



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

ALFA UMARO BARI

LECTINAS DE SEMENTES DE *Parkia panurensis* E DE *Parkia biglobosa*: ESTUDOS
FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS

FORTALEZA

2015

ALFA UMARO BARI

LECTINAS DE SEMENTES DE *Parkia panurensis* E DE *Parkia biglobosa*:
ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS

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

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B2321 Bari, Alfa Umáro.
Lectinas de sementes de *Parkia panurensis* e de *Parkia biglobosa* : Estudos físico-químico e estruturais /
Alfa Umáro Bari. – 2015.
79 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Lectina de *Parkia panurensis* e *parkia biglobosa*. 2. Lectina de mimosoidea. 3. Extrutura cristalina. 4.
Dominio beta-prisma . I. Título.

CDD 660.6

ALFA UMARO BARI

LECTINAS DE SEMENTES DE *Parkia panurensis* E DE *Parkia biglobosa*:
ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS E ESTRUTURAIS

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

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Jorge Luís Almeida Correia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha família.

A todas as pessoas que me inspiram e incentivam a seguir em frente mesmo nos tempos de dificuldades.

“A educação é a principal arma da
libertação”

Amilcar Lopes Cabral

AGRADECIMENTOS

A Allah pela misericórdia e a existência plena da vida.

Ao meu orientador, o professor Dr. Benildo Sousa Cavada, por ter acreditado em mim e ter me dado oportunidade de fazer parte de BioMol-Lab e, pelas orientações, apoio e ensinamentos que vou levar comigo por toda a vida.

À Professora Dra. Kyria S. do Nascimento, pela co-orientação, pelos conhecimentos transmitidos dentro de laboratório e, por estar sempre disposta ajudar no que for preciso para meu crescimento científico.

Ao Dr. Jorge Luis Almeida Correia, por aceitar participar da banca examinadora e pelas valiosas colaborações e sugestões.

À professora Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy, pela valiosa colaboração para realização deste trabalho.

Aos mestrandos Vanir, Vinicius, Mayara Q. e a aluna da Iniciação Científica Cecília pela grande contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Batista Cajazeiras, Dr. Emilio, Dra Thais. A Mayara T., Cláudia, Ronniery, Neto, Ivanice, Simone, William, Claryane, Cleane, Allyson, Sara, Lucas, Cecília, David, Larissa, Daniel, Mateus, Lennon, Adson, a todos que fazem parte de BioMol-Lab pela convivência, reflexões, críticas, sugestões e aprendizados no laboratório que contribuem para o meu enriquecimento intelectual e pessoal.

Aos amigos e colegas, pela convivência, apoio mútua e sobre tudo pela grande amizade e a todos que de certa forma contribuem para meu crescimento.

Ao governo Brasileiro pela oportunidade de vir estudar no Brasil e à CNPQ e CAPES pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

De uma forma muito especial a toda minha família, minha mãe Cadijatu Bari, meu pai Abduramane Bari, minha filha Sadjá Oliveira Bari e o Tio Sinhu Mustafa, irmãos, irmãs, tios, tias, primos, primas, pelo amor, educação, compreensão, paciência, carinho e por estarem sempre me apoiando. Sem vocês nada seria possível.

Muito grato.

RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não imune com no mínimo um domínio não catalítico que se liga de forma reversível a mono ou oligossacarídeos específicos e encontram-se largamente distribuídas no reino vegetal. As lectinas de sementes apresentam-se como valiosas ferramentas biotecnológicas por desempenharem importantes funções biológicas tais como reconhecimento de células cancerígenas, agentes mitogênicos, imunossuppressores entre outras. Neste trabalho foi isolada uma lectina de sementes de *Parkia panurensis* (PpaL) específica por manose e glicose pela combinação das técnicas de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-manose. A análise das propriedades físico-química demonstrou que PpaL consegue manter a sua atividade hemaglutinante a ampla faixa de temperatura e pH. PpaL é uma proteína dependente dos íons metálicos Ca^{2+} e principalmente o Mn^{2+} . Pela análise de eletroforese (SDS-PAGE) PpaL apresentou um perfil eletroforético composto por dupla banda, uma maior com peso molecular de aproximadamente 45 kDa e outra menor com peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Estudos para determinação de estrutura tridimensional de lectina de sementes de *Parkia biglobosa* demonstrou que a estrutura cristalina completa da PBL complexado com α -metil-manosídeo consiste de um monômero na unidade assimétrica formado por três domínios β -prisma com as sequências de aminoácidos homologas arranjado na forma de tandem. A estrutura do monômero apresenta três sítios de ligação a carboidratos, cada sítio de ligação a carboidratos está localizado em um dos domínios β -prisma. Todos os ligantes apresentaram diferentes padrões de interação com os resíduos do sítio de ligação a carboidrato.

