



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

RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES

**Purificação, caracterização físico-química e biológica de
SLA: uma nova lectina extraída de sementes de *Swartzia
laevicarpa* Amshoff.**

**FORTALEZA
2013**

RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES

Purificação, caracterização físico-química e biológica de SLA: uma nova lectina extraída de sementes de *Swartzia laevicarpa* Amshoff.

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

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Orientador: Dr. Benildo Sousa Cavada
Co Orientador: Dr Celso Shiniti Nagano

FORTALEZA
2013

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

S612p Simões, Rafael da Conceição.
Purificação, caracterização físico-química e biológica de SLA: uma nova lectina extraída de sementes de *Swartzia laevicarpa* Amshoff / Rafael da Conceição Simões. – 2013.
114 f. : il., colr., 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, 2013.
Área de Concentração: Química de Macromoléculas.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano.

1. *Swartzia laevicarpa*. 2. Swartzeae. 3. Lectina. 4. Artemia. I. Título.

CDD 574-192

RAFAEL DA CONCEIÇÃO SIMÕES

Purificação, caracterização físico-química e biológica de SLA: uma nova lectina extraída de sementes de *Swartzia laevicarpa* Amshoff.

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. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovada em: 20 / 06 / 2013

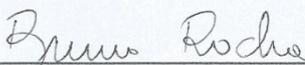
BANCA EXAMINADORA



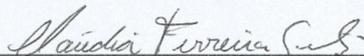
Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará



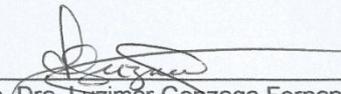
Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará



Profa. Dra. Claudia Ferreira Santos
Universidade Estadual do Ceará



Profa. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez
Universidade Federal da Bahia

À minha avó Maria Eunice (Dona Noca), *In Memoriam*, Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, criador do nosso rico e biodiverso universo, autor de todas as coisas. Agradeço pela sua grande obra e pelo dom da minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, que me acolheu em seu grupo e me deu grandes oportunidades;

Ao Prof. Celso Shiniti Nagano, por me aceitar como co-orientando e ter me ensinado muito sobre espectrometria de massas, organização do ambiente de trabalho e relacionamento com as pessoas;

Ao prof. Bruno Anderson Matias da Rocha, pelos ensinamentos diversos durante todo o mestrado, pela amizade e pelos bons conselhos;

A professora Claudia Ferreira Santos por ter aceitado o convite de participar dessa banca de Doutorado;

A professora Luzimar Gonzaga Fernandez, peça fundamental em minha formação científica e como pessoa. Por aceitar o convite para participar dessa defesa e por todas as lições que me ensinou e que ainda irá me ensinar;

Ao professor Luiz Augusto Gomes de Souza do INPA por ceder as sementes;

À professora Ana Maria Sampaio Assreuy e toda equipe do LAFFIN pelos experimentos de inflamação e Dor;

Ao professor Tarun K. Dam pelos experimentos de microcalorimetria de titulação isotérmica.

Aos irmãos que ganhei durante a estadia em Fortaleza, Helton e Rômulo. Obrigado pela amizade sincera e que com certeza perdurará por muitos anos. Também aos grandes amigos Eduardo, Ito, Mayron, Raquelzinha, Pereira-Jr, Bruno Lopes, Joana, Alysson, Arthur, Guilherme, Sâmia;

A todos os professores do grupo BioMol – LAB, Prof. Alexandre, Profa Kyria, Profa Silvana e a todos os alunos do BioMol lab;

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC;

Aos professores Paulo Tadeu Silva Costa, Renato Delmondez de Castro, Marta Bruno Loureiro e Iara Sordi Joachim Bravo pela grande colaboração em minha vida acadêmica;

Aos meus amigos que me acompanharam durante a iniciação científica, Paulo Teixeira, Eduardo Gomes, Cimilli Gabrieli, Rafael Teixeira, Jailson Brito, Ivana Virgens, Wilson Nascimento, Saulo Aflitos,;

Aos meus eternos amigos Diana, Dani, Tiga, Marnet, Joca Boêmio, Jorge Malungo, Gabriel, Laert, Tiago Brito, Marília, Fábio Sande. Obrigado pela amizade sempre, mesmo distante a presença de vocês é sempre constante em minha vida;

A minha família pela compreensão de que a minha vinda para Fortaleza era importante e por ter me dado apoio incondicional em todas as minhas decisões. Obrigado Karol, Ana, Dona Noca, Rebeca, Bruna, Giulia e principalmente obrigado Seu Simões e Dona Nanci, por serem os pais perfeitos. Agradeço a Deus todos os dias por ter me colocado em tão boas mãos;

Especialmente a minha amada avó Maria Eunice (Dona Noca) a quem dedico este trabalho, em sua memória, por tudo que sempre representou e sempre representará em minha vida.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização desse trabalho;

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

“Tudo tem seu apogeu e seu declínio... É natural que seja assim, todavia, quando tudo parece convergir para o que supomos o nada, eis que a vida ressurge, triunfante e bela! Novas folhas, novas flores, na infinita benção do recomeço!” (Chico Xavier)

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio de ligação específica e reversível a carboidratos, sem ação enzimática. Estas proteínas são amplamente distribuídas na natureza. As lectinas isoladas de sementes de leguminosas estão entre as mais estudadas e possuem homologia, sendo importantes marcadores moleculares da evolução dentro desta família vegetal. Existem poucas informações sobre as lectinas das tribos da base da subfamília Papilionoideae e novas informações são importantes para solidificar os conhecimentos sobre as lectinas dessas tribos. Este trabalho teve como objetivo purificar uma nova lectina de sementes de *Swartzia laevicarpa*, caracteriza-la físico-quimicamente e por espectrometria de massas e testa-la quanto a sua capacidade de causar inflamação e dor e quanto a sua toxicidade contra náuplios de *Artemia sp.* A lectina foi purificada por fracionamento por sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca iônica e exclusão molecular. Denominada de SLA, a lectina apresenta o perfil eletroforético de uma cadeia de 30 kDa e, diferente de SLL, apresenta subunidades por volta de 13 e 17 kDa. Possui afinidade por GalNAc e derivados de galactose, e apresenta características termodinâmicas de ligação diferente para Gal e GalNAc. A lectina em estudo causou inflamação em modelo de edema de pata de camundongos e hipernocicepção ligada a inflamação. SLA também apresentou toxicidade contra náuplios de fase II de *Artemia sp.* A lectina isolada e caracterizada nesse trabalho demonstra ser uma ferramenta taxonômica interessante para corroborar o posicionamento de Swartzeae além de demonstrar também um potencial biotecnológico no estudo de modelos de inflamação e dor. Através da espectrometria de massas foi possível verificar que SLA apresenta pelo menos duas isoformas e apresenta glicofomas. Possui aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos e nesse trabalho foram determinados 179 deles. SLA apresentou similaridade com lectinas de outras tribos basais como VML e SJA, corroborando com a classificação de Swartzieae como tribo de Papilionoideae e demonstrando a utilização de lectinas como ferramenta taxonômica.

Palavras Chave: *Swartzia laevicarpa*; Swartzeae; lectina; sequência; inflamação; *Artemia*.

ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immune origin that have at least one specific and reversible carbohydrate binding domain without enzymatic action. These proteins are widely distributed in nature. Lectins isolated from legume seeds are among the most studied, have homology and are important markers of evolution within this plant family. There is little information about the lectins of the basal tribes of the subfamily Papilionoideae and new information is important to solidify your knowledge of the lectins of these tribes. This study aimed to purify a new lectin from *Swartzia laevicarpa*, to characterize its physical-chemical and mass spectrometry proprieties and test as its ability to cause inflammation and pain and their toxicity against *Artemia sp.* The lectin was purified by ammonium sulfate fractionation followed by ion exchange chromatography and molecular exclusion. Named SLA, the lectin shows the electrophoretic profile of a chain of 30 kDa and, unlike SLL presents subunits around 13 and 17 kDa. Has affinity for GalNAc and Gal derivatives, and presents thermodynamic binds characteristics of different for Gal and GalNAc. SLA caused inflammation in a model of paw edema of mice and hypernociception linked to inflammation. SLA also showed toxicity against stage II nauplii of *Artemia sp.* The lectin isolated and characterized in this work proves to be an interesting tool and corroborate the taxonomic placement of Swartzeae. SLA also demonstrate the biotechnological potential in the study of models from inflammation and pain. By mass spectrometry we found that SLA has at least two isoforms and provides glycoforms. It has approximately 250 amino acid residues and in this work were determined 179 of them. SLA showed similarity with lectins from other basal tribes as VML and SJA, corroborating the classification as Swartzieae Papilionoideae tribe and demonstrating the use of lectins as a taxonomic tool.

Key Words: *Swartzia laevicarpa*; Swartzeae; lectin; sequence; inflammation; Artemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ilustração esquemática da heterogeneidade de carboidratos encontrados em glicoproteínas e glicolipídios da superfície de células.	18
Figura 02 – Classificação das lectinas de plantas quanto a sua capacidade de ligação a carboidratos.	25
Figura 03. Classificação das Lectinas Vegetais.	26
Figura 04 – Processamento pós traducional (Permutação Circular) ocorrente nas lectinas ConA-Like	29
Figura 05 – Relação filogenética proposta para a tribo da sub-família Papilionoideae	31
Figura 06 – Estrutura geral da lectina PELA	33
Figura 07 Reconhecimento de Man(α 1-3)Man e Man(α 1-6)Man por <i>Pterocarpus angolensis</i> lectin (PAL).	35
Figura 08 – Estrutura cristalográfica de BMA.	38
Figura 09 – Reação esquemática da química derivativa de Edman.	43
Figura 10 – Esquema de um espectrômetro de massa híbrido do tipo triplo quadrupolo.	44
Figura 11 – Classificação botânica de espécies de Swartzia	47
Figura 12 – Estágios de desenvolvimento de plântulas de <i>S. laevicarpa</i> .	48
Figura 13 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.	60
Figura 14 – Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacril S200.	61
Figura 15 – Eletroforese em gel de 12% de poliacrilamida.	62
Figura 16 – Estabilidade Térmica de SLA.	64
Figura 17 – Atividade hemaglutinante de SLA em diferentes valores de pH.	64
Figura 18 – Análise do efeito do EDTA na atividade hemaglutinante de SLA.	65
Figura 19 – Atividade Hemaglutinante de SLA contra eritrócitos humanos.	73

Figura 20 – Estrutura dos antígenos presentes na membrana das hemácias humanas.	73
Figura 21 – Termograma da interação de SLA com o açúcar GalNAc.	75
Figura 22 - Efeito inflamatório de SLA em camundongos.	81
Figura 23 – Efeito hipernociceptivo induzido por SLA.	83
Figura 24 – Teste de atividade tóxica de SLA contra <i>Artemia sp.</i>	84
Figura 25 – Espectro deconvoluído de SLA	92
Figura 26 – Espectro de fragmentação do íon de massa 3282,8647	94
Figura 27 – Alinhamento dos peptídeos sequenciados com a lectina de sementes de <i>Sophora japônica</i> (SJA).	94
Figura 28 - Resultado da busca no CCD utilizando a sequência parcial de SLA	95
Figura 29 – Alinhamento entre SLA, VML, B-SJAI, SJA, CLAI e RPbAI.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Especificidade por açúcares das lectinas da tribo Dalbergieae	32
Tabela 02. Especificidade por açúcares das lectinas da tribo Sophoreae purificadas de a partir de diferentes tecidos vegetais.	36
Tabela 03 – Atividade hemaglutinante e hemolítica de extratos de sementes de <i>Swartzia laevicarpa</i> em diferentes pHs .	58
Tabela 04 - Atividade hemaglutinante e hemolítica de diferentes frações de extratos sementes de <i>Swartzia laevicarpa</i> em pH 2,6 e 7,6	58
Tabela 05 – Tabela de purificação de SLA.	61
Tabela 06 – Inibição da atividade hemaglutinante de SLA por carboidratos e glicoproteínas.	74
Tabela 07 – Dados termodinâmicos de ligação de SLA à 27°C e pH 7,4.	79
Tabela 08 – Tabela de peptídeos sequenciados de SLA.	93

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- Ala** – Alanina;
Arg – Arginina;
Asn – Asparagina;
Asp – Ácido Aspartico;
B-SJA-II – Segunda lectina extraída da casca de *Sophora japonica*;
CaCl₂ – Cloreto de Calcio;
CID – Dissociação induzida por colisão;
ConA – Lectina de Canavalia ensiformes;
ConA-Like - Lectinas semelhantes a ConA;
ConBr – Lectina de Canavalia brasiliensis;
Cys - Cisteína;
Da – Dalton;
DGL – Lectina de Dioclea grandiflora;
ECL - Lectina de Erythrina cristagalli;
EcorL - Lectina de Erythrina corallodendron;
ESI – Ionização por Eletrospray;
EVA – Lectina de Erythrina velutina;
Fuc – Fucose;
GalNac – N-Acetil-Galactosamina;
Gly – Glicina;
HCl – Ácido Clorídrico;
Ile – Isoleucina;
LAA – Lectina de Luetzelburgia auriculata;
Leu –Leucina;
LHC – Grande colisor de Hadron;
M – Molar;
MALDI – Ionização por Dessorção a laser assistida por matriz;
Man – Manose;
Met – Metionina;
MnCl₂ – Cloreto de Manganês;
MS – Espectrometria de massa;
MS/MS – Espectrometria de massa em sequencial;
NaCl – Cloreto de sódio;
Phe – Fenilalanina;
PPL – Lectina de Parkia platycephala;
PPL-2 – Segunda lectina de *Parkia platycephala*;
- Q-ToF** – Quadrupolo acoplado a Tempo de Vôo;
RE – Reticulo endoplasmático;
RIP – Proteínas inativadoras de Ribossomos;
RPbAl – Isoforma Al da lectina extraída da casca de *Robinia pseudoacacia*;
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil sulfato de sódio;
Ser – Serina;
Thr – Treonina;
ToF – Tempo de Vôo;
Tyr – Tirosina;
Val – Valina;
VML – Lectina de Vatairea macrocarpa;
Xyl – Xilose.

Sumário

CAPITULO I – Fundamentação Teórica	17
1. Carboidratos e Glicobiologia	18
1.1 Glicoconjugados e Glicobiologia.....	18
1.2 Glicosilação de Proteínas	20
2. Lectinas vegetais	22
2.1 Breve histórico.....	22
2.2 Definição.....	23
2.3 Classificação.....	24
3. Lectinas de Leguminosa	27
3.1 Aspectos estruturais	27
3.2 Processamento Pós traducional de Lectinas de Leguminosas.....	28
3.3 Lectinas da tribo Dalbergieae	31
3.4 Lectinas da tribo Sophoreae.....	36
3.5 Lectinas da tribo Swartzieae.....	39
4. Estudos de interação proteína-ligante.....	40
4.1 Estudos de interação entre Lectinas vegetais e Carboidratos.....	40
4.2 Princípios básicos de Bioenergética e Termodinâmica	40
4.3 Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	41
5. Estudos da estrutura primária de proteínas	42
6. Generalidades sobre a espécie e a Tribo em estudo.....	45
7. Objetivos	49
7.1 Objetivo Geral.....	49
7.2 Objetivos Específicos	49
CAPÍTULO II – Purificação, e Caracterização físico-química parcial de uma nova lectina de sementes de <i>Swartzia laevicarpa</i>	50
1. Metodologia.....	51
1.1 Coleta e Higienização das sementes.....	51
1.2 Extração de proteínas totais solúveis e fracionamento por sulfato de amônio	51
1.3 Cromatografia de troca iônica.....	51
1.4 Cromatografia de Exclusão Molecular	52
1.5 Atividade hemaglutinante e atividade hemolítica	52
1.6 Inibição da atividade hemaglutinante.....	53
1.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.....	53
1.8 Calculo da Massa Molecular Aparente	54

1.9	Análise da glicosilação	54
1.10	Análise da estabilidade térmica e de pH.....	55
1.11	Análise da dependência de metais divalentes.....	56
2.	Resultados e discussão	57
2.1	Extração de proteínas totais e eliminação da atividade hemolítica.....	57
2.2	Purificação de SLA por cromatografia de troca iônica e exclusão molecular.....	59
2.3	Análise do perfil eletroforético e glicosilação	61
2.4	Estabilidade térmica, de pH e presença de cátions divalentes.....	63
3.	Conclusões	66
CAPÍTULO III – Análise da afinidade, atividade inflamatória e toxicidade contra <i>Artemia sp</i> de SLA		67
1.	Materiais e Métodos.....	68
1.1	Inibição da atividade hemaglutinante.....	68
1.2	Análise por microcalorimetria de titulação isotérmica	68
1.3	Camundongos	69
1.4	Teste de formação de edemas	69
1.5	Teste de sensibilidade (VON FREY)	69
1.6	Análise estatística para os testes com camundongos	70
1.7	Preparação da amostra para ensaios com <i>Artemia sp</i>	70
1.8	Obtenção dos náuplios de <i>Artemia sp</i>	70
1.9	Teste de letalidade em <i>Artemia sp</i>	71
2.	Resultados e Discussão.....	72
2.1	Análise de afinidade de SLA por Inibição da Atividade Hemaglutinante e Calorimetria de Titulação Isotérmica	72
2.2	Atividade Inflamatória	80
2.3	Teste de toxicidade em <i>Artemia sp</i>	83
4.	Conclusões	86
CAPÍTULO IV – Análise da massa intacta e sequência parcial de SLA por Espectrometria de Massas		87
1.	Materiais e Métodos.....	88
1.1	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa	88
1.2	Digestão <i>in gel</i> e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa	88
1.3	Análises da sequência primária por Bioinformática	89
3	Resultados e Discussão.....	90
3.1	Determinação da massa intacta de SLA.....	90
3.2	Sequenciamento parcial de SLA.....	93

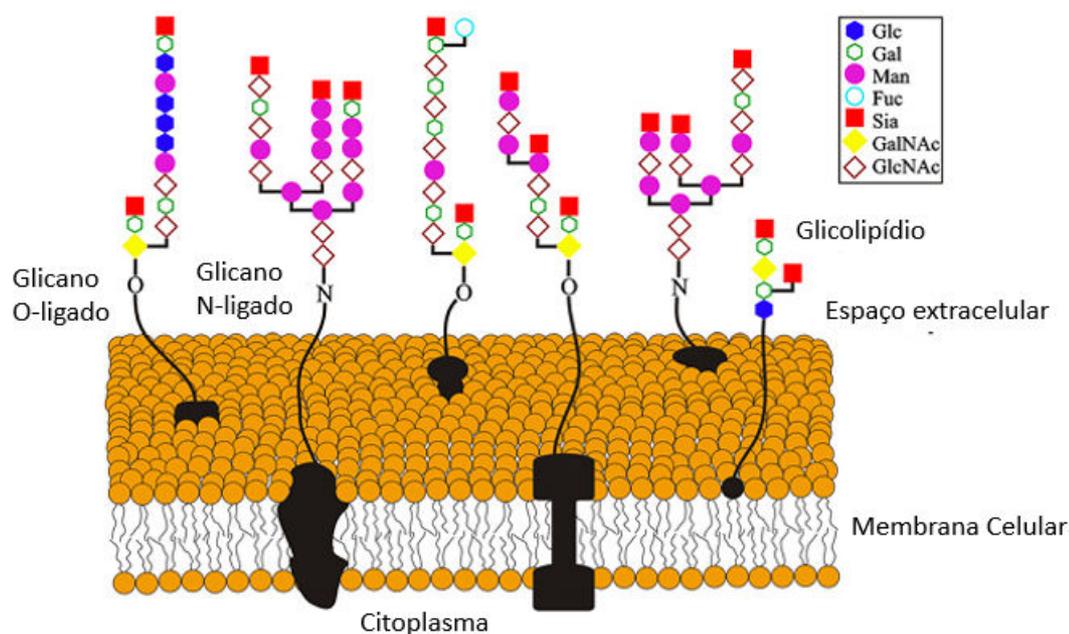
4. Conclusões	99
CONCLUSÕES GERAIS	100

1. Carboidratos e Glicobiologia

1.1 Glicoconjugados e Glicobiologia

A heterogeneidade dos carboidratos em sistemas vivos é um resultado direto de algumas de suas características: a habilidade de diferentes tipos e números de resíduos de açúcar formar ligações glicosídicas com outros, as características estruturais dessa molécula, o tipo de conformação anomérica de ligação, a ausência, presença ou posição da ramificação (Figura 01) (GORELIK *et al.*, 2001).

Figura 01 - Ilustração esquemática da heterogeneidade de carboidratos encontrados em glicoproteínas e glicolipídios da superfície de células.



Fonte: Adaptado de Ghazarian *et al.*, 2011

Para ilustra o aumento exponencial na complexidade de uma molécula de dissacarídeo, composta por duas moléculas idênticas de monossacarídeos, podemos usar como exemplo um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose com um dipeptídeo composto por duas moléculas de glicina. Nessas condições, a glicose pode formar 11 dissacarídeos diferentes, porém a glicina apenas formará um único dipeptídeo. Em uma escala ampliada, quatro diferentes aminoácidos podem formar 24 diferentes tetrapeptídeos, porém

quatro hexoses diferentes podem formar 35.560 tetrassacarídeos únicos em potencial (SHARON; LIS, 1989, 1993). Essa característica torna os carboidratos moléculas com um imenso potencial para armazenamento de informação biológica.

Além das funções já descritas anteriormente para os sacarídeos, eles também se associam com outras biomoléculas como proteínas e lipídeos e podem funcionar como rótulos de endereçamento de algumas proteínas ou como mediadores na interação célula – célula e na interação célula – matriz extracelular, além de diversas outras funções como migração celular durante o desenvolvimento, coagulação do sangue, resposta imunológica, cicatrização de lesões, reconhecimento hospedeiro-patógeno durante infecção, desenvolvimento de doenças, metástase, etc. A associação entre os carboidratos sinalizadores e outras biomoléculas formam os glicoconjugados (AKIYAMA *et al.*, 1989; SHARON; LIS, 1989, 2003; CHAMMAS *et al.*, 1991; BLOMME *et al.*, 2009 ; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2009).

O que é intrigante sobre a habilidade dos glicanos de codificar um imenso repertório de informação biológica é que eles não são codificados pelo genoma (FEIZI; MULLOY, 2003). O genoma codifica enzimas que agem nos glicanos, como glicosiltransferases e glicosidades. O nível de atividade dessas enzimas no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi e na superfície celular determina os padrões de glicosilação de glicolipídios e glicoproteínas (SHARON, 1980; OPDENAKKER *et al.*, 1993 ; ZHENG *et al.*, 1993)

A variabilidade estrutural e complexidade dos glicanos na superfície celular os permitem funcionar como moléculas sinalizadoras, de reconhecimento e de adesão (SHARON; LIS, 1989,1993 ; OFEK *et al.*, 2003a,b). Da mesma forma, glicanos estão envolvidos em muitas funções fisiológicas importantes que incluem o desenvolvimento embrionário normal, desenvolvimento, crescimento, inibição de contato, reconhecimento célula – célula, sinalização celular, reconhecimento de patógeno – hospedeiro, desenvolvimento de doenças, metástase, mobilização e localização intracelular, taxa de degradação e rigidez da membrana (SHARON, 1980; AKIYAMA *et al.*, 1989; SHARON; LIS, 1989, 2003; CHAMMAS *et al.*, 1991; OPDENAKKER *et al.*, 1993 ; ZHENG *et al.*, 1993 ; MODY *et al.*, 1995; DISNEY;

SEEBERGER, 2004 ; NIMRICHTER *et al.*, 2004 ;ZACHARA; HART, 2006 ; BLOMME *et al.*, 2009 ; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2009). Apesar das propriedades físicas e químicas dos carboidratos simples serem bem conhecidas, não é possível dizer o mesmo dos carboidratos complexos em sistemas vivos. A glicobiologia é uma área fértil e recente que está começando a ser entendida e valorizada. Estudos nessa área têm crescido nos últimos anos graças ao desenvolvimento de novas tecnologias como espectrômetros de massas mais potentes. (WORMALD; SHARON, 2004 ; OPPENHEIMER *et al.*, 2008; GOETZ *et al.*, 2009 ; POWLESLAND *et al.*, 2009; REK *et al.*, 2009 ; STRUWE *et al.*,2009 ; YAMANAKA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

1.2 Glicosilação de Proteínas

A glicosilação de proteínas é a modificação pós traducional mais comum e influencia significativamente muitos outros aspectos funcionais, incluindo localização celular, renovação e controle de qualidade de proteína (PARODI 1999; FUKUDA *et al.*, 1996; ARNOLD *et al.*, 2007)

Os oligossacarídeos podem formar ligações glicosídicas com proteínas de duas formas. A primeira forma envolve a ligação de uma GlcNAc à cadeia amina lateral de um resíduo de asparagina (N-glicosilação). A sequência de aminoácidos reconhecida para a N-ligação de carboidratos é Asn-Xaa-Ser(Thr), onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina (GORELIK *et al.*, 2001). O segundo tipo envolve a ligação do C-1 de uma GalNAc ao grupo hidroxil da cadeia lateral de um resíduo de serina ou treonina (O-glicosilação) (GORELIK *et al.*, 2001).

A N-glicosilação em eucariotos é iniciada pela adição covalente de um oligossacarídeo precursor comum contendo 14 resíduos de carboidratos (2 GlcNAc, 9 Man e 3 Glc) ao resíduo de asparagina da cadeia polipeptídica assim que esta recém sintetizada proteína é transferida para o retículo endoplasmático. Esse precursor comum de 14 carboidratos dá origem a 3 classes principais de oligossacarídeos N-ligados: (1) Oligossacarídeos "high-mannose", (2) oligossacarídeos complexos e (3) oligossacarídeos híbridos. Em algumas proteínas de eucariontes, a N-glicosilação é requerida para o correto

enovelamento da proteína no retículo endoplasmático. Nessas proteínas, 3 resíduos de glicose são removidos do oligossacarídeo precursor para o correto enovelamento. Em seguida, essa glicoproteína é transferida para o complexo de Golgi. Nessa organela, resíduos de manose podem ser removidos e outros monossacarídeos (GlcNAc, GalNAc, Gal, Fuc e Neu5Ac) podem ser adicionados no seu lugar para alongamento do oligossacarídeo. Além disso, diferentes porções da proteína podem ser glicosiladas por todas as três principais classes de N-glicanos (GHAZARIAN *et al.*, 2011).

