



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

RAPHAEL BATISTA DA NÓBREGA

**ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DA LECTINA DE *Canavalia
brasiliensis* COMPLEXADAS COM ADENINA E RIBOSE: ANALISE
ESTRUTURAL E PERSPECTIVAS**

**FORTALEZA
2016**

RAPHAEL BATISTA DA NÓBREGA

ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis*
COMPLEXADAS COM ADENINA E RIBOSE: ANÁLISE ESTRUTURAL E
PERSPECTIVAS

Tese de doutorado submetida à coordenação do Programa 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 Plínio Delatorre

FORTALEZA
2016

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

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

N676e Nóbrega, Raphael Batista da.

Estruturas cristalográficas da lectina de *Canavalia brasiliensis* complexada com adenina e ribose : análise estrutural e perspectivas / Raphael Batista da Nóbrega. – 2016.

101 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientação: Prof. Dr. Plínio Delatorre.

1. Lectinas. 2. Reconhecimento. 3. Ribose. 4. Adenina. 5. *Canavalia brasiliensis*. I. Título.

CDD 572

RAPHAEL BATISTA DA NÓBREGA

ESTRUTURAS CRISTALOGRÁFICAS DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis*
COMPLEXADAS COM ADENINA E RIBOSE: ANALISE ESTRUTURAL E
PERSPECTIVAS

Tese de doutorado submetida à coordenação do Programa 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: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Bruno Lopes de Sousa
Universidade Estadual do Ceará

Profª Drª. Kyria Santiago do Nascimento
Universidade Federal do Ceará

Profª. Drª Maria Gonçalves Pereira
Universidade Estadual do Ceará

Profª. Drª Norma Maria Barros Benevides.
Universidade Federal Do Ceará

Dedico este trabalho aos meus pais, Zeilton e Cliselda; a minha irmã, Eryka e a minha esposa, Vivyanne.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida.

A minha família (Zeilton – pai, Cliselda – mãe, Eryka – irmã), pelo esforço e incentivo.

Ao amigo e compadre Caetano, que tanto me ajudou e ajuda e sem o qual esse trabalho não seria possível.

Aos amigos da (PB): Antônio; Arnaldo; Geraldo; Gregório; Ideltônio; Ísis; Suellen.

Aos amigos do (CE): Bruno Lopes; Francisco Jr; Helton; Ito; Mayron; Rafael; Raquel; Renata e Rômulo.

Ao amigo Claudener que abriu a porta de sua casa sem mesmo me conhecer, permitindo que eu pudesse morar em Fortaleza e com quem pude aprender diariamente, tanto sobre ciência, quanto sobre enfrentar os desafios.

A todos os professores que passaram por minha formação e deixaram EXEMPLOS.

Aos professores, Dr. Benildo Cavada e Dr. Plínio Delatorre pela orientação e co-orientação respectivamente.

A minha esposa Vivyanne por seu companheirismo e por me fazer uma pessoa melhor.

A todos que de um modo ou de outro me fizeram chegar até aqui.

RESUMO

A família de lectinas vegetais mais estudadas é a das plantas leguminosas como a Concanavalina A (ConA) – *Canavalia ensiformes*. As atividades fisiológicas e biológicas atribuídas, tais como defesa da planta e ação antidepressiva, leva em consideração as suas interações com mono e oligossacarídeos de uma maneira específica e reversível. Embora lectinas da subtribo Diocleinae, como a ConA, sejam consideradas específicas para glicose e manose, estudos comparativos mostram que lectinas de diferentes espécies apresentam desempenhos diferenciados frente a um determinado modelo de atividade biológica, algo que parece estar relacionado à arquitetura do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (CRD) e à capacidade (ou não) de ligação a determinados mono- e oligossacarídeos. Além disso, tais atividades parecem não depender apenas da interação com carboidratos, haja vista que diversos estudos mostram que estas proteínas podem se ligar a outras biomoléculas, como compostos hidrofóbicos (a exemplo de adenina e ácido indolacético) e aminoácidos não protéicos (a exemplo do ácido α -aminobutírico – AABA). Neste trabalho, foram descritas duas estruturas cristalográficas da lectina ConBr, isolada de sementes da *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará), complexada com dois diferentes ligantes: um complexo da lectina com a β -D-ribofuranose e outro com a adenina, ambos compostos localizados no CRD. Baseado na localização desses ligantes, sugere-se, por *Docking* que a ConBr pode se ligar à adenosina. Além disso, esse estudo mostra que o AABA pode assumir diferentes disposições em seu sítio de ligação. Tomados em conjunto, estes resultados revelam novas perspectivas para as atividades fisiológicas e biológicas de lectinas de leguminosas.

Palavras-chave: Lectinas. Reconhecimento. Adenina. Ribose. *Canavalia brasiliensis*.

ABSTRACT

Legume lectins (e.g. ConA) are the most studied plant lectin family. The physiological and biological activities attribute to them, such as plant defense and antidepressant function, take into account their interactions with mono- and oligosaccharides in a specific and reversible manner. However, several studies show that these proteins can bind other biomolecules, such as hydrophobic compounds (e.g. adenine and indole acetic acid) and non protein amino acids (e.g. α -aminobutyric acid, AABA), although the structure-function relationship of these interactions remained poorly understood. In this study, we described two crystallographic structures of ConBr lectin isolated from the seeds of *C. brasiliensis*, complexed with two different ligands: a complex of the lectin with β -D-ribofuranose and another with adenine, both compounds found in the Carbohydrate-Recognition Domain (CRD). Based on the location of these binders, it is suggested by the docking ConBr can bind to adenosine. In addition, this study shows that AABA can take different provisions in its binding site. Taken together, these results reveal new insights into the physiological and biological activities legume lectins.

Keywords: Lectins. Recognition. Adenine. Ribose. *Canavalia brasiliensis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do processo de hemaglutinação	18
Figura 2 – Ilustração da Ricina	20
Figura 3 – Representação esquemática das quatro classes estruturais de lectinas	31
Figura 4 – Representação da biossíntese e processamento de lectinas Diocleinae	33
Figura 5 – Representação esquemática da coordenação de íons divalentes à lectina de leguminosa	34
Figura 6 – Visão lateral da estrutura monomérica de lectina de leguminosas..	35
Figura 7 – Representação esquemática generalizada do monômero de lectinas de leguminosas	36
Figura 8 – Representações esquemáticas de diferentes tipos de interações entre monômeros encontradas em lectinas de leguminosas	38
Figura 9 – Representação esquemática da ligação à carboidrato em lectinas de leguminosas	40
Figura 10 – Esquema de diagrama de fase para solubilidade protéica	48
Figura 11 – Padrão de difração obtido de um cristal a partir de lectina	50
Figura 12 – Representação da coordenação de AABA às estruturas de ConBr-adenina e ConBr-ribose	61
Figura 13 – Representação da molécula adenina no CRD de ConBr e ConM.....	63
Figura 14 – Representação da topologia estrutural do CRD de ConBr e ConM após ligação à adenina	65
Figura 15 – Sítio da adenina em ConBr	66
Figura 16 – Coordenação da β -D-ribofuranose no CRD de ConBr	68
Figura 17 – Representação comparativa do CRD de lectinas Diocleinae	70
Figura 18 – Representação da ConBr ligada as moléculas de adenina e ribose	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação em famílias de lectinas vegetais com sítio de reconhecimento a carboidratos na superfície	26
Tabela 2 – Famílias de lectinas de plantas: ocorrência e especificidade	27
Tabela 3 – Dados estruturais do processamento computacional dos complexos da lectina ConBr com ribose e com adenina	58
Tabela 4 – Ligações de hidrogênio (2.20-3.50 Å) e forças de van der Waals (3.50-4.50 Å) entre os átomos da adenina e resíduos da ConBr (a) e ConM (b)	63
Tabela 5 – Distâncias (Å) entre resíduos de aminoácidos a partir do CRD de ConBr nativa (n) e em complexo com ribose (c)	70
Tabela 6 – Volume (Å ³) do CRD de lectinas Canavalia nos estados nativo e ligada a carboidrato	71

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AABA	Ácido α -aminobutírico
AcNeu	Ácido N- acetilneuramínico
ADN	Adenosina
Ala	Resíduo de alanina na posição 207
Ala236	Resíduo de alanina na posição 236
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Arg228	Resíduo de arginina na posição 228
Asn14	Resíduo de asparagina na posição 14
C2	Átomo de carbono 2
C3	Átomo de carbono 3
Ca ²⁺	Íon cálcio
CGL	Lectina de <i>Canavalia gladiata</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (Concanavalina A)
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConM	Lectina de <i>Canavalia maritima</i>
CRD	Domínio de reconhecimento à carboidratos.
DB58	Lectina extraída das folhas de <i>Dolichos biflorus</i>
DBL	Lectina extraída das sementes de <i>Dolichos biflorus</i>
DGL	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>
DIAB	<i>Dolichos lablab</i>
DM	Docking molecular
F11	Resíduo de fenilalanina na posição 11
F191	Resíduo de fenilalanina na posição 191
F212	Resíduo de fenilalanina na posição 212
GABA	Ácido γ -aminobutírico
Gal	Carboidrato galactose
GalNAc	N-acetilgalactosamina;
GlcNAc	N-acetilglicosamina
Gly224	Resíduo de glicina na posição 224
Gly98	Resíduo de glicina na posição 98
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
I181	Resíduo de isoleucina na posição 181

Ile17	Resíduo de isoleucina na posição 17
Ile27	Resíduo de isoleucina na posição 27
L214	Resíduo de leucina na posição 214
L81	Resíduo de leucina na posição 81
L85	Resíduo de leucina na posição 85
Leu229	Resíduo de leucina na posição 229
Leu99	Resíduo de leucina na posição 99
Lys35	Resíduo de lisina na posição 35
Lys36	Resíduo de lisina na posição 35
MAL	Lectina de <i>Maackia amurensis</i>
Man	Carboidrato manose
MDP	2-metil-2,4-pentanediol
Mn ²⁺	Íon manganês
MX1	Linha de difração de Raios X1
MX2	Linha de difração de Raios X2
NaCl	Cloreto de sódio
PDB	Banco de dados de proteínas
ph	Potencial hidrogeniônico
PHAL	Lectina <i>Phaseolus vulgaris</i>
Phe	Resíduo de fenilalanina
PNA	Aglutinina de amendoim (<i>Arachis hypogea</i>)
PPL2	Lectina de <i>Parkia platycephala</i>
Pro202	Resíduo de prolina na posição 202
RIP	Poteína inativadora de ribossomo
S108	Resíduo de serina na posição 108
S113	Resíduo de serina na posição 113
SBA	Aglutinina de soja (<i>Glycine Max</i>)
SDS	Dodecil sulfeto de sódio
Ser168	Resíduo de serina na posição 168
Ser202	Resíduo de serina na posição 202
Thr226	Resíduo de treonina na posição 226
Thr97	Resíduo de treonina na posição 97
TNS	Ácido 2,6-toluidinilnaftalenossulfônico
TxLCI	Lectina isolada da tulipa

Tyr100	Resíduo de tirosina na posição 100
Tyr12	Resíduo de tirosina na posição 12
UEAII	Lectina de <i>Ulex europaeus</i>
V179	Resíduo de valina na posição 179
V89	Resíduo de valina na posição 89
V91	Resíduo de valina na posição 91
Val170	Resíduo de valina na posição 170
Val32	Resíduo de valina na posição 32
Visco I	Lectina de <i>Viscum album</i>
W404	Resíduo de triptofano na posição 404
WGA	Aglutinina de gérmen de trigo
Y54	Resíduo de tirosina na posição 54
ZIR	Isopenteniladenosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	ASPECTOS GERAIS	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	LECTINAS.....	18
2.1.1	A história das lectinas	18
2.1.2	Conceito	19
2.1.3	Aplicações	21
2.1.4	Lectinas Vegetais	22
2.1.5	Sistema de Classificação	24
2.1.5.1	<i>Lectinas de transporte</i>	25
2.1.5.2	<i>Lectinas com sítio ligante na superfície protéica</i>	25
2.1.1.1	<i>Quanto à organização estrutural</i>	30
2.1.6	Lectinas de Leguminosas	32
2.1.7	Sítios de ligação e especificidade	38
2.2	DETERMINANDO A ESTRUTURA 3D DE PROTEÍNA	42
2.2.1	Cristalografia de Raios X	43
2.2.2	Produção de Cristais	45
2.3	DIFRAÇÃO DE RAIOS X E SUAS FONTES	48
2.3.1	Padrão de Difração	49
2.4	SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR.....	49
2.5	REFINAMENTO ESTRUTURAL.....	50
3	OBJETIVOS	51
3.1	GERAL	51
3.2	ESPECÍFICOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1	PURIFICAÇÃO DA LECTINA.....	52
4.2	MOLÉCULAS LIGANTES.....	52
4.3	CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	52
4.4	SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR E REFINAMENTO	53
4.5	SIMULAÇÕES DE <i>DOCKING</i> MOLECULAR (DM)	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1	ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALINA.....	56
5.1.1	Estrutura geral da ConBr	56
5.1.2	Sítio para AABA	58
5.1.3	Sítio de ligação para adenina na estrutura da ConBr	60
5.1.4	Estrutura do CRD da ConBr ligado a β-D-ribofuranose	66
5.2	ANALISE DA ESTRUTURA DE CONBR POR DOCKING	71
5.2.1	Estrutura do complexo ConBr com adenosina e isopenteniladenosina por <i>docking</i> molecular	71
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Plantas são organismos que estão distribuídos nos mais diversos ecossistemas terrestres e desempenham diferentes funções nestes ambientes. O manejo e aplicação em diferentes áreas na indústria fazem das plantas a maior fonte de produtos naturais que se tem conhecimento

Em virtude de sua ampla distribuição, as plantas estão expostas as variações climáticas e geográficas de onde estão situadas. A ocorrência de intempéries, bem como a suscetibilidade a predadores impõem às plantas uma necessidade de adaptação a estes fatores (KESSLER; BALDWIN, 2002; MANDADI; SCHOLTHOF, 2013). Entretanto, devido à disponibilidade limitada de nutrientes, é necessário que as plantas diferenciem as formas de agressões para que possam adequar o seu desenvolvimento (NEILSON *et al.*, 2013). As percepções físicas e químicas desenvolvidas por estes organismos são mediadas por uma diversidade de compostos como ácidos graxos e aminoácidos encontrados nas estruturas orais de insetos (DINH; BALDWIN; GALIS, 2013) que acabam por induzir respostas de defesa nas plantas, muitas vezes mediada por moléculas sinalizadoras como o AMPc (MA *et al.*, 2009), açúcares (HODGE *et al.*, 2013), proteínas intrínsecas da planta como as lectinas (LANNON, N & VAN DAMME, E. J. M., 2014) e substâncias conhecidas como metabólitos secundários, tais como: alcalóides, terpenos, flavonóides, glicosinolatos e aminoácidos não protéicos (WINK, 1988). Estes últimos compostos apresentam pelo menos um grupamento amino e um carboxílico em sua estrutura, não estando envolvidos diretamente na síntese e estrutura de proteínas. É sabido que existe um número tão diverso quanto 250 moléculas deste tipo nas plantas, e que desempenham diferentes funções, tais como defesa, resposta ao estresse, desenvolvimento, floração e morfogênese (VRANOVA *et al.*, 2011). Destes podem-se destacar os ácidos butíricos, os quais contém quatro átomos de carbono e apresentam-se em três isoformas (α , β e γ) de acordo com a posição de seu grupamento amino.

Para os aminoácidos não protéicos, a literatura ainda está se expandindo sobre suas funções precisas, embora seja especulado que os mesmos apresentem ações sobre processos de defesa. Estudos têm demonstrado que o ácido β -aminobutírico aumenta a resistência das plantas contra infecções, enquanto o isômero γ é

praticamente inativo nesta situação, mas age propelindo efeito anti-herbivoria (COHEN *et al.*, 1994; COHEN, 2002; GARCÍA-MUNIZ; MARTÍNEZ-IZQUIERDO; PUIGDOMÈNECH, 1998; SIEGRIST; OROBER; BUCHENAUER, 2000; ŠAŠEK *et al.*, 2012; TON *et al.*, 2005).

A capacidade de realizar tão diversificada quantidade de interações e modular a resposta adequada parece estar diretamente associada com o fato das lectinas se ligarem de modo reversível a um ou mais dos compostos e por meio de vias de sinalização permitem às plantas determinarem de forma eficiente a resposta frente a situações adversas.

As células respondem a sinais através de mecanismos como, transdução de sinais iniciados pela interação de ligantes extracelulares (hormônios, citocinas, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização) com receptores específicos ancorados principalmente na membrana plasmática, no citoplasma ou núcleo. Os sinais são transduzidos da superfície celular para o interior da célula através da interação proteína-proteína, proteína-açúcar ou pela geração de segundos mensageiros como o cálcio, diacilglicerol, inositol 1,4,5-trifosfato, AMPc e GMPc, que levam à ativação de proteínas específicas. O resultado final da ativação de uma via de sinalização é a ativação de proteínas alvo específicas, modulando a sua atividade e a atividade da própria célula. Plantas podem interagir com citocinas e assim regular seu desenvolvimento radicular, embora a utilização de adenina tem demonstrado ser mais eficiente na estimulação da diferenciação e desenvolvimento vegetal (Wróblewska, K. 2012). A lectina *Phaseolus lunatus* apresenta a capacidade de ligar-se a adenina por interações dependentes do grupamento 6NH₂ uma vez que modificações neste grupo induzem redução intensa da capacidade de reconhecer a molécula de adenina (ROBERTS, D. D. *et al.*, 1986)

Os carboidratos são a principal classe de macromoléculas utilizadas para o reconhecimento e ancoramento às membranas celulares e podem formar ligações tanto covalentes (glicosídicas) quanto não covalentes (a partir de ligações de hidrogênio). A ausência ou presença de ramificações nos carboidratos permite gerar uma heterogeneidade complexa de estruturas proporcionando assim inúmeras possibilidades de contatos e comunicações (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001; SHARON; LIS, 1989). A principal forma de reconhecimento destes carboidratos é a partir de sua ligação reversível com um grupo de proteínas denominadas de lectinas (MURDOCK; SHADE, 2002; PEUMANS; VAN DAMME, 1995;)

Compreender as diversas formas de interação e reconhecimento celular está diretamente associado ao advento de modernas técnicas de biologia molecular e biologia estrutural. A utilização da cristalografia de proteínas, bem como proposições baseadas em *docking* molecular tem sido extremamente importante para permitir a determinação de detalhes atômicos dos meios pelos quais tais interações ocorrem. Diversos estudos têm mostrado que não apenas dentro de uma família de lectinas, mas até mesmo em uma única espécie é possível ter resultados significativamente diferentes em função de mudanças observadas em regiões dos sítios de reconhecimento a carboidratos. (CAVADA et al., 2001; NOBREGA et al., 2012; ROCHA et al., 2011)

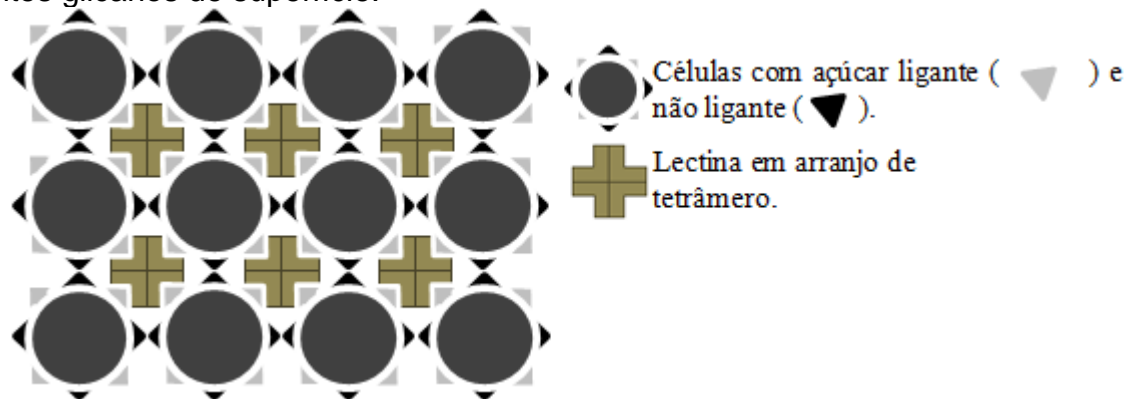
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 LECTINAS

2.1.1 A história das lectinas

O trabalho pioneiro referente ao estudo das aglutininas de origem vegetal e sua capacidade de ligação a macromoléculas é datado do Século XIX com o descobrimento da ricina, trabalho realizado pelo pesquisador Stilmark em 1888. Seus dados são referentes a experimentos realizados com extratos obtidos a partir da planta *Ricinus communis*, popularmente conhecida como mamona. Ele observou que extratos de sementes, assim como de outros vegetais pertencentes à família Euphorbiaceae, tinham capacidade de aglutinar hemácias de diferentes animais (FIGURA 1) (STILLMARK, 1888). Posteriormente estudos com *Abrus precatorius* em 1891 feitos por H. Hellin observou também a capacidade de hemaglutinação com a abrina, proteína extraída desta planta (SHARON; LIS, 2001).

Figura 1 – Representação esquemática do processo de hemaglutinação obtido a partir de ligações cruzadas entre uma lectina (genérica) de leguminosas e células com diferentes glicanos de superfície.



