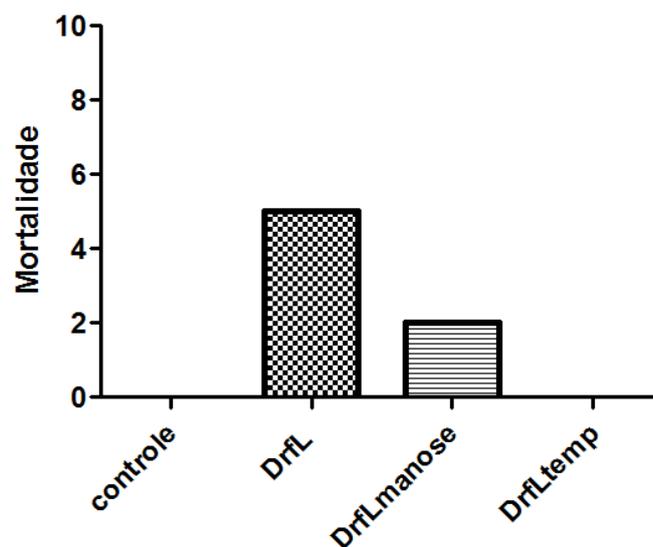
Fonte: Elaborado pelo autor. A mortalidade está representada como o número de náuplios de artemia mortos.

Alguns trabalhos tem demonstrado que algumas lectinas de espécies da subtribo Diocleinae possuem atividade tóxica. Santos e colaboradores (2010) demonstraram que *C.*

floribunda, *D. guianensis*, *D. grandiflora*, e *D. virgata* apresentam valores de Cl_{50} de 4,75 $\mu\text{g/mL}$, 5.21 $\mu\text{g/mL}$, 2.52 $\mu\text{g/mL}$ e 2.77 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Arruda e colaboradores (2013) realizaram experimentos de toxicidade com as lectinas de *C. ensiformes*, *C. marítima*, *C. boliviana*, *C. brasiliensis* e *C. grandiflora*, demonstrando que elas apresentam Cl_{50} de 376,48 $\mu\text{g/mL}$, 146,55 $\mu\text{g/mL}$, 218,13 $\mu\text{g/mL}$, 54,38 $\mu\text{g/mL}$ e 110,51 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Comparado com a Cl_{50} destas proteínas, DrfL apresentou menor toxicidade contra *Artemia* sp. dentre as lectinas testadas de espécies da subtribo Diocleinae.

Ao incubar DrfL com manose, a letalidade dos animais decresceu cerca de 60% e foi completamente abolida quando a proteína sofreu desnaturação térmica (FIGURA 25), demonstrando assim, que o sítio de ligação a carboidratos da lectina é o responsável por sua toxicidade, mesmo que baixa, contra *Artemia* sp.

Figura 26 – Inibição do efeito tóxico de DrfL contra *Artemia* sp.



Fonte: Elaborado pelo autor. Efeito tóxico de DrfL (100 $\mu\text{g/mL}$) previamente incubada com 100 mM de manose e submetida a desnaturação térmica a 100 °C por 1 h. A mortalidade está representada como o número de náuplios de artemia mortos.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que uma lectina específica para manose/glicose de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL) foi purificada através de um protocolo eficiente e reprodutível. A lectina possui três cadeias polipeptídicas com massas de 25.562, 12.874 e 12.706 Da, respectivamente, apresentando-se estável em uma ampla faixa de temperatura e pH, não perdendo sua atividade pelo tratamento com agente quelante. A sequência primária da DrfL apresentou grande similaridade com outras lectinas de espécies do mesmo gênero. DrfL foi cristalizada pelo método de difusão de vapor na presença do ligante X-Man e foi parcialmente resolvida a uma resolução de 1,76 Å. DrfL apresentou efeito relaxante em músculo liso de aortas endotelizadas de rato e apresentou atividade inflamatória no modelo de edema de pata de rato, por outro lado, DrfL exibiu baixa toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp. Estes resultados reforçam a importância das interações proteínas-carboidratos nas células e fornecem subsídios para a utilização de lectinas vegetais com ferramentas biotecnológicas em estudos envolvendo os mecanismos de interação proteína-carboidrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. Patologia: bases patológicas das doenças. 8ªed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** 13;422(6928):198-207. 2003.
- ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactosebinding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **Int J Biochem Cell Biol.** 35: 1674–1681. 2003.
- ALENCA, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; HAVT, A.; ARAGÃO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein Pept Lett.** 11: 195–200. 2004.
- ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; MOURA, T.R.; SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 374: 275–282. 2007.
- ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators. Inflamm.** 8: 107–113. 1999.
- ALESSI, D.; MACDOUGALL, L.K.; SOLA, M.M.; IKEBE, M.; COHEN, P. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. **Eur J Biochem.** v. 210, p. 1023-1035.1992.
- ALLEN, A.K.; NEUBERGER, A. The purification and properties of the lectin from potato tubers, a hydroxyproline-containing glycoprotein. **Biochemical Journal.** v.135, p. 307-324. 1973.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEM, T.L.; SCHARFFER, A.A.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402. 1997.
- ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETO, M. Lectin-induced NO production. **Cellular Immunology**, 194: 98–102. 1999.
- ARAÚJO-FILHO, J.H.; VASCONCELOS, I.M.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; GONDIM, D.M.; OLIVEIRA, J.T. A cona-like lectin from *Dioclea guianensis* benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, conm and cona. **J Agric Food Chem.** 58 (7), 4090-4096, 2010.
- ARRUDA, F.V.; MELO, A.A.; VASCONCELOS, M.A.; CARNEIRO, R.F.; BARROSO-NETO, I.L.; SILVA, S.R.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO,