A O-glicosilação é a modificação em glicoproteínas que é mais comumente realizada pelo complexo de Golgi (ROTTGER *et al.*, 1998). Neste tipo de glicosilação, o C-1 de uma molécula de GalNAc é ligado covalentemente à hidroxila da cadeia lateral de um resíduo de serina ou treonina na cadeia polipeptídica alvo (ROTTGER *et al.*, 1998; PATSOS *et al.*, 2009). Após a adição do resíduo de GalNAc, o enlongamento do oligossacarídeo O-ligado ocorre pela adição de outros resíduos de carboidratos como Gal, Fuc, GlcNAc e Neu5Ac (SCHACHTER; BROCKHAUSEN, 1992; MITRA *et al.*, 2006).

As principais funções da glicosilação de proteína são: modificar a sua solubilidade, carga elétrica, massa, tamanho e viscosidade em solução; controlar, modificar e estabilizar a conformação estrutural da proteína, conferir maior proteção contra proteólise, regular o tráfego e a localização dessas glicoproteínas, determinar o tempo de vida destas em circulação, participar de interações célula-célula etc. (LIS; SHARON, 1993).

A degradação de proteína é vital na regulação de processos celular e na sua sobrevivência. Proteínas como as reguladoras do ciclo celular, proteínas anti apoptóticas, fatores de transcrição e supressores de tumor precisam ser degradadas de uma forma temporal para manter a homeostasia da célula. Além disso, já foi mostrado que proteínas modificadas com O-GlcNAc são eficientemente transportadas do citoplasma para o núcleo in *Aplysia neurons*, sugerindo que O-GlcNAc pode funcionar como um sinalizador de localização nuclear alternativo ou como um sinalizador de retenção nuclear (ZACHARA; HART, 2006; HART *et al.*, 2007). Além disso, disso, a transcrição

de numerosos genes é regulada por fatores de transcrição que possuem O-GlcNAc (HANOVER, 2001 ; ZACHARA; HART, 2006).

2. Lectinas vegetais

2.1 Breve histórico

Por volta do final do século XIX, várias evidências se acumularam de que existiam proteínas na natureza com a capacidade de aglutinar eritrócitos. Essas proteínas eram chamadas de hemaglutininas ou fitohemaglutininas, pois eram em sua maioria encontradas em plantas. Acredita-se que o primeiro relato para tais proteínas foi feito por Peter Herrman Stillmark em sua tese de doutoramento na universidade de Dorpat na Estônia com o título “Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen” (Sobre a Ricina: Um fermento tóxico de sementes de *Ricinus communis* L. e algumas outras espécies de Euforbiacias). Ele havia isolado uma hemaglutinina altamente tóxica extraída de sementes de mamona (*Ricinus communis*) e a nomeado como ricina (STILLMARK, 1888). Subseqüentemente, H. Hellin isolou também uma hemaglutinina altamente tóxica de sementes de Jequirití (*Abrus precatorius*). Ambas se tornaram comercialmente disponíveis e foram utilizadas por Paul Ehrlich como antígenos modelos para estudos imunológicos, estabelecendo vários princípios fundamentais da imunologia através dessas proteínas (VAN DAMME *et. al*, 1998; SHARON; LIS, 2004)

Apenas em 1919 a primeira hemaglutinina foi purificada de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) por James B. Sumner na Universidade de Cornell (Estados Unidos). Este mesmo pesquisador recebeu o prêmio Nobel em 1942 pela descoberta de que enzimas são proteínas e podem ser cristalizadas. Em 1936 Sumner e Howell demonstraram que a Concanavalina A tem habilidade de aglutinar células como eritrócitos e fungos e precipitar glicoconjugados em solução. Eles também demonstraram que esta atividade pode ser inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade por açúcar. (SHARON; LIS, 2004).

A idéia de que a toxicidade é uma propriedade intrínseca das lectinas foi abandonada no início do século XX, depois que Ladsteiner e Raubitscheck 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 o trabalho de Landsteiner e Raubitscheck, 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).

O marco seguinte na história das lectinas vegetais foi a descoberta realizada por Renkonen, em 1948, e Boyd; Reguera, em 1949, de que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência por eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO. Começou-se a observar 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* 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 dividir ou de se diferenciar em outros tipos celulares (SHARON; LIS, 2004).

2.2 Definição

De acordo com a primeira proposta de definição de lectinas, que foi baseada em sua especificidade por açúcar e inibição da reação de aglutinação, lectinas seriam proteínas ou glicoproteínas ligantes a carboidratos de origem

não imune que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (GOLDSTEIN *et al*, 1980). Entretanto essa nomenclatura é excludente a algumas lectinas, pois só contempla aquelas com domínios múltiplos de ligação a carboidratos.

Em 1983, Kocourek e Horejsi propuseram a extensão da definição de lectinas de forma que as toxinas com baixa atividade hemaglutinante, porém com genuína cadeia lectínica fossem incluídas, porém com a observação de que as lectinas poderiam ter uma subunidade de função diferente, essa definição foi também considerada restrita (SHARON; LIS, 2004).

Em 1988 Barondes propôs a definição de que lectinas seriam proteínas ligantes a carboidratos que não anticorpos ou enzimas, porém esta classificação também excluiria as RIPs Tipo II e as Quitinases de classe I que possuem domínios ligantes a carboidratos. (SHARON; LIS, 2004)

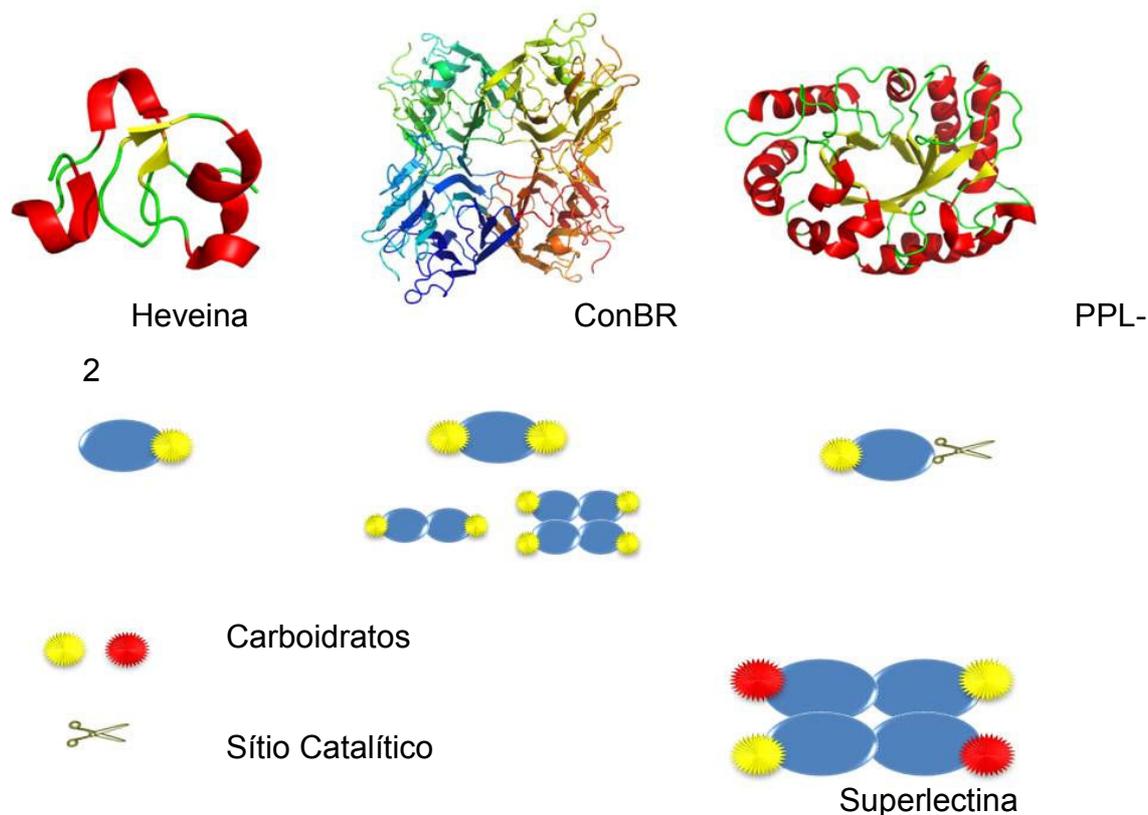
Observando todas essas nuances, Peumans e Van Damme propuseram em 1995 que as lectinas são proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico ligante reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico.

2.3 Classificação

As lectinas vegetais podem ser classificadas de acordo com a proposta de Van Damme e colaboradores (1998) que as divide em quatro grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (Figura 02).

Merolectinas são proteínas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidratos e não possuem a capacidade de oligomerização, não sendo capazes de aglutinar células e nem precipitar glicoconjugados. Um exemplo clássico desse grupo de proteínas é a lectina extraída do látex da seringueira *Hevea brasiliensis* chamada de Heveína (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

Figura 02 – Classificação das lectinas de plantas quanto a sua capacidade de ligação a carboidratos.



Proposta por Peumans e Van Damme (1995) e atualizada por Van Damme *et al.* (1998) (Adaptação).

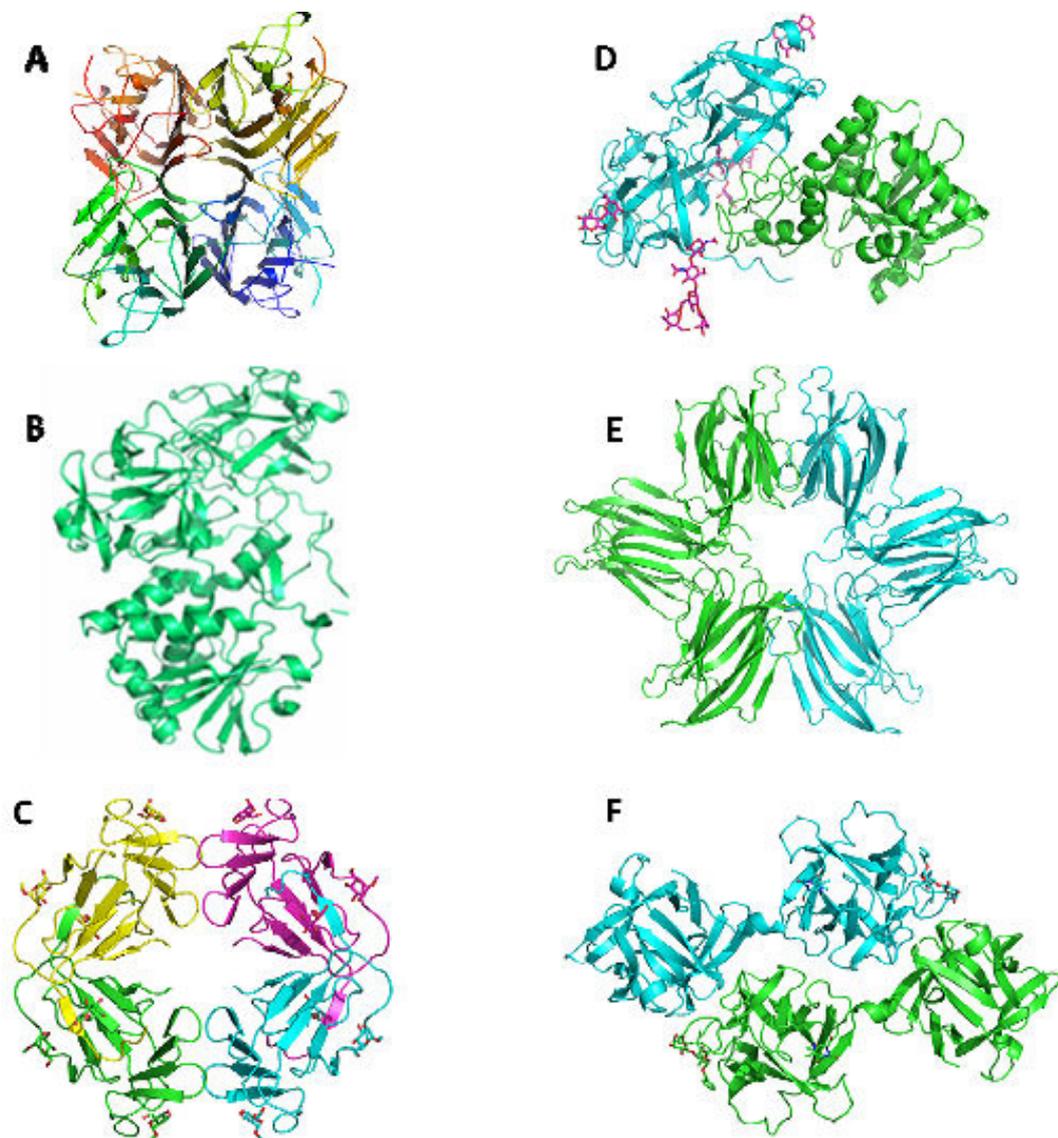
Hololectinas possuem mais de um sítio de ligação a carboidratos estruturalmente semelhantes e assim são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Nesta classificação estão contidas a maioria das lectinas extraídas de vegetais e um clássico exemplo são as lectinas da subtribo *Diocleinae* conhecidas como ConA-Like (CAVADA *et al.*, 2001).

Quimerolectinas possuem um domínio não relacionado à atividade lectínica além de um ou mais domínios de ligação a carboidrato. O principal exemplo desta classe de lectina é a Ricina, uma RIP do tipo II isolada de *Ricinus communis*, pioneira nos estudos da lectinologia (SHARON; LIS, 2004). Damos ênfase também à quimerolectina isolada de *Parkia platycephala* denominada PPL-2 que apresenta um domínio quitinásico além do domínio lectínico (CAVADA *et al.*, 2006).

Superlectinas, semelhantes às hololectinas, possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato por molécula, porém esses domínios

reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Um exemplo é a lectina de Tulipa que possui domínios ligantes a Manose e a GalNac não relacionados (VAN DAMME *et al*, 1996).

Figura 03. Classificação das Lectinas Vegetais.



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

As lectinas vegetais podem ainda ser classificadas em sete famílias acordo com Van Damme e colaboradores (1998) (Figura 03). São elas: A) Lectinas de leguminosas; B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose;

C) Lectinas ligantes a quitina; D) RIPs tipo 2; E) Lectinas relacionadas a jacalina; F) Lectinas relacionadas a amarantina e G) E lectinas de floema de Curcubitaceae. Esta classificação baseia-se em características estruturais e de afinidade a carboidratos apresentadas por essas proteínas

3. Lectinas de Leguminosa

3.1 Aspectos estruturais

Lectina é uma família de proteínas presente em todos os organismos, desde bactérias, vírus, até animais e plantas superiores (MOREIRA *et al*, 1991). Dentre as lectinas de plantas, as mais estudadas pertencem a família Leguminosae, particularmente a subfamília Papilionoideae (CAVADA *et al*, 2001).

As lectinas de leguminosa não são apenas as mais conhecidas, mas também desempenharam um papel determinante no desenvolvimento da lectinologia por serem muito abundante nas sementes, além do processo de purificação da maioria ser simples. Adicionalmente, algumas lectinas de leguminosas se tornaram ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica além de serem amplamente utilizadas como proteínas bioativas tanto na pesquisa quanto na medicina (VAN DAMME *et al*, 1998).

Sabe-se que as lectinas de Leguminosas são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas. Essa proteína possui na sua extremidade N-terminal um peptídeo sinal, com 20 a 30 resíduos de aminoácidos, que é removido posteriormente durante o transporte da pré-pro-lectina para o lúmen do retículo endoplasmático, originando uma pró-lectina. A pró-lectina passa então por uma série de modificações pós-traducionais, como glicosilação e clivagens proteolíticas, dando origem a lectina madura (SHARON; LIS, 1990).

As lectinas de leguminosas possuem entre 25 e 30 kDa e geralmente se associam como dímeros ou tetrâmeros. Estas proteínas apresentam uma grande conservação de sua estrutura monomérica, indicando extensiva similaridade seqüencial, ao mesmo tempo em que exibem uma notável

variedade de associações quaternárias com importantes implicações funcionais (SRINIVAS *et al*, 2001). As pequenas variações sequenciais e de arranjo quaternário parecem significar diferenças importantes em testes de atividades biológicas com lectinas de leguminosas *in vitro* e *in vivo* (CAVADA *et al*, 2001).

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 diversos “loops” com diferentes graus de variabilidade (SHARMA; SUROLIA, 1997). As conformações destes loops são determinadas pela presença de íons de metais de transição, como o cálcio e o manganês, na estrutura (LORIS *et al*, 1998; BOUCKAERT *et al*, 2000). A ausência desses metais resulta em uma instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al*, 2004).

Além de um sítio de ligação a carboidratos, altamente conservado, juntamente com um sítio de ligação a metais, que é responsável pela estabilização do “loop” que compõe o sítio de ligação a carboidratos, estudos recentes mostraram a capacidade de essas proteínas interagirem com compostos hidrofóbicos. Algumas lectinas de leguminosas podem interagir com outras espécies de moléculas que não carboidratos tais como adenina (HAMELRYCK *et al*, 1999) e ácido aminobutírico (DELATORRE *et al*, 2007). A ligação a essas moléculas às lectinas se dá através de uma região estrutural hidrofóbica, altamente conservada em muitas lectinas de leguminosas e que, devido a esse alto grau de conservação, pode estar envolvida em algum papel biológico importante (DELATORRE *et al*, 2007).

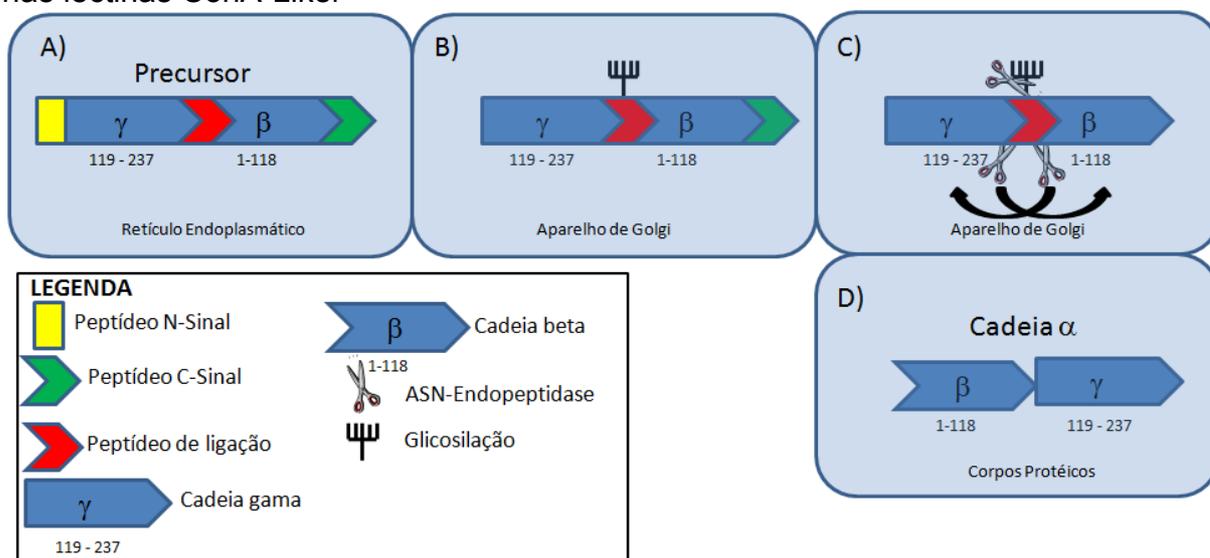
Dentro da filogenia de Leguminosas e da subfamília Papilionoideae, existem algumas tribos basais que apresentam lectinas com características bastante peculiares. São elas: Swartzieae, Sophoreae e Dalbergieae.

3.2 Processamento Pós traducional de Lectinas de Leguminosas

O processamento pós traducional mais complexo dentre as lectinas de leguminosas é aquele sofrido pelas lectinas da subtribo Diocleinae (Tribo Phaseoleae), a qual faz parte a Concanavalina A. Essas proteínas são expressas como pré-pro-proteína e são direcionadas para o retículo

endoplasmático. A pré-pro proteína é composta por um peptídeo sinal N-terminal com cerca de 20 aminoácidos que é clivado ainda no RE, duas cadeias peptídicas denominadas γ e β ligadas por uma cadeia intermediária que será glicosilada no RE e um peptídeo sinal C-terminal. Essa pré-pro-proteína glicosilada sofre novo processamento, agora no complexo de Golgi, onde perderá o peptídeo intermediário glicosilado e a região sinal C-Terminal, sendo as cadeias γ e β religadas de forma invertida em relação ao gene formando a proteína madura, denominada cadeia α (composta pelas cadeias $\beta+\gamma$) (Figura 04) (CARRINGTON *et. al*, 1985). Esse processamento pós traducional foi nomeado Permutação Circular, é mediado por uma Asn-endopeptidase. (MIN; JONES, 1994) e ocorre em outros grupos de proteínas (ULIEL *et. al*, 2001). Mesmo a re-ligação das cadeias não sendo totalmente eficiente, elas podem interagir entre si de forma não covalente formando a cadeia madura da lectina e por isso são co-purificadas em cromatografia de afinidade, sendo visualizadas nas eletroforeses (CAVADA *et al*, 2001).

Figura 04 – Processamento pós traducional (Permutação Circular) ocorrente nas lectinas ConA-Like.

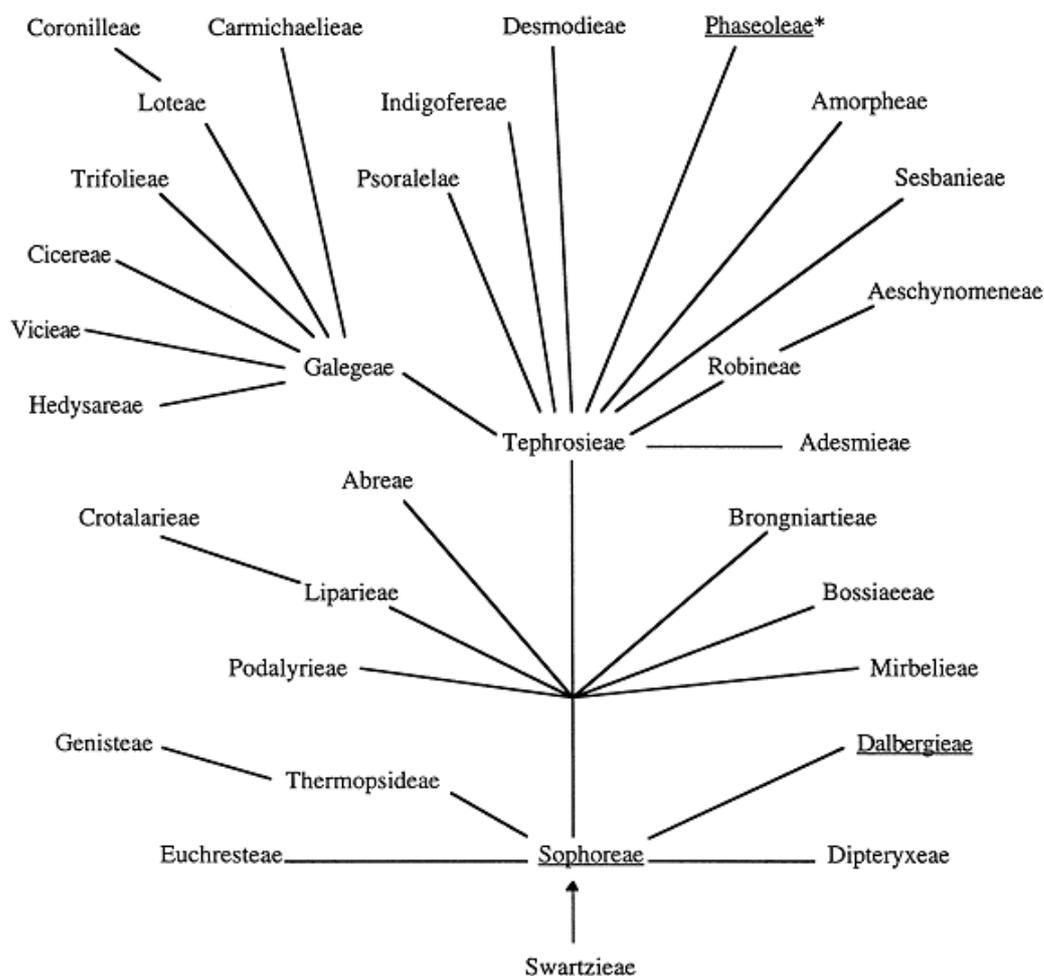


A) O Precursor é expresso no retículo endoplasmático e ainda não sofreu processamento. B) O Precursor perde o peptídeo sinal e é direcionado para o aparelho de Golgi, onde é glicosilado na região do peptídeo de ligação. C) A enzima Asparaginil endopeptidase retira a glicosilação, o peptídeo de ligação e o peptídeo c-terminal, e refaz a ligação das cadeias em ordem invertida. D) A proteína madura é então direcionada aos corpos protéicos nas sementes.

Dentro da sub-família Papilionoideae, apenas a tribo Phaseolae, sub-tribo Diocleinae, apresenta lectinas circularmente permutadas, porém, dentro

de outras tribos como Dalbergeae e Sophoreae, algumas lectinas apresentam um processamento por uma Asn-endopeptidase, gerando cadeias que não são religadas, mas que, da mesma forma que as cadeias das ConA-Like, interagem entre si e são co-purificadas por cromatografia de afinidade. Exemplos dessas lectinas são: VML, isolada de sementes de *Vatairea macrocarpa* e pertencente a tribo Dalbergeae (CALVETE *et. al*, 1998), LAA isolada de sementes de *Luetzelburgia auriculata* (OLIVEIRA *et, al*, 2002) e B-SJA-II isolada da casca de *Sophora japonica*, as últimas duas pertencente a tribo Sophoreae. Calvete e colaboradores (1998) sugeriram uma árvore filogenética para evolução das tribos da família Papilionoideae (Figura 05) e relatam que as tribos Sopotoreae e Dalbergeae são as únicas entre as tribos mais primitivas que apresentam lectinas processadas em duas cadeias, indicando que esse evento surgiu nos primórdios da evolução de Papilionoideae.

Figura 05 – Relação filogenética proposta para as tribos da sub-família Papilionoideae.



As tribos que possuem lectinas compostas de duas cadeias resultantes de processamento pós-traducional estão sublinhadas e as que possuem processamento de Permutação Circular com asterisco. Fonte: Calvete *et. al*, 1998.