Fonte: Produzida pelo autor.

Em 1926 James B. Sumner isola a proteína Concanavalina A (ConA) a partir da *Canavalia ensiformis* obtendo o primeiro resultado de uma verdadeira hemaglutinação (SUMMER; HOWELL, 1936).

W. C. Boyd e K. O. Renkonem em 1940 descobriram, independentemente, a especificidade das proteínas hemaglutinantes pelos grupos sanguíneos do sistema ABO (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Em 1950, surgem as primeiras indicações de que os açúcares presentes na membrana das células são as moléculas alvo das lectinas (WATKINS; MORGAN, 1952).

A palavra lectina vem do latim *legere*, significando seleção e foi primeiramente utilizada por Boyd e Shapleigh (1954) a partir de estudos de especificidade de extratos vegetais por grupos sanguíneos.

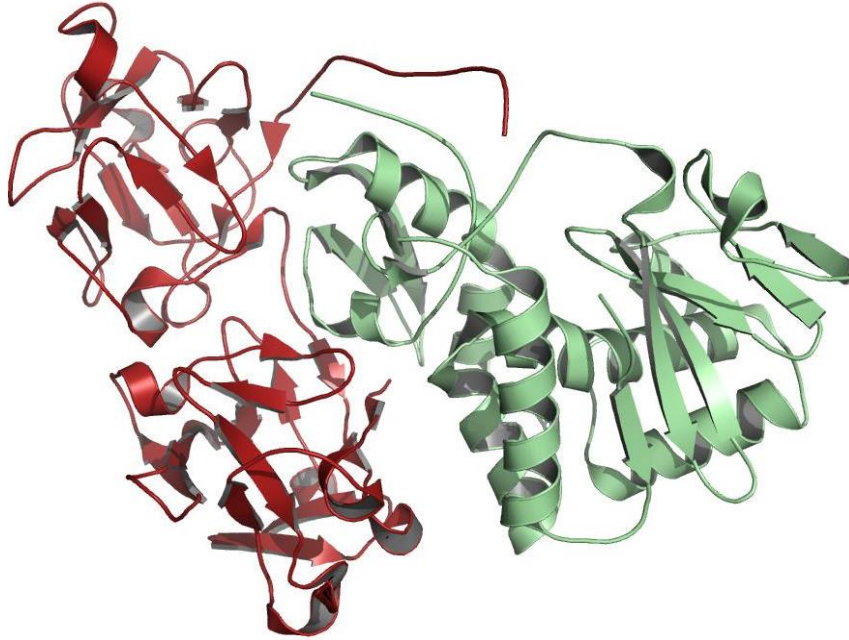
Grande destaque foi dado as lectinas em meados de 1960, a partir de estudos desenvolvidos por Peter C. Nowell com a planta *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960). A partir deste trabalho se deu início a uma longa história de descobertas e possíveis aplicações das lectinas de leguminosas, tais como a capacidade de induzir o processo mitótico em linfócitos (BARRAL-NETO *et al.* 1992) Esta evidência corroborou com as ideias anteriormente propostas de sinalização celular mediada por ligantes exógenos e que esta comunicação é dependente de açúcar na membrana como um transdutor da informação celular.

O grau de especificidade das lectinas é variável tanto de acordo com o tipo de açúcar presente, quanto ao tipo de lectina que está sendo utilizada em um dado ensaio. AUB; SANFORD e COTE, (1965) fizeram uma descoberta que viria a ser um dos marcos no estudo da glicômica, bem como da aplicação das lectinas na área da saúde. Ao trabalhar com gérmen de trigo, eles isolaram e determinaram que a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) era capaz de reconhecer e aglutinar preferencialmente células cancerosas (AUB; SANFORD; COTE, 1965).

2.1.2 Conceito

Segundo postulado por Peumans e Van Damme (1995), lectinas são proteínas capazes de reconhecer de modo específico e reversível carboidratos estando este reconhecimento dependente da presença de uma região na estrutura denominada de domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD). Tal conceito engloba uma extensa diversidade de proteínas como, por exemplo, a ricina (FIGURA 2) que tem a capacidade de se ligar de forma reversível e sem causar nenhuma alteração ao monossacarídeo D-galactose, contudo, apresenta atividade enzimática, com capacidade de inativar a síntese protéica ao se ligar ao ribossomo (RUTENBER *et al.*, 1991). Baseando-se nesta propriedade, a ricina é classificada como uma proteína do tipo RIP (do inglês – *Ribosome Inactivate Protein*).

Figura 2 – Ilustração da Ricina, proteína tóxica presente em sementes da espécie *Ricinus communis*. Em vermelho, dois domínios homólogos de reconhecimento a D-galactose e em verde domínio o domínio do tipo α/β com atividade distinta de reconhecimento à carboidratos. Código PDB: 1ABR.



Fonte: Produzida pelo autor

A característica de ligação a diferentes substratos foi posteriormente observada para outras proteínas que possuem, além do sítio ligante para o carboidrato, um segundo sítio ligante que interage com ligantes não-glicídicos (SINGH *et al*, 1999). Estes achados deixam claro que se faz necessário uma adequação mais precisa para classificar uma proteína como lectina: a lectina precisa ser uma proteína ou glicoproteína ligante reversível de ao menos um mono ou polissacarídeo; não pode ser de origem imune, embora possa a proteína lectina estimular a ativação de resposta imunológica e não pode alterar a estrutura do açúcar nem por sua ligação à lectina e nem tão pouco por ação enzimática (GABIUS, 1997; RÜDIGER; GABIUS, 2001).

Experimentos realizados com a lectina ConA auxiliaram a compreensão de que a aglutinação ocorre mediante reconhecimento de carboidratos específicos, complexos ou não. O processo de aglutinação pode ser bloqueado ou revertido mediante utilização de sacarídeos simples como manose e glicose, impedindo a formação de aglutinados celulares (SUMMER & HOWELL, 1936)

2.1.3 Aplicações

As propriedades observadas neste grupo de moléculas (lectinas), as tornam úteis para a detecção, isolamento e caracterização parcial de glicoproteínas. Além disso, possibilitam o estudo dos padrões glicídicos que podem ocorrer nas superfícies celulares e, assim auxiliar no entendimento das formas pelas quais ocorre o reconhecimento celular em muitos sistemas biológicos, como adesão de bactérias, vírus e protozoários em células hospedeiras; adesão de leucócitos em células do endotélio vascular (SHARON; LIS, 1989). Portanto, as lectinas podem ser utilizadas como ferramentas biotecnológicas por estarem amplamente disponíveis nos vegetais, por apresentarem alta especificidade a carboidratos e por permitirem modificações químicas e processos de conjugação, podendo ser utilizadas com vários propósitos (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; CRUZ *et al*, 2005; KOCOUREK; FREED, 1990; VARKI *et al*, 1999;):

- I. Atuarem como bio-efetores: ação mitogênica (ConA, leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*) para linfócitos periféricos humanos;
- II. Aplicação como inibidores em cultura celular;
- III. O tratamento antitumoral e regeneração tecidual;
- IV. Purificação de glicoconjugados e/ou glicoproteínas a partir da imobilização em matrizes fixas;
- V. Seleção e auxílio na clonagem em leveduras, bactérias e linhagens celulares;
- VI. Uso como imunotoxinas;
- VII. Uso de lectinas em sistemas de *blotting* de transferência de proteínas;
- VIII. Como marcadores celulares a partir de fluorescência;
- IX. Aplicação em reforço de fixação de nitrogênio em cereais;
- X. Indução de produção de óxido nítrico;
- XI. *Drug delivery*;
- XII. *Resposta contra estresse vegetal*

Uma ampla revisão sobre as aplicações das lectinas foi realizada por Sharon & Lis (2004), em que são atribuídas as lectinas capacidades de: identificação celular e sua subsequente separação; detecção e isolamento de glicoproteínas para análises estruturais; testes de histoquímica e citoquímica na detecção de glicanos situados em superfícies celulares; determinação de rotas neuronais; estudos de biossíntese de

glicoproteínas. Este grupo de proteínas vem sendo utilizado como importantes ferramentas no auxílio à investigação da organização estrutural e dinâmica molecular de carboidratos situados nas superfícies celulares no decorrer de diferentes eventos biológicos, tais como: divisão, diferenciação, processos malignos, bem como para o isolamento e caracterização de glicoconjugados (SHARON; LIS, 1993, 1995). Compreender as formas pelas quais são feitas as interações e o reconhecimento entre lectina e seus ligantes é um dos primeiros passos para elucidar como ocorrem as diversificadas funções biológicas desempenhadas por estas moléculas. Segundo Gabius & Gabius (1997) muitas lectinas possuem diferentes atividades como as seguintes: comunicação celular, defesa vegetal, fertilização, desenvolvimento, infecção parasitária, metástases tumorais e inflamação.

As lectinas são consideradas um grande grupo de proteínas que possuem afinidade por carboidratos e são ubíquas na natureza podendo ser encontradas em vegetais, protozoários e animais, fungos e bactérias (LIS; SHARON, 1998; IMBERT *et al*, 2004; MOURA *et al*, 2006; LEITE *et al*, 2005). Dentre estas fontes, podemos citar as de origem vegetal, consideradas as mais bem estudadas e caracterizadas devido a sua especificidade de reconhecimento e ligação sem, no entanto, alterar a estrutura glicídica ligante (GOLDSTEIN; HUGHES, 1980; LIENER *et al*, 1986; OTTENSOOSER *et al*, 1974). Por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, estas moléculas são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (MISQUITH *et al.*, 1994).

2.1.4 Lectinas Vegetais

Até o momento mais de 500 lectinas vegetais foram estudadas. Suas funções e mecanismos de ação atuantes nas plantas necessitam de maior compreensão e estudos. É suposto que os receptores aos quais as lectinas se ligam apresentam regiões com glicídios complementares ao sítio de reconhecimento à carboidratos (CRD) da lectina permitindo a ligação a glicoconjugados. As sementes são a principal fonte para extração das lectinas embora possam ser encontradas em outras partes da planta. Um dos grupos vegetais mais estudados é o das leguminosas e o crescente interesse por este grupo se deve ao fato de apresentarem alta similaridade quanto a sua sequência de aminoácidos e sua conservação estrutural (ETZLER, 1985).

Sabendo-se que há uma extensa variedade de glicanos na natureza e existe também grande diversidade de lectinas capazes de os reconhecerem, pode-se deduzir que lectinas vegetais desenvolveram-se evolutivamente de modo muito eficiente (PEUMANS; VAN DAMME, 1995) e embora seu papel fisiológico na planta permaneça incerto, algumas proposições têm sido feitas.

- Lectinas estão dirigidas para o reconhecimento de açúcares exógenos, tais como galactose e lactose, isto indica, portanto, que estão destinadas à interação com vários organismos, para seu reconhecimento ou voltados à defesa vegetal (VAN DAMME *et al*, 2004a). A proporção destas proteínas varia drasticamente entre as diferentes regiões do vegetal ou entre sua idade podendo ser de 1 a 10% do peso total das proteínas. Geralmente, as lectinas vegetais são distribuídas em todo o vegetal e são isoladas de diferentes partes: sementes (LATHA *et al.*, 2006) em maior proporção e em outros tecidos vegetais em menores proporções, tais como folhas (COELHO; SILVA, 2000), cascas (INA *et al.*, 2005), raízes (WANG; NG, 2006) e flores (SUSEELAN *et al*, 2002). As lectinas obtidas dos diferentes órgãos, por sua vez, não são necessariamente idênticas em estrutura ou especificidade de ligação a carboidratos, quando comparadas àquelas lectinas dos órgãos de estocagem (RÜDIGER, 1998). As lectinas de plantas que são produzidas em órgãos de estocagem que se encontra em sementes, na maioria, mas também tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta dominam os estudos em lectinologia devido a sua abundância na planta.

- Lectinas vegetais estão aptas a desempenhar papéis fisiológicos importantes, quer seja de forma sistêmica ou mesmo intracelular atuando como mediadores de interações proteína-carboidrato (VAN DAMME *et al*, 2004b).

- As lectinas podem ter papel que vão além de capacidade de reconhecer carboidratos, podendo atuar como transportadores ou fonte de moléculas de reserva como hormônios e aminoácidos não protéicos (DELATORRE *et al*, 2007).

Os estudos sobre lectinas são bastante diversificado quanto aos grupos vegetais investigados recebendo grande atenção as pertencentes às famílias: Leguminosae, Solanaceae (PEUMANS *et al.*, 2003), Cucurbitaceae (PLÁ *et al.*, 2004), Amaranthaceae (PORRAS *et al*, 2005), Cactaceae (ZENTENO *et al*, 1995), Euphorbiaceae (WITITSUWANNAKUL *et al*, 1998), Labiateae (FERNÁNDEZ-ALONSO *et al*, 2003; AKUL *et al*, 2003), Moraceae (MOREIRA *et al*, 1998) e Urticaceae (KAVALALI *et al*, 2003).

A primeira identificada e portanto, principal representante das lectinas de leguminosas é a obtida a partir da espécie *Canavalia ensiformes* e em virtude do alto grau de similaridade em sequência e estrutura com outras lectinas obtidas desta mesma família todas as outras lectinas deste grupo recebem o nome genérico de *ConA-like*. ConA apresenta especificidade pelos epímeros D-glicose/D-manose. Possui um monômero com 237 resíduos de aminoácidos. Desde sua obtenção, essa proteína é a mais bem caracterizada por estudos bioquímicos e biofísicos (CAVADA *et al.*, 2001).

Posterior a descoberta da ConA, surgiu uma busca intensa por novas lectinas deste tipo, e várias outras passaram a ser identificadas, isoladas e purificadas. Todas as lectinas têm como característica básica sua capacidade de se ligar a carboidratos, mas as semelhanças vão, além disto. Lectinas pertencentes a um mesmo grupo taxonômico apresentam propriedades físicas e estruturais bastante similares como tem sido observado para as obtidas da subtribo Diocleinae, como as lectinas de *Canavalia brasiliensis*– ConBr (MOREIRA; CAVADA, 1984), *Canavalia bonariensis* – CABO (CAVADA *et al.*, 1996a), *Cratylia floribunda* – CFL(OLIVEIRA *et al.*, 1991), *Dioclea guianensis*– DguiL (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Dioclea violácea* – DvioL (MOREIRA *et al.*, 1996), *Dioclea virgata*– Dvir (DELATTORRE, *et al.*, 2011) entre outras.

2.1.5 Sistema de Classificação

Em virtude das variações específicas observadas para as lectinas elas podem ser sub agrupadas levando-se em consideração diferentes aspectos como: similaridades em sua sequência de aminoácidos, local de atuação no vegetal, variações na conformação da estrutura secundária, terciária e quaternária, especificidade para carboidratos e características topológicas tanto do CRD quanto da existência de diferentes sítios para outros ligantes não glicídicos em combinação (DEVARAJAN; SONAVANE, 2003; DELATORRE *et al.*, 2007; DELATORRE *et al.*, 2013). Visando a identificação e agrupamento das lectinas pelos mecanismos de reconhecimento a carboidrato é preferencial considerar as características topológicas do CRD. Este critério baseado no arranjo tridimensional é importante, já que a topologia define a categoria de atividade da lectina, pois a acessibilidade do ligante ao sítio de reconhecimento determina mecanismos de reconhecimento distintos.

Sendo assim, tais proteínas podem ser divididas em dois grupos principais (ELGAVISH; SHAANAN, 1997):

2.1.5.1 *Lectinas de transporte*

Como as encontradas na região periplasmática presentes em bactérias. Nessas os sítios ligantes de açúcar estão situados mais internos à estrutura (englobando o ligante completamente).

2.1.5.2 *Lectinas com sítio ligante na superfície protéica*

Apresentam um sítio glicídico mais externo formando uma depressão ou cavidade superficial para acomodar o ligante. Nesse grupo, encontramos grande parte das lectinas conhecidas, divididas em famílias clássicas de acordo com sua procedência ou mesmo especificidades glicídicas (TABELA 1).

Tabela 1 – Classificação em famílias de lectinas vegetais com sítio de reconhecimento a carboidratos na superfície.

Lectinas vegetais	Especificidade	Massa Molecular monomérica (kDa)	Número/ Monômeros	Sítios/ monômero	Ligações Dissulfeto	Íons Coordenados
Legumes	Diversa	25-30	2 ou 4	1	-	Ca ²⁺ , Mn ²⁺
Cereais	GlcNAc AcNeu	18	2	2	++	-

GlcNAc: N-acetilglicosamina; AcNeu: ácido N- acetilneuramínico. Modificado a partir de SHARON, 1993.

A grande maioria das lectinas de plantas apresenta especificidade por carboidratos simples conhecidos como monossacarídeos ou complexos denominados oligossacarídeos e glicanos, os quais podem ser de origem vegetal ou não, como N-acetilglicosamina e ácidos N-glucurônico, galacturônico, xilurônico, L-idurônico, siálico e N-acetilmurâmico (SHARON; LIS, 1990; VAN DAMME *et al.*, 1998) podendo ser algumas quase exclusivas para oligossacarídeos. Desse modo, as lectinas podem ser classificadas com especificidade para monossacarídeo ou para oligossacarídeo (TABELA 2) (PEUMANS; VAN DAMME, 1998)

Tabela 2 – Famílias de lectinas de plantas: ocorrência e especificidade

Família	Ocorrência (número de lectinas identificadas)	Especificidade
Leguminosae	>100	Manose/glicose; Fucose; Gal/GalNAc; (GlcNAc) _n ; Ácido Siálico
Ligadoras a quitina	>100	(GlcNAc) _n GlcNAc
Ligadoras a manose de monocotiledôneas	>50	Manose
Cucurbitaceae	<10	(GlcNAc) _n
Amaranthaceae	<10	GlcNAc
Jacalina	<10	Gal/GalNAc Manose/maltose
RIP Tipo 2	>20	Gal/GalNAc Siaα2-6Gal/GalNAc

Gal: galactose; GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglicosamina

As estruturas de oligossacarídeos exibidos na superfície das células, incorporadas à matriz extracelular, e anexados à glicoproteínas secretadas podem apresentar papéis estruturais, mediar o movimento de glicoconjugados na superfície celular, agir como marcadores que medeiam eventos de reconhecimento entre células e entre célula-matriz ou ainda codificando informações biológicas para diferentes mecanismos de interação (DODD; SONAVANE, 2001; LIS; SHARON, 1984; 1986). A ligação de carboidratos por lectinas geralmente requer um reforço na afinidade para atingir seus efeitos biológicos. Isto é especialmente verdadeiro para os receptores, sejam de origem extra ou intracelulares e também para moléculas que participam na primeira linha de defesa imunitária. Para tais fins, a natureza muitas vezes utiliza um modo de reforço da afinidade que surge a partir de múltiplas interações entre as proteínas de ligação e os carboidratos ligantes. As características de ligação à açúcares são dadas por aminoácidos situados em *loops* que formam o CRD para ligação específica a sacarídeos (LEE; LEE, 2000).

O CRD é uma região altamente conservada em lectinas de leguminosas como a *ConA-like* e o papel dos aminoácidos conservados na interação de

monossacarídeos com lectinas tem sido amplamente relatado. A existência de variações no comprimento, sequência, e conformações dos cinco *loops* formadores do sítio de ligação determinam a especificidade para mono e oligossacarídeos (SHARMA; SUROLIA, 1997; LORIS *et al.*, 1998).

A especificidade de ligação existe em virtude das diferentes capacidades e formas de organização estrutural dos carboidratos e os modos destes interagirem com os diferentes arranjos posicionais dos aminoácidos no sítio de ligação da lectina. A diversidade nas configurações oligossacarídicas é derivada de um pequeno número de monômeros glicídicos. A diversidade estrutural dos glicanos se deve à configuração anomérica das unidades glicosídicas e a ocorrência de grupos laterais. De modo genérico, os arranjos com quatro diferentes monossacarídeos resultam em 35.560 tetrassacarídeos distintos, já entre 4 aminoácidos ou nucleotídeos podem ser formados apenas 24 arranjos estruturais distintos. Outras diversidades estruturais ocorrem devido às ligações do tipo covalentes de diferentes grupos funcionais, tais como grupos sulfato, fosfato, acetil, entre outros. Fatos estes possíveis pelos seguintes aspectos:

- O tipo de ligação glicosídica pode ser alfa (α) ou beta (β) no carbono anomérico;
- Arranjos posicionais das hidroxilas nos monossacarídeos adjacentes;
- Ocorrência de ligações do tipo 1-2, 1-3, 1-4, ou 1-6 da cadeia glicídica através de ligações entre monômeros;
- Ligação "N" ou "O" – osídica e consequente flexibilidade da ligação glicosídica.

Tais variações e diversidade de combinações permitem a geração de uma ampla gama de possibilidade de reconhecimento topológico das lectinas em relação aos carboidratos, e assim a informação biológica e sua decodificação ocorre de modo não linear, fato este não existente na transmissão do código genético. A consequência direta é a formação de complexos com organizações estequiométricas precisas e específicas como condição mínima para eventos biológicos pós-ligação (GABIUS *et al.*, 1996; GABIUS *et al.*, 1997; KALTNER; STIERSTORFER, 1998; LORIS, 2002; IRAZOQUI *et al.*, 2005).

A arquitetura global das lectinas varia amplamente nos diferentes padrões estruturais, no entanto sua capacidade de ligação a carboidratos é atribuída ao CRD, que foi denominado inicialmente por Kurt Drickamer em 1988. Cada CRD em um dado

grupo de lectinas apresentam um padrão constante e altamente conservado de resíduos de aminoácidos (DRICKAMER, 1988; KILPATRICK, 2002).