K.S.; TEIXEIRA, E.H.; SAKER-SAMPAIO, S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. Toxicity and binding profile of lectins from the Genus *canavalia* on brine shrimp. **Biomed Res Int.** 2013;2013:154542. 2013.

ASSREUY, A.M.S.; FONTENELE, S.R.; PIRES, A.D.E.F.; FERNANDES, D.C.; RODRIGUES, N.V.; BEZERRA, E.H.; MOURA, T.R.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 380: 509-521. 2009.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.** 6(3): 201-10. 1997.

ASSREUY, A.M.S.; PINTO, N.V.; MOTA, M.R.L; MEIRELES, A.V.P.; CAJAZEIRAS, J.B.; NOBRE, C.B.; SOARES, P.M.G.; CAVADA, B.S. Vascular Smooth Muscle Relaxation by a Lectin from *Pisum arvense*: Evidences of Endothelial NOS Pathway. **Protein and Peptide Letters.** 18: 1107-1111. 2011.

AWAL, M.; ASHRAFUZZAMAN, S.; HAQUE, M.E. Studies on Antibacterial Activity and Brine Shrimp Toxicity of Leaf Extract of *Cassia grandis*. **Bangladesh Journal of Medical Microbiologists.** v. 3(1), p. 17-19, 2009.

AZEVEDO W.F.; CANDURI, F.; SANTOS D.M.; SILVA R.G.; OLIVEIRA J.S.; CARVALHO L.P.S.; BASSO L.A.; MENDES M.A.; PALMA M.S.; SANTOS D.S. Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3 Å resolution. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 308(3), p. 545-552. 2003.

AZEVEDO, W.F. *Cristalização de macromoléculas biológicas*, São José do Rio Preto. SP, 2004.

BABOSHA, A.V. Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. **Biochemistry. Biokhimiia,** v. 73, n. 7, p. 812–825, jul. 2008.

BANERJEE R.; DAS K.; RAVISHANKAR R.; SUGUNA K.; SUROLIA A.; & VIJAYAN M. Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. **J Mol Biol,** v. 259, p. 281-296. 1996.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol. Biochem. Behavior,** 85, 160-169, 2006.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 96 (5): 673-678. 2001.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol. Invest.** 21, 297-303, 1992.

BARRE, A.; BOURNE, Y.; VAN DAMME, E.J.; PEUMANS, W.J.; ROUGÉ, P. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. **Biochimie**, v.83, n.7, p.645-651, Jul. 2001.

BARROSO G.M.; PEIXOTO A.L.; COSTA C.G.; ICHASSO C.L.F.; GUIMARÃES E.F.; LIMA H.C. Sistemática das Angiospermas do Brasil. v.2. Viçosa, **Imprensa Universitária**. 1991.

BATISTA F.A.; GOTO L.S.; GARCIA W.; DE MORAES D.I.; OLIVEIRA NETO M.; POLIKARPOV I.; COMINETTI M.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO H.S.; BELTRAMINI L.M.; ARAÚJO A.P. Camptosemin, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. **Eur Biophys J**, v. 39(8), p. 1193-205. 2010.

BENETEAU J.; RENARD D.; MARCHÉ L.; DOUVILLE E.; LAVENANT L.; RAHBÉ Y.; DUPONT D.; VILAINE F.; DINANT S. Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in Arabidopsis. **Plant Physiol**. 153(3):1345-61. 2010.