Palavras-chave: Lectina de *Parkia panurensis* e *Parkia biglobosa*. Lectina de Mimosoideae. Estrutura cristalina. Domínio β -prisma.

ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immune origin with at least one non-catalytic domain that reversibly binds to specific mono or oligo saccharides and are widely distributed in the plant kingdom. These lectins are presented as valuable tools for biotechnological byplay important biological functions such as recognition of cancer cells, mitogenic agents, immune suppressants among others. In this work, it was isolated lectin from *Parkia panurensis* seed (Ppal) specifies to mannose and glucose by combining the techniques of ammonium sulfate fractionation and affinity chromatography on a sepharose-mannose column. The analysis of the physicochemical properties showed that Ppal can maintain its hemagglutination activity at a wide range of temperature and pH and also was dependent of metal ions Ca^{2+} and especially Mn^{2+} . By the electrophoresis (SDS-PAGE) analysis, the Ppal showed an electrophoretic profile composed of dual band, higher molecular weight approximately 45kDa and a smaller molecular weight of approximately 30kDa. Studies to determine the three-dimensional structure of *Parkia biglobosa* seed lectin (PBL) showed the complete crystal structure of PBL complexed with α -methyl-mannoside consists of a monomer in the asymmetric unit consists of three β -prism domains with homologous amino acid sequences arranged in tandem. The structure of the monomer has three carbohydrate binding sites, each binding site to carbohydrates is located in one of the β -prism domains. All ligands showed different patterns of interaction with the residues of the carbohydrate binding site.

Keywords: Lectin of *Parkia panurensis* and *Parkia biglobosa*. Mimosoideae lectin. Crystal structure. Domain β -prism.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figure 1: Classificação estrutural de lectinas: Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. | 21 |
| Figure 2: Ramo de uma planta leguminosa; Alfafa (<i>Medicago sativa</i>) com detalhes de folha, flor, fruto e sementes. | 23 |
| <p>Figure 3: Estrutura tridimensional de um monômero de lectina de leguminosa <i>Arachis hypogaea</i> (PNA). As seis e sete cadeias de folhas-β antiparalelas são mostradas em cores vermelhos e azuis respectivamente. O carboidrato (lactose), mostrado na forma de de bola e bastão é reconhecido por resíduos de quatro loops: A (ciano), B(roxo), C(verde) e D(amarelo). Esta figura foi feita usando programas MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) e raster-3D (Merritt&Murphy, 1994)</p> | 27 |
| Figure 4: Determinação de massas moleculares aparentes das lectinas recombinantes em função de pH da solução pelo equilíbrio de sedimentação em centrifugação analítica. | 28 |
| Figure 5: Representação dos quatro níveis de organização estrutural das proteínas. | 34 |
| Figure 6: Estrutura tridimensional de uma proteína (TCLL): A rede de ligações de hidrogênio formado por loops extras está destacada. | 35 |
| Figure 7: (A) Folhas, (B) inflorescência, (C) vagens (D) semente de <i>Parkia panurensis</i> | 39 |
| <p>Figure 8: Cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose 4B-Manose. Volume da coluna: 5 mL, 3 mg/mL de amostra aplicada. A amostra ficou em contato com a matriz por aproximadamente 14 horas. As proteínas não ligantes a matriz foram eluídas com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 contendo NaCl 150mM (PI). A proteína ligante foi eluída com Glicina 100 mM pH 2,6 contendo NaCl 150 mM (PII). As amostras foram coletadas em volume de aproximadamente 1 mL, a um fluxo de 0,87 mL/min e foram detectadas por espectrofotometria em 280 nm.</p> | 49 |
| <p>Figure 9: 1- Marcadores moleculares (Fosforilase b 97 kDa, BSA 66 kDa, Ovoalbumina 45 kDa, Anidrate Carbônica 29 kDa e α- lactoalbumina 14,4 kDa). 2- 20 μg de PpaL em condição não redutoras. 3- 10 μg de PpaL em condições redutoras.</p> | 50 |
| Figure 10: Estabilidade térmica (A) e Estabilidade a variação de pH (B) de lectina de sementes de <i>Parkia panurensis</i> | 51 |
| Figure 11: Efeito do EDTA sobre a Atividade Hemaglutinante de DigL..... | 52 |
| Figure 12: Visão geral da estrutura do PBL. (A) monômero. (B) Representação do dímero. | 54 |
| <p>Figure 13: Visão geral do domínios β-prisma da PBL. (A) Domínio I. (B) Domínio II. (C) Domínio III.</p> | 55 |
| <p>Figure 14: Múltiplo alinhamento de sequências de aminoácidos de domínio β-prisma da PBL. Domínio I (resíduos 1-150), Domínio II (resíduos 151-295), Domínio III (resíduos 296-443).</p> | 56 |
| <p>Figure 15: Vista eletrostática do encaixe de MMA na estrutura de PBL. (A, C e E representam domínio β-prisma I, II e III respectivamente). Estruturas em destaque estão representadas em forma de bastão. Os resíduos envolvidos na interação com açúcar estão em cor verde e MMA está em cor amarela. (B, D e F representam domínio β-prisma I, II e III respectivamente) Orientação relativa e tipos de interação existente entre MMA e resíduos de sitio de ligação. As linhas tracejadas representam pontes de hidrogênio. As bolas vermelhas, azuis e pretas representam os átomos de Oxigênio, Nitrogênio e Carbono respectivamente. Comparações estruturais. Superposição dos sítios de ligação a carboidrato dos três domínios β-prisma de PBL e PPL. (A) domínios β-prisma I. (B) domínios β-prisma II. (C) domínios β-prisma III. PBL é representado pela cor verde e PPL é representado pela cor azul ciano.....</p> | 62 |
| <p>Figure 17: Efeito de PPL no teste de contorção. O ácido acético (0,8%, 0,1 ml / kg) foi injetado i.p. e o número de contorções foram contados a partir de 10-30 minutos após a injeção. Salina a 0,9% (50 μL/10g de peso corporal; iv), PPL (0,01, 0,1 e 1 mg/kg, iv) ou indometacina (5 mg/kg; ip) foram administrados 30 ou 60 minutos antes do ácido acético, respectivamente. A média \pm S.E.M. (n=8). Análise de variância e teste de Bonferroni. *p<0,05 comparado com o controle.</p> | 63 |
| <p>Figure 18: Efeito inibitório do PPL sobre a migração celular. PPL i.v. (1 mg/kg) ou salina (0,9%) foram injetados 30 min antes da injeção de (A) ácido acético (0,8%; 0,1 mL/kg) ou (B) fMLP (50 ng) administrado i.p., peritonite foi avaliada 4 horas após o estímulo. Leucócitos/neutrófilos total($\times 10^3$/ml)</p> | |