Um mesmo CRD pode apresentar diferenças estequiométricas e orientação espacial em seus resíduos, o que aumenta sua variabilidade estrutural e plasticidade no reconhecimento de carboidratos sejam eles unidades monoméricas ou glicanos complexos (DELATORRE *et al*, 2006; BEZERRA *et al*, 2011). A consequência direta disto é a capacidade que lectinas de uma mesma família exibem para reconhecimento com diferentes especificidades a carboidratos, em virtude dos contatos em regiões distintas ou partes de uma mesma estrutura complexa do carboidrato levando a diferentes atividades biológicas (CALVETE *et al*, 1998; CALVETE *et al*, 1999; NEUMANN *et al*, 2004; SOL *et al*, 2006; BEZERRA, G. A. *et al*, 2007; GARCIA-PINO, 2007].

A capacidade de reconhecimento e consequente seletividade entre lectina-carboidrato ocorre via pontes de hidrogênio tendo a participação de grupos hidroxila da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos da lectina ou grupos amida da cadeia principal com grupos hidroxila do carboidrato, forças de van der Waals e através das porções hidrofóbicas do açúcar ligante e segmentos de aminoácidos aromáticos principalmente envolvendo triptofano e fenilalanina, por intermédio de interações metálicas por cátions divalentes (ELGAVISH; SHAANAN, 1997; VARKI *et al*, 1999). A presença de moléculas de água no sítio de ligação para carboidratos ou próximos a este permite a formação de pontes de hidrogênio entre o carboidrato e a lectina, podendo equivaler aos grupos ligantes de hidrogênio da proteína mimetizando a função dos grupamentos hidroxila e sendo assim aceita como parte da arquitetura estrutural do sítio de ligação. É possível ainda haver interação entre aminoácidos da lectina e carboidratos carregados, como observado para interação do ácido siálico a partir de seu grupamento carboxilato e com aminoácidos carregados positivamente na cadeia lateral, como arginina (WEIS; DRICKAMER, 1996; VIJAYAN; CHANDRA, 1999).

A grande maioria das lectinas de origem vegetal pode ser classificada em sete famílias de proteínas que estão relacionadas estrutural e evolutivamente (VAN DAMME *et al*, 1998), sendo estas:

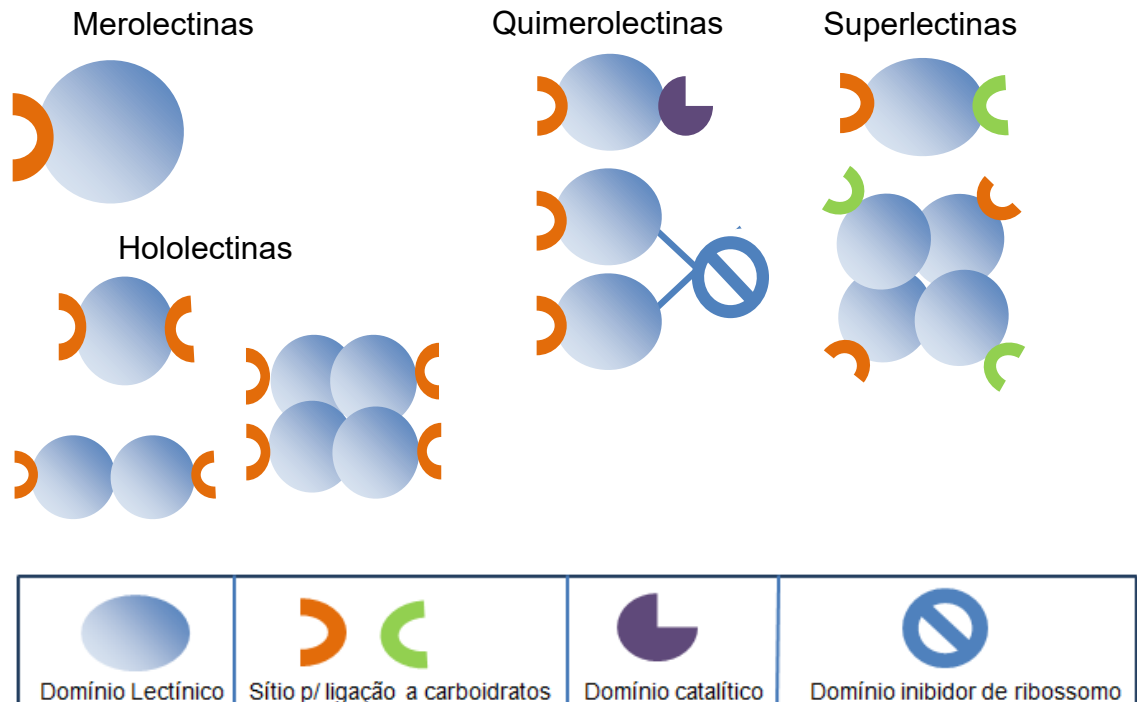
- Amarantinas;
- Lectinas do floema de cucurbitáceas;
- Lectinas com domínio heveína;

- Lectinas relacionadas à jacalina;
- Lectinas de monocotiledôneas que ligam manose;
- Lectinas de leguminosas e
- Proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 2.

2.1.5.3 *Quanto à organização estrutural*

Quando a análise é feita levando-se em consideração a organização estrutural inicialmente proposta por Peumans; Van Damme (1995) e Van Damme e colaboradores (1998), as lectinas podem ser classificadas em quatro categorias: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas (FIGURA 3)

Figura 3 – Representação esquemática das quatro classes estruturais de lectinas segundo Van Damme, 1998.



Fonte: Produzida pelo autor.

- **Merolectinas:** Tem como característica apenas um único sítio de ligação carboidratos sendo, portanto, incapaz de provocar aglutinação de células sanguíneas ou glicoconjugados. A principal representante desta classe de proteínas é a lectina obtida *Hevea brasiliensis*, a heveína. (VAN DAMME *et al.*, 1998).
- **Hololectinas:** São capazes de causar aglutinação de células sanguíneas uma vez que possuem como regra a presença de dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, os que lhe permitem realizar pontes cruzadas entre células e lectina. Tendo em vista esta capacidade, as lectinas deste grupo são chamadas também de aglutininas. A representante mais conhecida destas é a Concanavalina A (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).
- **Quimerolectinas:** Possuem em sua estrutura ao menos dois sítios ou domínios, sendo um para reconhecimento de carboidratos e o outro não relacionado a esta capacidade podendo ser de atividade catalítica. Caso apresente mais de um CRD, a lectina em questão pode também ser capaz de precipitar glicoconjugados. São exemplos deste grupo as proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) como a ricina e a PPL2 que é obtida de *Parkia platycephala*, cuja estrutura possui um domínio

de ligação a N-acetilglicosamina e outro com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

- Superlectinas: São caracterizadas por apresentarem dois ou mais CRDs com capacidades de reconhecimento a carboidratos distintos, tal característica as diferem das hololectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998). O mais bem estudado exemplo deste grupo é a lectina TxLCl isolada da tulipa. Esta lectina é constituída por dois CRDs, um ligante de manose e o outro para GalNac (N-acetil-D-galactosamina) (VAN DAMME *et al.*, 1996).

2.1.6 Lectinas de Leguminosas

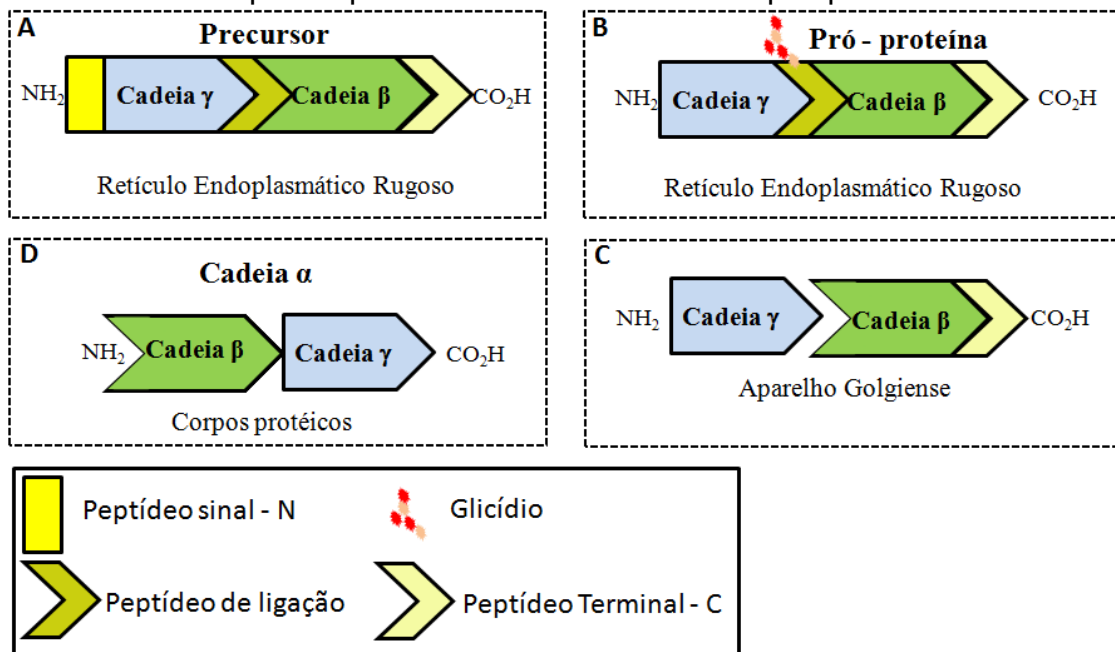
As lectinas extraídas de leguminosas constituem o grupo mais bem estudado e caracterizado do Reino vegetal. A família Leguminosae se divide em três subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae. Dentre estas, a primeira delas tem recebido maior atenção dos pesquisadores e em especial a tribo Phaseoleae (MANN, *et al.*, 2001). A partir desta tribo podemos ainda dividi-la em oito subtribos (Cajaninae, Clitoriae, Diocleinae, Erythrinae, Glycininae, Kennediinae, Ophrestinae e Phaseolinae). A subtribo melhor caracterizada é a Diocleinae, onde podemos encontrar os gêneros *Canavalia* e *Dioclea*, dentre outros. *Canavalia* e *Dioclea* possuem grande homologia em suas sequências primárias e estruturas terciárias (MOREIRA *et al.*, 1995). O motivo de tamanha atenção às Diocleinae talvez seja devido ao seu papel como importante fonte alimentar e pelo fato das lectinas presentes nas suas sementes atuarem como fator antinutricional (MURDOCK, 2002).

As lectinas de Diocleinae podem ser glicosiladas e estruturalmente compostas pela associação de dois a quatro monômeros unidos por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, permitindo que a lectina possa agir funcionalmente com vários ligantes. Suas especificidades de reconhecimento à carboidratos são dependentes dos dobramentos estruturais tridimensionais, bem como da conservação dos seus sítios de ligação (PEUMANS; VAN DAMME, 1998)

2.1.6.1 ***Biossíntese e processamento de lectinas Diocleinae***

São sintetizadas nas sementes em desenvolvimento e se acumulam em corpos protéicos em células parenquimatosas de reserva sendo produzida como uma pré-pró-proteína e formada por três peptídeos (um sinalizador, um de ligação e um terminal) e duas cadeias (γ e β). Após remoção do peptídeo sinal, a cadeia nascente da proteína é reconhecida e capturada para o lúmen reticular rugoso, onde irá receber um marcador glicídico no peptídeo de ligação, sendo agora denominada de pró-proteína. A estrutura da pró-proteína é agora endereçada para o complexo golgiense, onde será removido o peptídeo glicosilado formando então os dois domínios do precursor (C e N-terminal) das cadeias (γ e β) da proteína. A cadeia C-terminal sofre remoção do seu peptídeo terminal e se liga a cadeia N-terminal invertida formando assim a proteína madura (BOWLES; PAPPIN, 1988; CLAUDE *et al.*, 2005 MOREIRA;CAVADA, 1984)

Figura 4 – Representação da biossíntese e processamento de lectinas Diocleinae. (A) pré-pró-proteína produzida no retículo endoplasmático rugoso, (B) Glicosilação do peptídeos de ligação e remoção do peptídeos sinal-N. (C) Remoção da glicosilação por ação enzimática seguida de remoção do peptídeo terminal –C (não mostrado). (D) Lectina madura e pronta para ser armazenada nos corpos protéicos.

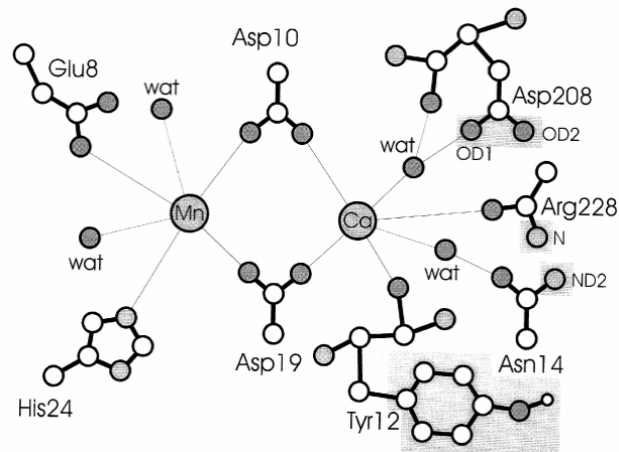


Fonte: Produzida pelo autor.

2.1.6.2 Organização Estrutural de Lectinas ConA-like

São formadas usualmente por duas subunidades (25-30 kDa), cada uma é constituída por uma cadeia γ (5 a 7 kDa) e uma β (15 a 19 kDa) unidas por ligações não covalentes (SHARON; LIS, 1989) e cada uma apresenta um sitio de ligação à carboidrato e auxiliando o ancoramento do açúcar ao sítio de ligação encontra-se os íons divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} (FIGURA 4) ou outro metal de transição (SHARON; LIS, 1990).

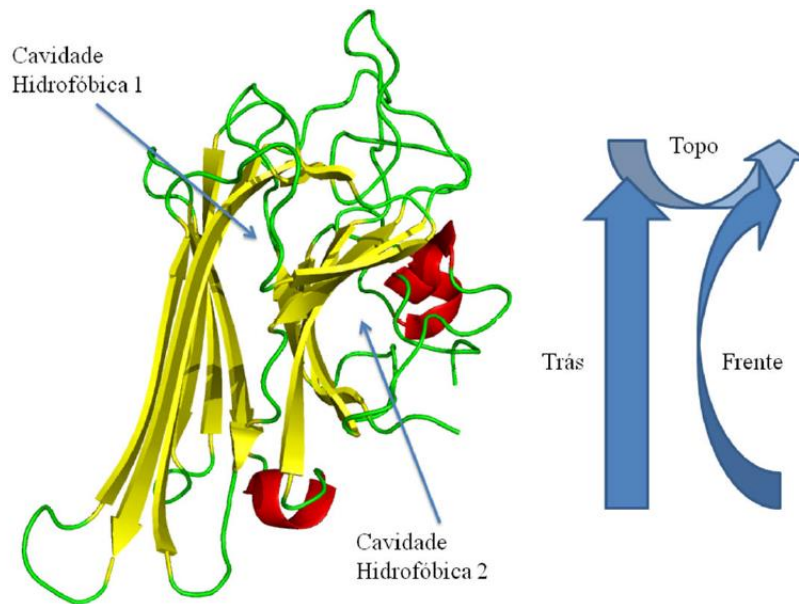
Figura 5 – Representação esquemática da coordenação de íons divalentes à lectina de leguminosa. Mostrando o sítio de ligação da ConA. Os átomos de carbono estão em branco, nitrogênio em cinza claro e oxigênio em cinza escuro. Os dois íons então indicados em cinza no centro da figura. Grupos funcionais essenciais para ligação de carboidratos estão destacados por uma caixa em cinza claro. Moléculas de água estão indicadas como *wat*.



Fonte: LORIS *et al*, 1998.

O arranjo tridimensional das lectinas de leguminosa é complexo e estruturalmente relacionado à topologia conhecida como *jelly-roll* (SRINIVAS *et al.*,2001). Este arranjo consiste de uma folha β plana com seis fitas na parte de trás da molécula, uma folha β curvada com sete fitas e no topo possui uma pequena folha β com cinco fitas. Dois núcleos hidrofóbicos estabilizam essa estrutura (FIGURA 5).

Figura 6 – Visão lateral da estrutura monomérica de lectina de leguminosas mostrando a disposição das cavidades hidrofóbicas e representação esquemática das estruturas em folhas β

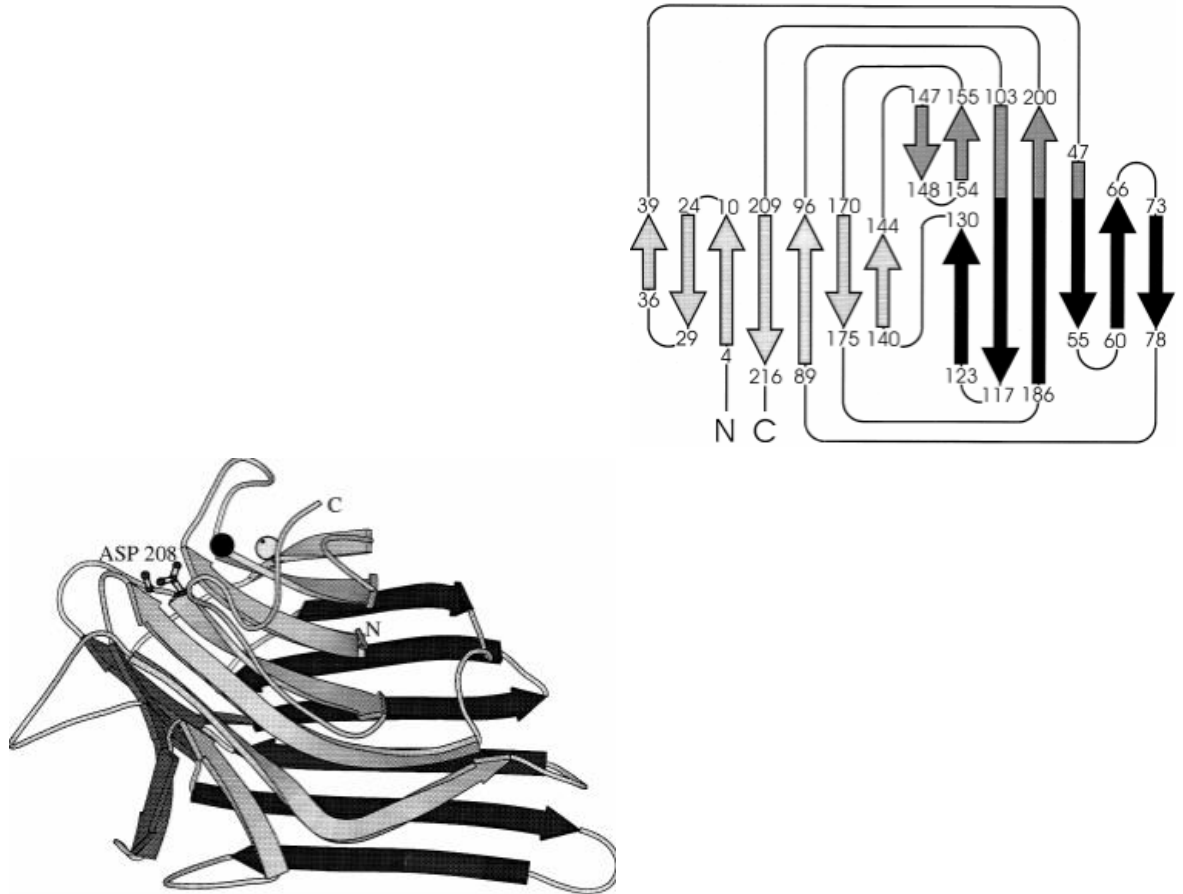


Fonte: Baseado em Sinha e colaboradores (2007).

Esta organização estrutural foi inicialmente determinada para a ConA. De acordo com os trabalhos de Loris e colaboradores (1998); Brinda e colaboradores (2004) e Hardman e colaboradores (1972), o monômero da lectina de leguminosa é composto por 3 folhas- β de fitas antiparalelas unidas por uma série de *loops*. As duas maiores folhas- β formam o que se chama “sanduíche” no qual a folha maior composta por 6 fitas antiparalelas é geralmente denominada de folha- β das costas ou posteriores (“*back β -sheet*”) e a outra de folha- β frontal (“*front β -sheet*”). Este “sanduíche” se apresenta pouco mais aberto em uma das extremidades onde se encaixa a terceira e menor folha- β (5 fitas β antiparalelas), perpendicular à folha das costas e compartilhando fitas- β retorcidas com a folha- β das costas (FIGURA 6). O principal núcleo hidrofóbico do monômero está localizado entre as folhas- β das costas e frontal. Pode haver duas β -*turns* (estrutura secundária não repetitiva) sucessivas e sua existência em uma mesma lectina é variável, dependendo do tipo de ligante presente no CRD e cerca de 50 % dos resíduos do monômero estão em regiões de *loops*. Um destes *loops* (um “ Ω -*loop*” contendo um resíduo conservado de glicina do sítio de ligação a monossacarídeo) se dobra sobre a folha- β frontal, resultando num segundo núcleo hidrofóbico entre a folha- β frontal e este *loop*.