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

BENJAMIN, C.F.; FIGUEIREDO, R.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 30: 873-881. 1997.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by Plant lectins. **Inflammation Research**, Basel, v. 38, p. 48-54, 1993.

BEVILACQUA, A.H.V.; SUFFREDINI, I.B.; BERNARDI, M.M. Neem *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) toxicity in *Artemia* sp: comparison of a commercial preparation and the pure oil. **Revista do Instituto de Ciência da Saúde**, v. 26(2), p. 157-160, 2008.

BEZERRA, M.J.B.; RODRIGUES, N.V.F.C.; PIRES, A.F.; BEZERRA, G.A.; NOBRE, C.B.; ALENCAR, K.L.L.; SOARES, P.M.G.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; MARTINS, J.L.; GRUBER, K.; SAMPAIO, A.H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Crystal structure of Dioclea violacea lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 45:807-815. 2013.

BIRGE, W.J.; BLACK, J.A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 808-810, 1985.

BISWAS, S.; AGRAWAL, P.; SAROHA, A.; DAS, H.R. Purification and mass spectrometric characterization of *Sesbania aculeata* (Dhaincha) stem lectin. **Protein J**, v. 28(9-10), p.391-9. 2009.

BLUNDELL, T.L.; JOHNSON, L.N. Protein Crystallography. **Academic Press**.USA. 1976.

- BONNEIL, E.; YOUNG, N.M.; LIS, H.; SHARON, N.; THIBAUT, P. Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the *Erythrina* genus by mass spectrometry. **Arch Biochem Biophys**, v. 426, p.241–9. 2004.
- BOUCKAERT, J.; DEWALLEF, Y.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; LORIS, R. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **Journal of Biological Chemistry**, 275, 19778–19787. 2000.
- BOUCKAERT, J.; LORIS, R.; POORTMANS, F.; WYNS, L. Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. **Proteins Struct Funct Genet.**, 23, 510-524. 1995.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 284-254. 1976.
- BRÜNGER, A. The Free R value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. **Nature**, v. 355, p. 472–474, 1992.
- BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; Bulletin of Environmental. **Contamination and Toxicology**, v.73, p. 878. 2004.
- CALDWELL, G.S.; BENTLEY, M.G.; OLIVE, P.J.W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicol**, v. 42, p. 301–306, 2003.
- CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDÁ, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1430 (2), 367-375. 1999.
- CANTU M.D.; CARRILHO E.; WULFF N.A.; PALMA M.S. Sequenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria De Massas: Um Guia Prático. **Quim Nova**, vol. 31, No. 3, p. 669-675. 2008.
- CARBALLO, J.L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.** 2: 17–21. 2002.
- CARRINGTON, D.M.; AUFRET, A.; HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during post-translational processing of Concanavalin A. **Nature** (London), v. 313, p. 64–67, 1985.
- CARVALHO, H.F. (1990). Aspectos moleculares e biológicos das lectinas. **Ciência e Cultura**. Nº 42, p. 884-893.
- CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rer Bras Hipertens**, v. 8, n. 1, 2001.
- CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL NETTO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Sciences**, v. 2(2), p. 123–135, 2001.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, p. 31–36, 1996.

CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; CRISOSTOMO, C.V.; SILVA, L.M.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Lectin from *Dioclea guianensis* var. *lasiophylla* Duke seeds mobilization during germination and seedlings growth in the dark. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 6, p. 21–25, 1994.

CAVADA, B.S.; MORENO, F.B.B.; ROCHA, B.A.M.; AZEVEDO-JUNIOR, W.F.; CASTELLÓN, R.E.R.; GOERSCH, G.V.; NAGANO, C.S.; SOUZA, E.P.; 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.; SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEB S Journal**, v. 273, p. 3962–3974, 2006.

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

CHEN, X.J.; CARROLL, J.A.; BEAVIS, R.C. Near-UV-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. **J Am Soc Mass Spectrom.**, v. 9 (9), p. 885-91. 1998.

CLAYDON, M.; DAVEY, S.; EDWARD-JONES, V.; GORDON D. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nat Biotechnol**, v. 14, n. 11, p. 1584-1586. 1996.

CORREIA, J.L.; NASCIMENTO, A.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; GONDIM, A.C.; PEREIRA, R.I.; SOUSA, B.L.; DA SILVA, A.L.; GARCIA, W.; TEIXEIRA, E.H.; DO NASCIMENTO, K.S.; DA ROCHA, B.A.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules**. 16: 9077-9089. 2011.