3.3 Lectinas da tribo Dalbergieae

A tribo Dalbergiae, pertencente a subfamília Papilionoideae, família Leguminosae, compreende 48 gêneros e cerca de 1200 espécies. Até o presente momento foram relatadas a presença de lectinas com especificidades distintas em 11 espécies dessa subtribo (Tabela 01).

Tabela 01. Especificidade por açúcares das lectinas da tribo Dalbergieae

Espécie	Especificidade	Referência
<i>Andira fraxinifolia</i>	Man	RANGEL <i>et al.</i> , 2009
<i>Andira retusa</i>	Man	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2002
<i>Lonchocarpus araripensis</i>	GlcNAc	PIRES <i>et al.</i> , 2008
<i>Lonchocarpus carpassa</i>	Gal/GalNAc/Glc	JOUBERT <i>et al.</i> , 1986
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	GlcNAc	ALENCAR <i>et al.</i> , 1999
<i>Machaerium acutifolium</i>	GlcNAc /Glc	BEZERRA <i>et al.</i> , 2003
<i>Platymiscium floribundum</i>	Man/ GlcNAc	PEREIRA-JÚNIOR, 2012
<i>Platypodium elegans</i>	Man/Glc	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2008
<i>Pterocarpus angolensis</i>	Man/Glc	LORIS <i>et al.</i> , 2003
<i>Vatairea macrocarpa</i>	Gal/GalNAc	CAVADA <i>et al.</i> , 1998

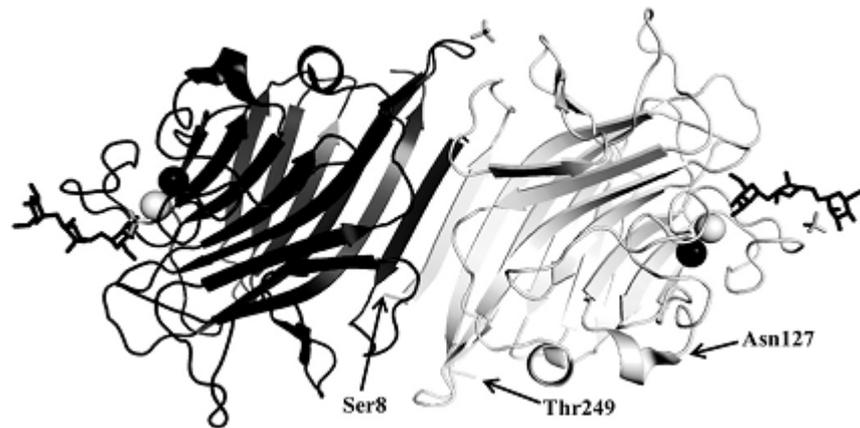
A lectina extraída de *Vatairea macrocarpa* é uma proteína ligante a galactose/n-acetil-galactosamina, formada por 4 subunidades de 26 kDa, que formam um tetrâmero em solução independente de pH (RAMOS *et al.*, 2000). Seus efeitos biológicos descritos incluem indução da infiltração de leucócitos em edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2004), liberação de mediadores quimiotáticos por macrófagos (ALENCAR *et al.*, 2007), aumento da resistência vascular renal, taxa de filtração glomerular e fluxo urinário (MARTINS *et al.*, 2003), migração de neutrófilos *in vivo* por mecanismo indireto (ALENCAR *et al.*, 2003) e apresenta especificidade para resíduos de antígeno do tipo Tn (DAM *et al.*, 2007).

Algumas atividades biológicas também foram evidenciadas em uma lectina extraída de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, como alta atividade antiinflamatória em modelo de edema de pata (ALENCAR *et al.*, 1999), efeito antiinflamatório e antibacteriano em um modelo de peritonite infecciosa (ALENCAR *et al.*, 2005), diminuição da migração leucocitária e hipernocicepção mecânica pela inibição da produção de citocinas e quimiocinas (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

Segundo Pires *et al.* 2008, a lectina de *Lonchocarpus araripensis* (LaL) possui ação antiinflamatória sobre o edema de pata induzido por carragenina, mas é desprovida de ação pró-inflamatória quando injetada localmente.

A lectina glicose/manose específica de *Platypodium elegans* (PEL) apresentou atividade termiticida contra operários e soldados de *Nasutitermis corniger*, além de potencial fungicida contra os fungos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporium* e *Fusarium lateritium* (BENEVIDES *et al.*, 2008). Essas duas atividades reforçam a participação de lectinas na defesa vegetal, atuando contra fitopatógenos. Além disso, a lectina de *P. elegans* também foi clonada e submetida a estudos de microarranjos de glicanos, demonstrando uma afinidade não usual para lectinas de leguminosas ligantes a Man tanto pelo microarranjo de glicanos quanto por microcalorimetria de titulação isotérmica. PELa (como foi chamada a proteína recombinante) também teve sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de difração por raios X e demonstra a estrutura conservada de lectinas de leguminosas que pode ser observada na figura 06 (BENEVIDES *et al.*, 2012).

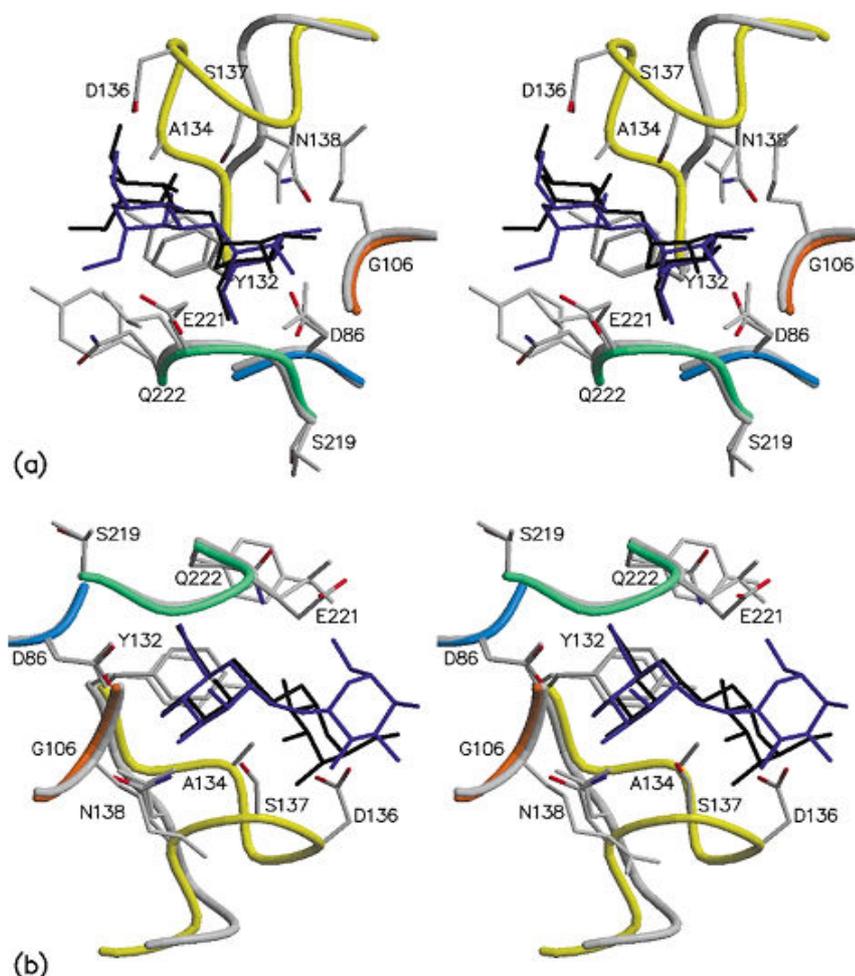
Figura 06 – Estrutura geral da lectina PELa



A figura representa a formação do dímero canônico de PELa complexada com um tri-sacarídeo de manose.

Dentre as lectinas da tribo Dalbergiae, a lectina Glc/Man específica de *Pterocarpus angolensis*, denominada PAL, foi a primeira a apresentar estrutura tridimensional determinada (LORIS *et al.*, 2003). A sua estrutura contém um *loop* clássico de especificidade a manose, mas seu *loop* de ligação a metal se assemelha ao de lectinas com especificidade não-relacionada, como *Ulex europeus* e *Maackia amurensis*. As interações com manose no sítio de ligação primário são conservadas, mas detalhes da extensão desse sítio de ligação a carboidratos difere de outros vistos em complexos a carboidratos equivalentes em ConA (Figura 07). Essas observações explicam as diferenças em seu respectivo perfil de especificidade fina a oligomanoses. (LORIS *et al.*, 2004).

Figura 07 Reconhecimento de Man(α 1-3)Man e Man(α 1-6)Man por *Pterocarpus angolensis* lectin (PAL).



A. Estéreo visão do sítio de ligação a carboidrato em complexo com Man(α 1-3)Man. O dissacarídeo é mostrado em azul e os *loops* de PAL estão nas cores laranja e amarelo. O *loop* equivalente e as cadeias laterais do complexo ConA-Man(α 1-3)Man estão mostrados em cinza claro. O dissacarídeo ligado a ConA é mostrado em preto. B. Estéreo visão similar do complexo PAL-Man(α 1-6)Man superposto sobre o complexo ConA-Man(α 1-6)Man (Adaptado de Loris et al., 2004).

Outros estudos realizados investigaram a interação entre o sítio de ligação de metal, atividade de reconhecimento e ligação a carboidratos, estabilidade e estrutura da lectina de *P. angolensis*. Estes resultados juntos com dados termodinâmicos contribuem para o melhor entendimento das interações lectina-carboidrato (GARCIA-PINO *et al.*, 2006; GARCIA-PINO *et al.*, 2007; BUTS *et al.*, 2006).

Estudos estruturais de lectinas da tribo Dalbergieae ainda são escassos, o que torna limitante a tentativa de se descrever certos mecanismos de ação baseado na afinidade diferencial frente a ligantes específicos. Além

disso, a presença de isoformas e glicofomas impedem o estudo individual de cada espécie, tanto do ponto de vista estrutural como da caracterização biológica.

3.4 Lectinas da tribo Sophoreae

A tribo Sophoreae é composta por 43 gêneros e 209 espécies. Nesta tribo existem relatos de 8 lectinas purificadas, sendo que entre elas 5 foram extraídas da espécie *Sophora japônica* (Tabela 02). A lectina extraída das sementes (SJA) reconhece carboidratos contendo manose / glicose e seus derivados (PORETZ *et al*, 1974).

Tabela 02. Especificidade por açúcares das lectinas da tribo Sophoreae purificadas de a partir de diferentes tecidos vegetais.

Espécie	Especificidade	Tecido	Referência
<i>Sophora flavescens</i>	Man/Glc	Raiz	DENG <i>et al.</i> , 2000
<i>Bowringia mildbraedii</i>	Man/Glc	Semente	ANIMASHAUN; HUGHES, 1989
<i>S. japônica (SJA)</i>	GalNAc/Gal	Semente	PORETZ <i>et al</i> , 1974.
<i>S. japônica (B-SJA I)</i>	GalNAc/Gal	Casca	GOLDSTEIN; HAYES, 1978
<i>S. japônica (B-SJA II)</i>	Man/GlcNAc	Casca	GOLDSTEIN; HAYES, 1978
<i>Sophora japonica</i>	GalNAc/Gal	Folha	ITO, 1986
<i>Sophora japonica</i>	GalNAc/Gal	Flor	ITO, 1986
<i>Luetzelburgia auriculata</i>	GalNAc/Gal	Semente	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2002

SJA é uma lectina tetramérica composta por dímeros de dímeros e sua estrutura quaternária possui 132 kDa. As unidades monoméricas estão ligadas entre si por pontes dissulfeto e a interação entre os dímeros para formar o tetrâmero se dá por contatos não covalentes. SJA se apresenta como uma glicoproteína que contem em torno de 7,8% de carboidratos (.PORETZ, 1972, ALLEN; JOHNSON, 1976). SJA é um produto biotecnológico que está comercialmente disponível para revenda. Esta proteína tem sido utilizada em diversos estudos de marcação de células diferenciadas. Um exemplo é a utilização de SJA para identificação de células nucleadas presentes em

amostras de urina, onde é possível diferenciar células oriundas do túbulo proximal (positivas para os testes com SJA) e oriundas do túbulo distal (negativas para os testes com SJA). (GRUPP *et al.*, 2001). SJA também foi utilizada para identificar glicoproteínas que continham resíduos de GalNAc presentes em subestruturas das cromátides de células de hamster chinês durante a divisão celular na metáfase (MYLLYHARJU; NOKKALA, 1996^{a,b}).

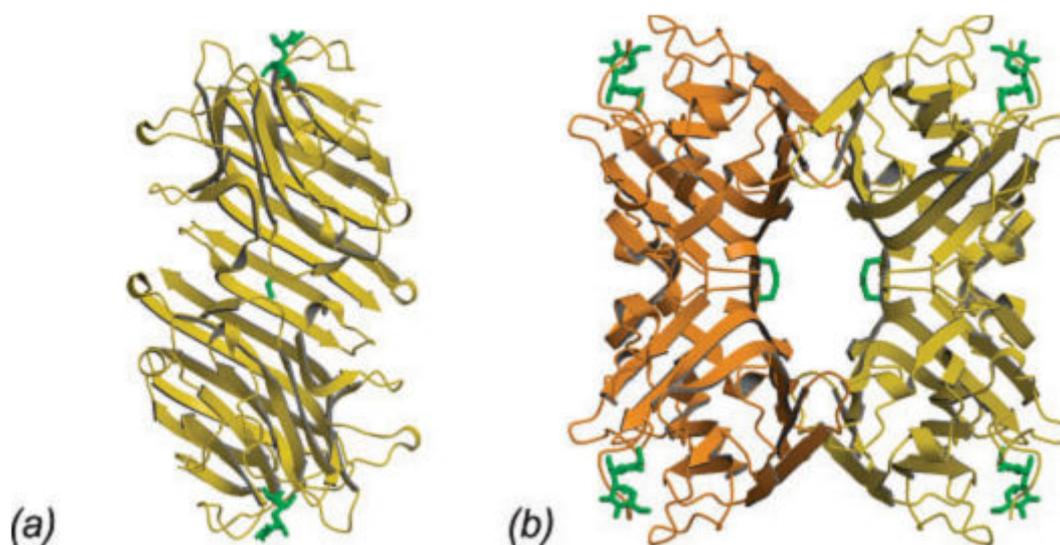
As lectinas isoladas de outras partes de *Sophora japonica* apresentam-se em eletroforese como uma banda em torno de 30 kDa e subunidades entre 14 e 17 kDa, o que demonstra que essas lectinas sofrem processamento similar ao apresentado por VML (ITO, 1986).

Deferente de SJA, A lectina de sementes de *Sophora flavescens*, que possui peso molecular de SFL de 32 kDa para o monômero, tem especificidade por Man/Glc e aglutina tanto eritrócitos humanos como de coelhos.(DENG *et al.*, 2000). Além disso o cDNA completo de SFL foi clonado e a sequência depositada (Genbank AF28512-1) deduz uma sequência de aminoácidos contendo uma pré proteína com 284 resíduos de aminoácidos que após processada produzirá uma proteína madura contendo 254 aminoácidos e um sítio de N-glicosilação em Asn182 (MA *et al.*, 2001). Também é relatada atividade antifúngica para SFA (DENG *et al.*, 2000). SFL causou a morte de células HeLa por ambos citotoxicidade direta e apoptose. Curiosamente, a apoptose induzida por SFL é de uma forma típica da caspase-dependente (LIU *et al.*, 2009).

A lectina de *Luetzelburgia auriculata* foi isolada por Oliveira e colaboradores (2002) por cromatografia de afinidade em coluna de GalNAc e se apresenta como um homotetrâmero em pH 7,6. Essa lectina é uma glicoproteína com cerca de 3,2% de carboidratos ligados, perde a atividade hemaglutinante após aquecida a 80°C e como a lectina de *Vatairea macrocarpa*, apresenta processamento em cadeias, sendo composta por uma cadeia alfa madura de 29kDa e duas de 15kDa (calculadas por eletroforese). LAA também apresenta a capacidade de inibir o crescimento dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium solani* e *Aspergillus niger* além de prejudicar a acidificação estimulada por glicose do meio de incubação de células de *Saccharomyces cerevisiae* (MELO *et al.*, 2005).

Dentre as lectinas da tribo Sophoreae, a única que possui estrutura tridimensional resolvida é a isolada de sementes de *Bowringia mildbraedii* (BMA). BMA é sintetizada como um precursor de 29-kDa que é clivada em cadeias α e β de tamanho aproximadamente igual (CHAWLA *et al.*, 1993). A cadeia β contém um único resíduo de cisteína que participa de uma ligação dissulfeto entre os dois monómeros. A proteína possui 48% de identidade de sequência com concanavalina A (Con A), que é a lectina de leguminosa mais extensivamente estudada em termo de sua estrutura. A estrutura cristalográfica de BMA foi resolvida em complexo com Man(α 1-2)Man (Figura 08). O dissacarídeo se liga a BMA exclusivamente no modo “downstream” com a manose não redutora ocupando o sítio principal de ligação a carboidrato. A manose redutora se liga em um subsítio polar predominante envolvendo Tyr131, Gln218 e Tyr219 (BUTS *et al.*, 2006).

Figura 08 – Estrutura cristalográfica de BMA.



a) Formação do dímero canônico de BMA. b) Formação tetramérica de BMA a partir dos dados cristalográficos.

Assim como em Dalberieae, é possível observar que as lectinas extraídas de espécies da tribo Sophoreae possuem uma diversidade de afinidades por açúcares entre as espécies e até mesmo dentro da mesma espécie, alterando apenas o tecido. No caso da *S. japônica*, é possível verificar a existência de lectinas com especificidade diferentes no mesmo tecido. Apesar

do gênero apresentar uma quantidade significativa de espécies, poucas são exploradas para extração de lectinas.

3.5 Lectinas da tribo Swartzieae

A composição da tribo Swartzieae tem sido objeto de discussões na literatura, com referências de até 15 gêneros. A tribo consiste do gênero tipo (com 143 espécies) e de outros 11 gêneros (com um total de cerca de 50 espécies), todos de regiões tropicais da África e do Novo Mundo (POLHILL, 1994). O primeiro relato de lectina de uma espécie dessa tribo foi para a espécie *S. pickelli* (CAVALCANTE; COELHO, 1990). Os autores relatam que *S. pickelli* apresenta atividade hemaglutinante contra sangue de diversas espécies animais e contra o sistema ABO humano e após fracionar o extrato em pH 7,5, os autores verificam que a atividade hemaglutinante se concentra na fração de 20 a 40% de saturação com sulfato de amônio e sugerem que essa fração deve ser trabalhada futuramente a fim de purificar a referida lectina. Desde então não foram lançados novos trabalhos envolvendo lectina dessa espécie.

Fernandes e colaboradores (2011) identificaram atividade hemaglutinante em nos extratos de *S. laevicarpa* após cromatografia de troca iônica. Eles relataram a presença de uma lectina ligante a galactose e seus derivados que foi isolada em cromatografia de afinidade em coluna de lactose imobilizada. A referida lectina isolada apresenta massa molecular aparente de 30 kDa e também apresenta fragmentos. Essa lectina foi isolada e denominada SLL, que é uma glicoproteína. A sequência N-terminal foi determinada por degradação de Edman e revelam homologia de SLL com outros grupos primitivos como (Dalbergieae e Sophoreae). SLL também não apresentou atividade antifúngica contra diversos fungos fitopatogênicos ou citotoxicidade contra diversas linhagens celulares de câncer (FERNANDES *et al.*, 2012).

Como pode ser visto, os estudos de lectinas das tribos basais da subfamília Papilionoidea são poucos e existe apenas uma lectina isolada de espécies da tribo Swartzieae. Tendo em vista que a sequência das lectinas exibem também relações filogenética entre os clados, a purificação e caracterização de novas lectinas dessas espécies são de suma importância

filogenética, além da relevância biotecnológica amplamente conhecida para esse grupo de proteínas.

4. Estudos de interação proteína-ligante

4.1 Estudos de interação entre Lectinas vegetais e Carboidratos.

Como já relatado nesse trabalho de tese, as lectinas tem a propriedade de interagir com carboidratos diversos sem modifica-los enzimaticamente. Essa interação entre as lectinas e os carboidratos têm diferentes intensidades. Compreender essa forma de ligação é de fundamental importância no estudo de funções e atividades biológicas de lectinas.

Os arranjos de glicanos são ferramentas potentes e rápidas que permitem a análise de interação de uma lectina com uma grande quantidade de glicanos. O Consortium for Functional Glycomics é uma iniciativa de pesquisa internacional que disponibiliza a sua estrutura como arranjos de glicanos, banco de reagentes, acesso a um amplo banco de dados de glicoma e a ferramentas de análise de forma totalmente gratuita, exigindo apenas que o resultado das análises fiquem disponíveis para acesso no banco de dados público da iniciativa.

Atualmente o Consortium for Functional Glycomis disponibiliza um arranjo de glicanos contendo 465 glicanos naturais e sintéticos o que permite de forma rápida conhecer qual o padrão de reconhecimento de uma proteína ligante a glicanos, como lectinas. Apesar de ser uma poderosa ferramenta, o arranjo de glicanos não apresenta um dado quantitativo exato da interação da lectina com o seu ligante.

Uma das formas de análise dessas interações são por estudos da termodinâmica de ligação. Diversas técnicas podem ser utilizadas para aferir os parâmetros termodinâmicos da ligação de lectinas a carboidratos. As mais utilizadas são a ressonância plasmônica nuclear e a microcalorimetria de titulação isotérmica.

4.2 Princípios básicos de Bioenergética e Termodinâmica

A bioenergética é o estudo quantitativo de transduções energéticas que ocorrem em uma célula viva bem como da natureza e da função dos processos químicos envolvidos nessas transduções. Todos esses processos químicos são regidos pelas leis da termodinâmica. As trocas de energias que ocorrem nas reações químicas são descritas por três parâmetros termodinâmicos:

Energia livre de Gibbs (ΔG) – A energia livre de Gibbs expressa a quantidade de energia capaz de realizar trabalho durante uma reação a temperatura e pressão constante. Quando a reação ocorre com liberação de energia, a variação de energia (ΔG) possui um valor negativo e a reação é dita exergônica. Quando o ΔG possui um valor positivo, a reação ocorre com absorção de energia e é dita endergônica.

Entalpia (H) – É o conteúdo de calor do sistema reagente. Ele reflete o número e o tipo de ligações químicas nos reagentes e produtos. A variação de entalpia (ΔH) é negativo quando a reação libera calor e é chamada de exotérmica. Quanto a reação química absorve calor, o valor de ΔH é positivo e a reação é endotérmica.

Entropia (S) – É uma expressão quantitativa da aleatoriedade ou desordem de um sistema. Quando os produtos de uma reação são menos complexos e mais desordenados do que seus reagentes, a reação ocorre com a variação de entropia (ΔS) positiva.

As condições de pressão e temperatura constante de sistema biológicos permitem que as variações de energia livre, entalpia e entropia sejam relacionadas quantitativamente pela equação $\Delta G = \Delta S - T \Delta H$, onde T é a temperatura e os demais parâmetros já foram identificados.

4.3 Microcalorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Um microcalorímetro de titulação isotérmica consiste em duas células que estão em um sistema adiabático. Uma das células, a célula amostra, conterá a solução de proteína a ser analisada e a segunda célula, a célula referência, conterá o mesmo tampão em que a amostra foi diluída. Na célula amostra será injetado o ligante ao qual se deseja verificar a interação em

intervalos de tempo iguais por uma micro seringa automática. As injeções serão realizadas até a total saturação da solução de proteína contida na célula amostra. Cada adição de ligante provoca uma troca de calor refletindo a interação macromolécula-ligante. O sinal gerado é proporcional à quantidade de complexo formado. A máquina mede a quantidade de energia necessária para trazer as duas células à mesma temperatura. A medida é a potência elétrica fornecida ao longo do tempo para cada injeção ($\mu\text{cal} / \text{sec}$), e depois ela é integrada.

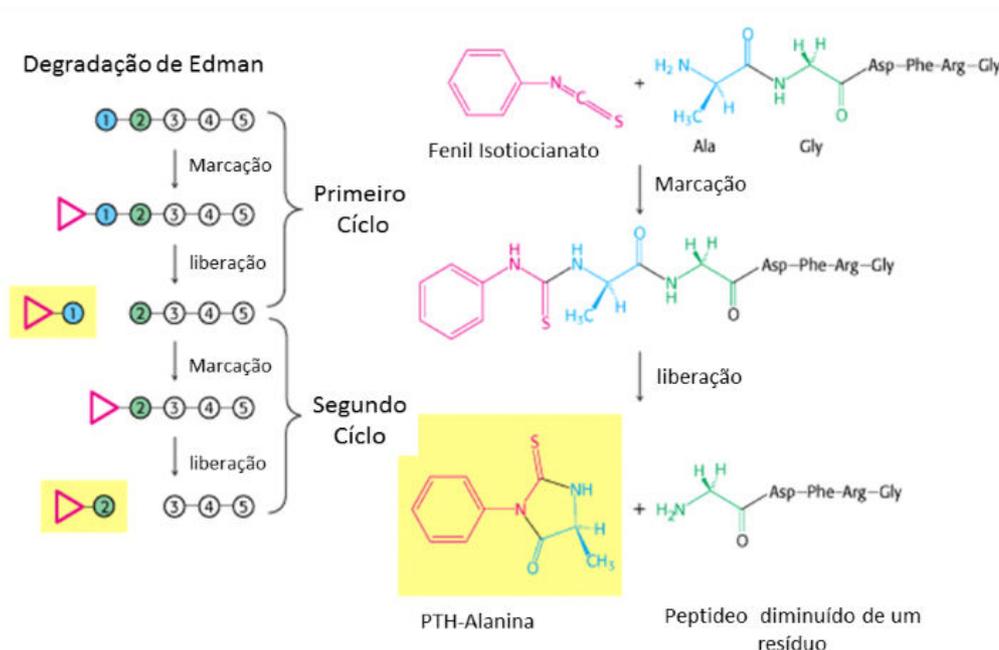
Quando as condições experimentais são ótimas, a curva obtida é de forma sigmóide. Um software de processamento de resultados calcula uma curva teórica que se sobrepõe aos pontos experimentais. A partir da curva, é possível extrair os parâmetros da interação. As informações sobre o ponto de inflexão indicam a estequiometria (n), a magnitude da curva informa sobre a entalpia (ΔH), enquanto que a inclinação da curva indica a afinidade (K_a). A partir desses valores e usando as equações da termodinâmica, é possível encontrar outros parâmetros tais como a entropia da interação (ΔS), variação da energia livre (ΔG), constante de dissociação (K_d) dentre outros parâmetros de interesse.