em fluido peritoneal. A média \pm S.E.M. (n =6). ANOVA e testes de Bonferroni. *P<0,05 em comparação com solução salina, #p<0,05 em relação ao estímulo.....64

Figure 19: Comparação do percentual da inibição no teste de contorção entre PPL e PBL. O ácido acético i.p. (0,8%, 0,1 ml / kg) foi injetado e o número de contorções foi contado a partir de 10 a 30 minutos após a injeção de 0,9% de solução salina i.v. (50 μ l/10 g de peso corporal), PPL i.v. (0,01; 0,1e1mg/kg) ou PBL i.v. (0,01; 0,1e1mg/kg) (adaptado de Cavada, et al.,2013) foram administradas respectivamente 30 min antes do ácido acético. A média \pm S.E.M. (n = 8). Para testes de ANOVA e Bonferroni. *P <0,05 em relação ao controle.....64

Figure 20: Alinhamento de sequência de aminoácidos de PBL e PPL feito em ESPript 2.1 (Gouet et al., 2003). A letra X em PBL representa o resíduo de Leucina ou Isoleucina que não são possíveis de distinguir pela massa 69

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01. Lectinas de espécies da família Leguminosa distribuídos em várias tribos mostrando especificidades por diferentes monossacarídeos..... | 25 |
| Tabela 02: Uso folclórico de <i>Parkia biglobosa</i> nos países oeste Africano para o tratamento de doenças. 30 | |
| Tabela 03. Atividade Hemaglutinante nos extratos protéicos de sementes de <i>Parkia panurensis</i> | 46 |
| Tabela04. Inibição de atividade Hemaglutinante de lectina de semente de <i>Parkia panurensis</i> por diferentes carboidratos..... | 47 |
| Tabela 05. Interação de sítios de ligação de cada domínio de PPL e PBL com carboidratos.. | 48 |
| Tabela 0 6. Tabela de purificação da lectina de sementes de <i>Parkia panurensis</i> | 49 |
| Tabela 07. Estatísticas de coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura. | 53 |
| Tabela 08. Porcentagem de similaridade entre os três domínios β -prisma da PBL. | 55 |
| Tabela 09. Resíduos de aminoácidos que Forman ponte de hidrogênio nos três Sítios de ligação de PBL com α -metil-manosídeo..... | 58 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å: Angstrom é uma unidade de medida de comprimento que se relaciona com o metro através da relação: $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$.