CUNMMINGS, R.D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. Glyco-science, status and perspectives. Ed. Gabius, S. Capítulo 10. Champman e Hall GmbH, Weinheim, Germany, p. 191-199. 1997.

DATTA, P.K.; FIGUEROA, M.O.R.; LAJOLO, F.M. Purification and characterization of two major lectins from *Araucaria brasiliensis* syn *Araucaria angustifolia* seeds (pinhão). **Plant Physiology**. Nº 97, p. 856-862. 1991.

DELANO, W. L. PyMOL User's Guide San Carlos, CA DeLano Scientific, 2002.

DELATORRE P.; AZEVEDO, W.F.J. Simulation of electron density maps. **J Appl Cryst**, v. 34, p. 658-660. 2001.

DELATORRE, P.; DELLAMANO, M.; FADEL, V.; HONDA, R.; SMARRA, A.L.S.; CANDURI, F.; OLIVIERI, J.R., RODRIGUEZ, G.O.B.; Azevedo Junior, W.F.

Crystallographic studies of fish hemoglobins. **Eclética Química** (Araraquara), São Paulo - Brasil, v. 25, p. 147-159. 2000.

DELATORRE, P. Lectinas de leguminosas: novos enfoques estruturais para velhas moléculas. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2006.

DENNIS, J.W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C.E. Protein glycosylation in development and disease. **BioEssay**, 21:412–21. 1999.

DREISEWERD, K. The Desorption Process in MALDI. **Chem Rev**, v. 103, p. 395. 2003

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SHITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal Biochem**. 28: 350-356. 1956.

DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A Practical Approach). **Oxford University Press**. 1992.

EDMAN, P. Acta Chem. Scand., 4, 283. 1950.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Structures of the *Erythrina corallodentron* lectin and of its complexes with mono- and disacharides. **Journal of Molecular Biology**, 277(4), 917-932, 1998.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W.G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr. D.**, v. 66, p. 486–501, 2010.

EVANS, P. “Data reduction”, Proceedings of CCP4 Study Weekend. **Data Collection & Processing**, p. 114–122, 1993.

FELDSTED, R.; EGORIN, M.; LEAVITT, R.; BAUCHUR, N. Recombination of subunits of *Phaseolus vulgaris* isolectins. **J Biol Chem**, v. 252, p. 2967–2971. 1977.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**. 246(4926):64-71. 1989.

FENSELAU, C.; DEMIREV, P.A. Characterization of intact microorganism by MALDI mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**, v. 20, n. 4, p. 157-171. 2001.

FERENCÍK, M.; STVRTINOVÁ, V. Endogenous control and modulation of inflammation. **Folia Biol. Praha**, 42: 47-55. 1996.

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

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.; BESERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E.H.; MOTA, M.R.; ASSREUY, A.M.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; DE ALENCAR, N.M. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 380(5), 407-414, 2009.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. 3rd Ed. **University Press**, Cambridge, UK. 18: 37-77. 1971.

FREIRE, M.G.M.; DESOUSA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**. 42: 275-280. 2003.

FRIGERIO, L.; ROBERTS, L. M. The enemy within: ricin and plant cells. **Journal of Experimental Botany**. V. 49, n° 326, p. 1473-1480. 1998.

FURCHGOTT, R.T.; ZAWADZKI, Z.V. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 288: 373-376. 1980.

GABIUS, H.J.; GABIUS, S. Glycoscience. **Status and Perspectives**. Chapman & Hall, Weinheim, Germany. 1997.

GABIUS, H.J. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code, **Naturwissenschaften**, v.87, p.108–121. 2000.

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M.; LIMA MOTA, M.R.; PINTO, N.V.; PASSOS MEIRELES, A.V.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; DE AZEVEDO, W.F.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J Struct Biol**, v. 152, n.3, p.185-94, 2005.

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal Structural Biology**, 152, 185–194, 2005.

GALEGO DEL SOL, F.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J. The First Crystal Structure of a Mimosoideae Lectin Reveals a Novel Quaternary Arrangement of a Widespread Domain. **J Mol Biol**, v. 353, p. 574–583. 2005

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker JM editor. *The Proteomics Protocols Handbook* Totowa: Humana Press; p. 571-607. 2009.

GERLACH, D.; SCHLOTT, B.; ZÄHRINGER, U.; SCHMIDT, K.H. *N*-acetyl-Dgalactosamine/ *N*-acetyl-D-glucosamine – recognizing lectin from the snail *Cepaea hortensis*: purification, chemical characterization, cloning and expression in *E. coli*. **Immunol Med Microbiol**, v. 43, p. 223-232. 2005.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**; 285:66. 1980.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. Histamine release induced by glucose (manose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concavalin A. **Agents Actions**. v. 41, n. 3-4, p. 132- 135, 1994.