5. Estudos da estrutura primária de proteínas

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

09). 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.

Figura 09 – Reação esquemática da química derivativa de Edman.



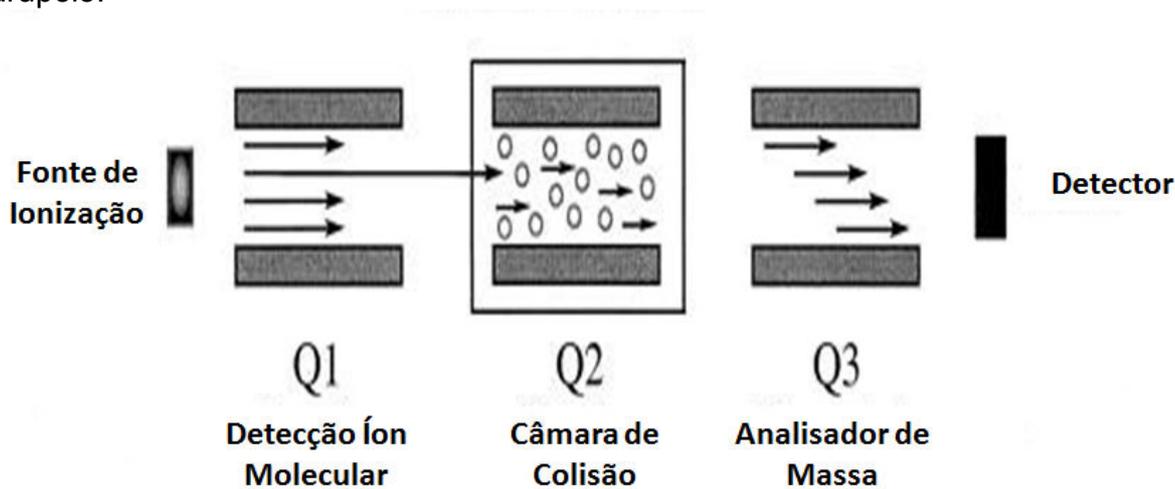
A amina livre do primeiro aminoácido da proteína (N-terminal) é induzida a reagir com o Fenil isotiocianato a fim de formar um PTH-Aminoácido. Esse então é clivado do restante da sequência protéica e identificado. Essa reação é feita ciclicamente a fim de identificar uma sequência de aminoácidos. Fonte: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

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.

A possibilidade da criação de espectrômetros de massas que contém mais de um analisador de massa iguais ou diferentes foi outro 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 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 10.

Figura 10 – Esquema de um espectrômetro de massa híbrido do tipo triplo quadrupolo.



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. Adaptado de Hoffman, 2007.

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 saldo de qualidade nas análises de estrutura de peptídeos, possibilitando diferenciar aminoácidos que possuem diferenças de milidalttons 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 massa sequencial para confirmar a sequência de aminoácidos e desvendar a sequência de glicanos ligados.

6. Generalidades sobre a espécie e a Tribo em estudo.

O centro de diversidade da tribo Swartzieae situa-se na Amazônia e sua distribuição estende-se para a América Central e sudeste do Brasil, com apenas nove espécies ocorrendo na África e Madagascar (POLHILL, 1981). A região sudeste do Brasil apresenta diversas formações vegetais, como Cerrado, Caatinga, Floresta Estacional e Floresta Pluvial Tropical Atlântica (segundo Fenname 1983), oferecendo uma grande diversidade de habitats. Além dessa diversidade, a região sudeste foi destacada por MORI e colaboradores (1981) e por THOMAS e colaboradores (1998) por conter determinadas áreas com alto endemismo. Estudos taxonômicos realizados com a tribo Swartzieae (MANSANO 1997, MANSANO; TOZZI, 1999) evidenciam sua riqueza específica e diversidade na região sudeste do Brasil.

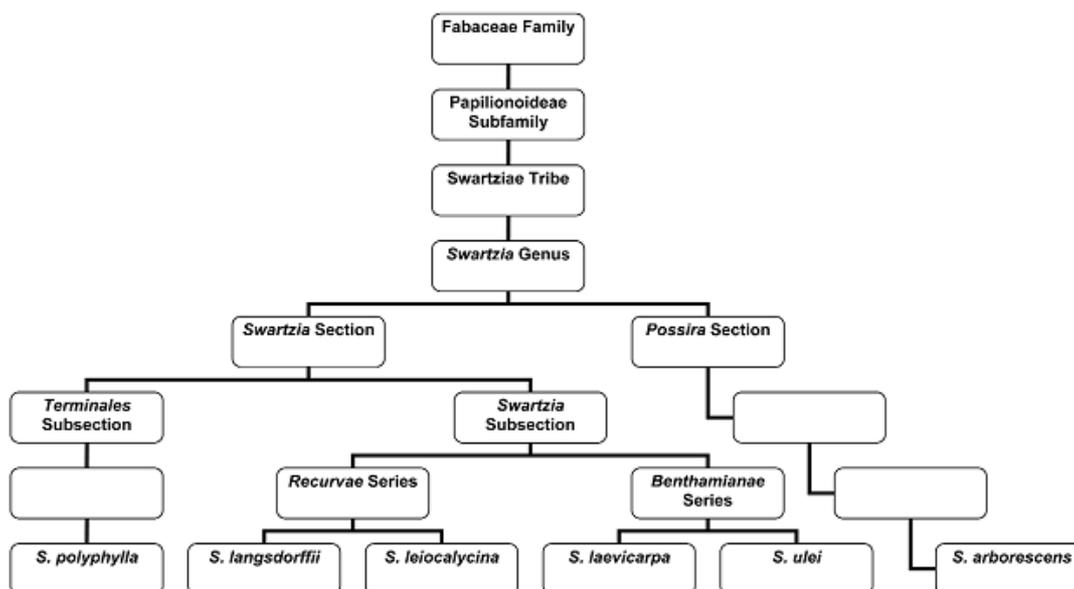
A posição sistemática da tribo Swartzia é discutida há muito tempo. Quando descrita por De Candolle (1825), esta foi colocada como uma nova subfamília diferente de Caesalpinoideae e Papilionoideae, tendo em vista que apresentava características das duas. Bentham em 1865 coloca Swartzia como tribo basal de Papilionoideae, próxima a Caesalpinoideae, porém em 1892 Taubert recoloca Swartzia como membro de Papilionoideae. Corner (1951, 1976) recoloca Swartzia como uma subfamília independente (da mesma forma que De Candolle) baseando-se em evidências na anatomia das sementes de *Swartzia pinnata* que é mais relacionada às sementes de Caesalpinoideae. Em 1976, Corner examinando a anatomia de sementes de *S. madagascariensis* verifica que essa difere da anatomia de sementes de Caesalpinoideae em diversos aspectos e se assemelha às sementes de Papilionoideae. Polhill e colaboradores em 1981 recolocam Swartzia na subfamília Papilionoideae com base nas evidências primariamente estabelecidas por Corner. (TURKER, 2003).

Algumas características das flores de Swartzieae compartilhadas com Caesalpinoideae são a similaridade do pólem, perda de alguns órgãos florais, um cálice inteiro, similar aos do gênero *Bauhinia* (pertencente à Caesalpinoideae). A base do posicionamento de Swartzieae em Papilionoideae incluem características da anatomia do caule, citologia do floema, características químicas e a existência de nódulos (TURKER, 2003).

Mesmo dentro do gênero, existem variações e divisões baseadas em características morfológicas e químicas de Swartzia. Segundo Magalhães e colaboradores (2006), o gênero Swartzia pode ser dividido em 2 sessões, a sessão *Possira* e a sessão *Swartzia*. A sessão *Swartzia* ainda pode ser dividida em duas subseções: *Terminales* e *Swartzia*. Essa segunda subseção também é dividida em sete séries, porém o autor demonstra espécies de apenas duas delas: *Recurvae* (mais primitiva) e *Benthamiane* (mais recente). A figura 11 mostra a divisão dentro do gênero Swartzia e a classificação de 6 espécies estudadas por Magalhães e colaboradores (2006). Nesse trabalho o autor utiliza índices químicos como método de classificação taxonômica, dividindo as espécies estudadas em dois grupos: As que produzem flavonoides e as que

produzem diterpenos abietanos. Diante dos resultados obtidos, o autor sugere a modificação de *S. langsdorff* para a sessão Possira.

Figura 11 – Classificação botânica de espécies de Swartzia

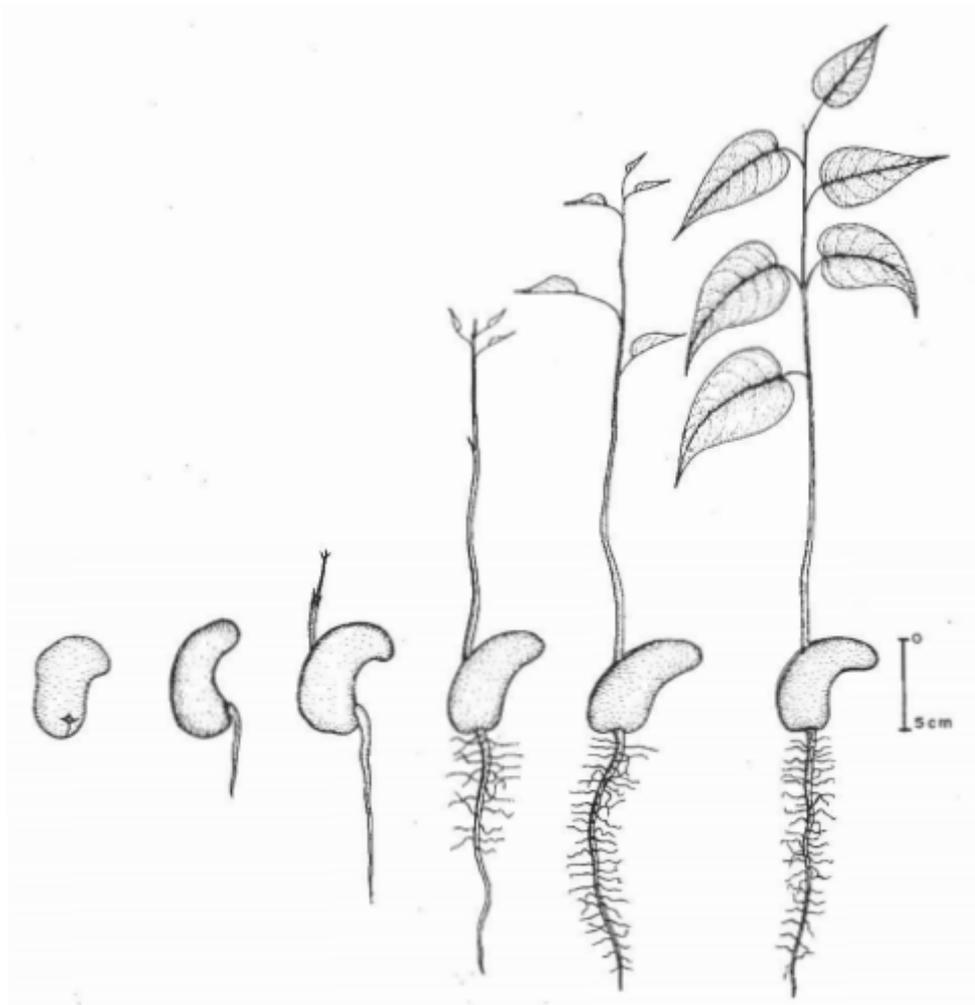


Fonte: Magalhães *et al*, 2006.

Dentre muitas espécies da tribo, neste trabalho a espécie *Swartzia laeviscarpa* foi a utilizada. Conhecida popularmente como Saboarana, ou Saboarana branca, sua madeira é utilizada na fabricação de móveis de luxo, carpintaria e construções em geral. É encontrada principalmente no estado do Amazonas, Pará e na região norte. Ocorre ainda no Suriname, Guianas, Venezuela e Colômbia. Apesar de ser utilizada na indústria madeireira de modo extrativista, esta espécie não se encontra relatada como ameaçada pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (MADI, 2013; IUCN, 2012)

A espécie possui hábito arbóreo, de médio a grande porte e cascas exudando seiva amarela. As sementes dessa espécie apresentam polimorfismo acentuado e após testes de germinação foi observado que elas podem ser poliembriônica, apresentando até 3 embriões em uma única semente. As sementes apresentam alta viabilidade pelo menos após 8 dias de coletas quando coletadas no mês de maio (cerca de 94% de germinação). (MADI, 2013; MOREIRA *et al*, 1995). Na figura 12 é possível visualizar uma sequência de diferentes estágios de plântulas de *S. laeviscarpa*.

Figura 12 – Estágios de desenvolvimento de plântulas de *S. laevicarpa*.



Fonte: Moreira *et al*, 1995.

Apesar de muitos relatos de produtos naturais extraídos de várias espécies de *Swartzia*, para *S. laevicarpa* apenas há o relato da purificação de uma lectina (SLL, relatado no item 3.5 deste capítulo). Existem dois depósitos de sequência parcial de RUBISCO (subunidade maior) com 8 aminoácidos e de uma aspartato aminotransferase com 95 aminoácidos, ambos oriundos do sequenciamento de regiões do DNA genômico extraído de folhas jovens com a finalidade de análises filogenéticas do clado Swartzioide realizados por Torke e Schaal (2008).

O nome popular Saboarana representa um apelo comercial forte devido ao valor comercial de sua madeira e nomeia também diversas ruas e também um projeto social desenvolvido no município de São Sebastião do Uatumã /

AM. Maiores detalhes do referido projeto social pode ser visualizado no endereço <http://www.youtube.com/watch?v=Nyip08vNPnk>

7. Objetivos

7.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo purificar uma nova lectina de sementes de *Swartzia laevis*, caracteriza-la físico-quimicamente e por espectrometria de massas e testa-la quanto a sua capacidade de causar inflamação e dor em ratos e quanto a sua citotoxicidade contra náuplios de *Artemia sp.*

7.2 Objetivos Específicos

- ✓ Purificar uma lectina de sementes de *Swartzia laevis*;
- ✓ Analisar a lectina quanto a sua massa molecular aparente por Eletroforese e Exclusão molecular;
- ✓ Analisar a lectina quanto a presença de glicanos;
- ✓ Analisar a resistência da proteína ao aumento da temperatura e alterações do pH;
- ✓ Verificar a dependência da lectina à metais divalentes;
- ✓ Analisar a afinidade da lectina a diferentes carboidratos e glicoproteínas por microcalorimetria de titulação isotérmica;
- ✓ Verificar o efeito inflamatório da lectina isolada em camundongos;
- ✓ Analisar a toxicidade de SLA contra *Artemia sp.*
- ✓ Determinar a massa molecular da proteína purificada e identificar possíveis isoformas e/ou glicofomas;
- ✓ Determinar a sequência parcial da lectina e analisa-la quanto a similaridade entre outras lectinas.

**CAPÍTULO II – Purificação, e Caracterização físico-química parcial
de uma nova lectina de sementes de *Swartzia laevicarpa***

1. Metodologia

1.1 Coleta e Higienização das sementes

As sementes de *Swartzia laevicarpa* foram coletadas na região Manaus – AM em uma estação do Instituto Nacional para Pesquisa da Amazônia e gentilmente cedidas pelo professor Dr Luiz Augusto Gomes de Souza. Ao chegar no laboratório, as sementes foram inicialmente colocadas em agitação em uma solução de 5% de hipoclorito de sódio a fim de retirar as impurezas presentes em seu tegumento. Em seguida, a semente foi lavada em água destilada em abundância e posta para secar em temperatura ambiente por 24h.

1.2 Extração de proteínas totais solúveis e fracionamento por sulfato de amônio

As sementes higienizadas foram trituradas com auxílio de um grau e pistilo e a farinha obtida foi submetida a moagem em um moinho doméstico para sementes de café. Essa farinha foi peneirada em peneira comercial e a farinha fina foi utilizada para extração das proteínas.

Foram realizadas extrações de proteínas em 0,1M de Glicina em pH 2,6 e 9,0 e 0,1M de Tris HCl pH 7,6, sendo que todas as soluções continham NaCl 0,15M. As extrações foram realizadas na proporção de 1:10 (p/v).

As suspensões foram centrifugadas a 10.000 x g por 20 minutos à 4°C e filtradas em papel filtro à pressão ambiente. Os extratos foram então denominados de E1 (pH 2,6), E2 (pH 7,6) e E3 (pH 9,0).

Cada extrato foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio sólido nas faixas de solubilidade de 0 a 30% de saturação, 30 a 60% de saturação e 60 a 90% de saturação. Durante todo o processo a Atividade hemaglutinante (A.H.), a dosagem de proteínas e a atividade específica (A.E.) foram utilizadas como parâmetro de avaliação das frações.

1.3 Cromatografia de troca iônica

A fração que apresentou maior atividade específica e menor atividade hemolítica foi submetida à cromatografia de troca iônica do tipo aniônica em

coluna de DEAE-Celulose. A fração oriunda da precipitação de sulfato de amônio foi dialisada contra água destilada exaustivamente e em seguida foi adicionado tampão Tris HCl pH 8,0 até uma concentração de 0,05M. A coluna foi equilibrada com o mesmo tampão. A fração foi aplicada à coluna e as proteínas não retidas foram lavadas com o tampão de equilíbrio. Em seguida a coluna foi eluída com o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,1M; 0,3M; 0,5M e 1M. Cada pico foi separado e avaliado quanto a atividade hemaglutinante, concentração de proteínas e atividade específica.

1.4 Cromatografia de Exclusão Molecular

O Pico oriundo da coluna de DEAE que apresentou melhor atividade específica foi submetido a diálise exaustiva e em seguida liofilizado. O material liofilizado foi então solubilizado em tampão Tris HCl 0,1M pH 8,0 contendo 0,5M de NaCl numa concentração de 10mg/mL e em seguida aplicado à uma coluna de exclusão molecular Sephacrill – S300 acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta performance (AKTA Purifier). As frações eluídas foram coletadas e avaliadas quanto a atividade hemaglutinante, concentração de proteínas e atividade específica.

1.5 Atividade hemaglutinante e atividade hemolítica

Os testes para detecção de atividade hemaglutinante foram realizados em tubos, a partir de uma adaptação ao protocolo descrito por Moreira e Perrone (1977) como descrito a seguir:

As amostras foram diluídas em tubos (1:2, 1:4, 1:8...) em Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M. A 100 µL de cada diluição foi adicionado 100 µL de uma suspensão a 3% de hemácias de coelho tratada com tripsina em NaCl 0,15 M. Os ensaios foram incubados a 37°C por 30 minutos e, após esse período, deixados em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A presença ou não de hemaglutinação foi 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.

1.6 Inibição da atividade hemaglutinante

Foi realizado um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com a finalidade de conhecer os carboidratos aos quais SLA se liga. 50 μ L de soluções estoques, a uma concentração de 0,1 mol/L de cada carboidrato (ou a 5mg/mL quando se trata de glicoproteínas), foram diluídos serialmente em Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, foi adicionada a cada tubo 50 μ L de uma solução de lectina em uma concentração de proteínas correspondente a 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 acrescentados 100 μ L de uma suspensão a 3% 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.

1.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

O acompanhamento do processo de purificação foi feito através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (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 0,2 M pH 6,8, SDS 4%, persulfato de amônio (100mg/ml) e TEMED concentrado. O gel de separação da amostra (main gel) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 12% em

tampão Tris/HCl 0,33 M, pH 8,8 contendo SDS 1%, TEMED (concentrado) e persulfato de amônio (100mg/ml).

As amostras foram solubilizadas a uma concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris/HCl 0,0625 M 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 200V, potência até 5W, e amperagem constante de 35mA. O tampão de corrida utilizado continha Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% pH 8,8. Proteínas de massa molecular conhecidas foram utilizadas como padrão.

Após a corrida eletroforética, o gel de separação foi corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). A retirada do excesso do corante (descoramento) utilizando a mesma solução desprovida do corante.

1.8 Cálculo da Massa Molecular Aparente

O cálculo da massa molecular aparente de SLA foi realizado utilizando proteínas de massa molecular nativa conhecidas para a realização da calibração da coluna de Sephacril S 200. Foram utilizadas as proteínas Andirase Carbônica (29 kDa), Ovalbumina (43 kDa) e Conalbumina (75 kDa) oriundos do kit para calibração de colunas de filtração em gel da GE e a proteína ConBR 120 kDa purificada em nosso laboratório. Os cálculos de regressão e calibração foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

1.9 Análise da glicosilação

Para análise da presença de glicano, as proteínas foram submetidas a reação de Schiff (ZACHARIUS *et al*, 1969). As amostras foram submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE em 15% de poliacrilamida. Após a corrida eletroforética, as proteínas no gel foram fixadas por uma hora em ácido acético 7,5%, em seguida foram expostas ao ácido periódico 0,2% por mais uma hora

e então o gel foi colocado no reagente de Schiff por uma hora. O excesso de corante foi retirado do gel utilizando uma solução de metabissulfito de sódio 0,5% em HCl 0,05 M. As bandas que se apresentarem rosas indicam a presença de glicanos e foram consideradas positivas para a reação de Schiff. O reagente de Schiff é composto por fucsina básica diluída em HCl. A reação é baseada na oxidação dos resíduos de hexoses produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff formando uma coloração rosa.

As amostras positivas na reação de Schiff foram submetidas a dosagem de carboidratos pelo método do Fenol – Ácido Sulfúrico (DUBOIS *et al*, 1956). 1mg da proteína foi solubilizadas em 1 mL de água ultra pura. 0,5 mL da solução de proteína foi adicionada a 0,5 mL de fenol 5% e em seguida foi adicionado lentamente pela parede do tubo de reação, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 minutos, a reação teve sua absorbância lida em espectrofotômetro num comprimento de onda de 490 nm. A curva padrão foi elaborada a partir de diferentes concentrações de uma solução de lactose. A partir dessa análise, foi estimado o teor (em porcentagem) de carboidrato presente na proteína. Esta reação se baseia na formação de hidroximetilfurfural a partir da hidrólise ácida das hexoses. Este composto combinado com o fenol gera um produto de cor amarelada proporcional à quantidade de hexoses.

1.10 Análise da estabilidade térmica e de pH

Alíquotas de SLA solubilizadas em NaCl 0,15 M foram preparadas em microtubos. Em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas variando de 30 °C a 100 °C por 60 minutos. Após este período, a atividade hemaglutinante foi testada em todas as amostras.

O efeito do pH sobre a atividade da lectina foi avaliado através de testes de atividade hemaglutinante. Para isto, SLA solubilizada em NaCl 0,15 M foi diluída em diferentes soluções tampão com pH variando de 4,0 a 10,0 contendo NaCl 0,15 M. Os seguintes tampões foram utilizados: Citrato de sódio 0,1 M pH 4,0 e 6,0, acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0 e 10,0.

1.11 Análise da dependência de metais divalentes

Como verificado no capítulo I dessa tese, as lectinas de leguminosas tem como característica estrutural a presença de metais divalentes, em especial o Cálcio e o Magnésio, em sua estrutura que orientam o correto posicionamento de alguns aminoácidos para a formação do sítio de ligação à carboidratos. A ausência desses na estrutura desestabiliza o sítio de ligação à carboidratos e impede que a ligação ocorra. Para verificar a existência desses metais na estrutura de SLA, foi realizado um ensaio utilizando o ácido orgânico EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), que tem a função de agente quelante e é capaz de “sequestrar” esses metais.

Para tal, uma solução de SLA a 0,1mg/mL diluída em Tris HCl pH 8,0 0,05M contendo NaCl 0,15M foi submetida a teste de hemaglutinação com sangue de coelho tripsinizado, sendo diluída serialmente em uma solução controle contendo NaCl 0,15M apenas e em uma solução de EDTA 0,1M contendo NaCl 0,15M.

2. Resultados e discussão

2.1 Extração de proteínas totais e eliminação da atividade hemolítica

As lectinas de leguminosas são a família de lectina vegetal mais bem estudada e caracterizada em diversos aspectos. Nesse trabalho, nós caracterizamos uma nova lectina extraída de sementes de *S. laevicarpa* e purificada por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e exclusão molecular. Nós chamamos a proteína purificada nesse trabalho de SLA a fim de diferenciar da proteína SLL purificada por um único passo de cromatografia de afinidade (FERNANDES *et al*, 2012).

Extrato de plantas do gênero *Swartzia* são comumente conhecidos pela presença de saponinas, um metabólito secundário com alta solubilidade em água e com propriedades hemolíticas. Algumas dessas saponinas são bem caracterizadas e possuem atividades contra fungos e moluscos (MAGALHÃES *et al*, 2006; MARQUI *et al*, 2008). Tendo em vista que a principal forma de visualização da presença de lectinas é pela sua atividade hemaglutinante, uma substância hemolítica presente no extrato dificulta a sua detecção.

Para tal propósito, foi realizada extração de proteínas em pH ácido, próximo da neutralidade e básico. É possível verificar na tabela 03 que a maior atividade hemolítica é encontrada em extratos em pH 9,0. Portanto, foram escolhidos os extratos em pH 2,6 e pH 7,6 para serem submetidos a precipitação com sulfato de amônio.

É possível conferir na tabela 04 que a fração 30-60% de saturação de sulfato de amônio em pH 2,6 apresentou maior atividade específica de hemaglutinação e atividade hemolítica nula. A partir desses resultados, foi escolhida esta fração, que a partir de agora será chamada de F2, para continuidade da purificação dessa proteína.

Tabela 03 – Atividade hemaglutinante e hemolítica de extratos de sementes de *Swartzia laevis* em diferentes pHs .