Figura 7 – Representação esquemática generalizada do monômero de lectinas de leguminosas obtida do modelo estrutural do monômero da ConA. Imagem tridimensional em diagrama de Ribbon com destaque para o resíduo *cis*-aspartato (Asp208) mostrado em diagrama bola-bastão e os íons cálcio e manganês estão

representados em preto e cinza. Imagem da direita em diagrama de topologia para enovelamento. As cores são as mesmas da imagem da esquerda e representam a estrutura com 6 fitas antiparalelas das costas em preto, 7 fitas em cinza claro e 5 fitas em cinza escuro.



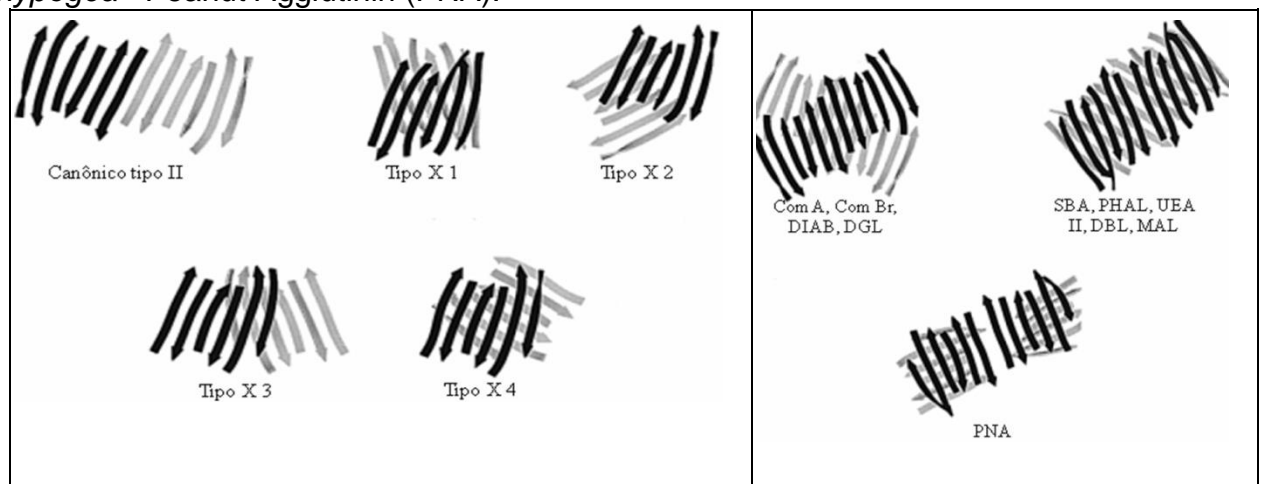
Fonte: Adaptado de Loris *et al*, 1998

O arranjo estrutural quaternário das lectinas de leguminosas se encontra naturalmente como dímeros e/ou tetrâmeros, onde o arranjo monomérico destas associações é mais pronunciadamente conservado em sua estrutura secundária e terciária. As variabilidades em suas associações quaternárias representam um mecanismo evolutivo comum para a criação de diversificação estrutural e funcional entre as lectinas exibindo um mesmo dobramento terciário (LORIS, 2002; PRABU *et al*, 1999; CHANDRA *et al*, 2001). Há ainda a manutenção de um equilíbrio entre os estados dímero-tetrâmero dependente de pH, fato este que pode ser considerado importante em virtude da capacidade potencial que as lectinas possuem para serem além de uma fonte de reserva protéica poderem transportar moléculas associadas a partir de seu arranjo quaternário (HUET; CLAVERIE, 1978; DELATORRE *et al*, 2007). A forma estrutural quaternária típica das lectinas de leguminosas é chamada de

“dímero canônico”(do inglês *Canonical Legume Lectin Dimer*). Este é constituído por uma estrutura conservada de doze fitas β -pregueadas trançadas, como resultado da associação de dois monômeros seja estes idênticos ou não, constituídos de seis fitas β -pregueadas entrelaçadas (LORIS *et al*, 1998). Antes da dimerização, processamentos pós-traducionais dos monômeros podem ocorrer para que as interações entre os monômeros sejam favorecidas.

Quando em arranjo tetramérico, as lectinas de leguminosas não apresentam simetria radial, em virtude dos posicionamentos dos monômeros serem diferentes uns dos outros. Estes em geral possuem basicamente dois planos de simetria e sendo assim ditos dímeros de dímeros (BRINDA *et al*, 2004). Os tipos de interações podem ser diferenciados tomando como base a orientação e posicionamento entre suas folhas- β das costas, e de seus monômeros. Os arranjos de interface entre os dímeros das lectinas oligoméricas são: canônico tipo-II, X1, X2, X3 e X4, (FIGURA 7) além de uma interface não usual como a verificada em PNA, que decorrente disto possui apenas um plano de simetria (MANOJ; SUGUNA, 2001).

Figura 8 – Representações esquemáticas de diferentes tipos de interações entre monômeros encontradas em lectinas de leguminosas. Imagens da esquerda mostrando folhas- β das costas envolvidas nos tipos de interfaces diméricas. A folha- β das costas de cada monômero é identificada por cores diferentes. Imagens da direita mostrando folhas- β das costas em lectinas tetraméricas. Subunidades 1 e 2 formando interfaces canônicas tipo-II são mostradas em preto. Subunidades 3 e 4 estão em cinza. Lectinas tetraméricas esquematizadas: *Canavalia ensiformis* – ConA; *C. brasiliensis* – ConBr; *Dolichos lablab* – DIAB; *Dioclea grandiflora*– DGL; *Glycine max* – Soy bean agglutinin (SBA); *Phaseolus vulgaris* – PHAL; *Ulex europaeus* –UEAII; *Dolichos biflorus* – DBL; *Maackia amurensis*– MAL; *Arachis hypogea*– Peanut Agglutinin (PNA).



Fonte: Adaptado a partir de MANOJ; SUGUNA, 2001.

2.1.7 Sítios de ligação e especificidade

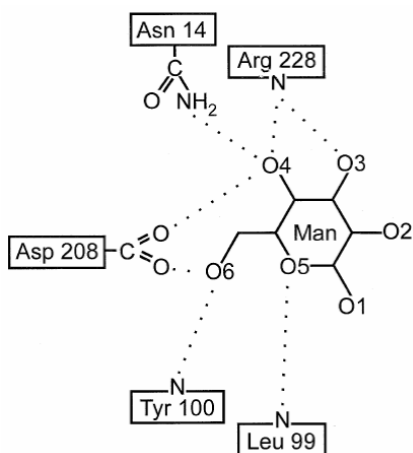
Classicamente o CRD se caracteriza como o mais representativo nas lectinas, mas é sabido que este não é o único com possibilidade de ligação existente. Além da clássica capacidade de reconhecer glicídios as lectinas podem interagir com outros ligantes não açúcares. Estas proteínas exibem uma variedade de sítios de ligação com características distintas, os quais incluem reconhecimento de hormônios, ácidos nucléicos e aminoácidos não protéicos (BABOSHA, 2008; DELATORRE et al., 2007; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983; Delatorre *et al.*, 2013; Malecki *et al.*, 2012). A organização estrutural mais interna do monômero, bem como, sua estruturação formando dímeros e tetrâmeros propicia o surgimento desses sítios de ligação. Sabidamente os CRDs se encontram na superfície protéica, enquanto os sítios de ligação a hormônios e aminoácidos não protéicos estão situados mais profundamente na estrutura sob a forma de cavidades (DELATORRE et al., 2007).

2.1.7.1 Sítio de afinidade à carboidratos

O sítio de ligação a carboidratos é bastante conservado entre as lectinas ConA-*like*. As lectinas de leguminosas possuem capacidade de interagir com açúcares simples e complexos (DAM & BREWER, 2002). Essa interação depende do sítio de ligação a carboidratos presente na superfície dessas proteínas e os resíduos de aminoácidos interagem com os açúcares por formação de cinco a oito pontes de hidrogênio (HAMODRAKAS *et al.*, 1982). A seletividade das lectinas é o resultado de ligações de hidrogênio e/ou formação de complexo entre metais com hidroxilas chave dos carboidratos podem atuar como aceptores e doadores de ligações de hidrogênio (Loris *et al.*, 1998).

A organização estrutural do CRD consiste em uma região na porção frontal do monômero que é formado por quatro regiões de voltas ou *loops* na estrutura secundária das lectinas (SHARMA; SUROLIA, 1997; YOUNG; OOMEN, 1992) Os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} situados abaixo do CRD estabiliza as cadeias laterais dos aminoácidos participantes do sítio de ligação, estes geralmente fazem quatro ligações com a proteína e duas moléculas de água. Uma destas faz ainda ligação entre o íon e o grupamento carbonila do Asp208, precedida por ligação *cis*-peptídica. A capacidade de interação com carboidratos requer a participação dos resíduos Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 (LORIS *et al.*, 1998). A Asn14 mantém sua posição devido à interação direta com o íon cálcio e o NH da ligação peptídica da Arg228, em outras lectinas de leguminosas apresentam uma glicina, que se mantém coordenada pela interação com o íon cálcio através da molécula de água (FIGURA 8). Outras interações essenciais envolvem as interações de van der Waals entre resíduos aromáticos como Tyr12, mas frequentemente Phe e em alguns casos Leu ou Cys e o anel do sacarídeo ou ainda um segmento do *loop* que se dobra sobre a folha- β frontal formada pelos resíduos de aminoácidos Thr97-Glu102 na ConA (LORRIS *et al.*, 1998).

Figura 9 – Representação esquemática da ligação à carboidrato em lectinas de leguminosas. Parte do sítio de ligação da ConA apresentando os resíduos do sítio de ligação a monossacarídeos ligado à manose (Man).



Fonte: LORIS *et al.*, 1998.

Interessantemente, o domínio de reconhecimento a carboidrato parece não se ligar apenas à moléculas glicídicas. Recentemente, Delatorre e colaboradores (2013) relataram a existência de um anel indol ligado aos resíduos Asp16 e Arg228, constituintes do CRD da ConM, sendo atribuído a este complexo a possível ação de controle da disponibilização desta molécula, que pode ser liberada como um composto volátil e atuando na defesa do vegetal contra patógenos (FREY *et al.*, 2000; ZHUANG *et al.*, 2012).

Os trabalhos de Cavada e colaboradores (2001); Figueiredo e colaboradores (2009) e Gadelha e colaboradores (2005), propunham que havendo pequenas mudanças na estrutura primária, como a de apenas um resíduo, é possível mudar completamente o dobramento estrutural de um dado seguimento da lectina e assim também modificar as propriedades e eficiências das respostas biológicas. Alterações na composição ou na conformação dos resíduos tanto do CRD quanto não diretamente associados a este permite um comportamento diferenciado na capacidade de reconhecimento das lectinas. Mudanças sutis como a mutação do resíduo Pro202 pelo Ser202 observada na lectina de *Canavalia maritima* (ConM) induzem uma reconfiguração do CRD que gera a diferença de afinidade observada entre a lectina desta espécie quando comparada com a ConA por exemplo. A organização tridimensional dos resíduos do CRD de cada lectina faz com que cada uma delas apresente um padrão de volume característico desta região sendo, portanto, responsável pela capacidade para induzir efeitos biológicos diferentes (BEZERRA *et al.*, 2011, BEZERRA *et al.*, 2013; CAVALCANTE *et al.*, 2011; NOBREGA *et al.*, 2012).

O reconhecimento de compostos não glicídicos pelas lectinas torna possível sua utilização para diferentes fins e a grande quantidade de diferentes ligantes conhecidos também pode ser explicada pela existência de sítios adicionais ao de carboidratos. Interações hidrofóbicas entre o anel glicosídico dos carboidratos e aminoácidos determinam a orientação de ligação no sítio de ligação carboidratos aumentando a especificidade entre lectina-carboidrato (Teixeira *et al.*, 2012).

2.1.7.2 Sítio de interação hidrofóbica

A literatura tem demonstrado que a capacidade de lectinas de leguminosas reconhecerem outros ligantes é possível em virtude da existência de sítios de ligação com características hidrofóbicas e estes podem se associar a moléculas, como hormônios, ácidos nucleicos e aminoácidos não protéicos (BABOSHA, 2008; DELATORRE *et al.*, 2007; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983b). Hamelryck e colaboradores (1999) demonstraram que lectinas extraídas da planta *Dolichos biflorus*, tanto a obtida de semente (DBL) quanto a partir da folha (DB58) podem ligar a molécula de adenina na interface do dímero não canônico, uma associação de dois monômeros que não formam o padrão de 12 cadeias de folhas β que são características das lectinas de leguminosas (Loris *et al.*, 1998). Os sítios de interação com ligantes glicídicos estão presentes nas lectinas na sua superfície, como é para o CRD, mas é sabido que as cavidades ou bolsões formados a partir da estrutura terciária ou quaternária propiciam o surgimento de eventuais sítios para ligantes com características hidrofóbicas (EDELMAN; WANG, 1978; HARDMAN; AINSWORTH, 1973; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1982; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983).

A partir da década de 70 vários trabalhos retratam a capacidade de reconhecimento a compostos hidrofóbicos e sugerem ainda que este reconhecimento seja mediado por ao menos dois sítios hidrofóbicos de atuação independentes. De acordo com Yang, Gall e Edelman (1974) a lectina ConA apresenta um sítio de grande afinidade para um composto fluorescente, enquanto que em 1978, Edelman e Wang apresentaram resultados de que a mesma lectina apresentou afinidade para o triptofano e AIA, porém, com baixa afinidade e propondo que existe um desses sítios em cada uma das quatro subunidades da lectina. Roberts e Goldstein (1982) estudando *Phaseolus lunatus* descreveram a capacidade da lectina desta planta ligar-se a molécula TNS (ácido 2,6-toluidinilnaftalenossulfônico) e a partir deste resultado

propuseram a existência de um único sítio de alta afinidade para esta molécula, além de outros quatro sítios de baixa afinidade para o mesmo composto, um em cada monômero.

Assim, a partir desses estudos, especula-se que existe um bolsão de alta afinidade para compostos hidrofóbicos por tetrâmero e um de baixa afinidade por monômero. O bolsão de alta afinidade ou cavidade hidrofóbica na ConA baseado em alguns estudos (BECKER *et al.*, 1975; EDELMAN *et al.*, 1972), estaria delimitado pelos seguintes resíduos de aminoácidos: Y54, L81, L85, V89, V91, F11, S113, V179, I181, F191, F212 e L214. Nesse sentido, é razoável imaginar que tal região pode de fato estar relacionada a alguma função fisiológica e/ou biológica desempenhada pelas lectinas, uma vez que tais resíduos são conservados nos diferentes gêneros que compõem a subtribo Diocleinae. Delatorre e colaboradores (2013) descrevem a ligação do anel indol na lectina ConM por meio da interação com os resíduos Asn14, Asp16 e Arg228 que compartilham sua organização estrutural tanto na formação do sub sítio hidrofóbico quanto na formação do CRD desta lectina, como também apresenta a descrição do sítio hidrofóbico de baixa afinidade sendo performado pelos resíduos S108 e N131.

Levando-se em consideração este achado é possível hipotetizar que as lectinas podem se ligar a moléculas derivadas da adenina. Esta ideia pode ser corroborada pelo fato de que foi observado que a lectina Visco I, obtida partir de *Viscum album*, pode se ligar não somente a citocina zeatina e cinetina (Meyer *et al.*, 2008; Malecki *et al.*, 2012), fitohormônios envolvidos na divisão e crescimento celular, mas também a monofosfato de adenina (Krauspenhaar *et al.*, 2002). Todas estas moléculas à base de adenina são estabilizadas por um resíduo de arginina, independentemente de variação de posição do anel purínico.

2.2 DETERMINANDO A ESTRUTURA 3D DE PROTEÍNA

A partir de 1959 quando a primeira estrutura protéica, a da mioglobina, foi resolvida por Kendrew e colaboradores, até os dias de hoje (BERMAN *et al.*, 2000), várias proteínas tiveram sua estrutura resolvida com propriedade permitindo assim uma verdadeira revolução sobre o entendimento do que são e de como podem atuar as proteínas nos sistemas biológicos. A partir da resolução estrutural tridimensional é possível compreender os princípios básicos da arquitetura protéica em virtude da

determinação das coordenadas atômicas e que estão hoje depositadas em bancos de dados de estruturas como, por exemplo, o *Protein Data Bank* - PDB (www.rcsb.org/pdb/). O entendimento da relação entre estrutura primária e função de proteínas constitui uma área em constante expansão dentro da bioquímica de macromoléculas. A aplicação de diferentes métodos para a resolução de estruturas tridimensionais de macromoléculas faz com que varie bastante o tempo necessário para a finalização da resolução da estrutura. A técnica mais tradicional empregada na resolução de macromoléculas é a cristalografia de raios X (BLUNDELL; JOHNSON, 1976; DRENTH, 1994).

Compreender como se dão os mecanismos de reconhecimento de carboidratos pelos seus sítios ligantes em diferentes proteínas pode ser uma ferramenta muito valiosa para elucidação de como são estabelecidos as interações e comunicações entre diferentes sistemas moleculares tanto em sistemas vegetais como animais e entre os dois. Estruturas de lectinas complexadas com moléculas de glicanos não apenas fornecem coordenadas e informações sobre as regiões do CRD, detalhes destas interações são usadas para explicar os resultados observados em processos biológicos (BEZERRA *et al.*, 2011; BEZERRA *et al.*, 2013; CAVADA *et al.*, 2001; CAVALCANTE *et al.*, 2011; NOBREGA *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2011).

2.2.1 Cristalografia de Raios X

O cristal de macromolécula não costuma exceder 1mm³ e é bastante sensível quanto à manutenção do seu estado cristalino, isto devido ao fato de conterem alta concentração de solvente podendo chegar até 75 % do volume do cristal (DE AZEVEDO *et al.*, 2003) e em virtude das fracas interações dentro da rede cristalina que são mantidas por forças hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Assim sendo, é necessário para a obtenção dos cristais de macromoléculas que estejam em um ambiente saturado de solvente, sendo necessário manter tal condição, haja vista que do contrário acarretará em desidratação conduzindo a destruição do cristal pela ocorrência de quebra das forças de coesão existentes. A suscetibilidade do cristal se dá ainda frente a variações físicas e/ou químicas como pH, temperatura, vibração entre outras. A existência de solvente dentro do cristal cria canais ou poros que são extremamente úteis quando se quer testar se substâncias podem ou não se ligar ao cristal através de processo de difusão, o que chamamos de co-cristalização e

consequentemente serem difratadas juntamente com o cristal protéico. Com o advento de métodos de cristalização a partir de compostos binários entre proteínas e ligantes, houve a abertura de uma nova área do conhecimento chamada *drug design*.

A palavra cristal deriva do grego *krustallos* que significa gelo puro. Os cristais de macromoléculas biológicas como os de proteína são arranjos translacionais de átomos nas três dimensões do espaço, são quimicamente bem definidos, possuem altíssimo grau de pureza e pode polarizar a luz, isto em virtude de serem formados a partir de aminoácidos em configuração L. Segundo Ducruix; Giegé (1992) cristais podem ser definidos como uma ordenação perfeita e infinita dos seus blocos componentes, ou unidades assimétricas, que se arranjam em simetrias já definidas. A célula unitária é na realidade a unidade mínima de volume uniforme que define a estrutura de uma proteína e sobre a qual ocorrem repetições translacionais. Uma célula unitária possui como característica a existência de três vetores, a saber: “a”, “b” e “c” que possuem a função de definir as arestas da célula e que a partir destes vetores são formados os ângulos α , β e γ .

Cristais protéicos são estruturas de dimensões finitas, podendo assim ser utilizados seus fragmentos como “sementes” através das quais é possível se obter “novos” cristais por ordenação ou sobreposição de mais proteína seguindo a simetria do cristal original (semente). Suas células unitárias não raramente chegam a possuir dimensões de 1000 Å (USHA *et al*, 1984).

Cada uma das faces de um cristal pode ser descrita com relação a três eixos não co-planares, através de inteiros pequenos chamados de h, k e l. Estes índices não só descrevem as faces cristalinas, mas incluem ainda os grupos de planos paralelos que compõem o retículo cristalino. Sendo assim, os feixes obtidos a partir da difração de um cristal são na verdade feixes refletidos por esses planos (GKUSKER; TRUEBLOOD, 1985). É graças à formação cristalina regular dos cristais que se podem utilizá-los a partir da técnica de difração de raios X e assim determinar tridimensionalmente sua estrutura protéica.

São vários os passos existentes para a obtenção da estrutura de uma proteína. Primeiro é preciso cristalizar a proteína, de modo que seja possível ter um cristal de tamanho e qualidade suficientes para serem submetidos ao processo de difração de raios X. Para determinar a estrutura é preciso que se conheçam os fatores de estrutura e os ângulos de fase relacionados. Contudo, não é possível mensurar os dados sobre ângulos de fase e, conseqüente impossibilidade de determinação direta da estrutura

protéica, fato este chamado de perda de fase. Visando a resolução deste empecilho foi criado o método de substituição molecular, a partir do qual se faz uso de um modelo pré-determinado como base de apoio para a sobreposição entre as estruturas resolvida e a investigada (DRENTH, 1994).