GOUET, P.; ROBERT, X.; COURCELLE, E. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structure of proteins. **Nucleic Acids Res**. 31: 3320-3323. 2003.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation. 2004.

GUZMAN-PARTIDA, A.M.; ROBLES-BURGUENO, M.R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VAZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins. **Biochimie**, v. 86, p. 335–42. 2004.

HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Properties and structure of the legume lectin family. **Trends Glycosc Glyc**, vol. 10, p. 349-404. 1998.

HAN, C.H.; LIU, Q.H.; NG T.B.; WANG H.X. A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochem Bioph Res Co**, v. 14, p. 336. 2005.

HERNANDEZ, P.; DEBRAY, H.; JAEKEL, H.; GARFIAS, Y.; JIMENEZ, M.D.; MDEL, C.; MARTINEZ-CAIRO, S.; ZENTENOO, E. Chemical characterization of the lectin from *Amaranthus leucocarpus* syn. *Hypocondriacus* by 2-D proteome analysis. **Glycoconj J**, v. 18, p. 321–9. 2001.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. Mass spectrometry: principles and applications. 3. Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience. 2007.

JANCARIK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **J Appl Crystallogr**, v. 24, p. 409-411. 1991.

JIANG S.Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectins superfamily in higher plants. **BMC Evol Biol**, v 79. 2010.

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

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K.J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**. v. 49, p. 157-230, 1997.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Anal Chem**. 60(20):2299-301. 1988.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.S.; SEXANA, A.K.; PANDITA, R.M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. **Phytochemistry**, v. 66, p. 16. 2005.

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

KIMBLE, B.; RAMIREZ NIETO, G.; PEREZ, D. R. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. **Virol. J.**, 7, 365, 2010.

KITADA, M.; KURODA, Y.; DEZAWA, M. Lectins as a Tool for Detecting Neural Stem/Progenitor Cells in the Adult Mouse Brain. **Anat. Rec. Hoboken.**, 1, 1-19, 2010.

KLEHA, J.F.; DEVESLY, P.; JOHN, S. A. The effects of lectins on the Release of EDRF from rabbit aorta. **BrJPharmacol.** 104:287–288, 1991.

KONOZY, E.H.E.; BERNARDES, E.S.; ROSA, C.; FACA, V.; GREENE, L.J.; WARD, R.J. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** V. 410, p. 222-229. 2003.

KONOZY, E.H.E.; MULAY, R.; FACA, V.; WARD, R.J.; GREENE, L.J.; OQUEBARRIERA, M.C.; SABHARWAL, S.; BHIDE, S.V. Purification, some properties of a D-galactose-binding leaf lectin from *Erythrina indica* and further characterization of seed lectin. **Biochimie.** V. 84, p. 1035-1043. 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **British Journal of Pharmacology**, Londres, v. 114, p. 578-583, 1995.

LASKOWSKI, R.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283–291, 1993.

LESLIE, A.; POWELL, H. Processing Diffraction Data with Mosflm. *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, v. 245, p. 41–51, 2007.

LEWIS G.P.; SCHRIRE B.; MACKINDER B.; LOCK M. Legumes of the world. **Royal Botanical Gardens**, Kew. 2005.

LIMA, M.E.P.; CARNEIRO, M.E.; NASCIMENTO, A.E.; GRANGEIRO, T.B.; HOLANDA, M.L.; AMORIM, R.C.N.; BENEVIDES, N.M.B. Purification of a Lectin from the Marine Red Alga *Gracilaria cornea* and Its Effects on the Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J Agr Food Chem**, v. 53, p. 6414-6419. 2005.

LIMA, R.F.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SAMPAIO, A.A.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, M.A.S. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **J Pharm Pharmacol.** 56:1415–1421, 2004.

LIU, B; LI, C.Y.; BIAN, H.J.; MIN, M.W.; CHEN, L.F.; BAO, J.K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Arch Biochem Biophys.** 482(1-2):1-6. 2009.

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

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Bioch Bioph Acta**, v. 1383, p. 9-36. 1998.

LORIS, R.; VAN WALLE, I.; DE GREVE, H.; BEECKMANS, S.; DEBOECK, F.; WYNS, L.; BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **Journal of Molecular Biology**, 335, 1227. 2004.