	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade Hemaglutinante ^{a)}			Atividade Hemolítica ^{b)}			Atividade Hemaglutinante Específica ^{c)}		
		N ¹	T ²	P ³	N ¹	T ²	P ³	N ¹	T ²	P ³
pH 2,6	0.84	0	32	16	2	2	2	0	38.03	19.01
pH 7,6	2.91	0	128	128	16	16	16	0	43.92	43.92
pH 9,0	3.10	0	128	128	32	32	32	0	41.25	41.25

- a) Atividade hemaglutinante expressa em UH/mL;
b) Atividade hemolítica expressa em UHe/mL;
c) Atividade hemaglutinante específica expressa em UH/mgP

Tabela 04 - Atividade hemaglutinante e hemolítica de diferentes frações de extratos sementes de *Swartzia laevis* em pH 2,6 e 7,6

	pH 2,6			pH 7,6				
	Proteínas Totais(mg/mL)	Atividade Hemaglutinante ^{a)}	Atividade hemolítica ^{b)}	Atividade Hemaglutinante Específica ^{c)}	Proteínas Totais(mg/mL)	Atividade Hemaglutinante ^{a)}	Atividade hemolítica ^{b)}	Atividade Hemaglutinante Específica ^{c)}
F0-30	0,35	2	0	5,75	0,28	2	0	7,27
F30-60	0,56	128	0	228,57	2,68	0	128	0,00
F60-90	0,07	2	0	27,78	0,19	0	8	0,00

- a) Atividade hemaglutinante expressa em UH/mL;
b) Atividade hemolítica expressa em UHe/mL;
c) Atividade hemaglutinante específica expressa em UH/mgP

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio sólido é uma estratégia comum para purificação de proteínas a partir do aumento de sua atividade específica. Na purificação de SLA, a precipitação com sulfato de amônio permitiu a concentração da atividade lectínica em uma fração separada da atividade hemolítica.

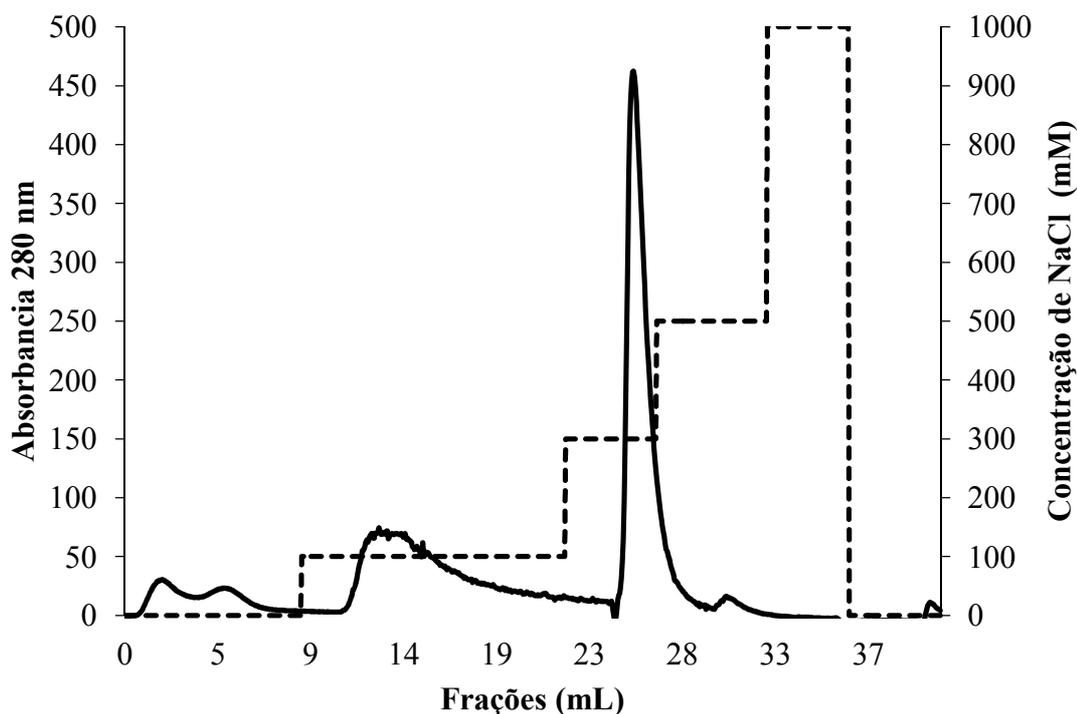
A precipitação aumentou a atividade específica de SLA em 6 vezes em relação ao extrato. O fracionamento de extratos de sementes de *Luetzelburgia auriculata* em 40-60% de saturação aumenta a atividade específica em 18,4 vezes (OLIVEIRA *et al*, 2002). Extratos de sementes de *Swartzia pickelly* também demonstraram um aumento da atividade hemaglutinante específica na fração de 20-40% de saturação (CAVALCANTE; COELHO, 1990). Depois da precipitação, SLA foi purificada por dois passos cromatográficos, uma cromatografia aniônica em coluna de DEAE-Sepharose e uma exclusão molecular em coluna Sephacril S-200.

2.2 Purificação de SLA por cromatografia de troca iônica e exclusão molecular.

Após diálise exaustiva contra água destilada, foi adicionado à F2 uma quantidade suficiente de tampão Tris HCl 1M pH 8,0 a fim de que a amostra final chegasse a concentração de 50 mM de tampão, utilizando-se para isso a fórmula de diluição ($C_1V_1 = C_2V_2$; sendo C= Concentração, V= Volume, 1= inicial e 2 = final).

A figura 13 mostra o resultado da cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE em pH 8,0 com aumento da concentração de NaCl. O pico que concentrou a atividade hemaglutinante foi o eluído com 0,3 M de NaCl.

Figura 13 – Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel.

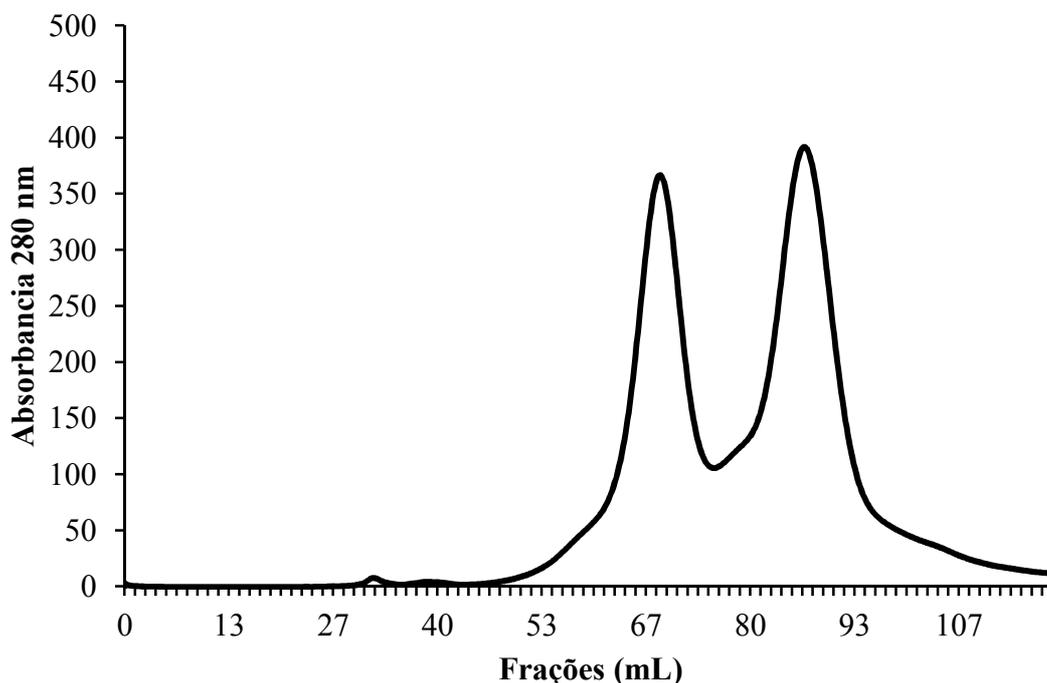


A cromatografia foi realizada em sistema automatizado Akta Purifier. A coluna tinha o volume de 1mL. Foi aplicado 20 mg da fração F2 à coluna para realização da cromatografia e as frações coletadas foram de 1 mL.

O pico ativo, agora chamado de P3DEAE, foi dialisado exaustivamente contra água e liofilizado para em seguida ser aplicado em cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacril S300.

O resultado da cromatografia pode ser visto na figura 14. O primeiro pico eluído, agora chamado de SLA, concentrou a atividade hemaglutinante e o segundo apenas apresenta atividade residual.

Figura 14 – Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephacril S200.



A cromatografia foi realizada em sistema automatizado Akta Purifier. A coluna tinha o volume de 120mL. Foi aplicado 5mL de uma solução de 10 mg/mL do P3DEAE à coluna para realização da cromatografia e as frações coletadas foram de 1 mL.

Tabela 05 – Tabela de purificação de SLA.

Fração	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Hemaglutinante (UH/mL) ^{a)}	Atividade Específica (UH/mgP) ^{b)}	Purificação (X) ^{c)}
Extrato	0,84	16	19,5	1
Fração 30-60%	0,56	128	228,57	12
P3DEAE	0,5	1024	2048	108
SLA	0,25	1024	4096	215

a) Atividade hemaglutinante expressa em UH/mL;

b) Atividade hemaglutinante específica expressa em UH/mgP

c) Purificação da lectina em relação ao extrato.

Conforme tabela de purificação acima (Tabela 05), é possível verificar que SLA foi purificada 215 vezes em relação ao extrato.

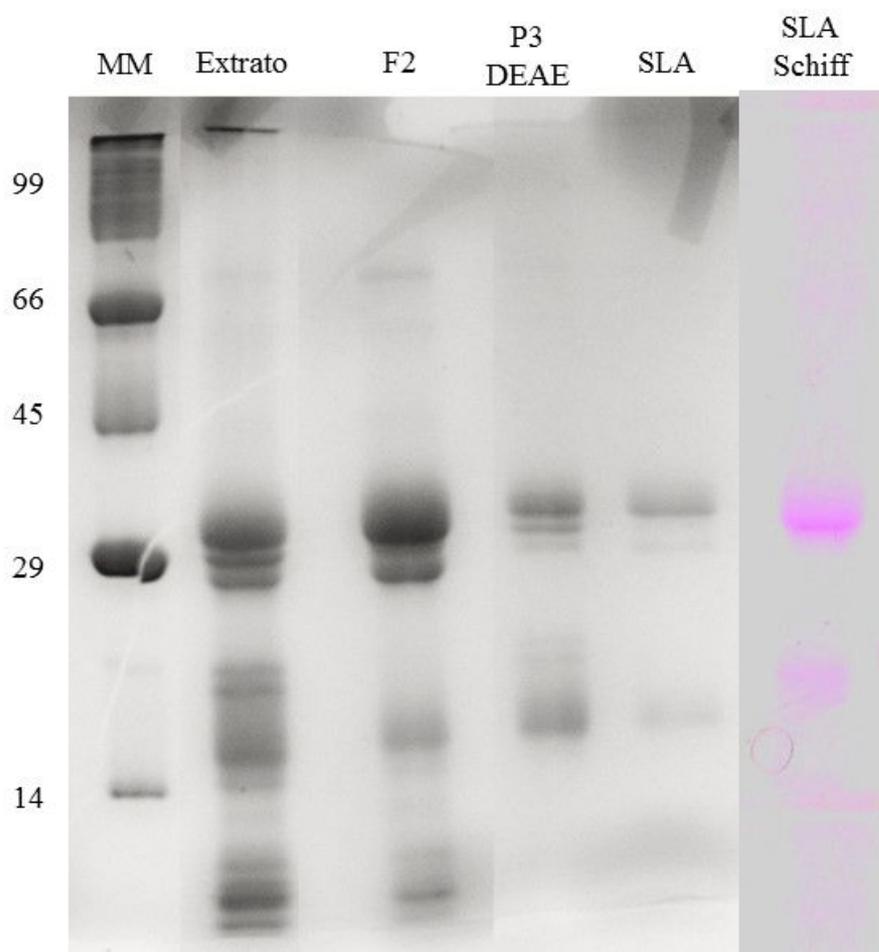
2.3 Análise do perfil eletroforético e glicosilação

Como muitas lectinas de leguminosa, SLA apresenta uma banda de 30 kDa e fragmentos em torno de 12 e 17 kDa (Figura 15). Quanto analisada de

forma nativa por exclusão molecular, SLA apresenta-se com 132 kDa. Esses resultados sugerem que SLA é um homotetrâmero em solução. Esse homotetrâmero é formado por cadeias de 30 kDa. As lectinas de leguminosas possuem geralmente monômeros entre 25 e 30 kDa e se associam como dímeros ou tetrâmeros, algumas apresentando um equilíbrio entre os estados de oligomerização que depende do pH (SOL *et al*, 2007 e NAGANO *et al*, 2008).

Ao ser submetida a reação do Fenol – Ácido Sulfúrico (DUBOIS, 1976), foi possível verificar que SLA possui um total de 3,8% de Carboidratos.

Figura 15 – Eletroforese em gel de 12% de poliacrilamida.



MM = Marcador Molecular composto por Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrate Carbônica 29 kDa e α -lactoalbumina 14,4 kDa. Extrato = Extrato de sementes de *Swartzia laevis* em pH 7,6. F2 = Fração de 30-60% de solubilidade em sulfato de amônio do referido extrato. P3DEAE = Proteínas contidas no Pico 3 da cromatografia de DEAE. SLA = Proteína purificada. SLA Schiff = Resultado da coloração por reagente de Schiff da banda referente à SLA.

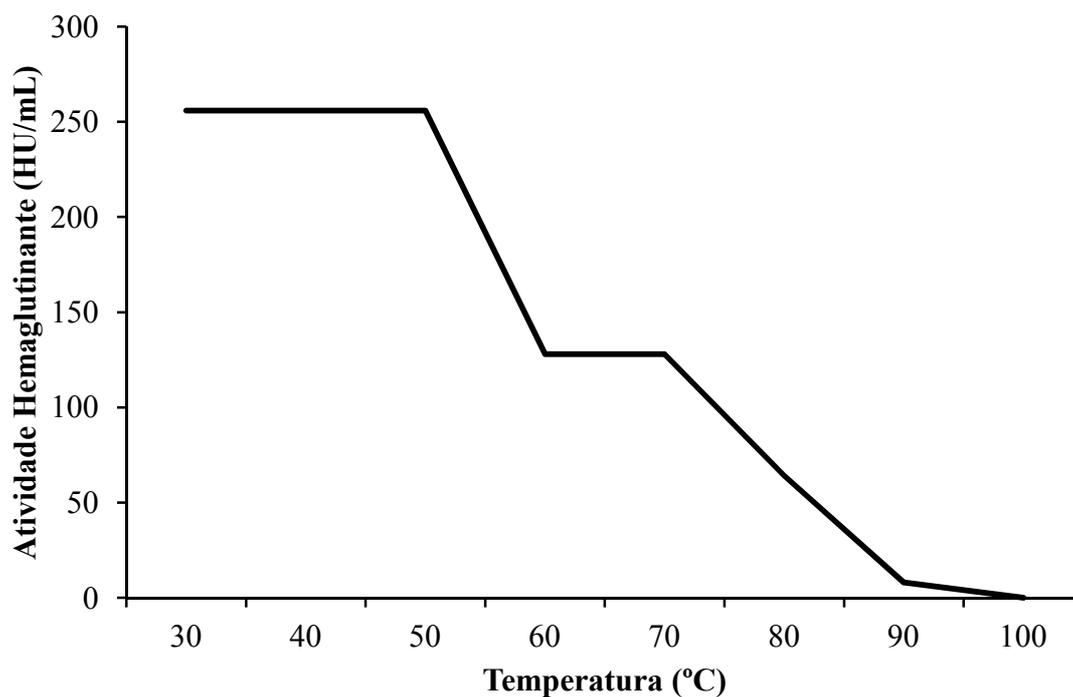
A maturação das lectinas da subtribo Diocleinae como a Concanavalina A extraídas de sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) envolve um mecanismo complexo conhecido como permutação circular, já relatado detalhadamente no capítulo 01 desse trabalho de tese. Algumas lectinas de tribos basais da subfamília Papilionoideae sofrem um processamento similar, como VML, B-SJA-I e LAA. SLA aparentemente apresenta o mesmo processamento proteolítico presente nas lectinas citadas anteriormente.

SLA apresenta-se como uma glicoproteína. As lectinas de leguminosas geralmente são produzidas no retículo endoplasmático como pre-pro-proteínas que em seguida são transportadas para o Aparelho de Golgi e alí sofrerão algumas modificações pós traducionais a fim de se tornarem proteínas maduras (SHARON; LIS, 1990).

2.4 Estabilidade térmica, de pH e presença de cátions divalentes.

SLA foi submetida a temperaturas variando de 30 a 100°C com incrementos de 10°C por uma hora e após isso sua atividade hemaglutinante foi testada. Na Figura 16 é possível observar que SLA apresentou uma diminuição de 50% de sua atividade hemaglutinante a partir de 60°C e apresentou atividade, mesmo que diminuída, até 90°C.

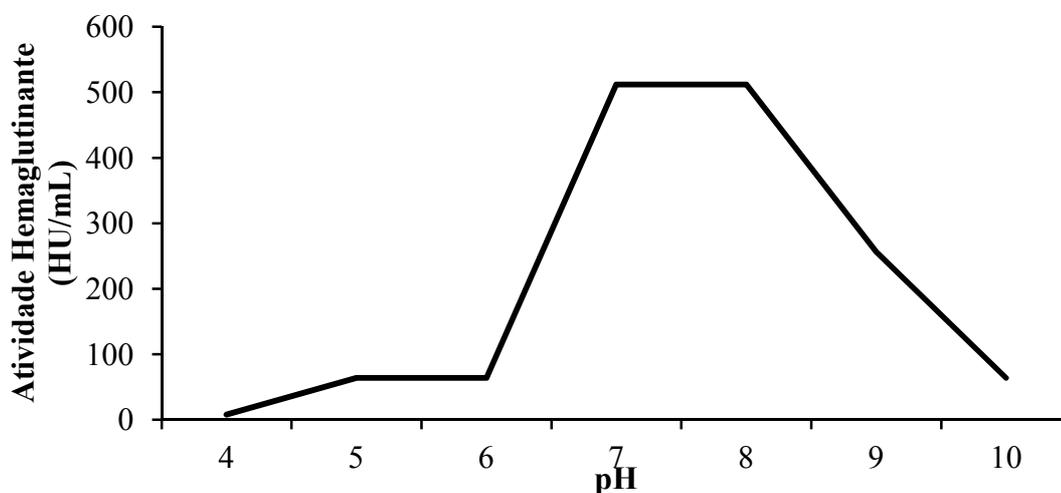
Figura 16 – Estabilidade Térmica de SLA.



Teste de estabilidade térmica de SLA. A proteína foi submetida a aquecimento com intervalos de 10°C durante uma hora até perder totalmente sua atividade hemaglutinante.

A figura 17 representa a atividade de SLA em diferentes pHs. É possível verificar que o pH ótimo para atividade dessa proteína é entre 7 e 8. Em pH 9,0 é possível verificar uma diminuição de 50% de sua atividade e em pH 6,0 a atividade é próxima aos 20% do máximo atingido.

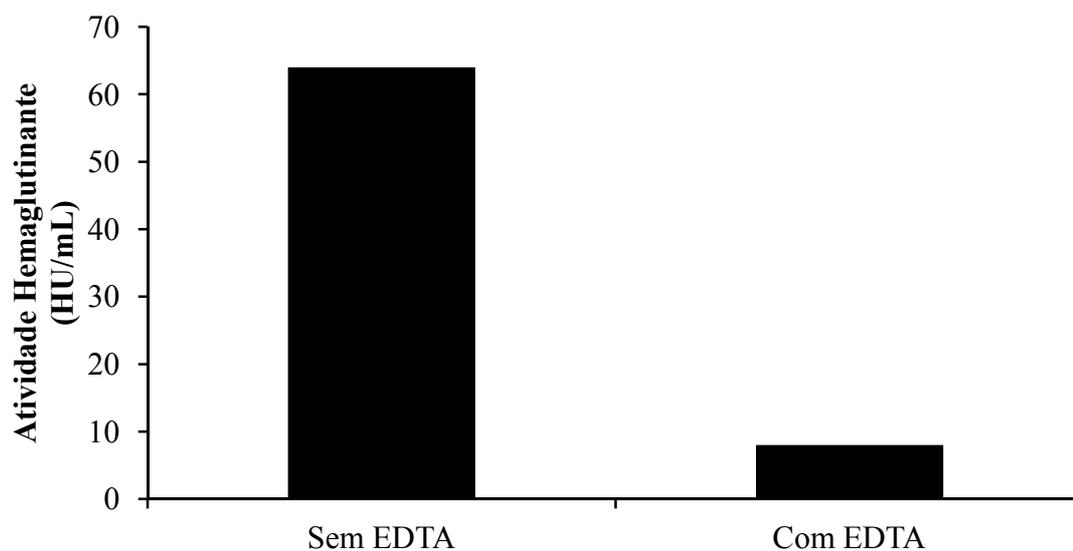
Figura 17 – Atividade hemaglutinante de SLA em diferentes valores de pH.



Teste de estabilidade em diferentes pH de SLA. A proteína foi submetida a testes de atividade hemaglutinante em diferentes pH.

Ao testar a atividade hemaglutinante de SLA na presença de EDTA, foi possível verificar que há uma redução desta (Figura 18) em 87,5%, indicando que a atividade hemaglutinante de SLA é dependente de cátions divalentes.

Figura 18 – Análise do efeito do EDTA na atividade hemaglutinante de SLA.



3. Conclusões

Nesse capítulo foi possível verificar que uma nova lectina de sementes de *Swartzia laevis* foi purificada. Essa lectina, chamada de SLA para diferenciar da primeira lectina, SLL, foi purificada por dois passos cromatográficos após precipitação com sulfato de amônio para eliminação da atividade hemolítica, provavelmente exercida por saponinas presentes no extrato total. SLA foi purificada 215 vezes em relação ao extrato total, é uma glicoproteína que apresenta processamento proteolítico em cadeias e resiste até a temperatura de 50°C sem alterar sua atividade. Possui o pH ótimo entre 7 e 8 e sua atividade hemaglutinante é dependente de metais divalentes.

**CAPÍTULO III – Análise da afinidade, atividade inflamatória e toxicidade
contra *Artemia sp* de SLA**

1. Materiais e Métodos

1.1 Inibição da atividade hemaglutinante

Foi realizado um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com a finalidade de conhecer os carboidratos aos quais SLA se liga. 50 μ L de soluções estoques, a uma concentração de 0,1 mol/L de cada carboidrato (ou a 5mg/mL quando se trata de glicoproteínas), foram diluídos serialmente em Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 contendo NaCl 0,15 mol/L. Em seguida, foi adicionada a cada tubo 50 μ L de uma solução de lectina em uma concentração de proteínas correspondente a 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 acrescentados 100 μ L de uma suspensão a 3% 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.

1.2 Análise por microcalorimetria de titulação isotérmica

SLA teve sua afinidade por alguns sacarídeos mensurada por microcalorimetria isotérmica de titulação (ITC). Os experimentos foram realizados com um *VP-ITC Isothermal Titration Calorimeter* (Microcal), a $27,0 \pm 0,1$ °C. A concentração da proteína na célula microcalorimétrica (1,4478 mL) foi em torno de 0,001 M em HEPES 0,1 M pH 7,4. O controle consistiu da adição das soluções de açúcares na ausência da proteína, o que rendeu mudanças insignificantes na entalpia. Os dados experimentais foram fixados em uma curva de titulação teórica usando o software disponibilizado pela Microcal, fornecendo a constante associação (K_a), a entalpia de ligação (ΔH) e o número de sítios de ligação por monômero (n). Os parâmetros termodinâmicos, tais

como variação de energia livre (ΔG) e de entropia (ΔS) foram calculados a partir da equação $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K_a$. Todos os experimentos foram realizados com valores de $10 < c < 100$ (WISEMAN *et al.*, 1989).

1.3 Camundongos

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (25 – 30 g) procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia-Farmacologia da Inflamação (LAFFIN) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Os animais receberam ração e água *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura, e foram manipulados de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE N° 10130208-8/40).

1.4 Teste de formação de edemas

Os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos por pletismometria antes da injeção da lectina SLA (500 μg /pata) (tempo zero). Posteriormente, os volumes das patas foram medidos 0.5-5h após a administração subcutânea (s.c.) da lectina. O controle negativo de edema foi administrado apenas com salina s.c. O edema foi calculado como a diferença entre o volume das patas em um determinado tempo após o estímulo e antes do estímulo (tempo zero). As áreas sob as curvas (ASC) também foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995) e os resultados expressos em unidades arbitrárias.

1.5 Teste de sensibilidade (VON FREY)

O método consiste em dispor os animais em caixas de acrílico com assoalho de rede de malha não maleável e aplicar, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo com um filamento flexível (0,8 g) até que o mesmo produza uma resposta caracterizada como sacudida ("*flinch*") da pata estimulada. Os

estímulos são repetidos por até 6 vezes e se contabilizam o número de respostas apresentadas pelo animal.

Os animais foram administração s.c. de lectina (500 µg/pata). A observação da resposta de retirada da pata foi avaliada imediatamente antes (tempo zero) e 0.5 - 5 horas após a injeção do estímulo. O controle negativo de hipernocicepção foi administrado apenas com salina s.c

1.6 Análise estatística para os testes com camundongos

A análise estatística e a construção dos gráficos foram realizadas com o auxílio do software Origin 7.0[®] (OriginLab). Os resultados estão apresentados como Média ± Erro Padrão da Média (EPM) de n experimentos. Diferenças significantes, consideradas para valores de $p < 0,05$, foram determinadas utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste corretivo de Bonferroni.

1.7 Preparação da amostra para ensaios com *Artemia sp.*

SLA foi dissolvida em água do mar artificial na concentração de 1 mg/mL de proteína. A amostra foi centrifugada a 9000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante utilizado para o bioensaio com náuplios de *Artemia sp.*

1.8 Obtenção dos náuplios de *Artemia sp.*

Os cistos de *Artemia sp* foram eclodidos em água do mar artificial, previamente filtrada e autoclavada, à temperatura ambiente, sob constante iluminação e forte aeração. Os cistos de artemia foram incubados em um recipiente cilíndrico de fundo cônico de polietileno com a proporção de 1g de cistos para 1L de água do mar artificial. Após um período de 48h a aeração foi desligada e a iluminação direcionada ao fundo do recipiente com o objetivo de separar os náuplios, que possuem fototropismo positivo e nadam em direção a

luz, enquanto que os cistos não eclodidos ficam na superfície d'água. Os náuplios são então coletados e utilizados para o bioensaio.