Para que o processo de cristalização seja adequado e suficiente para os passos posteriores da resolução da estrutura é preciso que haja o que se chama de nucleação, seguida de crescimento do cristal e finalizando com a parada do crescimento cristalino. A fase de nucleação é onde ocorre a formação dos primeiros agregados ordenados. É comum a formação de núcleos cristalinos em condições de supersaturação, que pode ser alcançada pela evaporação lenta do solvente ou pela variação de alguns dos parâmetros como temperatura, pH e força iônica, mas se deve salientar que também devido a supersaturação é recorrente haver formação de agregados amorfos. A parada do crescimento cristalino pode ocorrer: em virtude do defeito no processo de crescimento, pela falta de material protéico no meio ou ainda devido ao envelhecimento da proteína. Durante o processo de cristalização a transição de fase atinge um nível energético desestabilizado que só melhora após a passagem da amostra para o estado sólido da matéria. Assim sendo há uma diversidade de fatores tais como: pureza da amostra, solubilidade e supersaturação, temperatura, pH e sais que podem determinar a eficiência do processo de cristalização de macromoléculas (BERGFORS, 1999).

2.2.2 Produção de Cristais

2.2.2.1 *Método da Difusão de Vapor*

A primeira vez em que a técnica de difusão de vapor foi utilizada para cristalização de uma macromolécula biológica data de 1969, com a cristalização de uma molécula de ácido ribonucléico transportador (tRNA) (VON HIPPEL; SCHLEICH, 1969). Este processo consiste em obter em um ambiente fechado uma situação de supersaturação de soluto, fato este conseguido em virtude da evaporação lenta do solvente presente na solução. A técnica consiste em utilizar uma gota formada com volumes iguais da proteína a ser cristalizada e da solução de cristalização que é formada por um sal, tampão e agente precipitante. Essa gota é posta para ser equilibrada frente à solução de cristalização situada dentro do poço contendo os

mesmos componentes, mas de concentração muito maior do que a encontrada na gota. A partir do princípio de difusão de espécies voláteis há a formação de pressão de vapor entre a gota e a solução do poço que tende a provocar equilíbrio em suas concentrações e conseqüente redução do volume da gota que, por sua vez, gera a supersaturação do soluto. Isto induz a proteína a assumir um estado energético mais estável, que só é alcançado à medida que esta passa do estado coloidal para o estado sólido como precipitado ou forma cristalina.

2.2.2.2 Método da Matriz Esparsa

O princípio básico da difusão de vapor é a utilização de uma solução tampão com um agente precipitante e um sal. A combinação de diferentes constituintes da solução do poço em diferentes concentrações permitiu a cristalização da grande maioria das proteínas com estrutura tridimensional conhecidas. O crescente número de proteínas obtidas por cristalografia foi conseguido usando-se um pequeno número de condições de cristalização que se assemelham entre si quanto ao número de aditivos utilizados. A diversidade destes aditivos é bem limitada se comparada com a quantidade de proteínas cristalizadas com a utilização dessas condições (CARTER; CARTER, 1979).

A partir do levantamento bibliográfico de diferentes protocolos de cristalização e levando em consideração testes realizados, a Dr^a Jaru Jancarick e colaboradores propuseram em 1991 um grupo de diferentes condições através das quais é possível a obtenção de cristais protéicos, quer seja usando diretamente suas condições propostas, quer seja por modificações realizadas a partir destas primeiras (JANCARICK; KIM, 1991).

A técnica da matriz esparsa leva em consideração a variação de três parâmetros básicos no processo de cristalização que são: pH e tampões, aditivos e agentes precipitantes construídos de modo multifatorial. Para o pH foram utilizados diferentes tampões nas faixas de 4,6; 5,6; 6,5; 7,5 e 8,5; Os agentes precipitantes escolhidos foram 2-propanol para o agente volátil, 2-metil-2,4-pentenediol (MDP) e polietileno glicol (PEG) que atuam alterando a solubilidade e viscosidade da solução; e diferentes sais que atuam competindo pelos grupos carregados da superfície protéica e os íons em solução, de modo que tende a evitar a precipitação da proteína (JANCARICK; KIM, 1991).

2.2.2.3 Diagrama de fases

A solubilidade de uma macromolécula biológica é dependente de diferentes parâmetros. É possível determinar a importância de um dado parâmetro a partir da geração de um diagrama bidimensional. Este por sua vez pode representar a solubilidade da macromolécula em uma solução como sendo um parâmetro variável em detrimento aos demais parâmetros que são mantidos constantes. Esse diagrama bidimensional é representado na FIGURA 9 e formado por:

Figura 10 – Esquema de diagrama de fase para solubilidade protéica



- Curva de solubilidade: representa os níveis limites entre as diferentes zonas de supersaturação e hiposaturação. Estando a proteína abaixo da curva ela não poderá ser cristalizada por se encontrar em um ambiente de baixa saturação. Estando acima, pode haver formação de cristais por estar a molécula em supersaturação. A supersaturação pode ser dividida em zonas que representam: Zona de precipitação, onde a macromolécula se separa da solução assumindo estado amorfo devido ao excesso de proteína; Zona de nucleação, onde há formação de

cristais; Zona metaestável, uma região sobre a qual pode não haver nucleação mesmo estando supersaturada. No entanto é possível gerar cristais nessa zona se esta sofrer uma modificação ou perturbação mecânica. É comum no caso de se atingir essa zona a utilização de cristais como semente para o processo de cristalização seguir. A técnica que faz uso desse princípio é chamada de *seeding* e pode ser realizada utilizando “macro cristais”- *macroseeding* que são introduzidos na solução ou *microseeding*, que utiliza a introdução de vários diminutos cristais.

2.3 DIFRAÇÃO DE RAIOS X E SUAS FONTES

Raios X são constituídos por radiação eletromagnética, assim como a luz, contudo, as ondas estão situadas entre os comprimentos na faixa de 1000 a 1 Å, ou seja, bem mais curto do que o comprimento de onda da luz visível. Os raios X foram descobertos por Roentgen em 1895. Já a técnica de difração de raios X foi desenvolvida em meados de 1910 por Von Laue, Friedrich e Knipping, que trabalhando com cristais descobriram a existência de redes cristalinas nestes. Os raios X podem ser produzidos a partir de diferentes origens:

- A geração a partir de tubos de raios X, os níveis de alta energia são mantidos em virtude da existência de eletrodos que atraem elétrons em direção ao ânodo. No ponto de impacto há a geração de raios X, no caso da utilização do metal cobre como ânodo, este apresenta como característica a emissão de raios X com comprimento de onda de 1,5 Å e por isso é muito utilizado para cristalografia de proteínas.

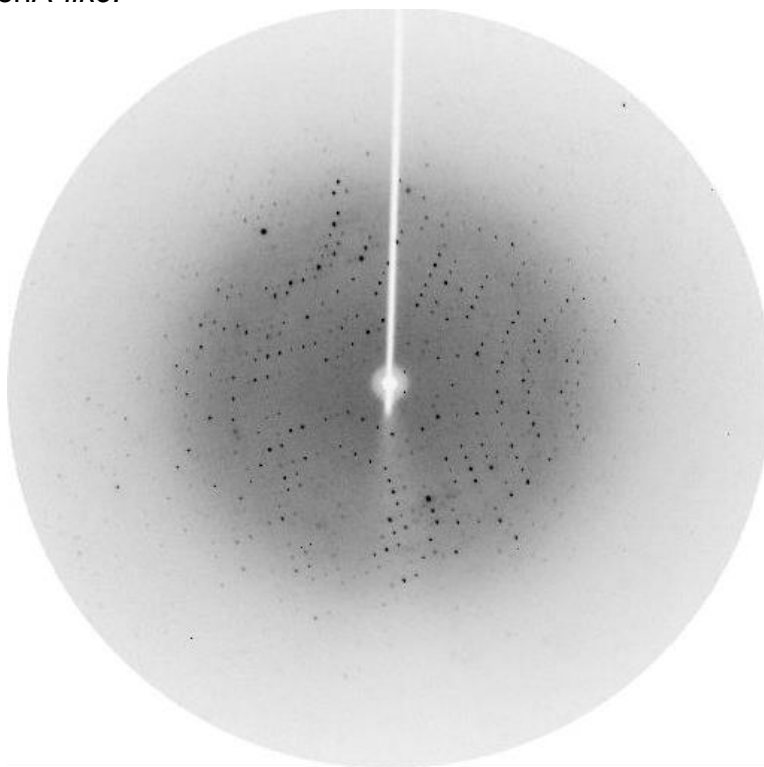
- A partir da radiação síncrotron por meio da qual podem ser também produzidos ondas em comprimentos de onda na faixa do ultravioleta e infravermelho. Este tipo de radiação é originado a partir de elétrons que são acelerados em órbitas circulares a velocidade próxima a da luz. Após os elétrons serem desviados e consecutivamente desacelerados há emissão de radiação eletromagnética, cuja energia é dependente da velocidade da partícula. Podendo ser utilizadas para diversos fins (McREE, 1999).

A única fonte de radiação síncrotron da América do Sul está situada no Brasil, cidade de Campinas - São Paulo, o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron que possui diferentes estações de trabalho dentre as quais são utilizadas para experimentos de cristalografia de raios X as intituladas MX1 e MX2.

2.3.1 Padrão de Difração

A difração de raios X a partir de cristais protéicos resulta da incidência dos raios X oriundos das fontes geradoras em uma rede cristalina acarretando seu espalhamento. Os elétrons ordenados em volta do núcleo atômico possuem arranjo regular e periodicidade translacional fazendo com que haja superposição dos espalhamentos dos raios X formando áreas de interferência construtiva e destrutiva conforme a diferença de fase, resultando em padrão de difração (FIGURA 10) (DELATORRE, 2001).

Figura 11 –. Padrão de difração obtido de um cristal a partir de lectina ConA-like.



Fonte: Produzida pelo autor.

2.4 SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR

É uma técnica aplicada com a finalidade de auxiliar a determinação inicial da estrutura tridimensional da proteína. Consiste em utilizar uma molécula similar com alto grau de homologia como modelo inicial visando sanar o problema de fase. Para resolver a estrutura é preciso encontrar a orientação do modelo na célula unitária, localizar os posicionamentos atômicos e validar a qualidade do conjunto. Para isto é

necessária a utilização de um conjunto de dados de difração de raios X (SCHWARZENBACHER *et al*, 2004). A escolha do modelo para a substituição molecular é baseada em similaridades na sequência primária de aminoácidos que são mensuradas a partir de levantamento prévio feito com o auxílio do programa BLAST (ALTSCHUL *et al*, 1990).

2.5 REFINAMENTO ESTRUTURAL

É utilizado para calcular e construir o mapa de densidade eletrônica que consiste na organização posicional da cadeia polipeptídica com uma dada sequência de aminoácidos. Existem limitações para a interpretação do mapa de densidade eletrônica como, por exemplo, erros nos ângulos das fases e resolução dos dados de difração que são intrinsecamente dependentes da qualidade do cristal. Portanto, um mapa de densidade pode ser obtido com alta ou baixa resolução de difração o que pode dificultar ou facilitar a sobreposição dos modelos e consequente resolução estrutural, haja vista que um mapa de baixa resolução permite no máximo uma visão do contorno do aminoácido enquanto que, se o mapa é de alta resolução é possível enxergar os arranjos e ligações entre os aminoácidos.

O refinamento cristalográfico auxilia a resolução da estrutura protéica por permitir serem encontradas as concordâncias entre os fatores de estrutura observados e calculados. Estes fatores são as amplitudes de difração que foram experimentalmente observadas (F_{obs}) e as calculadas com base no modelo (F_{calc}). A diferença entre as duas é representada pelo fator R (R_{fator}) que pode ser calculado e representa o grau de concordância entre as amplitudes observadas e as calculadas. Podendo ser usado como meio de mensurar o refinamento.

O processo de refinamento é feito tendo como base valores estabelecidos como padrões. Se forem usados aspectos energéticos para se aproximar desse valor, este refinamento é de restrição. As coordenadas dos átomos são variáveis, já os ângulos existentes entre os aminoácidos são os fatores de restrição. Durante o processo de refinamento é utilizado um parâmetro estatístico chamado R_{free} que consiste em um intervalo de 5 a 10% das reflexões que é retirado do refinamento e funciona como um controle através do qual pode ser verificado se os valores de R_{fator} são aceitáveis e verdadeiros para o modelo estrutural.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar as estruturas tridimensionais da lectina obtida a partir de sementes da *Canavalia brasiliensis* complexada com adenina e β -ribofuranose pela técnica de cristalografia de raios X

3.2 ESPECÍFICOS

- Comparar as estruturas tridimensionais dos modelos da lectina complexada com os ligantes, adenina e β -ribofuranose
- Determinar a organização da estrutura dos sítios de ligação para os ligantes;
- Descrever as interações que estabilizam os ligantes em seus sítios;
- Analisar as variações na conformação da estrutura protéica resultantes da interação com os ligantes;
- Comparar a estrutura dos complexos de ConBr-adenina e β -ribofuranose com outras estruturas já solucionadas;
- Analisar e descrever as interações entre a ConBr-adenina e β -ribofuranose e os compostos complexos formados pelo método do *Docking* com a adenosina e isopentiniladenosina

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PURIFICAÇÃO DA LECTINA

Sementes de *Canavalia brasiliensis* foram moídas para produzir um pó fino com o auxílio de um moedor de café e posteriormente o extrato bruto foi solubilizado em temperatura de 25 °C por agitação contínua em 0,15 M de NaCl [1:10 (peso/volume)] por 1h, depois foram centrifugadas a 10.000 x g sob temperatura de 4 °C por 20 minutos. A purificação das proteínas foi feita por cromatografia de afinidade utilizando-se coluna Sephadex G-50 (10 x 50 cm) seguindo-se o protocolo de Ramos e colaboradores (1996). A fração ativa eluída após diálise contra água foi liofilizada e denominada de ConBr e sua pureza analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), e posteriormente ela passou a ser utilizada nos experimentos de cristalização.

4.2 MOLÉCULAS LIGANTES

As moléculas ligantes, adenina e β -ribofuranose foram adquiridas a partir da Sigma-Aldrich (USA) e incubadas com as proteínas para os testes de cristalização.

4.3 CRISTALIZAÇÃO E DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

ConBr liofilizada foi dissolvida para uma concentração final de 12,5 mg.mL⁻¹ em tampão Tris-HCL 20 mM, pH 7,6. Cristais viáveis e adequados destas proteínas para o processo de difração foram obtidos seguindo os protocolos estabelecidos por Bezerra e colaboradores (2011).

Os cristais nativos de ConBr foram submetidos a 2 testes de cristalização:

I – *soaking* com 1 μ L de adenina a 10 mM;

II – *soaking* com 1 μ L de β -ribofuranose a 5 mM

Os dados de difração de raios X foram coletados a temperatura de 100 K e para evitar a formação de gelo, os cristais foram mergulhados em solução crioprotetora composta de 70% da solução de cristalização (condição 32 – 0,1 M de cloreto de

sódio, 0,1 M tampão HEPES, pH 7,5 e 1,6 M de sulfato de amônia) e 30% de glicerol, para os cristais de ConBr-adenina e ConBr-ribose. Os cristais foram “laçados” com uso de *loops* que foram alinhados utilizando-se o goniômetro e então submetidos à coleta de dados. Os dados de difração de raios-X foram coletados em um comprimento de onda de 1,47 Å usando fonte de luz de radiação síncrotron (estação MX1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, Brasil), utilizando um detector CCD-MAR de 165 mm (MAR Research) em 120 imagens com uma oscilação de 1° por imagem para cada um dos cristais. Os dados de difração foram indexados, integrados e escalonados usando os programas MOSFLM e SCALA, ambos encontrados no pacote de programas *Collaborative Computational Project*, Número 4, 1994 (CCP4)

4.4 SUBSTITUIÇÃO MOLECULAR E REFINAMENTO

As estruturas cristalinas foram determinadas por substituição molecular usando o programa MolRep (VARGIN; TEPLYAKOV, 1997). Os modelos de coordenadas atômicas foram obtidos a partir da cadeia peptídica “A” do conjunto ConBr nativa (PDB código 3JU9, BEZERRA *et al.*, 2011). Após os cálculos de rotação e translação, os três complexos, ConBr-adenina, ConBr-ribose produziram valores de coeficiente de correlação e R_{factor} , apresentados na TABELA 3.

As estruturas iniciais foram submetidas a ciclos de refinamento de corpo rígido e refinamento de restrição usando o programa REFMAC5 (*Collaborative Computational Project*, Número 4, 1994). As estruturas foram modeladas usando o WINCOOT 0.6.2.1 (EMSLEY *et al.*, 2010). Em seguida inspecionaram-se os mapas de densidade eletrônica, sendo observadas as densidades para adenina e ribose, cujas coordenadas foram obtidas a partir do programa PRODRG (SCHÜTTELKOPF; AALTEN, 2004). Inspeção do complexo ConBr-adenina revelou a presença de mapas de densidade eletrônica para a molécula do glicerol. Nos complexos ConBr-adenina e ConBr-ribose também foi observado um mapa de diferença ($F_o - F_c$) para o AABA. Posteriormente, as moléculas de água foram adicionadas às duas estruturas cristalinas, e foi realizado o refinamento final de restrição permitindo a convergência entre os valores dos parâmetros de R_{factor} e R_{free} . As posições estereoquímicas dos aminoácidos na cadeia protéica foram analisadas usando o gráfico de Ramachandran a partir do programa Procheck (LASKOWSKI *et al.*, 1993). O B-fator foi também

considerado como parâmetro estrutural para análise dos resultados. As distâncias dos componentes das proteínas foram calculadas considerando como ligações de hidrogênio aquelas situadas entre os valores de 2,20 – 3,50 Å. Os dados de substituição molecular e refinamento, bem como códigos PDB para todas as estruturas são mostrados (TABELA 3). O arranjo biológico foi avaliado com o programa PISA (KRISINEL & HENRICK, 2007).

4.5 SIMULAÇÕES DE DOCKING MOLECULAR (DM)

Muitas vezes um complexo proteína-ligante não pode ser cristalizado, seja pela dificuldade de se obter a proteína em sua forma pura e/ou cristalizada ou pela não formação de um complexo estável. Para superar isto, simulações computacionais permitem prever a orientação de uma molécula em relação a outra (LENGAUER; RAREY, 1996). Neste sentido, de maneira geral, o processo de MD prediz as maneiras de ligação de um ligante a uma proteína cuja estrutura tridimensional já foi determinada, de modo que o melhor modelo para o complexo é obtido a partir de funções de *score* que refletem, matematicamente, a força das interações não covalentes que estabilizam as duas moléculas (JAIN, 2006).

Para avaliar a capacidade da ConBr em reconhecer ligantes derivados das substâncias com a qual fora cristalizada, como a adenosina foi utilizada a estrutura monomérica da ConBr (PDB 4H55) e a forma ribosídica da citocinina isopenteniladenina modelada com o programa PRODRG (SCHÜTTELKOPF; van AALTEN, 2004), para realizar a simulação *in silico* de *docking* molecular utilizando-se o software de acesso livre e gratuito Autodock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Este programa utiliza uma abordagem baseada em *grid* (grade virtual posicionada ao redor do ligante onde se mede a distância de cada um de seus pontos em relação ao receptor, gerando-se valores energéticos) para prever as posições e orientações de uma pequena molécula flexível em relação a um receptor rígido ou flexível de uma maneira bastante rápida, diminuindo assim os custos computacionais do processo. Neste procedimento, os arquivos PDB do receptor e dos ligantes foram preparados inicialmente pela adição de átomos de hidrogênio polares e de cargas *Gasteiger* [método de cálculo de cargas atômicas baseado no tipo de átomo e em sua conectividade (GASTEIGER & MARSILI, 1978; GASTEIGER; MARSILI, 1980)], sendo os mesmos, posteriormente, convertidos em um arquivo *pdbqt*, requisitado para o

funcionamento adequado da simulação. Antes de iniciar os procedimentos, as coordenadas x, y, z da caixa de *grid* foram ajustadas no centro do CRD da ConBr (x = 11.086 Å; y = 11.735 Å; z = 23.511 Å), enquanto suas dimensões foram de 28 x 28 x 28 Å e a exaustividade (função que mede o quanto o programa trabalha para buscar uma solução de baixa energia) de 12. As melhores soluções foram escolhidas considerando-se a capacidade do resíduo de ribose dos ligantes manterem interações, através de uma de suas hidroxilas com o ácido aspártico 208, um resíduo de aminoácido essencial para a ligação de lectinas de leguminosas com carboidratos (SHARMA; SUROLIA, 1997); poses obedecendo a esse critério foram posteriormente ranqueadas de acordo com a energia de ligação teórica obtida na simulação, dada como um valor negativo em Kcal/mol que representa a soma de forças atrativas e repulsivas que estabilizam o complexo receptor-ligante (TROTT & OLSON, 2010).

Os arquivos PDB utilizados nos procedimentos de DM foram previamente modificados. Aquele da ConBr (4H55), por exemplo, teve todos os seus heteroátomos removidos, deixando-se apenas as coordenadas referentes à cadeia polipeptídica. Os arquivos PDB dos ligantes foram obtidos através do PRODRG.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALINA

5.1.1 Estrutura geral da ConBr

Os complexos protéicos da ConBr apresentaram um dobramento estrutural típico das lectinas da subtribo Diocleinae chamado de β -sanduiche, assim como previamente descrito para as lectinas do tipo ConA e ConA-*like* (SRINIVAS *et al.*, 2001) sendo formadas por uma parte frontal contendo sete fitas- β antiparalelas que se sobrepõe a uma porção posterior com seis fitas- β antiparalelas, de modo que estas duas regiões encontram-se conectadas por diversos *loops*.