LUSHER, T.F.; BARTON, M. Biology of the endotellium. **Clin Cardiol**. 20:II310, 1997.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepitoptera: Pyralidae), *Zabrotes fubsasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Pruchidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, 146: 486–498. 2007.

MAKHLOF, A.; FUJIMOTO, S.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of WGA-carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77(2), p. 216-24. 2010.

MANN, K.; FARIAS, C.M.S.A.; GALLEGO DEL SOL, F.; SANTOS C.F.; GRANGEIRO T.B.; NAGANO C.S.; CAVADA B.S.; CALVETE J.J. The amino-acid sequence of the glucose/ mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin related domains. **Eur J Biochem**, v. 218, p. 4414–4422. 2001.

MATTHEWS, B. The solvent content of protein crystals. **J. Mol. Biol.**, v. 33, p. 491–587, 1968.

McGEER, P.L.; McGEER, E.G. Autotoxicity and Alsheimer Disease. **Archieves of Neurology**, 57:789-790. 2000.

MOLINA, M.C.; VINCENTE, C. Correlationships between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina phycobionts*. **Cell Communication and Adhesion**, v. 3, p. 1-12. 1995

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** 43: 109-142. 1991.

MOREIRA, R.A.; PERRONE, J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.** 59: 783–787. 1977.

MORENO, F.B.M.B.; DE OLIVEIRA, T.M.; MARTIL, D.E.; VICOTI, M.M.; BEZERRA, G.A.; ABREGO, J.R.B.; CAVADA, B.S.; AZEVEDO, W.F. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **J Struct Biol.**, 161,133–143, 2008.

MOTA, M.R.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.A.; OLIVEIRA, C.C.; BENEVIDES, R.G.; CAVADA, B.S.; ASSUREUY, A.M.S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 374:1–10. 2006.

MÜLLER, W. E. G.; CONRAD, J.; SCHRÖDER, C.; ZAHN, R.K.; KURELEC, B.; DREESBACH, K.; UHLENBRUCK, G. Characterization of trimeric, selfrecognizing *Geodia cydonium* lectin I. **European Journal Biochemistry**. V. 133, p. 263-267. 1983.

NAEEM, A.; KHAN, R.H.; VIKRAM, H.; AKIF, M. Purification of *Cajanus cajan* root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Arch Biochem Biophys**, v. 396(1), p.99-105. 2001.

NAGANO, C.S.; CALVETE, J.J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B.S.; SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependence dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J.** 409: 417-28. 2008.

NAGANO, C.S.; MORENO, F.B.M.B.; BLOCH JUNIOR, C.; PRATES, M.V.; CALVETE, J.J.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; TAVARES, T.D.; NASCIMENTO, K.S.; GRANGEIRO, T.B.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. Purification and characterization of a new lectin from the red marine alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, 159-165. 2002.

NAGHDI, M.; BANDANI, A.R. Snowdrop Lectin (GNA) Affects Growth and Development of *Spodoptera exigua* (Hubner). **J Agr Sci Tech**, vol. 14, p. 469-477. 2012.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.L.; BITENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPLAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; FREITAS, A.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int Immunopharmacol** 7:824–835, 2007.

NASCIMENTO, A.S.F.; GONDIM, A.C.S.; Cajazeiras, J.B.; CORREIA, J.L.A.; Pires, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; SILVA, A.L.C.; Nagano, C.S.; Assreuy, A.M.S.; Cavada, B.S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **Journal of Molecular Recognition**. 25:657-664. 2012.

NIALL, H.D. (1973). Automated Edman degradation: the protein sequenator. **Methods Enzymol.** 27:942-1010.

NÓBREGA, R.B.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.A.; SANTI-GADELHA, T.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; DELATORRE, P. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**. 94: 900–906. 2012

NUNES, E.S.; SOUZA, M.A.; VAZ, A.F.; SILVA, T.G.; AGUIAR, J.S.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.; GUARNIERI, M.C.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59(7-8), p. 667-71. 2012.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; MOURA, T.R.; TEIXEIRA, C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; CUNHA, F.Q.; NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, 379(6), 609-616, 2009.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S.M.; CAVADA, B.S.; TEIXEIRA, E.H.; MOURA, T.R.; TEIXEIRA, C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential antiinflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 379, n. 6, p. 609-616, 2009.

OHIZUMI, Y.; GAIDAMASHVILI, M.; OHWADA, S.; MATSUDA, K.; KOMINAMI, J.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **J Agric Food Chem.** 57(7):2896-902. 2009.

PELLETIER, M.; LAVASTRE, V.; SAVOIE, A.; RATTHÉ, C.; SALLER, R.; HOSTANSKA, K.; GIRARD, D. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 101, p. 229-236, 2001.