1.9 Teste de letalidade em *Artemia* sp.

Os ensaios foram feitos em placa de Limbro de 24 poços, contendo 2 mL de água do mar artificial e 10 náuplios por poço. Volumes específicos das amostras foram adicionados a cada poço para se obter as concentrações de 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. Os experimentos foram feitos em triplicata com um controle contendo apenas água do mar e 10 náuplios. Após 24h foi feita a leitura da placa, onde foi determinado o número de náuplios mortos em cada poço. A partir desses dados foi calculado o percentual para cada concentração e os valores de LC50 por análise estatística PROBIT descrita por Finney (1971).

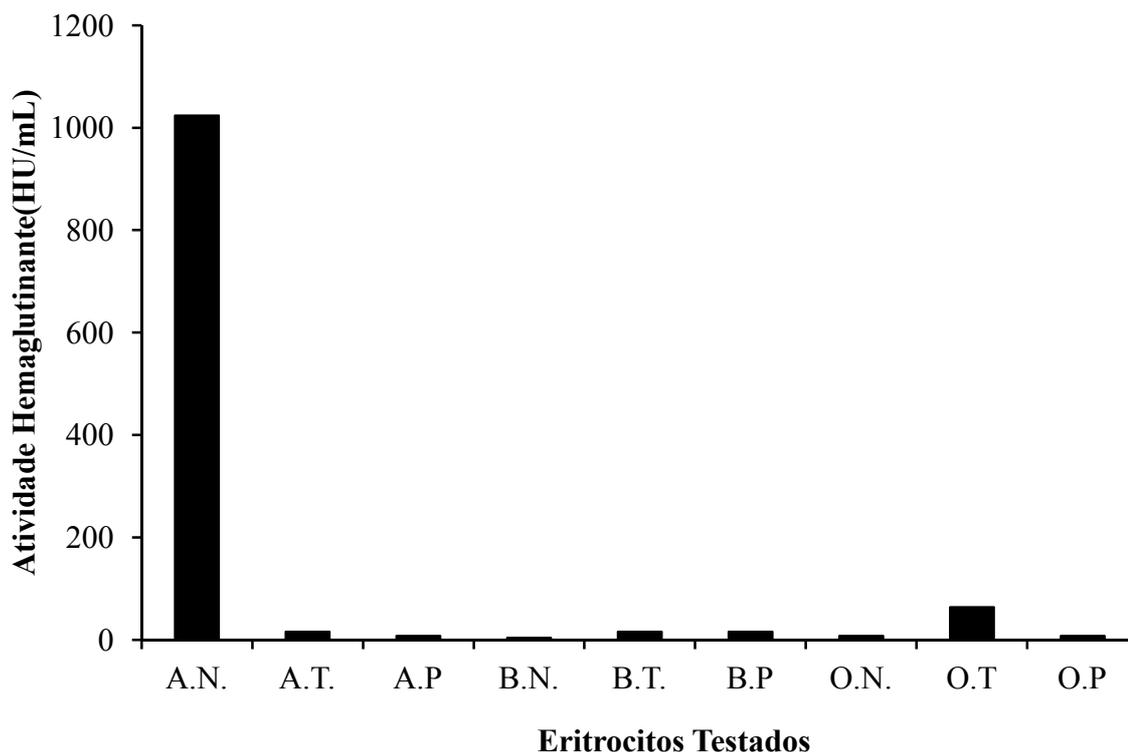
2. Resultados e Discussão

2.1 Análise de afinidade de SLA por Inibição da Atividade Hemaglutinante e Calorimetria de Titulação Isotérmica

SLA foi submetida a teste de inibição da atividade hemaglutinante a fim de conhecer os açúcares a qual ela se liga. Como pode ser verificado na tabela 06, SLA é uma lectina que reconhece Galactose e seus derivados, apresentando uma especificidade em ordem decrescente dos açúcares testados para: GlcNAc, Lactose, Metil α -D-Galactopiranosideo e Galactose e apresenta também uma forte afinidade por Mucina submaxilar bovina. Ao testar a atividade hemaglutinante de SLA contra os eritrócitos humanos do sistema ABO tratados ou não enzimaticamente, foi possível verificar que a maior AH é encontrada contra eritrócitos do tipo A não tratados enzimaticamente (Figura 19).

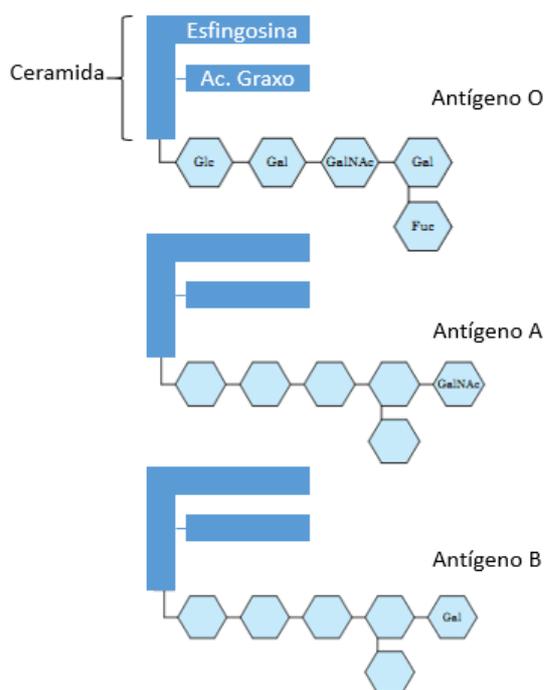
A maior afinidade de SLA por sangue humano do tipo A é esperada, tendo em vista que, como pode ser visto na figura 20, o glicolípídio que forma o antígeno A possui um resíduo GalNAc em sua extremidade e a proteína em estudo demonstrou grande afinidade por este açúcar.

Figura 19 – Atividade Hemaglutinante de SLA contra eritrócitos humanos.



Os eritrócitos testados pertencem ao sistema ABO. A primeira letra representa o grupo sanguíneo e a segunda letra segue a seguinte legenda: N = eritrócitos não tratados enzimaticamente; T = eritrócitos tratados com a enzima Tripsina e P = eritrócitos tratados com a enzima papaína.

Figura 20 – Estrutura dos antígenos presentes na membrana das hemácias humanas.



Adaptado de Nelson, Cox, 2003

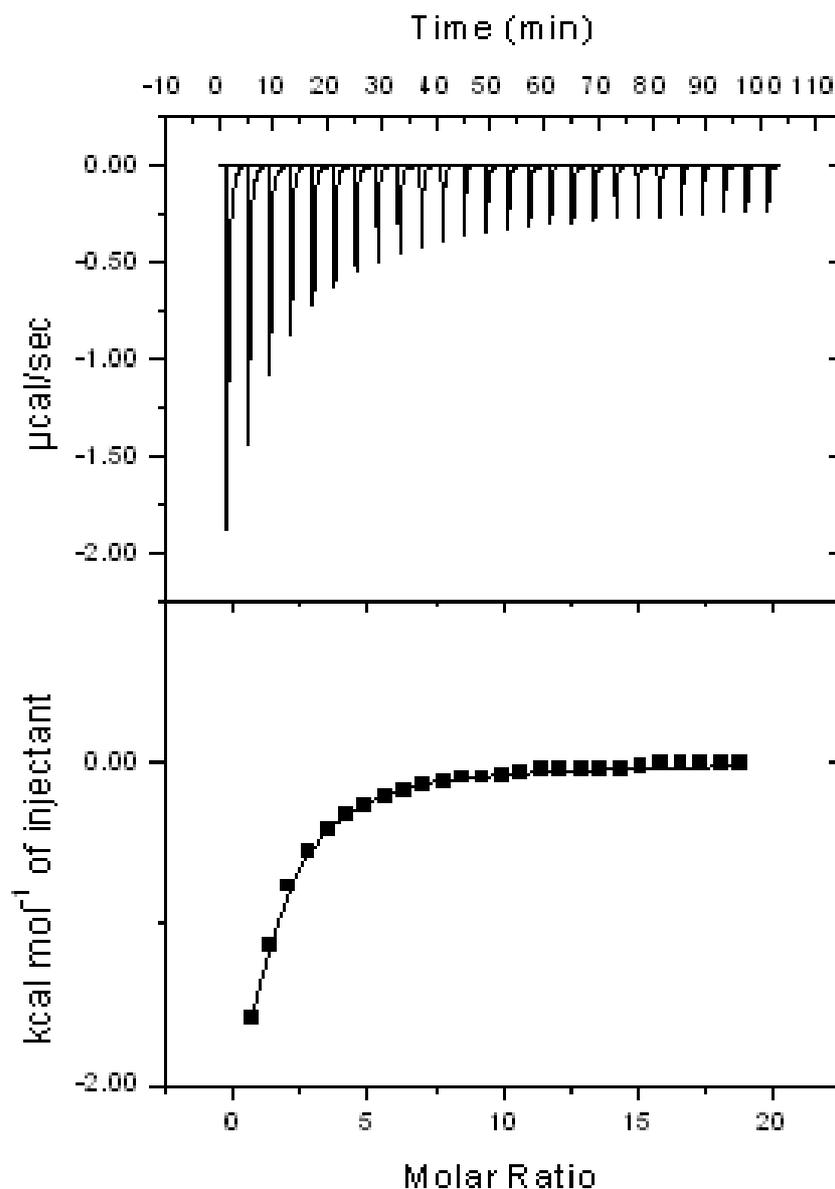
Tabela 06 – Inibição da atividade hemaglutinante de SLA por carboidratos e glicoproteínas.

Carboidrato ou Glicoproteína	M.C.I
Glicose	N.I.
Manose	N.I.
GlcNAc	N.I.
Galactose	12.5 mM
Metil α -D-Galactopiranosideo	6.25 mM
GalNAc	0.78 mM
Lactose	3.17 mM
Mucina submaxilar bovina	78.12 μ g/mL

M.C.I. = Mínima concentração inibitória. Os valores estão expressos em mM (milimolar) para os carboidratos e em μ g/mL para a glicoproteína Mucina.

Após as análises realizadas por ensaios de visualização da inibição da atividade hemaglutinante macroscopicamente, foram também realizados ensaios de microcalorimetria de titulação isotérmica (ITC). Para os ensaios foram utilizados os açúcares: α e β -lactose, Galactose, GalNAc e as glicoproteínas asialofetuína e mucina extraída de glândulas submaxilar de bovinos (BSM). Os resultados brutos são registrados em termogramas. A figura 21 representa o termograma de ITC para a análise da interação de SLA com GalNAc.

Figura 21 – Termograma da interação de SLA com o açúcar GalNAc.



É possível observar na tabela 07 que SLA interagiu com todos os açúcares testados, gerando uma variação de energia livre de Gibbs ($-\Delta G$) negativa e todos demonstraram valores de entalpia (ΔH) favoráveis. A interação de SLA com os anômeros de lactose, galactose e asialofetaina descrevem uma entropia ($-T\Delta S$) desfavorável enquanto que os valores de entropia para a interação de SLA com GalNAc e BSM são favoráveis.

Dados termodinâmicos que apresentam entropia desfavorável (positiva) estão relacionados à formações de ligações de hidrogênio com penalidades conformacionais nas moléculas, enquanto que o contrário

(entropia favorável) indica que a interação é formada por interações entálpicas e hidrofóbicas com liberação de moléculas de água. É possível observar que o mecanismo de interação de SLA com os diferentes açúcares se dá pelo menos de duas formas diferentes, sendo as interações mais fortes (GalNAc e BSM) provavelmente mediadas e protagonizadas por interações hidrofóbicas com remoção de moléculas de água do domínio de reconhecimento de carboidratos enquanto que interações mais fracas (Lactose, Gal e ASF) são protagonizadas por interações de hidrogênio.

É possível observar através da constante de afinidade (K_a), corroborando com os dados de hemaglutinação, que SLA interage mais fortemente com BSM, seguido de Asialofetúina, GalNAc, Lactose e Galactose.

O valor de n na tabela 07 representa a estequiometria da ligação expressa em número de sítios de ligação por subunidade da lectina. Como demonstrado por Dam e colaboradores (2002), o valor $1/n$ expressa a valência funcional de ligações de carboidratos complexos e glicoproteínas a lectinas. Os dados de SLA demonstram que o valor de n para os açúcares simples e para lactose foi de 1 o que diz que cada monômero da lectina interage com uma molécula do açúcar. Já para a interação de SLA com Asialofetúina, o valor de n foi de 0,27 e o valor de $1/n = 3,7$ e o valor de n para interação de SLA com BSM foi de 0,03 e o valor de $1/n = 33,3$ o que quer dizer que cada molécula de Asialofetúina irá interagir com aproximadamente 4 monômeros de lectina e que cada molécula de BSM interagirá com aproximadamente 33 moléculas de SLA.

O catabolismo de algumas glicoproteínas no plasma é regulado pela modificação de seus carboidratos. Quando resíduos terminais de ácido siálico são removidos, os resíduos galactosil são reconhecidos por receptores de asialoglicoproteínas (ASGP-R) na membrana plasmática de hepatócitos (ASHWELL; MORELL, 1974).

Fetúina é uma glicoproteína presente no soro de bezerros que possui diversos resíduos de ácido siálico que podem ser removidos quimicamente ou enzimaticamente. Quando removidos, essa proteína é conhecida com Asialofetúina (ASF). ASF possui 3 sítios de N-glicosilação aos quais estão ligados 3 cadeias trianténárias com porções LacNAc terminais, totalizando 9 porções LacNAc que estão disponíveis para realizar ligações com lectinas.

Mucinas são glicoproteínas lineares altamente O-glicosiladas que são secretadas por organismos superiores para proteger e lubrificar a superfície de células epiteliais. Domínios mucina e relacionados a mucina são envolvidos na modulação da resposta imune, inflamação, adesão e tumorigenese (VARKI, 1993; BYRD; BRESALIER, 2004). As mucinas são utilizadas no diagnóstico de uma variedade de doenças. Particularmente, o nível de expressão de diversas mucinas e o tipo de cadeia de carboidratos dessas mucinas tem sido comprovadamente úteis como marcadores de diagnósticos para uma variedade de cânceres. Mucinas de câncer de colon apresentam a expressão aumentada do glicano aGalNAcThr/Ser (Antígeno TN), BGal3GalNAc (Antígeno T ou TF) e aNeuAC6GalNAc (antígeno sialil-Tn) (Bresalier, 2004). Nesse sentido, estudos do reconhecimento de mucinas são importantes para o entendimento das propriedades da relação estrutura-atividade (DAM *et al*, 2007).

As cadeias de glicanos de muitas proteínas possuem múltiplas cópias do mesmo epítipo. Um efeito desta multivalência de carboidratos é o aumento da afinidade de uma glicoproteína por seu receptor específico que reconhece carboidratos, incluindo lectinas. A multivalência de glicoproteínas podem ser de dois tipos ou uma combinação dos dois. O primeiro, glicoproteínas que possuem glicanos N ou O ligados que são multivalentes ou múltiplas cadeias de glicanos em diferentes sítios que conferem multivalência para a glicoproteína (BREWER, 1996; GUPTA *et al*, 1996; LIU *et al*, 2002).

Dam e colaboradores (2007) estudaram a estequiometria de ligação de VML e SBA para mucina submaxilar porcina (PSM) e diversos derivados desta com padrões de glicosilação e com tamanhos diferentes. Foi possível observar que VML e SBA apresentaram uma maior afinidade por mucinas onde prevalecem o antígeno Tn, sendo que VML apresenta constantes de afinidade maiores do que SBA. O autor relata também que Tn-PSM apresenta cerca 2300 resíduos disponíveis de GalNAc-Ser/Thr para ligação, porém VML apresenta um valor de $1/n$ de 555. O autor relata que esse, devido ao mecanismo de ligação de VML com Tn-PSM, mesmo na saturação, não há a ligação a todas os glicanos disponíveis. Ainda segundo o autor, isso provavelmente se dá devido à característica das mucinas de serem proteínas lineares e com muitas glicosilações, ocorrendo um impedimento estérico de

ligação das lectinas a todos os epítipo disponíveis. O mesmo pode estar ocorrendo na ligação de SLA com a mucina submaxilar de bovino.

Dam e colaboradores (2005) estudaram também a termodinâmica de interação de algumas galectinas animais à ASF e verificaram valores de $1/n$ próximos a 9, o total de valências disponíveis para ligação. Em nosso estudo, foi verificado que o valor de $1/n$ para ligação de SLA com ASF foi de aproximadamente 4, indicando mais uma vez que mesmo na saturação, SLA não se liga completamente a todos os epítipo disponíveis. É interessante salientar também que, como dito antes, os terminais disponíveis para interação de SLA com ASF são resíduos de LacNAc e a interação de SLA será pela Gal presente nesse carboidrato, assim justificando o modelo de interação de SLA com ASF ser relacionado ao modelo de ligação com Gal e Lactose.

Tabela 07 – Dados termodinâmicos de ligação de SLA à 27°C e pH 7,4.

Ligantes	K_a^{a)} nM	K_d nM	-ΔH^{b)} (kcal/mol)	n	-ΔG (kcal/mol)	-TΔS (kcal/mol)
Galactose	0,12	8,33	1,7	1,19	4,21	-2,51
α – Lactose	0,15	6,67	0,51	0,99	4,34	-3,83
β – Lactose	0,24	4,17	0,17	1,00	4,62	-4,45
GalNac	1,12	0,89	11,9	1,01	5,53	6,37
Asialofetaina	151	0,007	6,4	0,27	8,44	-2,04
BSM	983	0,001	109,7	0,03	9,55	100,15

a) Erros de valores de K_a estão entre 2 e 10 %

b) Erros nos valores de -ΔH estão entre ±0.1–0.2 kcal mol⁻¹

2.2 Atividade Inflamatória

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).

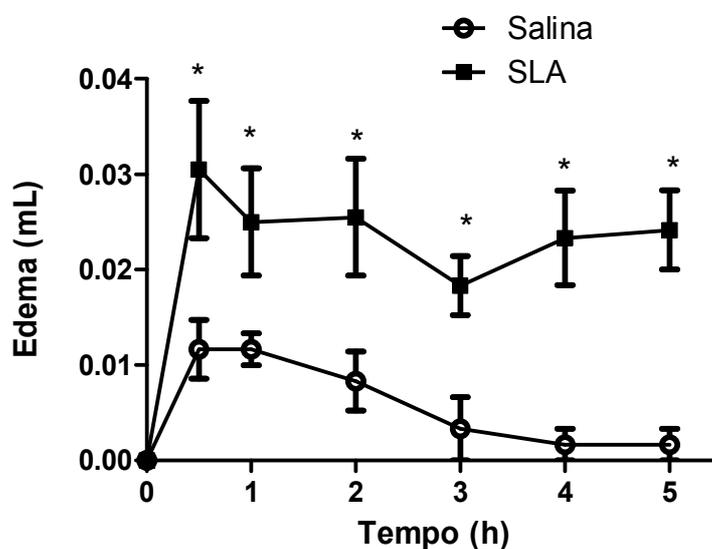
A vasodilatação é um fenômeno que corresponde a alterações no calibre vascular, que conduz a um aumento do fluxo sanguíneo, decorrente da ação de mediadores principalmente em arteríolas.

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.

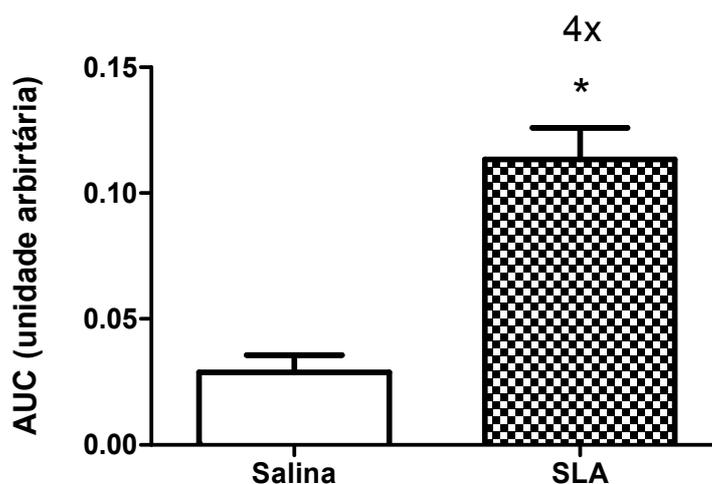
A injeção s.c. intraplantar de SLA foi capaz de induzir edema com início em 30 min, que se manteve constante até a 5ª hora. Em todos os tempos testados, a lectina (ASC: $0,113 \pm 0,08$) foi diferente estatisticamente do controle negativo de salina (ASC: $0,028 \pm 0,02$), aumentando o volume das patas em 4x (Figura 22).

Figura 22 - Efeito inflamatório de SLA em camundongos.

A)



B)



A lectina foi administrada (500 μ g s.c.) na pata traseira direita dos animais. O grupo controle recebeu salina (0,01 mL/Kg; s.c.) na pata contralateral. O edema foi medido antes (tempo zero) e 0,5-5 hs após a injeção da lectina e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero (A). As áreas sob as curvas (ASC) foram determinadas pelo método do trapézio (B). Resultados expressos como Média \pm E.P.M. (n=6). *p <0,05 em relação à salina; one-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

Algumas lectinas já tiveram o seu efeito inflamatório testado. Um exemplo de lectina ligante a galactose com atividade pró inflamatória é VML. VML induz um edema significativo com comportamento dose dependente e tempo dependente. Esse edema é acompanhado de migração de leucócitos e é drasticamente reduzido em animais leucopênicos. Esse resultado sugere que

VML produz um efeito inflamatório dependente de leucócitos (ALENCAR *et al*, 2004).

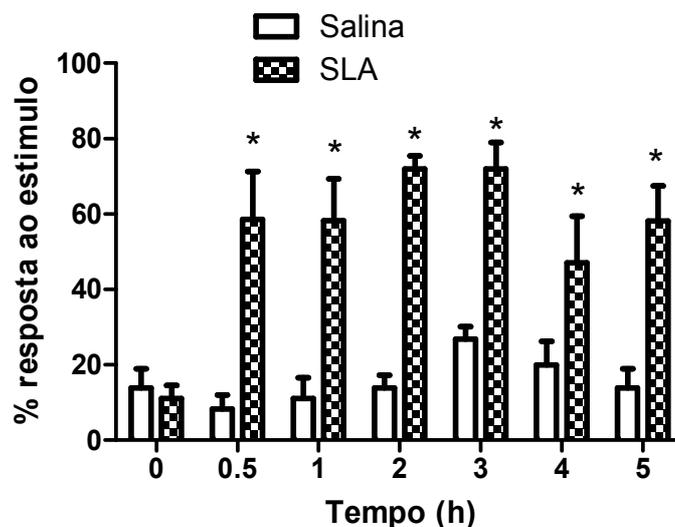
A lectina de *Bauhinia bauinioides* (BBL) também apresenta efeito pró inflamatório com formação de edema que é drasticamente reduzido ao pré tratar os animais com L-NAME, indicando que o efeito inflamatório de BBL inclui a participação do óxido nítrico na fase tardia do edema (SILVA *et al*, 2011).

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 sub cutânea é capaz de causar edema de duração de 24h e de ordem de 4x maior que o controle (NUNES *et al*, 2009; SIMÕES *et al*, 2012).

O método de Von Frey é utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, no sentido de observar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva dos animais. Ele reproduz, experimentalmente, a dor de natureza inflamatório (VIVANCOS *et al*, 2004).

No teste de Von-Frey, a lectina induziu a hipernocicepção nos mesmos tempos em que induziu edema, sendo, em todos eles, diferente da salina (Figura 23).

Figura 23 – Efeito hipernociceptivo induzido por SLA.



Os camundongos receberam a lectina (500 $\mu\text{g/pata}$, s.c) como estímulo inflamatório. A hipernocicepção foi medida antes (T0) e nas 0.5-5h após o tratamento. O grupo controle recebeu apenas salina (s.c.). Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. da intensidade de hipernocicepção, $n = 8$; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (salina); one-way ANOVA seguida de teste de Bonferroni.

Esse resultado demonstra que a inflamação causada por SLA é também acompanhada de dor. Essa dor pode estar relacionada a fatores libertados pelas células inflamatórias como a bradicinina, a serotonina, a histamina e as enzimas proteolíticas. Esse resultado indica que o mecanismo de inflamação de SLA pode ser similar ao desempenhado por VML, mediado principalmente pela presença de células como leucócitos.

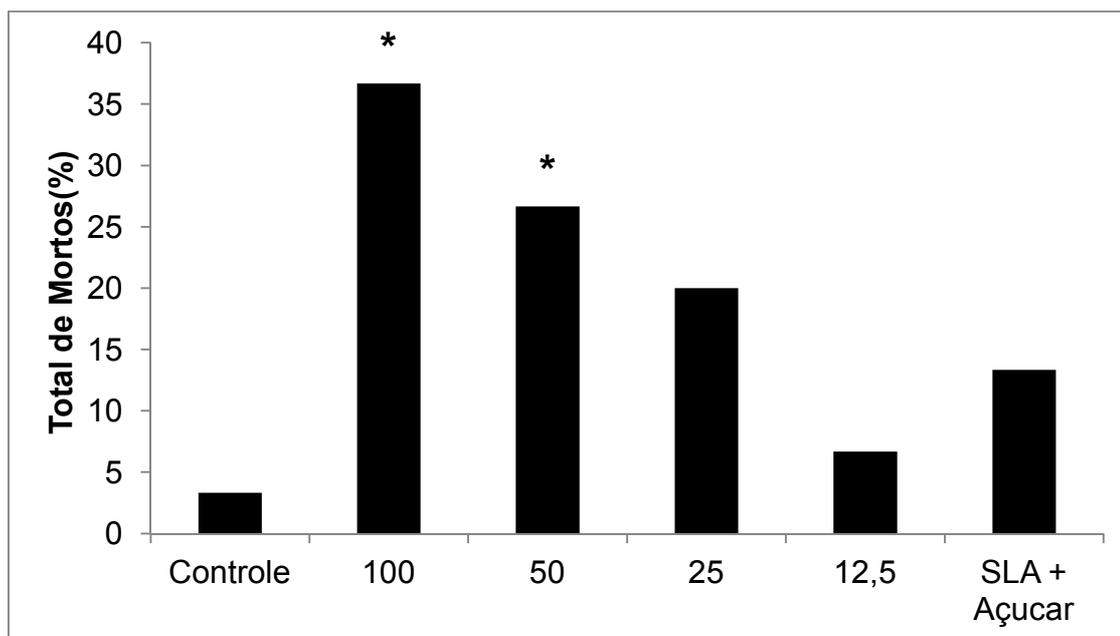
2.3 Teste de toxicidade em *Artemia sp*

Artemia sp é um invertebrado marinho encontrado em ecossistemas salinos aquáticos e marinhos. Esse organismo desempenha um importante papel no fluxo de energia da cadeia alimentar e tem sido usado em bioensaio de laboratório a fim de determinar toxicidade de algumas substâncias pela estimativa de uma concentração letal média. O teste de letalidade utilizando *Artemia sp* tem sido utilizado como “screen” inicial para identificar compostos bioativos com cito toxicidade assim como indicam compostos com variadas atividades farmacológicas (como anticâncer, antiviral, inseticida, pesticida etc). (MEYER *et al*, 1982).