As estruturas dos complexos, ConBr-ribose e ConBr-adenina apresentaram-se na forma de monômero na unidade assimétrica e sendo estabilizada por 80 moléculas de água. Ambas as estruturas apresentaram os íons manganês e cálcio coordenados como apresentado em outras lectinas ConA-*like* (LORIS *et al.*, 1998) e apresentaram um arranjo biológico como tetrâmero de acordo com o resultado obtido pelo programa PISA. O ciclo final de refinamento foi realizado considerando o conjunto do tipo anisotrópico e seus resultados estatísticos e estruturais estão plotados na tabela 3.

Tabela 3 – Dados estruturais do processamento computacional dos complexos da lectina ConBr com ribose e adenina.

Parâmetro	ConBr-Ribose (4H55)	ConBr-Adenina (4P14)
<i>Coleta de Dados</i>		
# Total de observações	12,200	15,266
# Total de observações únicas	11,606	14,460
Limite de Resolução (Å)	27,68-2,15 (2,26- 2,15)	22,56-2,00 (2,05- 2,00)
Rmerge (%)	8,7 (24,1)	6,7 (36.1)
Completeza (%)	98,8 (98,8)	99,9 (100.0)
Multiplicidade	4,6 (4,3)	9,5 (9.4)
$(I)/\sigma$	7,0 (3,2)	18,6 (4.8)
Comprimento de ondat (Å)	1,428	1,430
Grupo espacial	I222	I222
Parâmetro de Célula (Å)		
	a = 67,2	a = 67,1
	b = 70,4	b = 70,9
	c = 97,5	c = 97,4
Distância para o detector (mm)	110	85
Tempo de exposição (s)	100	30
Coeficiente de Matthews (Å ³ Da ⁻¹)	2,27	2,32
Conteúdo de solvente (%)	47,06	47,06
<i>Substituição molecular</i>		
wRfac/Score (%)	39,2 / 70,1	44,4 / 75,5
Refinamento		
Limite de Resolução (Å)	24.39-2.07	22.30-2.00
Rfactor/Rfree (%)	18.3/22.6	17.5/22.8
# Resíduos de aminoácidos na unidade assimétrica	237	237
#Moléculas de água	80	84
<i>Rms de valores ideais</i>		
Comprimentos de ligações (Å)	0,020	0,018
Ângulos de ligações (graus)	2.142	2.001
<i>Fator de Temperatura</i>		
	21.55	35.11
Média do valor B para toda cadeia protéica (Å ²)		
<i>Ramachandran</i>		
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	96.07	97.41
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	3.93	2.59

Embora lectinas de *Diocleinae* possuam 237 resíduos de aminoácidos por monômero, geralmente observa-se que os resíduos que vão do Ser117 ao Thr123 estão ausentes na maioria das estruturas depositadas no banco de dados PDB, uma vez que a região ocupada por esses resíduos forma um *loop* sendo, portanto, muito flexível e com alto espectro de vibração e com isto de difícil modelagem a partir da estrutura cristalina (BOUCKAERT *et al.*, 1999), e isto foi observado também para todas as estruturas resolvidas neste trabalho. As regiões de *loop* foram parcialmente modeladas nas diferentes estruturas de lectinas. Os resíduos Ser117 e Asn118 foram modelados no complexo formado pela ConBr-ribose, que também contém uma molécula de AABA coordenada na interface do dímero canônico. Semelhante ao complexo ConBr-ribose, a estrutura ConBr-adenina também apresenta uma molécula de AABA no sítio de ligação à compostos hidrofóbicos e para este complexo foi possível realizar a modelagem dos resíduos Ser117, Asn118, Ser119, His121 (exceto anel imidazol) e Glu122. Ao analisarmos estes resultados foi possível observar que a ligação de aminoácidos não protéicos por si só não promove a estabilização da região de *loop* de maneira direta, assim como anteriormente sugerido pelo estudo realizado por Bezerra e colaboradores, 2011, indicando que outros fatores estão envolvidos e são requeridos para que ocorra a estabilização de regiões mais flexíveis das cadeias protéicas, como as interações entre os resíduos de *loops* e moléculas de água (BÖSS & PLEISS, 2008).

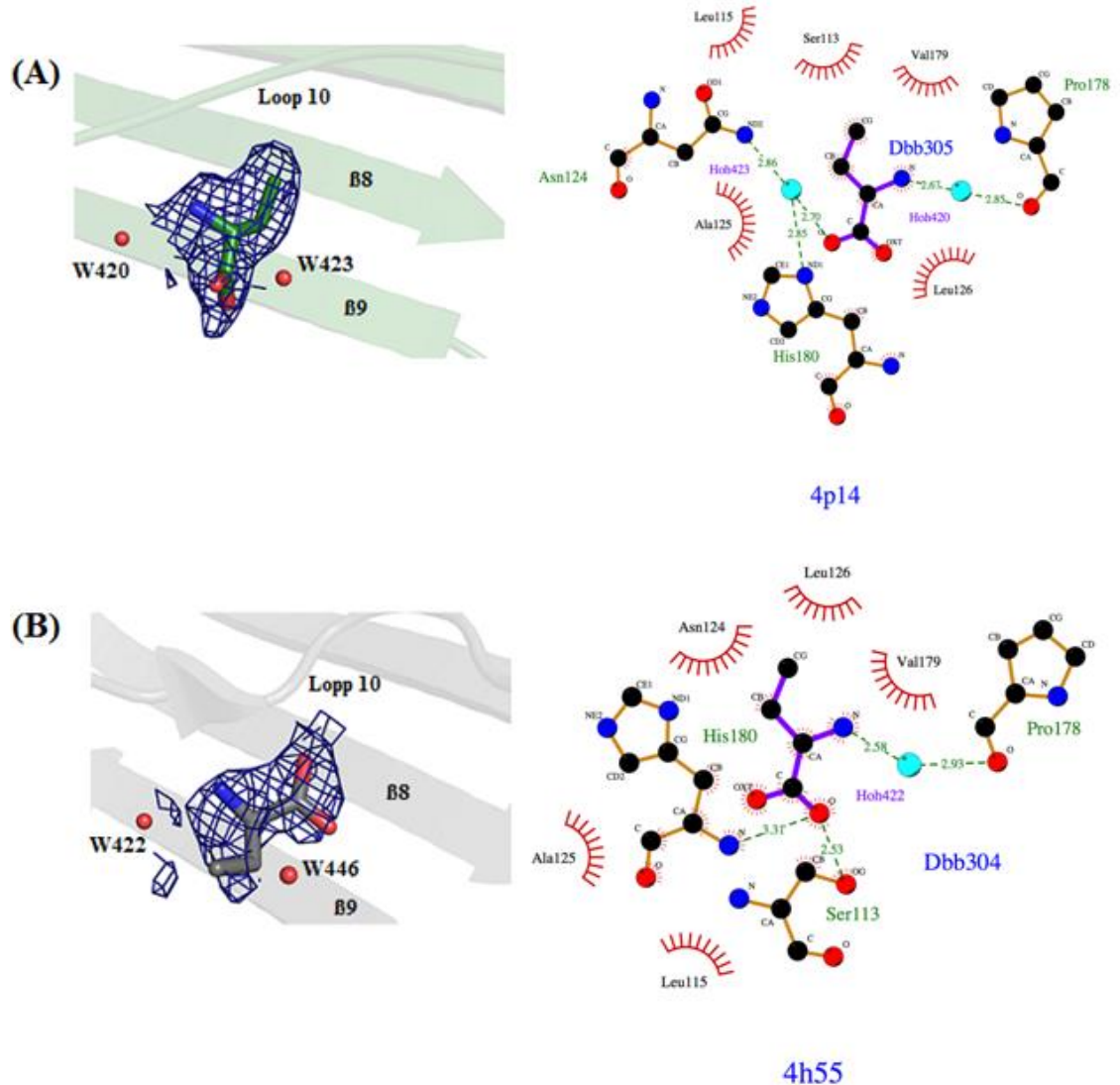
5.1.2 Sítio para AABA

O AABA é um aminoácido não protéico que pode apresentar o papel de defesa para a planta contra patógenos como proposto por Delatorre *et al* (2007) para a lectina de *Canavalia gladiata* (CGL).

Nas estruturas de ConBr foi possível visualizar a densidade eletrônica do ligante AABA no sítio de ligação primário, sendo este formado pelas regiões: *loop* (décimo [resíduos 180 – 188] e oitavo [resíduos 104 – 116]) e nona fita- β (resíduos 124 – 130) FIGURA 11, sendo que esta fita- β interage com seu homólogo no outro monômero para formar a interface do dímero canônico, assim como observado para a estrutura de ConBr previamente determinada por Bezerra e colaboradores (2011). No complexo ConBr-adenina (4P14) o AABA está orientado e estabilizado de modo

semelhante ao observado para estrutura nativa da ConBr, realizando interações hidrofílicas bem como hidrofóbicas, as primeiras envolvendo ligações de hidrogênio entre o nitrogênio do AABA e o nitrogênio da His180 da cadeia principal e entre o oxigênio deste ligante com o oxigênio da cadeia principal do resíduo Ala125. O aminoácido não protéico faz contato também com 2 moléculas de água envolvendo seus átomos de oxigênio OXT e o de nitrogênio. As interações hidrofóbicas envolvem o átomo CG do AABA e os resíduos Leu115, Leu126 e Val179 (FIGURA-11A). Interessantemente no complexo ConBr-ribose (4H55), o AABA apresenta uma orientação alternativa (FIGURA 11B) em que o ligante encontra-se rotacionado 180° em relação a estrutura ConBr-adenina. Nesta nova orientação o grupo carboxílico do AABA está interagindo por ligação de hidrogênio com o oxigênio OG do resíduo Ser113, o nitrogênio da His180 e uma molécula de água, enquanto o átomo de carbono CG realiza interações de van der Waals com outra molécula de água estrutural. Considerando-se que a ligação ocorre de um ponto de vista de estabilização energética (MOBLEY & DILL, 2009) é plausível supor que as diferentes orientações observadas para AABA pode representar dois padrões de energia mínima para que a ligação ocorra. No entanto, se ocorrer em solução, e mais importante, se conferir diferentes propriedades para as lectinas, não é por enquanto possível determinar. É hipotetizado que derivados de ácido butírico como AABA ou GABA podem funcionar tanto como estoque de aminoácidos para a planta quanto para os processos de defesa da mesma (ABHILASH *et al.*, 2015; BEZERRA *et al.*, 2011; DELATORRE *et al.*, 2007;). Tendo em vista a coordenação do AABA próximo a região de *loop* Ser117-Glu122, que geralmente apresenta uma fraca densidade eletrônica em virtude da alta dispersão vibracional (BOUCKAERT *et al.*, 1999) é possível analisar esta região em função da variação da coordenação deste ligante nas duas estruturas aqui apresentadas. Embora AABA se encontre perto deste *loop* a sua modelação deficiente em comparação com ConBr (código PDB 3JU9 [BEZERRA *et al.*, 2011]) pode ser devido ao número de moléculas de água nas imediações do *loop*.

Figura 12 – Representação da coordenação de AABA às estruturas de ConBr-adenina e ConBr-ribose. Em A do lado esquerdo está o *omit map* (1,0 σ) da orientação convencional do AABA no complexo ConBr-adenina. A direita representação das forças hidrofóbicas envolvidas na estabilização do aminoácido não protéico. Em B detalhe do lado esquerdo *omit map* (1,0 σ) da orientação alternativa do AABA no complexo ConBr-ribose. A direita está representada as forças hidrofóbicas envolvidas nesta nova estabilização. Tanto em A quanto em B é mostrada a estrutura secundária da proteína e os resíduos que interagem com o AABA e as moléculas de água estruturais (esferas vermelhas). Nos ligantes e na cadeia protéica os átomos em vermelho são oxigênios, em azul são nitrogênios e em negro são carbonos.



Fonte: Produzida pelo autor.

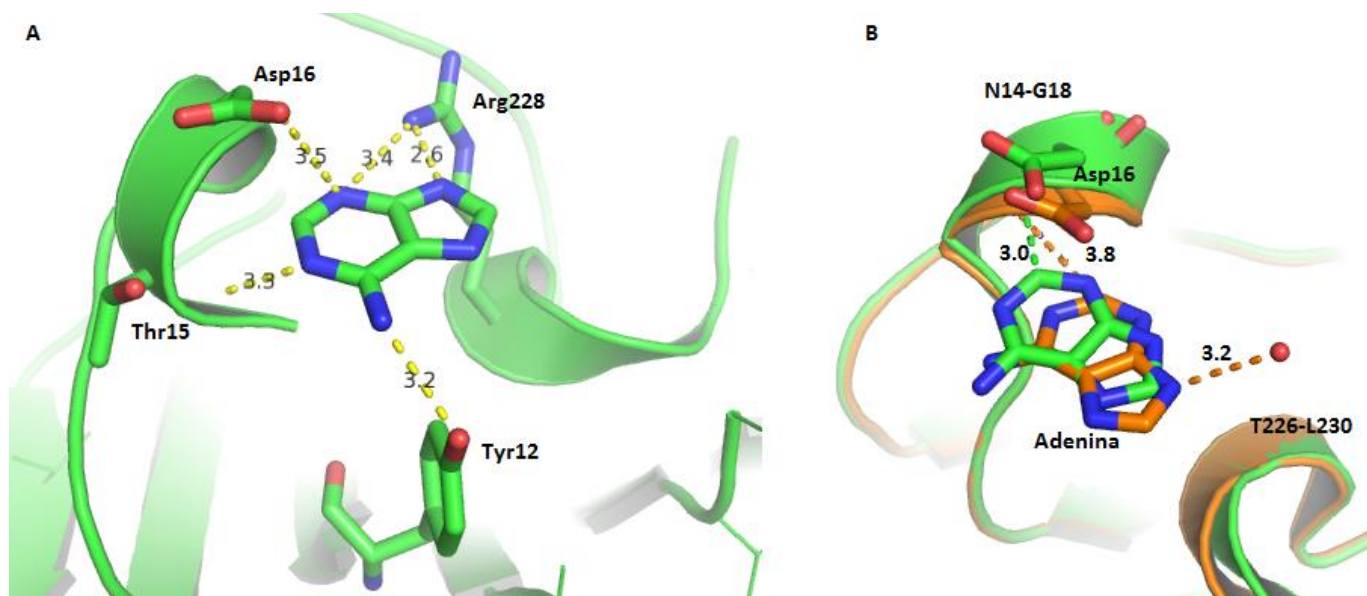
5.1.3 Sítio de ligação para adenina na estrutura da ConBr

A densidade eletrônica da adenina foi encontrada logo acima do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da lectina ConBr onde a base nitrogenada

apresentou uma rede de interações que permite a estabilização da ligação por meio de ligações de hidrogênio e forças de van der Waals com os resíduos do CRD.

A análise da estrutura cristalina da ConBr – adenina nos permitiu determinar que os átomos de nitrogênio N1, N3, N6, N7 e N9 apresentam ligações de hidrogênio com os resíduos Tyr12, Asn14, Thr15, Asp16, e Arg228 (FIGURA 12A) (TABELA 4). Resultados semelhantes foram obtidos para a estrutura de ConM ligada a adenina obtida por Delatorre e colaboradores (2012) depositada sob o código PDB 4I30, embora apresentem uma divergência quanto ao posicionamento do anel purínico, que para a estrutura da ConBr quando comparada a da ConM encontra-se posicionado mais próximo ao Asp16 (FIGURA 12B). Em ambas as estruturas todos os átomos de nitrogênio participam da estabilização da adenina, mas devido a sua orientação, algumas interações diferentes são observadas. Por exemplo, o átomo N1 interage com o nitrogênio da cadeia principal da Thr15 e não há participação de moléculas de água para esta estabilização, fato este observado na interação da ConM com adenina (DELATORRE *et al.*, 2012). Além disso, é possível observar uma ligação de hidrogênio não usual (C-H- – -N) entre o átomo de C2 da adenina e o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Asp16 (FIGURA. 12B verde)

Figura 13 – Representação da molécula adenina no CRD de ConBr (em verde) e ConM (em laranja). (A) Interações por ligação de hidrogênio da adenina no CRD da ConBr. (B) Sobreposição comparativa do CRD de ConBr e ConM destacando a aproximação entre nitrogênio da cadeia principal do Asp16 e o C2 da adenina.



Fonte: Produzida pelo autor.

Tabela 4 – Ligações de hidrogênio (2.20-3.50 Å) e forças de van der Waals (3.50-4.50 Å) entre os átomos da adenina e resíduos da ConBr (a) e ConM (b).

Átomos da Adenina	Resíduos da Lectina
N1	Thr15 N (3.28) ^a
	Asp16 N (3.56) ^b
	Asp16 OD1 (3.53 ^b /4.47 ^a)
	Asp16 OD2 (3.12 ^b /3.63 ^a)
N3	Asn14 ND2 (3.37 ^b /4.17 ^a)
	Asp16 OD2 (3.35 ^b /3.48 ^a)
	Arg228 NH1 (2.33 ^b /3.40 ^a)
N6	Tyr12 OH (3.48 ^b /3.19 ^a)
	Pro13 O (3.78 ^b /4.11 ^a)
	Asn14 ND2 (4.36) ^b
N7	Tyr12 OH (3.97) ^b
	Asn14 ND2 (3.95 ^b /3.45 ^a)

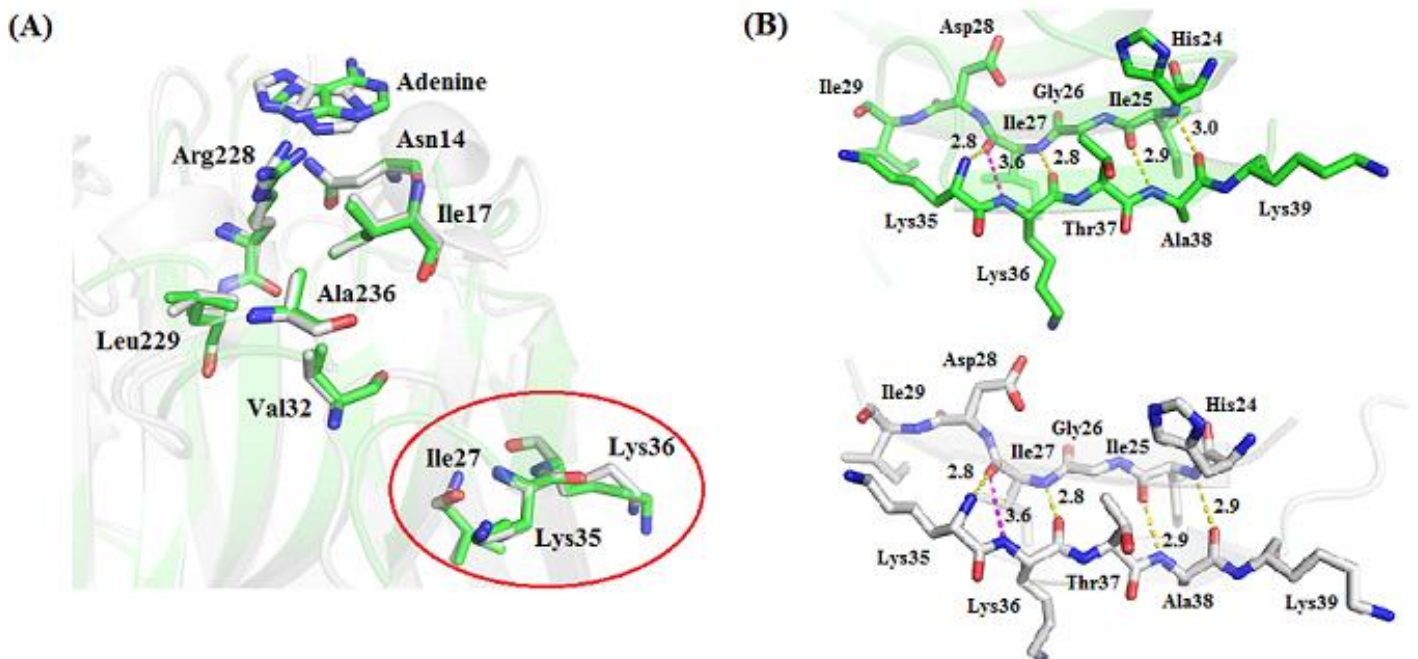
Tabela 4 –Ligações de hidrogênio (2.20-3.50 Å) e forças de van der Waals (3.50-4.50 Å) entre os átomos da adenina e resíduos da ConBr (a) e ConM (b).

Átomos da Adenina	Resíduos da Lectina
N9	W468 (3.20) ^b
	Asn14 ND2 (3.56) ^a
	Arg228 NH1 (3.19 ^b /2.56 ^a)
C2	Asp16 N (2.97) ^a

Distâncias em parênteses são em Å.