PERVIN, F.; HOSSAIN, M.M.; KHATUN, S.; SIDDIQUE, S.P.; SALAM, K.A.; KARIM, M.R.; ABSAR, N. Comparative cytotoxicity study of six bioactive lectins purified from pondweed (*Potamogeton nodosus* Poir) rootstock on Brine Shrimp. **J. Med. Sci.** 6: 999–1002. 2006.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, p. 347-352. 1995.

PEUMANS, W.J.; WINTER, H.C.; BEMER, V.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E.J.M. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate J**, v. 14, p. 259-265. 1997.

PIMENTEL, M.F.; LIMA, PIRES, D.; MARTINS, L.R.; BEATRIZ, A.; SANTAELLA, S.T.; COSTA-LOTUFO, L.V. Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol PANAMJAS **Pan-American Journal of Aquatic sciences.**, v. 4(3), p. 363 – 368, 2009.

PINTO, L.S.; NAGANO, C.S.; OLIVEIRA, T.M.; MOURA, T.R.; SAMPAIO, A.H.; DEBRAY, H.; PINTO, V.P.; DELLAGOSTIN, O.A.; CAVADA, B.S. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **J. Biosci.**, 33: 355–363. 2008.

PRAKASHKUMAR R.; PUSHPANGADAN P.; VIJAYA KUMAR T. Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerela. **India Biologia Plantarum**, v. 40, p. 155-58. 1998.

PRATAP, J.V.; AROCKIA, J.; RANI, P.G.; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: Implications to the generation of carbohydrate specificity. **Journal of Molecular Biology**. V. 317, p. 237-247. 2002.

PUSTZAI, A. Plant Lectins. Cambridge University Press. 1991.

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

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Pharmacology. 4 ed. New York. 2001.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv mori. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744. 2001.

RÍOS-DE-ÁLVAREZ, L.; JACKSON, F.; GREER, A.; BARTLEY, Y.; BARTLEY, D.J.; GRANT, G.; HUNTLEY, J.F. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. **Vet Parasitol**, v. 186(3-4), p. 390-8. 2012.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13820-4, 25 nov. 1983.

ROCHA, B.A.; DELATORRE, P.; OLIVEIRA, T.M.; BENEVIDES, R.G.; PIRES, A.F.; SOUSA, A.A.; ASSREUY, A.M.; DEBRAY, H.; AZEVEDO, W.F. JR.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 806-816, 2011.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J.T.; AZEVEDO MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophages stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannosebinding plant lectins. **Braz J Med Biol Res.**, v. 25, n. 8, p. 823-826, 1992.

ROPER, D.I.; HUYTON, T.; VAGIN, A.; DODSON, G. The molecular basis of vancomycin resistance in clinically relevant Enterococci: crystal structure of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.16, p.8921-8925, Aug. 2000.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Lectinologie: Geschichte, konzepte und pharmazeutische bedeutung. **Deutsche Apotheker Zeitung**. V. 133, nº 26, p. 15-36. 1993.

SAMPIETRO, A.R.; ISLÃ, M.I.; QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, v. 160, p. 659-667. 2001.

SANTIAGO, M.Q. Purificação, Caracterização E Atividade Biológica De Uma Lectina Extraída De Sementes De *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. Monografia. Monografia de graduação. Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2013.

SANTOS, A.F.; CAVADA, B.S.; ROCHA, B.A.; NASCIMENTO, K.S.; SANT'ANA, A.E. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresour Technol**, v. 101(2), p. 794-8. 2010.

SANTOS, A.F.; AZEVEDO, D.P.; SANTOS, M.R.; MENDONÇA, D.I.; SANT'ANA, A.E. The lethality of *Euphorbia conspicua* to adults of *Biomphalaria glabrata*, cercaria of *Schistosoma mansoni* and larvae of *Artemia salina* **Bioresource Technology**, v. 98, p. 135-139, 2007.

SARKER, A.B.; AKAGI, T.; TERAMOTO, N.; NOSE, S.; YOSHINO, T.; KONDO, E. *Bauhinia purpurea* (BPA) binding to normal and neoplastic thyroid glands. **Pathol. Res. Pract.**, 190: 1005-1011. 1994.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Cloning by genomic PCR and production of peanut agglutinin in *Escherichia coli*. **Gene**, 148, 299-304, 1994.