Artemia sp tem ganhado popularidade como um organismo teste pois é de fácil cultivo, curto tempo de geração, cosmopolita e possui uma disponibilidade comercial fácil. Desde que os animais que eclodem dos cistos são de idade similar e mesmas condições genotípicas e fisiológicas, a variabilidade do teste é bastante reduzida (BARAHONA; SANCHEZ-FORTUN, 1999).

A toxicidade de SLA foi testada contra náuplios de fase II de *Artemia sp* e os resultados estão expressos na figura 24. É possível verificar que SLA apresentou uma atividade tóxica para a espécie em estudo quando aplicada nas doses de 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tendo em vista que as demais doses não foram estatisticamente diferente do controle.

Figura 24 – Teste de atividade tóxica de SLA contra *Artemia sp*.



O teste foi realizado utilizando diluições de SLA em 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100, 50, 25 e 12,5). Como controle negativo, as amostras foram testadas apenas com a mesma solução utilizada para diluir SLA (Controle). Como controle positivo, foi adicionado 100 mM de lactose à solução de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SLA e testada sua atividade tóxica contra *Artemia sp* (SLA + Açúcar). * significam resultados diferente do controle.

Ao analisarmos os resultados pelo teste de PROBIT para calcular o valor de letalidade de SLA para 50% da população teste (LC_{50}) obtivemos o valor de $114,44 \pm 19,4 \mu\text{g}/\text{mL}$. Tendo em vista que não foram testados valores maiores que 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o valor acima é uma estimativa.

Ao incubar a solução de SLA a 100 µg/mL com 100 mM de lactose, é possível verificar uma redução na mortalidade de indivíduos indicando que o efeito tóxico de SLA está envolvido com o sítio de ligação à carboidratos.

Algumas lectinas já foram testadas no mesmo organismo, apresentando uma toxicidade muito maior do que SLA. São exemplos as lectinas ConBR, CFL, Dvir, Dgui e DGL, todas ligantes a Man/Glc. Elas apresentaram LC50 de respectivamente 14,5; 4,75; 2,77; 5,21 e 2,52 µg/mL (SANTOS *et al*, 2010)

4. Conclusões

Nesse capítulo foi possível determinar que SLA é uma lectina que reconhece carboidratos relacionados à Gal com uma afinidade maior por GalNAC, seguido de Lactose e Galactose. SLA apresenta afinidade por glicoproteínas como asialofetúina e Mucina submaxilar bovina. A interação de SLA com Lactose, galactose e ASF ocorre com entropia desfavorável indicando efeito principal de interações de hidrogênio enquanto a ligação com GalNAc e BSM ocorre com entropia e entalpia favorável, indicando uma participação de ligações hidrofóbicas e reorganização de moléculas de água. Mesmo na saturação, SLA não se liga a todos os resíduos de açúcar das glicoproteínas testadas, o que acontece provavelmente por impedimento estérico. SLA também apresentou atividade pró-inflamatória com efeito hipernociceptivo ligado à inflamação, indicando a presença de células como leucócitos mediando o processo inflamatório. A toxicidade a náuplios da fase II de *Artemia* sp foi verificada para doses superiores à 50 µg/mL de SLA. Diante desses resultados, é possível verificar que a proteína purificada nesse trabalho apresenta-se como uma interessante ferramenta biotecnológico para estudos em processos de inflamação e dor e também como uma candidata a testes de toxicidade envolvendo epítomos que expressem antígenos contendo GalNAc.

**CAPÍTULO IV – Análise da massa intacta e sequência parcial de
SLA por Espectrometria de Massas**

1. Materiais e Métodos

1.1 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

A massa molecular das proteínas 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 3kV e 40V 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).

1.2 Digestão *in gel* e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massa

As proteínas a serem analisadas foram aplicadas a 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) ou quimiotripsina (Sigma) na proporção de 1:50 (peso / peso; enzima:substrato). Para digestão da amostra com a enzima termolisina, o gel foi reidratado numa solução de 50mM de Tris –HCl pH 7,5 com NaCl 5mM e CaCl_2 5mM nas mesmas proporções que as demais enzimas. A reação de digestão permaneceu overnight 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 μ L 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 massa (SYNAPT HDMS – Waters Corp). A amostra foi aplicada a uma coluna de fase reversa C18 (75 μ m x 100 mm) e eluída com um gradiente partindo de 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 Analysis – Análise Direta de Dados) os íons precursoros 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). 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*).

1.3 Análises da sequência primária por Bioinformática

A partir da obtenção da sequência primária, as informações de pI teórico, composição de aminoácidos, fórmula molecular e coeficiente de absorção foram computados pelo programa ProtParam (GASTEIGER *et. al*, 2005). Os alinhamentos de sequência primária foram feitos através do programa ESPript 2.2 (GOUET *et. al*, 1999). Os dados filogenéticos foram gerados no programa ClustalW

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação da massa intacta de SLA

Foi possível observar que SLA apresentou um espectro de massas bastante heterogêneo, indicando a presença de isoformas ou glicofomas variando entre as massas 28874 a 29925 ± 2 Da. Através da análise do espectro deconvoluído que pode ser observado na figura 25 abaixo, é possível observar um padrão que representaria pelo menos 3 isoformas ou glicofomas diferentes. A primeira estaria compreendida entre os íons de massa 28874 a 29061 ± 2 Da, a segunda entre os íons de massa 29311 e 29495 ± 2 Da e a terceira entre os íons de 29799 e 29495 ± 2 Da.

O primeiro grupo indica que as massas 29061 ± 2 Da corresponde a adição de uma molécula de hexose com um aducto de sódio, o que o caracteriza como uma glicofoma do íon de massa 28874 ± 2 Da.

A segunda série que varia de 29311 e 29495 ± 2 Da também corresponde a adição de uma molécula de hexose com um aducto de sódio, também a caracterizando o íon 29495 ± 2 Da como uma glicofoma do íon de massa 29311 ± 2 Da.

A diferença de massa entre os íons da primeira série e da segunda série corresponde à massa de uma hexose, uma desoxihexose e uma pentose. Sendo assim, esses íons também podem representar uma glicofoma.

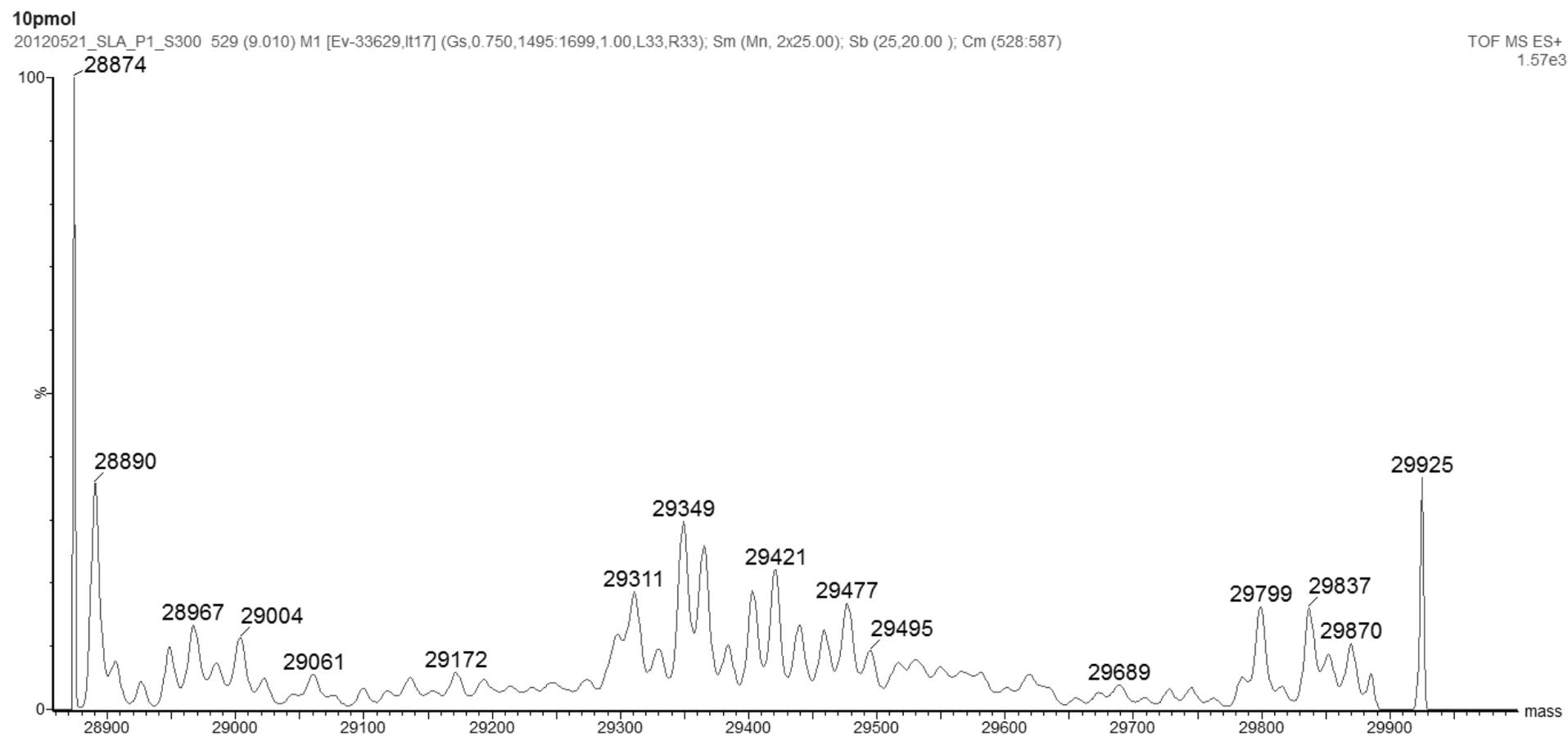
O terceiro grupo que compreende os íons de massa entre 29799 e 29925 ± 2 Da apresentam uma diferença de massa de 126 ± 2 Da. Esse valor não corresponde a massa de monossacarídeos que compõem os glicanos de proteínas vegetais, portanto esses íons podem representar pelo menos duas isoformas.

Os íons que aparecem intermediários às séries podem corresponder a modificações químicas em alguns aminoácidos como perda de uma hidroxila, presença de aductos e oxidação de aminoácidos como metionina.

Uma das razões para chamarmos a proteína purificada nesse trabalho de SLA e diferenci-la de SLL, purificada por Fernandes e colaboradores (2012) é a massa molecular e o processamento em cadeias. SLL apresenta uma massa majoritária de 28994 kDa por espectrometria de massas, enquanto SLA

apresenta uma massa de 28874 ± 2 kDa além da presença de pelo menos 4 glicofomas e 2 isoformas em SLA. Além disso, as cadeias proteolíticas em SLA são co purificadas e aparecem no perfil eletroforético, enquanto que SLL não apresenta processamento de cadeias.

Figura 25 – Espectro deconvoluído de SLA



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

3.2 Sequenciamento parcial de SLA

SLA foi digerida com as enzimas Tripsina, Quimiotripsina e Asp-N. O resultado da digestão pode ser observada na tabela de peptídeos (Tabela 08) abaixo. Foram sequenciados 10 peptídeos de tripsina, 1 de Asp-N e 1 de quimiotripsina, totalizando 179 aminoácidos e a massa de 20149,76 Da. Levando em consideração a massa média de um resíduo de aminoácido como 110 e a massa média aferida para SLA, chegamos a conclusão de que essa proteína possui aproximadamente 251 resíduos, o que corresponde a aproximadamente 69% da sequência da proteína.

Tabela 08 – Tabela de peptídeos sequenciados de SLA.

Peptídeo	Sequência	Massa Teórica	Massa Aferida	Diferença
T1	ADLVSFTYTK	1143,5812	1143,5565	0,02
T2	ALYAAPIHIWDR	1424,7565	1424,7119	0,04
T3	KRFLTSFSFLLR	1513,8770	1513,9043	-0,03
T4	NSNSHNTTLVAVEFDTFHNK	2274,0664	3282,8647	-1008,80
T5	TEREKFENGELSQFLNAAK	2210,0967	2210,0625	0,03
T6	TLTASLTYPK	1093,6019	1093,6013	0,00
T7	SYLVSTFVDVK	1256,6653	1256,6144	0,05
T8	EALPEWVR	998,5185	998,5439	-0,03
T9	VFGSASTGLSK	1052,5502	1052,5442	0,01
T10	FEVLDWGEPLR	1359,6823	1359,6312	0,05
A1	DALVSFVAQTQFRTVGNP	1949,0000	1948,9844	0,02
Q1	FLGPKSSEFLGLGNTDHPPTLTEP	2553,2751	2553,3164	-0,04
Q2	DVKEALPEWVRVGF	1643,8671	1643,8844	-0,02

O peptídeo identificado na tabela 08 como T4 (NSNSHNTTLVAVEFDTFHNK) apresenta um sítio de N-glicosilação composto pela sequência NTT. É possível verificar que existe uma diferença de 1008,80 Da entre a massa teórica do peptídeo e a massa aferida. Essa diferença de massa é idêntica a massa calculada para o glicano Man₂XylFucGlcNAc₂, uma variação do glicano Man₃XylFucGlcNAc₂ (Figura 26) que pode ser encontrado em outras proteínas que não lectinas, como é o caso da Serino-Protease de rizomas de *Zingiber officinale* (CHOI & LAURSEN, 2000).

Nas lectinas de *R. pseudoacacia*, *S. japonica*, *V. macrocarpa*, *E. coralodrendon* e *E.cristagalli* esse glicano também está presente, sendo

encontrado na estrutura cristalográfica das duas Erythrinas (SHAANAN *et al.*, 1991; BONNEIL *et al.*, 2004; TURTON *et al.*, 2004; YAMAGUCHI *et al.*, 1993 E WANTYGHEM *et al.*, 1992)

Figura 26 – Espectro de fragmentação do íon de massa 3282,8647

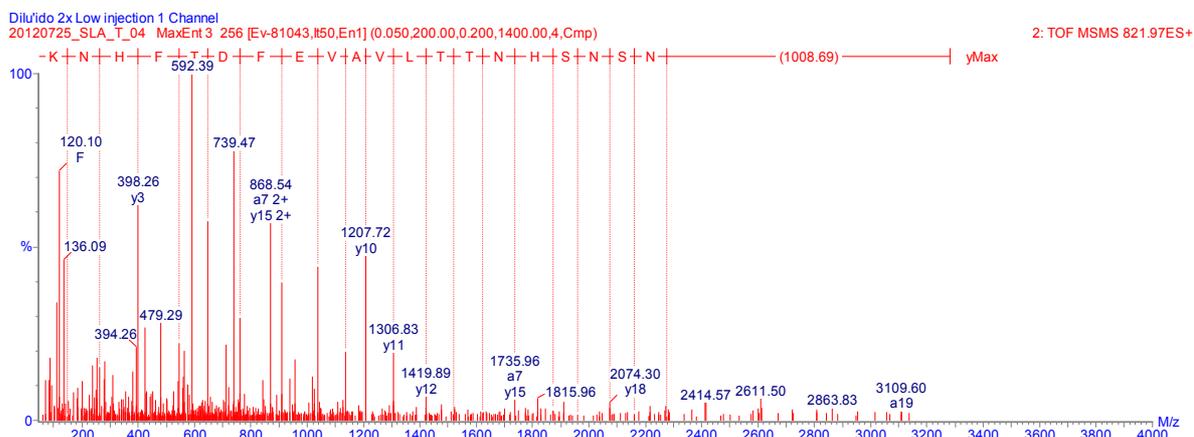


Figura 27 – Alinhamento dos peptídeos sequenciados com a lectina de sementes de *Sophora japonica* (SJA).

1	11	21	31	41	51
EILSFSFPKF	ASNQEDLLLQ	GDALVSSKGE	LQLTTVENGV	PIWNSTGRAL	YYAPVHIWDK
ADXVSFTYTK					AX YAAPXHXWDR
		DAXVSFVAQ	TQFRTVGNP		
61	71	81	91	101	111
STGRVASFAT	SFSFVVKAPV	ASKSADGIAF	FLAPPNNQIQ	GPGGGHLGLF	HSSGYNSSYQ
KRFXT	SFSFXXR				NSNSHNTT*
			FLGPKSSEFL	GLGNTDHPPT	LTEP
121	131	141	151	161	171
IIAVDFDTHI	NAWDPNTRHI	GIDVNSINST	KTVTWGQNG	EVANVLISYQ	AATETLTVSL
XVAVEFDTFH	NK		TEREKFENG	EXSQFXNAK	TXTASX
181	191	201	211	221	231
TYPSSQTSYI	LSAAVDLKSI	LPEWVRVGF	AATGLTTQYV	ETHDVLWSWF	TSTLETGDCG
TYPKSYXVST	FFDVKEA	XPEWVRVGF	ATSGXSK	FEVXDWGE	PXR
		DVKEA			FG
241	251				
AKDDNVHLVS	YAFI				
SXVDNTKXRN	X				

Os peptídeos em azul são oriundos de digestão com tripsina, os de vermelho com quimiotripsina e os verde com AspN. Os aminoácidos Leucina e Isoleucina não foram diferenciados durante o sequenciamento, portanto, foram representados por X. O * representa um possível sítio de glicosilação.

A sequência parcial de SLA foi submetida ao BLAST com busca no banco de dados de domínios conservados (CDD – Conserved Domain Database). Foi possível identificar as regiões conservadas de homodímeros e

homotetrâmeros presentes nos peptídeos T2 (AXYAAPXHXWDR), T6 (TXTASXTYPK) e T7 (SYXVSTFVDVK), região de ligação à metal presente no peptídeo T4 (NSNSHNTTXVAVEFDTFHNK) e regiões do sítio de ligação à carboidratos no peptídeo C1 (FXGPKSSEFXGXGNTDHPPTXTEP). Os aminoácidos marcados em cinza são os identificados como responsáveis pela interação. A busca no banco de dados de domínios conservados mostrou também que SLA pertence à família de Lectinas de Leguminosas (Figura 28).

Figura 28 - Resultado da busca no CCD utilizando a sequência parcial de SLA

Conserved domains on [lc|21267]

Local query sequence

Graphical summary show options »

Query seq. 1 25 50 75 100 125 150 179

homodimer interaction site
homotetramer interaction site

metal binding site

carbohydrate binding site

Non-specific hits

Superfamilies

lectin_legume_LecRK_Arcelin_ConA
Lectin_legB
lectin_L-type superfamily

Search for similar domain architectures [?] Refine search [?]

List of domain hits

Description	PssmId	Multi-dom	E-value
[H]lectin_legume_LecRK_Arcelin_ConA[cd06899], legume lectins, lectin-like receptor kinases, arcelin, concanavalinA, and alpha-amylase inhibito	173887	no	4.37e-12
[H]Lectin_legB[pfam00139], Legume lectin domain;	215744	no	4.90e-12

Blast search parameters

Data Source: Live blast search RID = U59897CP01R

User Options: Database: cdsearch/cdd v3.10 Low complexity filter: yes E-value threshold: 0.01 Maximum number of hits: 500

References:

- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D)225-9.
- Marchler-Bauer A et al. (2009), "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database.", *Nucleic Acids Res.*37(D)205-10.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.*32(W)327-331.

[Help](#) | [Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
NCBI | NLM | NIH

Os resultados da busca no CDD concordam fortemente com os dados experimentais nesse trabalho que demonstram que SLA é um tetrâmero dependente de metal para ligar-se a carboidratos. As lectinas de leguminosas possuem um sítio de ligação à carboidratos formado por algumas regiões de loops e essa conformação é determinada pela presença de metais de transição como cálcio e manganês. A perda desses metais resulta na perda da capacidade de ligação à carboidratos (SHARMA & SUROLIA, 1997; LORIS *et al*, 1998; BOUCKAERT *et al*, 2000; LORIS *et al*, 2004).

Os resultados do BLAST mostram que a sequência parcial de SLA está mais relacionada a VML (Lectina de *Vatairea macrocarpa* Código de Acesso: P811371 Score máximo: 77,8 e-value=2 e-16), B-SJA I (Lectina GalNAC específica da casca de semente de *Sophora japonica* Código de Acesso: P93538.1 Score máximo: 67,4 e-value=9e-13) CLA I (Proteína semelhante a lectina e sem atividade hemaglutinante de *Cladrastis lutea* Código de Acesso: Q39527.1 Score máximo: 65,9 e-value= 5e-12) SJA (Lectina ligante a GalNAC de sementes de *Sophora japonica* Código de Acesso: P93535.1 Score máximo: 65,9 e-value= 5e-12) e RPbAI (Lectina da casca do caule de *Robinia pseudoacacia* Código de Acesso: Q42372.1 Score máximo: 64,7 e-value= 1e-11)

O alinhamento de sequência dessas 5 proteínas pode ser visualizado na figura 29. A similaridade de sequência parcial de SLA foi de 43% com VML e B-SJA I, 41,3% com CLA I, 40% com SJA e 36% com RPbAI. É possível verificar no alinhamento que SLA possui algumas regiões de sequência conservadas similares às lectinas de tribos basais como Sophoreae e Dalbergieae e com uma lectina da tribo Robineae, todas da subfamília Papilionoideae.

laevicarpa, sendo SLA, proteína purificada nesse trabalho, uma lectina com processamento proteolítico enquanto SLL não o apresenta.

A tribo Swartzieae compartilha algumas características florais com membros da subfamília Caesalpinoideae como a similaridade do pólen, perda de alguns órgãos florais e um cálice inteiro, similar aos do gênero *Bauhinia* (pertencente a subfamília Caesalpinoideae). Algumas características como a anatomia da madeira, citologia do pólen, compostos químicos e a presença de nódulos são características que posicionam a tribo *Swartzia* à subfamília Papilionoideae. Além disso, a referida tribo compartilha algumas características com tribos basais de Papilionoideae como a perda e a fusão de alguns órgãos florais (FERGUSON; SKVARLA, 1988, 1991; BEHNKE, 1981; COWAN, 1981; TUCKER, 2003).

Nesse estudo foi determinado a sequência parcial de uma lectina extraída de sementes de *S. laevicarpa*, uma espécie pertencente a tribo Swartzieae. SLA demonstrou ser uma lectina relacionada à outras de tribos basais de Papilionoideae como Dalbergieae e Sophoreae e com uma lectina da tribo Robineae. Esses resultados corroboram fortemente com a localização da tribo Swartzieae na subfamília Papilionoideae e demonstra que as lectinas podem ser utilizadas como uma ferramenta taxonômica interessante. Para uma afirmação conclusiva da posição filogenética dessa tribo baseando-se na sequência de lectinas, faz-se necessário que mais sequências de outras espécies do gênero sejam desvendadas.

4. Conclusões

A proteína purificada nesse trabalho e chamada de SLA provavelmente é formada por um pool de glicofomas e isoformas. Foi possível identificar 179 aminoácidos de um provável total de 251, o que corresponde a aproximadamente 70% da sequência completa dessa proteína. A partir da sequência parcial também foi possível identificar regiões conservadas que a classifica como uma lectina de leguminosa com regiões de formação de dímeros e tetrâmeros, sítio de ligação à carboidrato e de ligação a metais, corroborando com os dados experimentais detalhados no capítulo III dessa tese. Com base nos dados de sequenciamento e análise da massa da proteína, foi possível indicar diferenças que comprovam que SLA e SLL são proteínas diferentes, sendo que a primeira apresenta processamento pós traducional em cadeias e a segunda não. Também foi possível verificar que SLA é uma proteína com sequência de aminoácidos relacionada a outras lectinas de tribos basais da sub-família Papilionoideae como Dalbergieae e Sophoreae. Esses dados corroboram com o posicionamento de Swartzia como uma tribo basal de Papilionoideae e demonstra que a estrutura primária de lectinas pode ser utilizada como uma ferramenta taxonômica para ajudar a estabelecer o posicionamento da referida tribo.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi isolada uma nova lectina de sementes da espécie *Swartzia laevicarpa* que foi nomeada de SLA. A lectina foi caracterizada físico-quimicamente e também por espectrometria de massas. Foi possível verificar que o pH ótimo de atividade dessa é entre 7 e 8 e que a mesma perde 50% da sua atividade a partir de 60°C. SLA é uma glicoproteína com massa aparente por SDS-PAGE de 30 kDa e, diferente de SLL, também isolada da mesma semente, apresenta processamento proteolítico em cadeias, como outras lectinas de tribos relacionadas.

SLA tem afinidade por GalNAc e carboidratos relacionados à Gal e apresenta um padrão de ligação distinto para resíduos de Gal e de GalNAc. Também possui atividade pró inflamatória e hipernociceptiva, sendo a dor de origem inflamatória. Quando administrada em doses superiores a 50 µg/mL apresenta toxicidade para *Artemia sp.* Esses dados demonstram que SLA é uma interessante ferramenta biotecnológico para estudos em processos de inflamação e dor e também como uma candidata a testes de toxicidade envolvendo epítomos que expressem antígenos contendo GalNAc

SLA demonstrou-se dependente de metais através do teste com EDTA e a sequência parcial também demonstrou que a lectina apresenta sítios de interação com metais. Também pela sequência parcial foi possível verificar que SLA pertence à família de lectinas de leguminosas e apresenta o domínio de ligação a carboidratos e domínios de interação homodímeros e homotetrâmeros conservados. SLA apresentou similaridade com lectinas da tribo Dalbergieae e Sophoreae, o que corrobora com dados taxonômicos que classificam a tribo Swartzieae como pertencente a subfamília Papilionoideae e é relacionada às tribos basais.