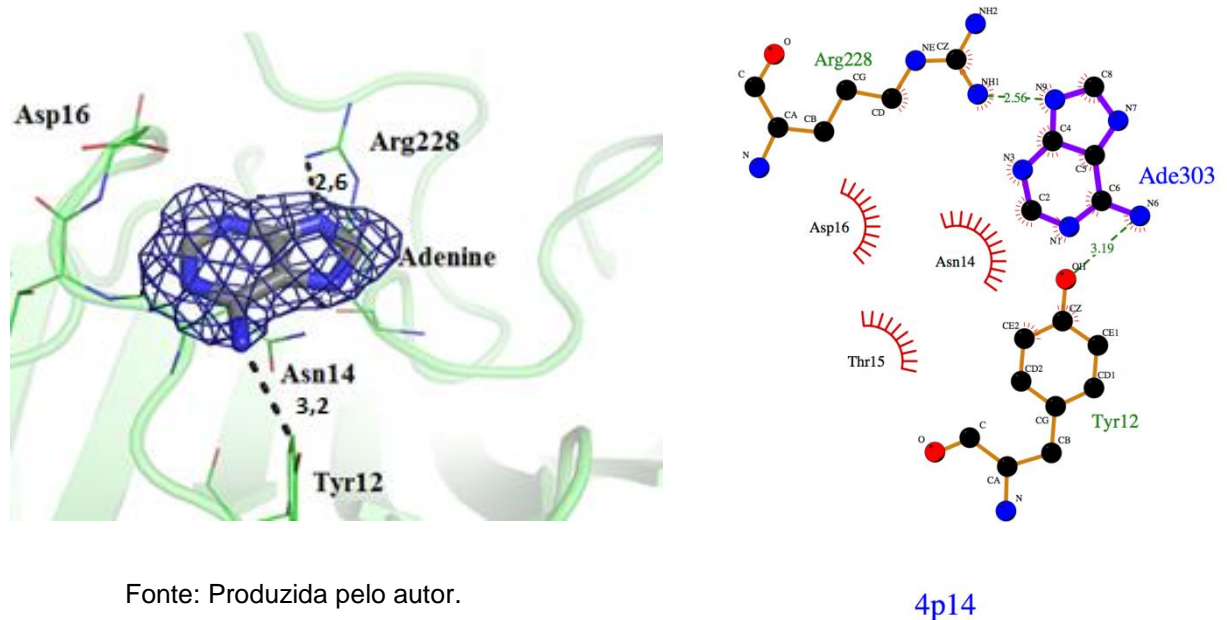
A presença de moléculas hidrofóbicas na vizinhança do CRD das lectinas, tais como adenina e grupo indol (DELATORRE *et al.*, 2013) é uma observação singular, uma vez que os resíduos envolvidos na estabilização do ligante são caracteristicamente polares, o que implica na existência de outra explicação para este fato. Podemos hipotetizar que uma β -*bulge* formada pelos resíduos Ile27, Lys35 e Lys36 apresentam um papel fundamental nessa questão (FIGURA 13). Esta estrutura não repetitiva promove uma mudança de direção da cadeia polipeptídica na lectina de modo que aproxima os resíduos Val32 para Asn14, Ile17, Arg228, Leu229 e Ala236 criando uma cavidade ou bolsão hidrofóbico atrás do sítio de ligação que propicia a atração e o encaixe às moléculas hidrofóbicas para próximo ao CRD de ConBr e também ConM (FIGURA 14)

Figura 14 – Representação da topologia estrutural do CRD de ConBr e ConM após ligação à adenina. (A) superposição entre as duas estruturas mostrando que a adenina está deslocada na ConBr (verde) em relação a ConM (cinza). Os resíduos Ile27-Lys35-Lys36 (elipse vermelha) formam uma β -bulge, promovendo uma mudança em direção ao polipeptídeo, aproximando o resíduo Val32 aos Asn14, Arg228, Leu229 e Ala236, criando um bolsão hidrofóbico logo atrás do CRD que pode estar relacionado com a presença da adenina no sítio relatado neste trabalho. (B) Detalhe da β -bulge em ConBr (painel superior) e ConM (painel inferior). Nesta estrutura secundária o grupo carbonila da cadeia principal de um resíduo (chamado de “n”) em uma cadeia não realiza ligação de hidrogênio com o “-NH” do resíduo “m” na outra cadeia (linha magenta traçada), mas fazê-lo com o resíduo “m-1”. Em ConBr e ConM “n” é Ile27, “m” é Lys36 e “m-1” é Lys35.



Fonte: Produzida pelo autor.

Figura 15 – Sítio da adenina em ConBr. (A) Painel esquerdo: *omit map* (1.0σ) da base nitrogenada no CRD da ConBr e interações polares. Painel direito: representação das forças hidrofóbicas envolvidas na estabilização da adenina a partir do programa ligplot.



As duas estruturas cristalográficas de lectinas de DBL e de *Dolichos lablab* complexadas com adenina mostram que a molécula hidrofóbica se liga na interface dimérica não canônica do arranjo tetramérico, local este sendo denominado de interface tipo-X1 por meio do arranjo estrutural formado devido a presença de uma porção C-terminal em hélice (SHETTY *et al.*, 2013), fato este não observado para as lectinas *ConA-like* além de fato de apresentarem estas últimas uma interface designada como sendo tipo – X2 (MANOJ & SUGUNA, 2001). Os diferentes arranjos destes dois tipos de interfaces diméricas nos levou a supor que este último não permitia ligação da adenina neste sítio para lectinas *ConA-like*, explicando parcialmente os resultados aqui apresentados.

A especificidade de ligação a carboidratos de lectinas de plantas levou a sua ampla utilização em pesquisas relacionadas a possíveis papéis destes carboidratos na superfície celular (AMBROSI *et al.*, 2005). A utilização de lectinas para esses fins e nas investigações sobre seus papéis em plantas levou-nos a supor que estas proteínas podem possuir outras importantes propriedades biológicas além apenas da ligação de carboidratos (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1982). A ligação de compostos que não açúcares têm sido reportados na literatura, mas não para um grupo amplo de lectinas (HAMELRYCK *et al.*, 1999). Hardman & Ainsworth em 1973 relataram que a ligação de moléculas não polares à cristais de ConA era possível e postularam que

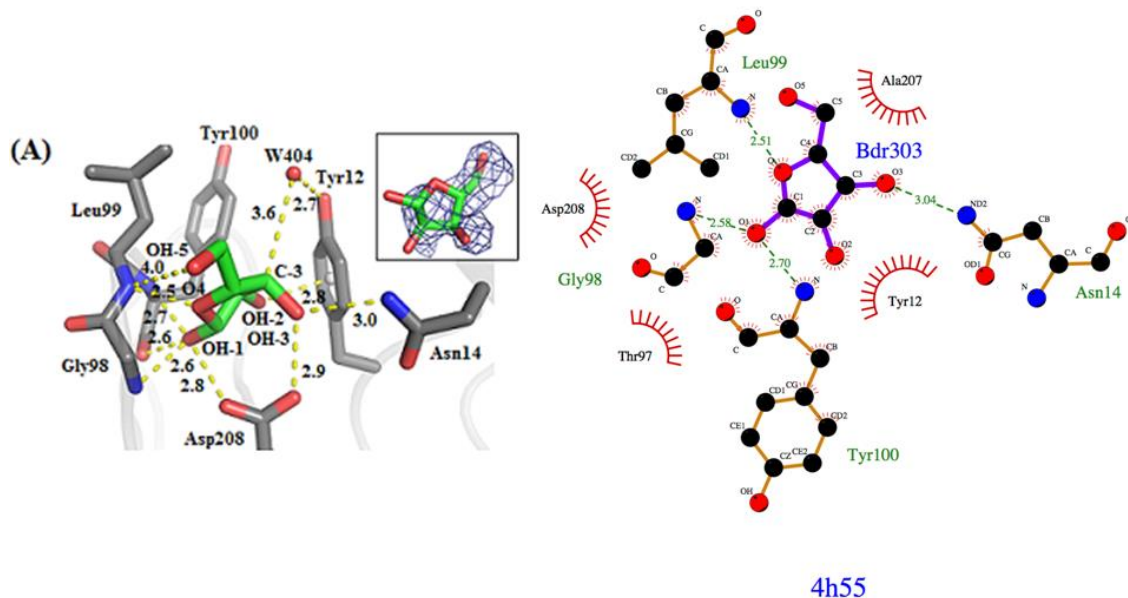
as lectinas podem atuar nos processos de regulação de divisão celular ou germinação por se ligar a algumas moléculas não polares, tais como fatores de crescimento ou citocinas. Edelman; Wang (1978) mostraram que o fitormônio ácido indolacético se liga a ConA mesmo que de modo fraco (KOMATH *et al.*, 2006). Além disso, foi descrito que algumas lectinas de leguminosas possuem um sítio de ligação a compostos hidrofóbicos que permite ligar tanto adenina quanto hormônios de plantas derivados de adenina como, por exemplo, as citocininas (ROBERTS & GOLDSTEIN, 1983). A molécula de adenina foi encontrada na cavidade formada entre as interfaces do dímero não canônico das estruturas das lectinas de DBL e DB58, que tem uma característica hidrofóbica (HAMELRYCK *et al.*, 1999). A adenina é conhecida por ser o precursor de citocininas e fitormônios envolvidos em vários processos fisiológicos nas plantas (BARCISZEWSKI *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2011; GIRON *et al.*, 2013; SCHMÜLLING, 2004). Estudos têm demonstrado que as lectinas podem se ligar a estas moléculas (MALECKI *et al.*, 2012; MEYERS, 2008), sugerindo que lectinas de leguminosas ligam-se a adenina/citocina podendo assim estar envolvidos na regulação do crescimento e/ou estoque de hormônios para as plantas.

5.1.4 Estrutura do CRD da ConBr ligado a β -D-ribofuranose

A densidade da β -D-ribofuranose foi encontrada no CRD (FIGURA 15A). A ligação da ribose no monômero da estrutura cristalográfica da ConBr foi estabilizada por interações com resíduos chave do CRD a partir de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas OH-1 e OH-3 e o resíduo Asp208, essencial para o reconhecimento de carboidratos pelas lectinas de Diocleinae (SHAMA & SUROLIA, 1997). Alguns estudos têm relatado que as distâncias entre Tyr12-Lys99 e Tyr100-Arg228 faz o CRD mais estreito e mais profundo em comparação com outras lectinas do mesmo gênero, o que se reflete, por exemplo, em menor produção de óxido nítrico induzida por ConBr (BEZERRA *et al.*, 2011). Para a OH-1, o átomo de oxigênio têm função de acceptor de ligação de hidrogênio para ligação peptídica entre Leu99 e Tyr100 (2,70 Å). Enquanto seu hidrogênio age como doador de ligação de hidrogênio para o grupo carbonila de Tyr100 (2,39 Å). Para a OH-3, o átomo de oxigênio funciona como um acceptor de ligação de hidrogênio para o átomo de nitrogênio ND2 de Asn14 (3,04 Å), enquanto o seu átomo de hidrogênio atua como dador de ligação de hidrogênio para o átomo de

oxigênio OD1 do Asp 208 (2,87 Å). Além disso, o de átomo de oxigênio (O4) da molécula β-D-ribofuranose participa nas interações polares, funcionando como um acceptor de ligação de hidrogênio para ligação peptídica entre Gly98 e Leu99 (2,51 Å). Outras ligações de hidrogênio envolvem estes mesmos grupos hidroxila e os resíduos Asn14, Gly98 e Tyr100 (FIGURA15B). O oxigênio da ribose exibe uma interação do tipo ligação de hidrogênio com o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Leu99, enquanto OH-2 promove uma ligação OH- - π com Tyr12. A hidroxila OH-5 não faz ligações de hidrogênio no CRD, mas realiza interação de van der Waals com Leu99. Os resíduos Tyr12, Gly98, Tyr100 e Ala207 também contribuem para a estabilização do ligante a partir da presença de forças de van der Waals adicionais.

Figura 16 - Coordenação da β-D-ribofuranose no CRD de ConBr. (A) Interações polares envolvidas na estabilização da furanose. A molécula de água W404 realiza interação CH- -O com o ligante, que mesmo fracamente liga-o a Tyr12. No canto superior com o omit map (1.0 σ) da ribose. (B) Representação ligplot das forças hidrofóbicas envolvidas na estabilização do ligante.



Fonte: Produzida pelo autor.

Embora a molécula de água estrutural (H₂O451) esteja realizando ligações de hidrogênio com os resíduos Asn14, Asp16 e Arg228 (não mostrado), este fato também observado para outras estruturas ConA-like (Bezerra *et al.*, 2007). O complexo solucionado ConBr-ribose diferentemente de outras ConA-like complexadas com carboidratos apresenta estabilização por meio de ligação de hidrogênio entre a água (H₂O404), o C3 da ribose e o oxigênio de Tyr12 interagindo fracamente com ribose a 3,60Å. Grupos hidroxila interagem com moléculas de água sendo uma característica

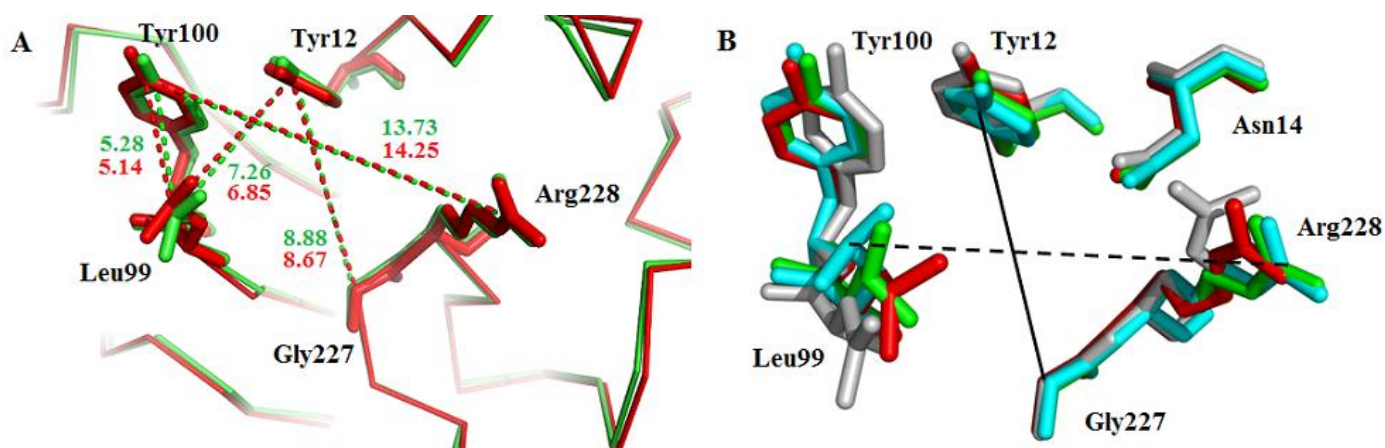
comum de ligação lectina-carboidrato (Tschampel; Woods, 2003). Esta observação indica que ribose satisfaz seu potencial de ligação de hidrogênio com aminoácidos de ConBr e reforça a ideia de que a importância do reconhecimento de carboidratos mediada por água é variável (Krengel; Imberty, 2007)

Diversos estudos têm demonstrado que a afinidade de lectinas da subtribo Diocleinae por carboidratos não inclui a ribose ou seus derivados (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1967; BECKER *et al.*, 1975). Contudo, este trabalho mostra que a lectina de ConBr pode interagir com este resíduo sacarídico. Embora a estrutura cristalográfica tenha sido determinada a mais de 15 anos (SANZ-APARÍCIO *et al.*, 1997), esta é a primeira vez que é relatada a resolução da estrutura 3D de ConBr complexada com uma molécula de carboidrato. A possível explicação para a dificuldade da estabilização de açúcares estarem ligados a esta proteína é o fato de os resíduos de aminoácidos situados no CRD apresentarem um padrão conformacional que difere dos de outras lectinas *ConA-like*. Quando comparamos a estrutura determinada neste trabalho com a previamente solucionada e depositada no PDB (código ID 3JU9) é possível perceber que a presença da ribose formando o complexo com ConBr aumenta a distância entre os resíduos Tyr12 e Gly227 e entre Tyr12 e Leu99, enquanto que diminui as distâncias entre a Tyr100 e Arg228 (TABELA 5) e (FIGURA 16).

Tabela 5 – Distâncias (Å) entre resíduos de aminoácidos a partir do CRD de ConBr nativa (n) e em complexo com ribose (c).

		ⁿ ConBr (3JU9)	^c ConBr (4H55)
Tyr12 CZ	Gly227 CA	8.67	8.88
Tyr12 CZ	Leu99 CG	6.85	7.75
Tyr12 CZ	Tyr100 CZ	5.45	5.17
Leu99 CG	Asn14 ND2	9.11	9.35
Leu99 CG	Arg228 CZ	11.86	11.64
Tyr100 CZ	Asn14 ND2	9.90	9.69
Tyr100 CZ	Arg228 CZ	14.25	13.73

Figura 17 – Representação comparativa do CRD de lectinas Diocleinae. (A) Sobreposição de resíduos chave do CRD e suas distâncias relativas de ConBr ligada com ribose (verde) e sem ligante (vermelho) destacando as mudanças conformacionais resultantes da presença do ligante. (B) Ciano- ConBr, verde –ConM, vermelho CGL e cinza-ConA sem açúcar



Fonte: Produzida pelo autor.

Estas modificações resultantes da presença de ribose alteram o dobramento do CRD deixando-o mais profundo, e maior no eixo longitudinal (Tyr12-Gly227) e menor transversalmente (Leu99-Arg228), facilitando assim a coordenação da ribose

ligando-a e aumentando o volume do CRD, que é mais raso para ConBr nativa (sem ligante) em comparação com outras lectinas de *Canavalia* (TABELA 6).

Tabela 6. – Volume (A^3) do CRD de lectinas *Canavalia* nos estados nativo e ligada a carboidrato.

ConBr		ConM		CGL		ConA	
Nativa (3JU9)	Ribose (4H55)	Nativa (2CWM)	Man1-3 (2P37)	Nativa (1WUV)	Man1-3 (2EF6)	Nativa (1JBC)	Man1-3 (1QDO)
105	138	135	208	165	216	151	197

O código PDB está em parênteses. ConBr: *Canavalia brasiliensis*; ConM: *Canavalia maritima*; CGL: *Canavalia gladiata*; ConA: *Canavalia ensiformis*; Man1-3: Man(α 1-3)Man(α 1-O)Me.

Os grandes volumes dos CRDs de outras lectinas de *Canavalia* parecem bloquear a coordenação de moléculas de carboidratos pequenos em função da falta de ligações suficientes para a estabilização, explicando assim a ausência na literatura de observações de moléculas de ribose e/ou derivados coordenados nas estruturas. O volume do CRD da ConBr com ribose tornou-se semelhante aos CRDs sem ligantes glicídicos de ConM por exemplo, indicando que a ConBr pode apresentar uma elevada afinidade para pequenas moléculas de carboidratos que não requerem grandes espaços para sua acomodação. Por outro lado, os maiores volumes dos CRD de outras lectinas de *Canavalia* bloqueiam a coordenação de moléculas de carboidratos pequenas, devido a falta de ligações suficientes para a estabilização, explicando assim os relatos anteriores para não coordenação de ribose e seus derivados.

Nóbrega et al, (2012) relataram que lectinas da subtribo Diocleinae com grandes distâncias entre Leu99 a Arg228 devem apresentar outras interações para estabilizar a segunda unidade do carboidrato. No entanto analisando o CRD de ConBr percebemos que as distâncias entre estes dois resíduos de aminoácidos são superiores aos de outras lectinas não ligadas a carboidratos, e este fato não permitiu a coordenação de carboidratos mais complexos em ConBr até o momento. Sendo proposto que esta discrepância se deve as distâncias entre Tyr12 e Gly227.