AH: Atividade Hemaglutinante

AHE: Atividade Hemaglutinante Especifica

BSA: Albumina Sérica Bovina

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESI: Ionização por Eletro Spray

HCl: Ácido clorídrico

kDa: Kilodalton

mgP: Miligrama de proteína

mL: Mililitro

M: Concentração molar

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

nm: Nanômetro

PBL: Lectina purificada de sementes de *Parkia biglobosa*

PpaL: Lectina purificada de sementes de *Parkia panurensis*

PPL: Lectina purificada de semente de *Parkia platycephala*

pH: Logaritmo negativo da concentração de íons de hidrogênio

RPM: Rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio

Tris: Hidroximetil Aminometano

UH: Unidade Hemaglutinante

µg: Micro grama

µL: Micro Litro

Φ, Ψ: Phi e Psi (Ângulo de resíduo de aminoácido numa proteína)

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO . | 16 |
| 1.1 | Considerações gerais. | 16 |
| 1.2 | Revisão bibliográfica | 18 |
| 1.2.1 | <i>Lectinas dos vegetais</i> . | 18 |
| 1.2.2 | <i>Distribuição de lectinas dos vegetais</i> | 19 |
| 1.2.3 | <i>Definição e classificação estrutural de lectinas dos vegetais</i> | 20 |
| 1.3 | Lectinas de leguminosas . | 22 |
| 1.3.1 | <i>Lectinas de gênero Parkia (Mimosoideae)</i> | 28 |
| 1.3.2 | <i>Lectinas Relacionados à Jacalina (JRL)</i> | 32 |
| 1.4 | Técnicas de cromatografia líquida . | 33 |
| 1.5 | Estrutura terciária de proteínas | 34 |
| 1.6 | Nocicepção..... | 36 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 38 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 38 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 38 |
| 3 | MATERIAS E MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1 | Material vegetal..... | 39 |
| 3.2 | Animais..... | 40 |
| 3.3 | Purificação da lectina de sementes de <i>Parkia panurensis</i> | 40 |
| 3.3.1 | <i>Extração e fracionamento de proteínas</i> | 40 |
| 3.3.2 | <i>Dosagem proteínas e de carboidratos</i> | 41 |
| 3.3.3 | <i>Ensaio de hemaglutinação e inibição de atividade hemaglutinante por carboidratos</i> | 41 |
| 3.3.4 | <i>Cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose-manose</i> | 41 |
| 3.4 | Caracterização físico-química de lectinas de sementes de <i>parkia panurensis</i> . | 42 |
| 3.4.1 | <i>Eletroforese em condições desnaturante</i> | 42 |
| 3.4.4 | <i>Efeito da temperatura, pH e EDTA sobre atividade hemaglutinante</i> | 42 |
| 3.5 | Determinação da estrutura tridimensional da lectina de sementes de <i>Parkia abiglobosa</i> . | 43 |
| 3.5.1 | Cristalização e coleta de dados | 43 |
| 3.5.2 | Substituição molecular e refinamento..... | 44 |
| 3.6 | Ensaio biológicos . | 44 |
| 3.6.1 | Atividade antinociceptivo das lectinas de sementes de <i>Parkia platycephala</i> | 44 |

| | |
|---|----|
| <i>3.6.2 Teste de contorções abdominais</i> | 44 |
| <i>3.6.3 Modelo de peritonite</i> | 45 |
| <i>3.6.4 Análises estatístico</i> | 45 |
| 4 RESULTADOS | 46 |
| 4.1 Purificação de uma nova lectina de sementes de Parkia panurensis | 46 |
| 4.2 Caracterizações físico-químicas da lectina de sementes de Parkia panurensis | 50 |
| 4.3 Determinação da estrutura tridimensional da lectina de sementes de Parkia biglobosa | 52 |
| 4.4 Atividade antinociceptivo das lectinas de sementes de Parkia biglobosa e Parkia platycephala | 62 |
| 5 DISCUSSÕES | 65 |
| 6 CONCLUSÃO | 74 |
| REFERÊNCIAS | 75 |