- AKIYAMA SK, YAMADA SS, YAMADA KM.(1989) Analysis of the role of glycosylation of the human fibronectin receptor. **J Biol Chem** 264:18011–8.
- 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. (2003). The galactosebinding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, 35:1674–1681.
- ALENCAR, 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. (2004). *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein Pept Lett**, 11:195–200.
- 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. (2007). *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 374:275–282.
- ALENCAR, N.M.N., TEIXEIRA, E.H., ASSREUY, A.M.S., CAVADA, B.S., FLORES, C.A., RIBEIRO, R.A. (1999). Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm**, 8:107–13.
- ALENCAR, V.B., ALENCAR, N.M., ASSREUY, A.M., MOTA, M.L., BRITO, G.A., ARAGÃO, K.S., BITTENCOURT, F.S., PINTO, V.P., DEBRAY, H., RIBEIRO, R.A., CAVADA, B.S. (2005b). Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **Int J Biochem Cell Biol**, 37:1805–1814.
- ALLEN, H. J., & JOHNSON, E. A. Z. (1976). The isolation of lectins on acid-treated agarose. **Carbohydrate Research**, 50(12).
- ANIMASHAUN, T. AND HUGHES, R.C. (1989). Bowringa milbraedii agglutinin. Specificity of binding to early processing intermediates of asparagine-linked oligosaccharide and use as marker of endoplasmic reticulum glycoproteins. **J. Biol. Chem.** 264, 4657-4663.
- ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., and SCHWEDE T. (2007). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22,195-201.
- ASHWELL, G., MORELL, A.G. (1974) The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. **Adv. Enzymol**, 41 99 - 128

- BARAHONA, M.V., SANCHEZ-FORTUN, S. (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Environ Pollut**, 104, pp. 469–476
- BEHNKE, H.-D. (1981). Swartzia: phloem ultrastructure supporting its inclusion into Leguminosae—Papilionoideae. **Iselya** 2: 13–16
- BENEVIDES, R.G. (2008). Avaliação do Potencial Fungicida e Termiticida de uma Fração Protéica Lectínica de Sementes de *Platypodium elegans* Vogel e Obtenção da Lectina Purificada. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza.
- BENEVIDES, R. G. ; GANNE, G. ;SIMOES, R. C.; SCHUBERT, V. ; NIEMIETZ, M. ; UNVERZAGT, C. ; CHAZALET, V. ; BRETON, C. ; VARROT, A. ; CAVADA, B. S. ; IMBERTY, A.(2012) . A Lectin from *Platypodium elegans* with Unusual Specificity and Affinity for Asymmetric Complex N-Glycans. **Journal of Biological Chemistry (Online)** v. 287, p. 26352-26364
- BEZERRA, D. P.; LEITE, K. B.; NUNES, E. P.; MARINHO, E. S.; CAVADA, B. S.(2003) Purificação de uma Lectina Presente em Sementes de *Machaerium acutifolium*. *Anais da XXVI Reunião Nordestina de Botânica*, In: XXVI **Reunião Nordestina de Botânica**, Fortaleza..
- BLOMME B, VAN STEENKISTE C, CALLEWAERT N, VAN VLIERBERGHE. (2009) Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **J Hepatol**;50:592–603.
- BONNEIL, E.; YOUNG, N. M.; LIS, H.; SHARON, N.; THIBAUT, P. (2004) Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the *Erythrina* genus by mass spectrometry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 426, 241-249
- BOUCKAERT, J., DEWALLEF, Y., POORTMANS, F., WYNS, L. & LORIS, R. (2000). The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 19778–87.
- BREWER, C. F. (1996) Multivalent lectin-carbohydrate cross-linking interactions, **Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.** 6, 165-179.
- BUTS, L., GARCIA-PINO, A., IMBERTY, A., AMIOT, N., BOONS, G. J., BEECKMANS, S., VERSÉES, W., WYNS, L., LORIS, R.(2006). Structural basis for the recognition of complex-type biantennary oligosaccharides by *Pterocarpus angolensis* lectin. **FEBS J.**, 273, 2407–2420,.
- BYRD ,J. C. E BRESALIER, R. S. (2004), Mucins and mucin binding prot eins in colorectal cancer, **Cancer Metastasis Rev.**, 23 77–99.
- CALVETE, J.J., SANTOS, C.F., MANN, K., GRANGEIRO, T.B., NIMTZ, M., URBANKE, C. & CAVADA, B.S. (1998). Amino acid sequence, glycan

structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. *FEBS Lett.*, 425: 286-292.

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

CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T.B. & BARRAL NETTO, M. (2001). Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2: 123-135.

CAVADA, B.S., MARINHO, E.S., SOUZA, E.P., BENEVIDES, R.G., DELATORRE, P., SOUZA, L.A., NASCIMENTO, K.S., SAMPAIO, A.H., MORENO, F.B., RUSTIGUEL, J.K., CANDURI, F., DE AZEVEDO JR., W.F. & DEBRAY, H. (2006). Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Acta Crystallographica Section F*, 62: 235-7.

CAVALCANTE, M.S.M; COELHO, L.C.B.B. (1990) Isolation and partial purification of a lectin from *Swartzia pickelli* Killip (White Jacaranda). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85(3) 371-371.

CHAMBERY, A., DI MARO, A., PARENTE, A. (2008). 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.

CHAMMAS R, VEIGA SS, LINE S, POTOENJAK P, BRENTANI R.R (1991). Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp120/140: an alpha 6/beta 1 integrin. *J Biol Chem* 266(3) 349–55.

CHAWLA, D., ANIMASHAUN, T., HUGHES, R. C., HARRIS, A, & AITKEN, A. (1993). *Bowringia mildbraedii* agglutinin: polypeptide composition, primary structure and homologies with other legume lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1202(1), 38–46.

COWAN, R. S. (1981). Swartzieae. In Polhill and P. R. Raven [eds.], **Advances in legume systematics**, part 1, 209–212. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

CHOI, K.H; LAURSEN, R.A. (2000). Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome *Zingiber officinale*. *European Journal of Biochemistry* 267(5),1516–1526.

DAM, T. K., AND BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem. Rev.*, 102, 387-429, 2002.

- DAM, T. K.; GERKEN, T. A.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; MOURA, T. R.; BREWER, C. F. Binding studies of alpha-GalNAc-specific lectins to the alpha-GalNAc (Tn-antigen) form of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 28256–28263, 2007.
- DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., SOUZA, E. P., OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., MORENO, F.B., FREITAS, B.T., SANTI-GADELHA, T., SAMPAIO, A. H., AZEVEDO JR., W. F. & CAVADA, B. S. (2007). Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules **BMC Struct. Biol.**, 7: 52.
- DENG, J.-L., ZENG, Z.-K., YAN, B., HUANG, X.-Q., (2000). Purification and characterization of *Sophora flavescens* lectin. **Acta. Bot. Sin.** 42, 828–833.
- DISNEY MD, SEEBERGER P H.(2004) The use of carbohydrate microarrays to study carbohydrate–cell interactions and to detect pathogens. **Chem Biol** 11(1) 701–7.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Anal. Chem.**, 28:350-356.
- EDMAN, P (1950). **Acta Chem. Scand.**, 4, 283.
- FEIZI T, MULLOY B. (2003). Carbohydrates and glycoconjugates: glycomics: the new era of carbohydrate biology. **Curr Opin Struct Biol** 13:602–4.
- FERENCÍK, M. & STVRTINOVÁ, V. (1996). Endogenous control and modulation of inflammation. **Folia Biol. Praha**, 42: 47-55.
- FERGUSON, I.K., AND J. J. SKVARLA. (1988). Pollen morphology of the tribe Swartzieae (subfamily Papilionoideae: Leguminosae). 1. Introduction and all genera excluding *Aldina* and *Swartzia*. **American Journal of Botany** 75: 1884–1897.
- FERGUSON, I.K., AND J. J. SKVARLA. (1991). Pollen morphology of the tribe Swartzieae (subfamily Papilionoideae: Leguminosae). 2. The genera *Aldina* Endlicher and *Swartzia* Schreber and systematic conclusions. **Review of Palaeobotany and Palynology** 67: 153–177.
- FERNANDES, A. V, RAMOS, M. V, GONÇALVES, J. F. C., MARANHÃO, P. A. C., CHEVREUIL, L. R., & SOUZA, L. A. G. (2011). Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 23(3), 237–244.
- FERNANDES, A.V. ; VASCONCELOS, I. M. ; RAMOS, M. V. ; MONTEIRO, A. C. O. ; PEREIRA J.O. ; GONÇALVES, J.F.(2012). Purification and Characterization of a Lectin of the Swartzieae Legume Taxa. **Protein and Peptide Letters**, v. 19, p. 1-8,

- FERRIGE, A.G., SEDDON, M.J., GREEN, B.N., JARVIS, S.A., SKILLING, J. (1992). Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 6: 707–711.
- FINNEY, D.J. (1971). Probit analysis. Cambridge, England: Cambridge University Press, 31p.
- FUKUDA M. (1996). Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. **Cancer Res.** 56 2237–2244
- GARCIA-PINO, A.; BUTS, L.; WYNS, L.; LORIS, R. (2006) Interplay between metal binding and cis/trans isomerization in legume lectins: structural and thermodynamic study of *P. angolensis* lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 361, n. 1, p. 153-67.
- Garcia-Pino A.; Buts L.; Wyns L.; Imberty A.; Loris, R. How a Plant Lectin Recognizes High Mannose Oligosaccharides. **Plant Biologists**. Vol. 144
- GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): **The Proteomics Protocols Handbook**, Humana Press. 571-607
- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. (2011). . **Acta histochemica** 113 236 –247
- GOETZ JA, MECHREF Y, KANG P, JENG MH, NOVOTNY MV.(2009) Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. **Glycoconj J** ;26:117–31.
- GOLDSTEIN, I. J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T., & SHARON, N. (1980). What should be called a lectin? **Nature**, 285:66.
- GOLDSTEIN, I. J. & HAYES, C. E. (1978). In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* (Tipson, R. S. & Hrnton, D., eds), 35, 127-340,
- GORELIK, E., GALILI, U., RAZ, A. (2001) On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev** 20, 245–77,.
- GOUET, P., COURCELLE, E., STUART, D.I. and METOZ, F. (1999). ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*. 15 305-8
- GRUPP, C., JOHN, H., HEMPRICH, U., SINGER, A, MUNZEL, U., & MÜLLER, G. A. (2001). Identification of nucleated cells in urine using lectin staining. *American journal of kidney diseases* : **the official journal of the National Kidney Foundation**, 37(1), 84–93.
- GUPTA, D., KALTNER, H., DONG, X., GABIUS, H.-J., AND BREWER, C. F. (1996) Comparative cross-linking activities of lactose-specific plant and

animal lectins and a natural lactose-binding immunoglobulin G fraction from human serum with asialofetuin, **Glycobiology** 6, 843-849.

HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., DAO-THI, M.H., STRECKER, G., IMBERTY, A., FERNANDEZ, E., WYNS, L. & ETZLER, M.E. (1999). Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **J Mol Biol.**, 286: 1161-1177.

HANOVER JA.(2001). Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. **FASEB J**;15:1865–76.

HART GW, HOUSLEY MP, SLAWSON C.(2007) Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**;446:1017–22.

HOFFMANN, E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry Principles and Applications**. 3 ed. Wiley, England. 2007.

ITO, Y. (1986). Occurrence of lectins in leaves and flowers of *Sophora japonica*. **Plant Science**, 47 7-82.

IUCN (2012). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 01 de Junho de 2013.

JOUBERT FJ, SHARON N, MERRIFIELD EH. Purification and properties of a lectin from *Lonchocarpus capassa* (apple-leaf) seed. **Phytochemistry**. 25: 323–327. 1986.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.

LANDUCCI, E. C., ANTUNES, E. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LIS H.; SHARON N.(1993) Protein glycosylation. Structural and functional aspects. **Eur. J. Biochem**. 218, 1-27.

LIU, B; LI CY; BIAN HJ; MIN MW, CHEN LF, BAO JK. (2009) Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Arch Biochem Biophys**. 482(1-2):1-6..

LIU, F.-T., PATTERSON, R. J., AND WANG, J. L. (2002) Intracellular functions of galectins, **Biochim. Biophys. Acta** 1572, 263-273.

LORIS, R., IMBERTY, A., BEECKMANS, S., VAN DRIESSCHE, E., READ, J. S., BOUCKAERT, (2003). J. Crystal structure of *Pterocarpus angolensis* lectin in complex with glucose, sucrose and turanose. **J. Biol. Chem**. 278, 16297–16303,

LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., & WYNS, L. (1998). Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, 1383: 9-36.

- LORIS, R., WALLE, I.V., GREVE, H.D., BEECKMANS, S., DEBOECK, F., WYNS, L., BOUCKAERT, J. (2004) Structural Basis of Oligomannose Recognize by the *Pterocarpus angolensis* Seed Lectin. **J Mol Biol.** 335(5):1227-1240.
- MA, Z.-G., YAN, B., HUANG, X.-Q., WANG, L.-X., ZENG, Z.-K., (2001). Cloning and sequencing of a lectin protein gene from the roots of *Sophora flavescens*. **Acta Bot. Sin.** 43, 821–825.
- MADI, Francisco Tarcísio Moraes. Conhecendo a madeira.com. Disponível em: <http://www.leaonet.com/conhecendoamadeira/madeira/index.php?id=74>. Acessado em: 01 de Junho de 2013.
- MAGALHÃES, A. F., TOZZIB, A. M. G. A., SANTOSA, C. C., MAGALHÃES, E. G. (2006) Analysis of metabolites from plants of the *Swartzia* genus using chemical indexes: evolutionary tendencies. **Ecl. Quím.**, 31(2): 13-16.
- MIN, W., JONES, D. H. (1994) In vitro splicing of concanavalin A is catalyzed by asparaginyl endopeptidase; **Nat. Struct. Biol** 1: 502–504
- MITRA N., SINHA S., RAMYA T.N., SUROLIA A. (2006). N-linked oligosaccharides as outfitters for glycoprotein folding, form and function. **Trends Biochem Sci.** 31 156–63.
- MODY R, JOSHI S, CHANEY W. (1995) Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J Pharmacol Toxicol Methods**;33:1–10
- MOREIRA, F.W., MOREIRA, F.M.S., SILVA, M.F. (1995). Germinação, crescimento inicial e nodulação em viveiro de Saboarana (*Swartzia laevis* AMSHOFF). **Acta Amazonica** 25 (3/4) 149-160.
- MOREIRA, R.A., AINOUIZ, I.L., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. (1991). Plant Lectins, Chemical and Biological Aspects; **Mem. Ins. Oswaldo Cruz.** 86: 211-218.
- MOREIRA, R.A., PERRONE, J.C.(1977). Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiol.**, 59: 783–787.
- MUKHOPADHYAY B, MARTINS MB, KARAMANSKA R, RUSSELL DA, FIELD RA. (2009). Bacterial detection using carbohydrate-functionalised CdS quantum dots: a model study exploiting *E. coli* recognition of mannosides. **Tetrahedron Lett.** 50:886–9
- MYLLYHARJU J, NOKKALA S, (1996^a). Glycoproteins with N-acetylglucosamine and mannose residues in Chinese hamster metaphase chromosomes. **Hereditas** 124: 251–259.
- MYLLYHARJU J, NOKKALA S, (1996^b). Fucosylated glycoproteins in Chinese hamster metaphase chromosomes. **Hereditas** 125: 285–288.

- NAGANO, CS; DEBRAY, H; NASCIMENTO, KS; PINTO, VPT; Cavada, BS; SAKER-SAMPAIO, S; FARIAS, WRL; SAMPAIO, AH (2005). HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Science** (Print), USA, v. 14, n.8, p. 2167-2176,.
- NAGANO, C.S., CALVETE, J.J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B.S. AND SANZ, L. (2008) Insights into the structural basis of the pH-dependence dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J.** 409: 417-28.
- NAPIMOGA, M.H, CAVADA, B.S, ALENCAR, N.M.N, MOTA, M.L, BITENCOURT, F.S, ALVES-FILHO, J.C, GRESPAN, R., GONÇALVES, R.B, CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T, FREITAS, A., PARADA, C.A, FERREIRA, S.H, CUNHA, F.Q. (2007). *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int Immunopharmacol** 7:824–835.
- NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. (2002) Composição mínima, teores proteicos e detecção de atividade hemaglutinante em sementes de *Andira retusa* (Leguminosae, Papilionoidae, Dalbergieae); Resumos do 53o Congresso Nacional de Botânica; **53º Congresso Nacional de Botânica**; Recife; BRASIL,.
- NIALL HD (1973). Automated Edman degradation: the protein sequenator. **Methods Enzymol.**27:942-1010.
- NIMRICHTER L, GARGIR A, GORTLER M, ALTSTOCK RT, SHTEVI A, WEISSHAUS O, (2004). Intact cell adhesion to glycan microarrays. **Glycobiology**;14:197–203
- NUNES BS; RENSONNET NS; CAVADA BS ; DAL-SECCO, D; VIEIRA, SM; TEIXEIRA, EH; MOURA, TR; TEIXEIRA, CS; CLEMENTE-NAPIMOGA, JT; CUNHA, FQ; NAPIMOGA, MH. (2009). Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1,.
- OFEK I, HASTY DL, DOYLE RJ. (2003). Bacterial adhesion to animal cells and tissues. **Washington, DC**: ASM Press;.
- OFEK I, HASTY DL, SHARON N. (2003). Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 38:181–91.
- OLIVEIRA, J.T.A., MELO, V.M.M., CAMARA, M.F.L., VASCONCELOS, I.M., BELTRAMINI, L.M., MACHADO, O.L.T., GOMES, V.M., PEREIRA, S.P., FERNANDES, C.F., NUNES, E.P., CAPISTRANO, G.G.G., MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O. (2002) Purification and physicochemical

characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculada*. **Phytochemistry** 61: 301-310.

- OPDENAKKER G., RUDD P.M., PONTING C. P., DWEK R. A. (1993). Concepts and principles of glycobiology. **FASEB J** 7:1330–7.
- OPPENHEIMER SB, ALVAREZ M, NNOLI J.(2008). Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. **Acta Histochem**; 110:6–13
- PARODI, A.J. (1999). . **Biochimica et Biophysica Acta** - General Subjects 1426, 287–295.
- PATSOS G, HEBBE-VITON V, ROBBE-MASSELOT C, MASSELOT D, SAN MARTIN R, GREENWOOD R, (2009). O-Glycan inhibitors generate arylglycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines. **Glycobiology** ;19:382–98.
- PEREIRA JUNIOR, F. N., SILVA, H. C., FREITAS, B. T., ROCHA, B. A. M., DO NASCIMENTO, K. S., NAGANO, C.S., LEAL, R. B., SAMPAIO, A.H., CAVADA, B. S. Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **JMR. Journal of Molecular Recognition.** , v.25, p.443 - 449, 2012.
- PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SIQUEIRA, R. C. L.; SILVA, M. S. J.; MARINHO, M. M.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.(2008). Atividade Antiinflamatória Da Lectina De Sementes De *Lonchocarpus arariensis*. **3ª Reunião Regional FESBE**, Fortaleza, CE,.
- POLHILL, R. M. (1994). Complete synopsis of legume genera. In F. A. Bisby, J. Buckingham, and J. B. Harborne [eds.], **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**, vol. 1, xlix–liv. Chapman and Hall, New York, New York, USA
- PORETZ, R. D. (1972) in *Methods in Enzymology* (Ginsburg, V., ed.), Vol. 28, pp. 349-354, **Academic Press**, New York.
- POWLESLAND AS, HITCHEN PG, PARRY S, GRAHAM SA, BARRIO MM, ELOLA MT. (2009). Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. **Glycobiology**;19:899–909
- RAMOS, MV; GRANGEIRO, TB; CAVADA, BS; SAMPAIO, A. H.(2000). Carbohydrate/glycan binding specificity of legume lectins in respect to their proposed biological functions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 43(4) 349-359.
- RANGEL, T. B. A., CARVALHO, A. U., NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S., FERNANDES, P. M. B. (2009). Isolamento e caracterização parcial de lectina proveniente de sementes da espécie vegetal *Andira fraxinifolia*

(LEGUMINOSAE-FABACEAE). Anais/Resumos da **61ª Reunião Anual da SBPC**.

REK A, KRENN E, KUNGL AJ.(2009). Therapeutically targeting protein–glycan interactions. **Br J Pharmacol**;157:686–94.

ROTTGER S , WHITE J , WANDALL HH, OLIVO JC, STARK A , BENNETT EP, (1998). Localization of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation through out the Golgi apparatus. **J Cell Sci** ;111:45–60.

SANTOS AF.; CAVADA, BS. ; ROCHA BAM ; NASCIMENTO KS; SANTANA AEG. (2010). Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 794-798,.

SCHACHTER H, BROCKHAUSEN I. (1992). The biosynthesis of serine (threonine)-N-acetylga- lactosamine-linked carbohydrate moieties. In: Allen HJ, Kisailus EC, editors. *Glycoconjugates: composition, structure and function*. **New York: Marcel Dekker Inc.**.. p. 262–332

SHAANAN B, LIS H, SHARON N.(1991). Structure of a Legume Lectin with an Ordered N-linked Carbohydrate in Complex with Lactose. **Science**. 254: 862-866..

SHARMA, V. & SUROLIA, A. (1997). Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, 267: 433–445.

SHARON N. (1980) Carbohydrates. **Sci Am**;243:90–116.

SHARON N, LIS H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. **Science**. 246:227–34.

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

SHARON, N. LIS, H. (1990). Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, 4: 3198-3208.

SHARON, N., LIS, H. (1993) Carbohydrates in cell recognition. **Science Am**, 268:82–9,.

SHARON N, LIS H.(2003) Lectins, 2nd edn. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**.

SHARON, N., LIS, H.(2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**.14:53R–62R.

SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V., & MANN, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, 1(6), 2856-60.

- SILVA, HC; BARI AU ; PEREIRA-JÚNIOR FN ; SIMÕES RC ; NERO ILB ; NOBRE CB ; PEREIRA, MG; NASCIMENTO, KS ; ROCHA, BAM; DELATORRE, P; NAGANO, CS; ASSREUY, AMS; CAVADA, BS. (2011) Purification and Partial Characterization of a New Pro-inflammatory Lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) Seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, p. 396-402.
- SIMÕES, RC ; ROCHA, BAM; BEZERRA, MJB; BARROSO-NETO, IL; PEREIRA-JUNIOR, FN; MOURA, RM ; NASCIMENTO, KS; NAGANO, CS ; DELATORRE, P; PIRES, AF; ASSREUY, AMS; SAMPAIO, AH; CAVADA, BS.(2012). 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,
- SOL, FG. ; CAVADA, BS. ; CALVETE, JJ. (2007). Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of Structural Biology**, v. 158, p. 1-9,.
- SRINIVAS, VR., REDDY, GB., AHMAD, N., SWAMINATHAN, CP., MITRA. N. & SUROLIA, A. (2001) Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1527: 102–111.
- STOCKERT, R.J., MORELL, A.G. (1982) Endocytosis of glycoproteins in: Arias I.M, Popper, H. Schachter D. **The Liver: Biology and Pathobiology**. New York. Rave, 205-217.
- STRUWE WB, HUGHES BL, OSBORN DW, BOUDREAU ED, SHAW KMD, WARREN CE. (2009). Modeling a congenital disorder of glycosylation type-1 in *C. elegans* : a genome-wide RNAi screen for N -glycosylation dependent loci. **Glycobiology**
- TORKE, BM; SCHAA, BA. (2008). Molecular phylogenetics of the species-rich neotropical genus *Swartzia* (Leguminosae, Papilionoideae) and related genera of the swartzioid clade. **Am. J. Bot.** 95(2) 215-228
- TUCKER, SC. (2003). Floral ontogeny in *swartzia* (leguminosae:papilionoideae:swartzieae):distribution and role of the ring meristem. **American Journal of Botany** 90(9): 1271–1292
- TURTON, K; NATESH, R; THIYAGARAJAN, N; CHADDOCK, JA; ACHARYA, R. (2004). Crystal structures of *Erythrina cristagalli* lectin with bound N-linked oligosaccharide and lactose. **Glycobiology** 14(10): 923-929.
- ULIEL, S., FLIESS, A., UNGER, R. (2001). Natural occurring circular permutations in proteins. **Protein engineering**, 14(8) 533-542.

- VAN DAMME, EJM; BARRE, A; BEMER, V; ROUGPE, P; VEUVEN, FV; PEUMANS, WJ. (1995). A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Molecular Biology**. 29(3), 579-598
- VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGÉ, P. (1998) Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 17(6), 575–692.
- VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F. & PEUMANS, W.J. (1996). The NeuAc α -2,6-gal/galNAc binding lectin from Elderberry (*Sambucus nigra*) bark: A type 2 Ribosome Inactivating Protein with an unusual specificity and structure? In **Eur. J. Biochem.**, 235: 128-137.
- VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W.F., GOLDSTEIN, I.J., PEUMANS, W.J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Plant.**, 183: 258-262.
- VARKI, A., Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. **Glycobiology** , 3 (1993) 97–101.
- WANTYGHEM J, PLATZER N, GINER M, DERAPPE C, GOUSSAULT Y. (1992). Structural analysis of the carbohydrate chain of glycopeptides isolated from *Robinia pseudoacacia* seed lectins. **Carbohydr Res.** 236: 181-193..
- WISEMAN, T., WILLISTON, S., BRANDTS, J. F., LIN, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. **Anal. Biochem.**, 179, 131–137.
- WORMALD MR, SHARON N. (2004). Carbohydrates and glycoconjugates: progress in non-mammalian glycosylation, glycosyltransferases, invertebrate lectins and carbohydrate-carbohydrate interactions. **Curr Opin Struct Biol**;14:591–2.
- YAMAGUCHI O, KIMURA M, ARAKI M, YAMASAKI N, KIMURA Y, NAKAJIMA Y, TAKAGI S. (1993) Chemical Structures of Two Subunits, A-Subunit and B-Subunit, of Galactose-Specific Isolectins from *Erythrina variegata* Seeds. **J Biochem**; 114: 560-566.
- YAMANAKA M, KATO Y, ANGATA T, NARIMATSU H. (2009) Deletion polymorphism in SIGLEC14 and its functional implications. **Glycobiology**;19:841–6.
- ZACHARA NE, HART GW. (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc!. **Biochim Biophys Acta**;1761:599–617

ZACHARIUS, R.M., ZELL, T.E., MORRISON, J.H., WOODLOCK, J.J., (1969). Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry** 30, 148-152

ZHANG Y, LIU S, LIU Y, WANG Z, WANG X, YAN Q.(2009). Overexpression of fucosyltransferase VII (FUT7) promotes embryo adhesion and implantation. **Fertil Steril** 91:908–14

ZHENG M, FANG H, TSURUOKA T, TSUJI T, SASAKI T, HAKOMORI S.(1993). Regulatory role of GM3 gangliosides in alpha 5 beta 1 integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. **J Biol Chem**;268:2217–22.