SHARON, N. Lectins-carbohydrates complexes of plants and animals. Na atomic. **Trends Biochem Science**, v. 18, p. 221-6. 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins. Chapman and Hall, London, v.126. 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legume Lectins – A large family of homologous proteins. In **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208. 1990.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from haemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14(11), p. 53–62. 2004.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, 282(5), 2753-2764, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, Jan., 74-80. 1993.

SILVA, C.T.L. Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SILVA, R.B.L. Endotélio: Um novo alvo terapêutico no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista Médica Ana Costa**, v. 11, n. 1, 2006.

SIMÕES, R.C.; ROCHA, B.A.M.; BEZERRA, M.J.B.; BARROSO-NETO, I.L.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; MOURA, R.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. RCM. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 811-818, 2012.

SINGH, R.S.; TIUVARY, A.K.; KENNEDY, J.F. Lectins: sources, activities and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 19, n° 2, p. 145-178. 1999.

SOEDJANAATMADJA, U.M.S.; SUBROTO, T.; BEINTEMA, J.J. (1995). Processed products of hevein precursor in the latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Federation of European Biochemical Societies**. V. 363, p. 211-213.

SRINIVASAN, N.; RUFINO, S.D.; PEPYS, M.B.; WOOD, S.P.; BLUNDELL, T.L. (1996) A superfamily of proteins with the lectin fold. **Chemrracs-Biochem Mol Biol**, 6, 149-164,

STUMP, M.J.; FLEMING, R.C.; GONG, W.H.; JABER, A.J.; JONES, J.J.; SURBER, C.W.; WILKINS, C.L. (2002) Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews** 37: 275–303.

SUSEELAN, K.N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K.B.; KRISHNA, T.G. (2002) Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Arch Biochem Bioph**, v. 407, p. 241-247.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; CUNHA, R.M.; HAVT, A.; MARTINS, J.L.; PINTO, V.P.; GONÇALVES, R.B.; CAVADA, B.S. *In*

in vitro inhibition of *Streptococci* binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J Appl Microbiol.**, 101, 111-116, 2006.

VAN DAMME, E.J.M.; GOUSSAERT, S.; CHARELS, D.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. (1997) The mannose/maltose-specific Convolvulaceae lectins. **Eur J Cell Biol**, v. 74, p. 7. 1997.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. (1998) Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Cr Rev Plant Sci**, v. 17, p. 575-692.

VAN DAMME, E.J.M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258- 264, 1991.

VANE, J.R.; ANGGARD, E.E.; BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**323:27-36, 1990.

VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. **Med Sci Monit.** 7:1075-85. 2001.

VARGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **J. Appl. Crystallogr.** 30, 1022–1025, 1997.

VARROT A.; BLANCHARD B.; IMBERTY A. (2011) Lectin Binding and its Structural Basis, in Carbohydrate Recognition: Biological Problems, Methods, and Applications (eds B. Wang and G.-J. Boons), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

VEIGA, L.F.; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: (eds.), Métodos em Ecotoxicologia Marinha. Aplicações no Brasil., p. 111-112, 2002.

WAH, D.A.; ROMERO, A.; GALLEGO DEL SOL, F.; CAVADA, B.S.; RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; SAMPAIO, A.H.; CALVETE, J.J. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. **Journal of Molecular Biology**, Cary, v. 310, n.4, p. 885- 894, 2001.

WEIS, W.I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, 65, 441-473, 1996.

WINN, M.; BALLARD, C.C.; COWTAN, K.D.; DODSON, E.J.; EMSLEY, P.; EVANS, P.R.; KEEGAN, R.M.; KRISINEL, E.B.; LESLIE, A.G.; MCCOY, A.; MCNICHOLAS, S.J.; MURSHUDOV, G.N.; PANNU, N.S.; POTTERTON, E.A.; POWELL, H.R.; READ, R.J.; VAGIN, A.; WILSON, K.S. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallogr. D**, v.67, p. 235–242, 2011.

WONG, J.H.; NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, p. 234-43. 2005.

WU, A.M.; WU, J.H.; LIU, JIA-HU; SINGH, T. Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). **Life Sci.**, 74: 1763–1779. 2004.

YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; THIBAUT, P. Mass spectrometric analysis of genetic and post-translational heterogeneity in the lectins jacalin and *Maclura pomifera* agglutinin. **Glycoconj J**, v. 12, p. 135-141. 1995.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.; WOODLOCK, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Anal. Biochem.** 30 (1): 148–152. 1969.

ZHANG, L.; HSU, C.H.; ROBINSON, C.P. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax *in vitro*. **Toxicol App Pharmacol.** v. 129, n. 1, p. 16-22, 1994.