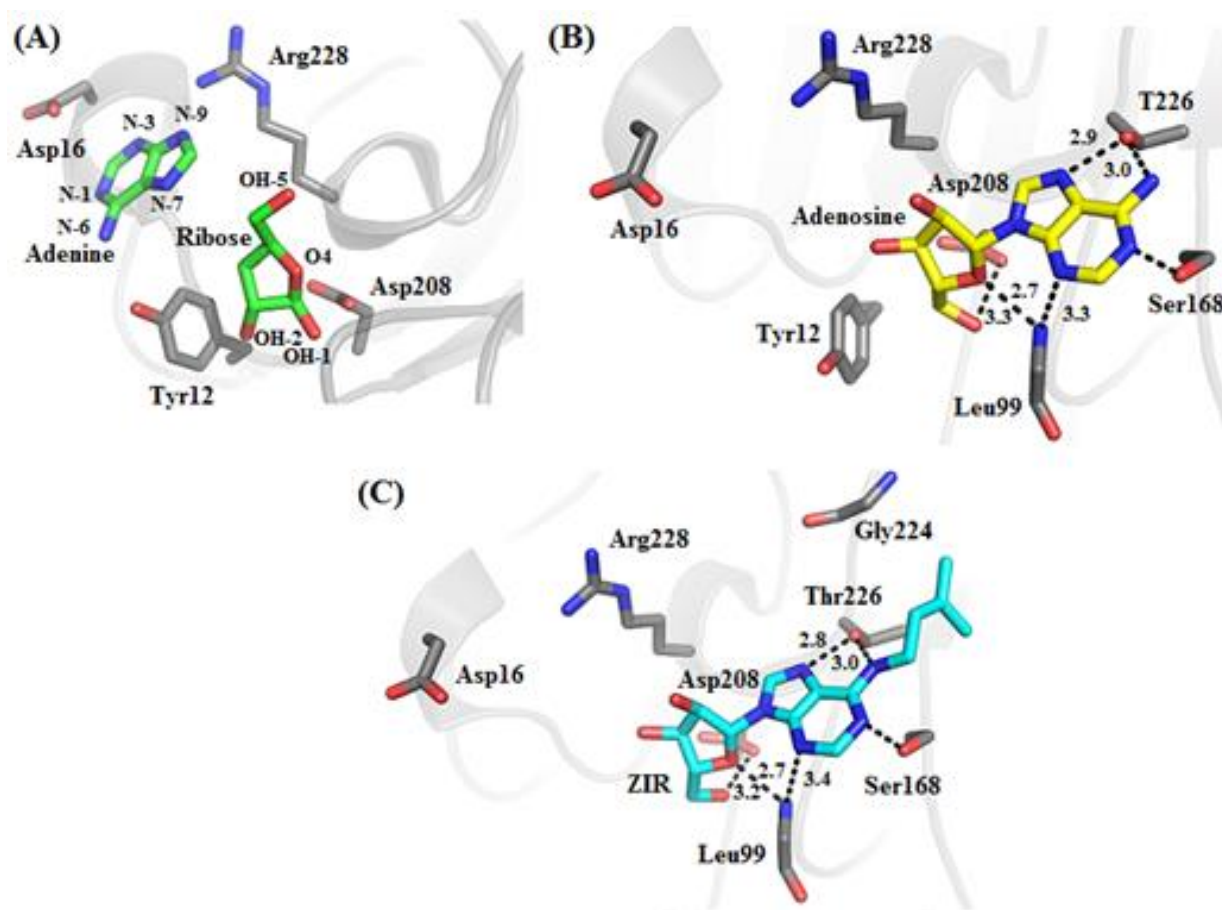
5.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA DE CONBR POR DOCKING

5.2.1 Estrutura do complexo ConBr com adenosina e isopenteniladenosina por *docking* molecular

A ligação da ribose no CRD, e da adenina perto deste domínio, na estrutura da ConBr, nos sugere a possibilidade de ligação destas proteínas a nucleosídeos e/ou seus derivados. Para testar essa hipótese, submetemos a estrutura da ConBr (código PDB4H55) a simulações de *docking* molecular através do *software* Autodock Vina frente à adenosina (ADN) e à forma conjugada à ribose do fitormônio isopenteniladenosina (ZIR), dois compostos conjugados de adenina e ribose que funcionam, respectivamente, como um produto de degradação e uma forma inativa de citocinina, um fitormônio que regula o desenvolvimento da planta à respostas ambientais (KOPEČNY *et al.*, 2015). As melhores poses retornadas pelo programa indicaram uma energia de ligação teórica para a interação da adenosina e da ZIR à ConBr de -7.3 e -6.2 Kcal/mol, respectivamente. Os dois ligantes interagiram de uma maneira bem diferente no CRD da lectina em relação aos seus constituintes isolados para os complexos cristalográficos (FIGURA 17). Nos modelos *in silico*, o anel furanosídico sofreu uma rotação de aproximadamente 180° em seu eixo transversal, de maneira que a hidroxila OH-3 rompe sua interação com o Asp208 e a OH-5 passa a interagir com este resíduo de aminoácido (FIGURA 17A e B). O anel purínico, por sua vez, encontra-se estabilizado por forças de van der Waals e interações de hidrogênio com os resíduos Leu99, Ser168 e Thr226. Essas diferenças posicionais entre os anéis livres (estruturas cristalográficas) e conjugados (estruturas modeladas) parecem ter ocorrido devido à ligação covalente existente entre o carbono C-1 da ribose e o nitrogênio N-9 da adenina: nesse estado, forma-se uma molécula que não consegue ser acomodada no CRD da ConBr, como suas porções constituintes isolados sem sofrer interferência estérica com os resíduos de aminoácidos que formam o sítio; assim, a molécula conjugada, particularmente a purina, deve se posicionar de modo diferente, como de fato é observado nos resultados do *docking*.

Figura 18 – Representação da ConBr ligada às moléculas de adenina e ribose (A) Orientação da estrutura cristalina da adenina e ribose no CRD da lectina. (B) e (C) Estabilização da adenosina e *N*6-isopenteniladenosina (ZIR), respectivamente, no CRD de ConBr por *docking* molecular mostrando as diferentes orientações do anel purínico em relação ao da estrutura cristalina. O resíduo Val170 foi omitido para facilitar a visualização.

Fonte: Produzida pelo autor



É interessante notar que apesar da ZIR ser maior que a adenosina, por apresentar uma cadeia alquila ligada ao nitrogênio N-6 do anel purínico, essa característica determina um maior número de interações com a ConBr (a cadeia hidrocarbonada encontra-se voltada para uma região relativamente hidrofóbica formada pelos resíduos, Ser168, Val170, Gly224, e Thr226 (FIGURA 17 C), sua energia de ligação teórica à ConBr é menor, como descrito no parágrafo anterior. Embora, geralmente, um número maior de ligações indique um processo termodinamicamente mais favorável, por diminuir a energia livre do sistema (MARTIN & CLEMENTS, 2013; MOBLEY & DILL, 2009), os tipos de forças envolvidas na interação entre moléculas devem ser levadas em consideração na análise da energia

de ligação. Nesse sentido, é provável que forças repulsivas entre a cadeia isopentenil e os grupos polares dos resíduos Ser168 e Thr226 tenham elevado o termo de repulsão da função *score* do Autodock Vina (TROTT & OLSON, 2009), abaixando assim a energia de ligação para o complexo ConBr-ZIR.

Essas simulações realizadas entre a ConBr e a adenosina e a ZIR predizem que lectinas da subtribo Diocleinae podem interagir com citocininas, como outras lectinas vegetais (MALECKI *et al.*, 2012; MEYER *et al.*, 2008), ou pelo menos com seus precursores ou formas inativas (produtos da degradação). No exemplo aqui descrito, é observado que a ConBr tem maior probabilidade de se ligar à adenosina, o que, do ponto de vista fisiológico, pode indicar a participação dessas proteínas em processos não somente relacionados a defesa contra agentes agressores bióticos e abióticos, como já bem descrito na literatura (ABHILASH *et al.*, 2015; DANG & VAN DAMME, 2015; DELATORRE *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2008; SCHUTTER *et al.*, 2015), mas também em eventos regulatórios do desenvolvimento e crescimento vegetal, como divisão e diferenciação celular e desenvolvimento de sementes (DELATORRE *et al.*, 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estrutura da lectina ConBr complexada com adenina corrobora os resultados que indicam que lectinas de origem vegetal podem atuar como proteínas que regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas a partir da capacidade de estocar citocinas e fitohormônios. As estruturas da lectina de ConBr complexadas com ribose e adenina sugerem que esta proteína pode se ligar a nucleosídeos, tal como predito por ensaio de *docking* molecular, sugerindo uma possível função de transporte destas moléculas. Estudos ainda são necessários para que sejam corroborados os efeitos diversificados vistos na literatura. Os achados deste trabalho contribuem diretamente para a compreensão da função biológica de ConBr na planta e futuramente na ação biológica de modelos *in vivo* e *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABHILASH, J. et al. The crystal structure of a lectin from *Butea monosperma*: Insight into its glycosylation and binding of ligands. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.72, p. 1376-1383, anj. 2015.
- AGRAWAL, B.B.L., GOLDSTEIN, I.J. Physical and chemical characterization of concanavalin A, the hemagglutinin from jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Biochim. Biophys. Acta**. v. 133, p. 376-379. 1967
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v 215, n.3, p 403-410. out. 1990.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biolecular Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1593-1608. 2005
- AUB, J.; SANFORD, B.; COTE, M. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, v. 54, n. 2, p. 396-399, ago. 1965.
- BABOSHA, A. V. Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 73, n. 7, p. 812–825, jul. 2008.
- BARRAL-NETO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. **Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleinae subtribe**. *Immunol. Invest.*, 21: 297-303. 1992.
- BARCISZEWSKI, J.; MASSINO, F.; CLARK, B. F. C, Kinetin – a multiactive molecule. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 40, n. 3, p. 182-192, fev.2007.
- BECKER, J.W. et al. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1513-1524, fev. 1975.
- BEN-ARI, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 3, n. 9, p. 728-739, set. 2002.
- BERGFORS, T. M. (Editor). **Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips**. La Jolla, CA: International University Line, 1999.
- BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v 28, n. 1, p 235-242, 2000.
- BEZERRA, G. A. et al. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the

understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. **Journal of Structural Biology**, v 160, n.2, p 168-176, ago. 2007.

BEZERRA, E. H. S. et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 4, p 566-570, mai. 2011.

BEZERRA, M. J. et al. Crystal structure of Dioclea violacea lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with Dioclea rostrata lectin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 4, p. 807–815, abr. 2013.

BIES, C.; LEHR, C.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, mar. 2004.

BÖSS, F.; PLEISS, J. Conserved water molecules stabilize the Ω -loop in class A β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n.3, p.1072-1079, mar. 2008.

BOUCKAERT, J. et al. Novel structures of plant lectins and their complexes with carbohydrates. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 5, p. 572-577, out. 1999.

BOWLES, D. J.; PAPPIN, D. J. Traffic and assembly of concanavalin. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, p. 60–64, 1988.

BOYD, W.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, mar. 1954.

BRINDA, K. V. et al.. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science**, v 13, n. 7, p 1735-1749, jul. 2004.

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

CALVETE, J. J. et al. Primary structure and post-translational processing of Vatairea macrocarpa seed lectin. **Journal of Protein Chemistry**, v, 17, n. 6, p. 545-547, 1998.

CALVETE, J. J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v, 1430, n. 2, p. 367-375, mar. 1999.

CARTER, C. W.; JR.; CARTER, C. W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 23, p 12219-23. 1979.

CAVADA, B. S. et al. **Purification and biological properties of a lectin from Canavalia bonariensis Lind. Seeds**. (Van Driessche, E.; Fisher, J.; Beeckmans, S.; Bog-Hansen, T.C.; eds), Textop, Denmark. v 11, p. 74-80, 1996.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptides Science**, v 2, n. 2, p 123-135, jun. 2001.

CAVADA, B. S. et al. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Acta Crystallographica Section F**, v. 62, n, 3, p. 235-237, mar. 2006.

CAVALCANTE, T. et al. Effect of Lectins from Diocleinae Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, 2011.

CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume fold. **Protein Engineering**, v.14, n.11, p. 857–866, nov, 2001.

CHOI, J. et al. Cytokinins and *plant* immunity: old foes or new friends? **Trends in Plant Science**, v.16, n. 7, p. 388-394, jul. 2011.

CLAUDE, S. D. *et al.* Targeting of proConA to the Plant Vacuole depends on its Nine Amino-acid C-terminal Propeptide. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, p. 1603-1612, 2005.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 295-300, set. 2000.

COHEN, Y. et al. β -aminobutyric acid induces accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. **Plant Physiology**, v. 104, n. 1, p. 59-66, jan. 1994.

COHEN, Y.R. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. **Plant Disease**, v. 86, n. 5, p. 448-457, mai. 2002.

CRUZ, P. H. et al. Las Lectinas Vegetales como Modelo de Estudio de las Interacciones Proteina carbohidrato. **Revista de Educación Bioquímica**, v. 24, n. 1, p 21-27, 2005.

DAM, T. K., BREWER, C. F. Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 2, p. 387-429, fev. 2002.

DANG, L., VAN DAMME, E.J.M. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**. v.117, p. 51-64. 2015

DE AZEVEDO, W. F. et al. Crystal structure of human purine nucleoside phosphorylase at 2.3Å resolution. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 3, p 545-552, ago. 2003.

DELATORRE, P.; FADEL, V.; DE AZEVEDO, W. F. JR. Simulação de densidade eletrônica de cristais unidimensionais e bidimensionais. (Simulation of electron density for one dimensional and two dimensional crystals). **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 23, n. 1, p. 63-73, mar. 2001.

DELATORRE, P. et al. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 154, n. 3, p 280–286, abr. 2006

DELATORRE, P. et al. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, v. 7, n. 52, ago. 2007.

DELATORRE, P. et al. Mass spectrometry and X-ray diffraction analysis of two crystal types of *Dioclea virgata* lectin: an antinociceptive protein candidate to structure/function analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 6, p.741-754, jul. 2011.

DELATORRE, P. et al. Crystal structure of *Canavalia maritima* seeds lectin (ConM) co-crystallized with gamma-aminobutyric acid (GABA) and soaked with adenine (**PDB ID 4I30**). 2012

DELATORRE, P. et al. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**, v. 95, n. 9, p. 1697-1703, set. 2013.

DEVARAJAN, P. V. & SONAVANE, G. S. Lectin mediated drug delivery systems, 2003. Disponível em <<http://www.expresspharmapulse.com>>. Acesso em: 18 jan. 2011.

DINH, S. T.; BALDWIN, I. T.; GALIS, I. The herbivore elicitor-regulated1 gene enhances abscisic acid levels and defense against herbivores in *Nicotiana attenuata* plants. **Plant Physiology**, v.162, n. 4, p. 2106-2124, ago. 2013.

DODD, R.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 71R–79R, mai. 2001.

DRENTH, J. **Principles of Proteins X-Ray Crystallography**. New York: Springer-Verlag. USA. 1994.

DRICKAMER, K. Two Distinct Classes of Carbohydrate-recognition Domains in Animal Lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 20, p. 9557-9560, jul. 1988.

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

EDELMAN, G. M. et al. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 9, p. 2580-2584, set. 1972.

- EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. Binding and functional properties of Concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic-acid and other hydrophobic ligands. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 9, p. 3016-3022. mai. 1978.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 462-467, dez. 1997.
- EMSLEY, P. et al. Features and development of coot. **Acta Crystallographica**, D66, p. 486-50, 2010.
- ETZLER, M.E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, p. 209-234, jun. 1985.
- FERNÁNDEZ-ALONSO, J. L. et al. Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 617-633, jun. 2003.
- FIGUEIREDO, J. G. et al. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 5, p. 407-414, nov. 2009.
- FREY, M. et al. An herbivore elicitor activates the gene for indole emission in maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14801-14806, dez. 2000.
- GABIUS, S. et al. Endogenous lectins and neoglycoconjugates: a sweet approach to tumor diagnosis and targeted drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 250-261, 1996.
- GABIUS, H. J. Animal lectins. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, n. 3, p. 543-576, fev. 1997.
- GABIUS, H. J.; GABIUS, S. (editores). **Glycoscience: Status and Perspectives**. Chapman & Hall, Weinheim. 1997.
- GADELHA, C. A. A. et al. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, v. 152, n. 3, p. 185-194, dez. 2005.
- GARCÍA-MUNIZ, N.; MARTÍNEZ-IZQUIERDO, J. A.; PUIGDOMÈNECH, P. Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein from fungal elicitors. **Plant Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 623-632, nov. 1998.
- GARCIA-PINO, A. et al. How a Plant Lectin Recognizes High Mannose Oligosaccharides. **Plant Physiology**, v. 144, n. 4, p. 1733-1741, ago. 2007.

GKUSKER, J. P.; TRUEBLOOD, K. N. **Crystal Structures analysis**, New York: Oxford University Press, 1985.

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

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Review**, v. 20, n. 3, p. 245–277, dez. 2001.

GIRON, D. et al. Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. **Functional Ecology**, v. 27, n. 3, p. 599-609, fev, 2013.

HAMELRYCK, T. et al. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 286, n. 4, p. 1161-77, mar. 1999.

HAMODRAKAS, S. et al. The crystal structure of the complex of concanavalin A with 4'-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranoside. **Journal of Structural Biology**, v. 118, n. 1, p. 23-30, fev. 1997.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4- Å resolution, **Biochemistry**, v. 11, n. 26, p. 4910-4919, dez. 1972.

HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Binding of nonpolar molecules by crystalline Concanavalin A. **Biochemistry**, v. 12, n. 22, p. 4442-4448, out. 1973.

HODGE, S. et al. Aphid-induced accumulation of trehalose in *Arabidopsis thaliana* is systemic and dependent upon aphid density. **Planta**, v. 237, n. 4, p. 1057-1064, abr. 2013.

HUET, M.; CLAVERIE, J. M. Sedimentation studies of the reversible dimer-tetramer transition kinetics of concanavalin A. **Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 236-241, jan. 1978.

IMBERT, A. et al. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and Infection**. v 6, n. 2. p 221-228, fev. 2004

INA, C. et al. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 21-27, out. 2005.

IRAZOQUI, F. J. et al. Fine carbohydrate recognition of *Euphorbia milii* lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 1, p. 14-21, out. 2005

JAIN, A.N. Scoring functions for protein-ligand docking. **Curr. Protein Pep. Sci.**, v. 7, p.

407-420. 2006

JANCARICK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: A screening method for the crystallization of macromolecules. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n. 4, p. 409-411, 1991.

KALTNER, H.; STIERSTORFER, B. Animal lectins as cell adhesion molecules. **Acta Anatomica**, v. 161, n. 1-4, p. 162-179, 1998.

KAVALALI, G. et al. Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, n. 2-3, p. 241-245, fev. 2003.

KESSLER, A.; BALDWIN, I.T. Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, p. 299-328, 2002.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, sep. 2002.

KRAUSPENHAAR, R. et al. Crystallisation under microgravity of mistletoe lectin I from *Viscum album* with adenine monophosphate and the crystal structure at 1.9 Å resolution. **Acta Crystallography Section D**, v. 58, n. 1, p. 1704-1707, out. 2002.

KRENGEL, U., IMBERTY, A. Crystallography and lectin structure database, in: Nilsson, C.L. (Ed.), *Lectins: Analytical Technologies*. **Elsevier**, pp 15-50. 2007

KRISSINEL, E., HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **J. Mol. Biol.** v. 372, p. 774-797. 2007

KRYSTAL, J.H., SANACORA, G., DUMAN, R.S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: The path to ketamine and beyond. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1133-1141, jun. 2013.

KOCOUREK, J.; FREED, D. L. J. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. St. Louis: Sigma Chemical Company, v. 7, 1990.

KOMATH, S. S., KAVITHA, M., SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 4, 973–988. 2006.

KOPEČNÝ, D., KONČITÍKOVÁ, R., POPELKA, H., BRIOZZO, P., VIGOUROUX, A., KOPEČNÁ, M. et al. Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxydase/dehydrogenase active site. **FEBS J.** 283, 361-377. 2015.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature (London)**, 227, 680–685. 1970.

LANNOO, N. & VANDAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front. Plant Sci.** v. 5:397. doi:10.3389/fpls.2014.00397

LASKOWSKI, R.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M.. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 231, n. 4, p. 1049–1067, jun. 1993.

LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 296-306, fev. 2006.

LAURIE, A.T.; JACKSON, R.M. Q-sitefinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 1908-1916, mai 2005.

LEE, R. T.; LEE, Y. C. Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. **Glycoconjugate Journal**. v 17, n. 7, p 543-551, jul. 2000.

LEITE, Y .F. et al. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, n. 1-2, p. 137-145, abr. 2005.

LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 6, p. 402-406. 1996

LIENER, I. E. **Nutritional significance of lectins in the diet.** In: **The lectins, properties, functions, and applications in biology and medicine.** LIENER, I.; SHARON, N & GOLDSTEIN, I. (Eds.). New York: Academic Press, Inc. pp 527-552, 1986.

LIS H.; SHARON N. **Biology of Carboidrates.** New York: Eds., Wiley. pp. 1-85. 1984

LIS H.; SHARON N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LIS H.; SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Review**, v.98, n. 2, p. 637-674, abr. 1998.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1383, n.1, p 9-36, mar. 1998.

LORIS, R Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**,.v. 1572, n. 2-3, p. 198-208, set. 2002.

MA, W. et al.. Ca^{2+} , cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. **Proccedings of the National. Academy of Sciences of the United States os America**, v. 106, n. 49, p. 20995-21000. 2009.

- MALECKI, P. H. et al. Binding of the plant hormone kinetin in the active site of Mistletoe lectin I from *Viscum album*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 2, p. 334-338, fev. 2012.
- MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K. B. Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? **The Plant Cell**, v. 25, n. 4, p. 1489-1505, mai. 2013.
- MANN, K. et al. The amino-acid sequence of the glucose/ mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin related domains. **European Journal of Biochemistry**, v. 218, n. 16, p. 4414-4422, ago. 2001.
- MARTIN, S.F., CLEMENTS, J.H. Correlating structure and energetics in protein-ligand interactions: paradigms and paradoxes. **Annu. Rev. Biochem.** v. 82, p. 267-293. 2013
- McREE, D. E. XtalView/ Xfit - A versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. **Journal of Structural Biology**, v. 125, n.2-3, p. 156-165, abr. 1999.
- MEYER, A. et al. Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, n. 11, p. 1590-1595, nov. 2008.
- MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Engineering**, v. 14, n. 10, p. 735-745, out. 2001.
- MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30393-30401, dez. 1994.
- MOBLEY, D.L., DILL, K.A. Binding of small-molecule ligands to proteins: "what you see" is not always "what you get". **Structure**. v.17, p. 489-498. 2009
- MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113-120, mar. 1984.
- MOREIRA, R. A. et al. Lectins and the chemotaxonomy of the sub-tribe Diocleinae (Leguminosae – Phaseolae). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 7, n. 1, p. 7-14, jun. 1995.
- MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violácea* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 1, p. 23-29. 1996.
- MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, n. 5, p. 783-787, mai. 1977.

- MOREIRA, R. A. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183-1188, abr. 1998.
- MOURA, R. M. et al. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, v. 145, n. 4, p. 517-523, ago. 2006.
- MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6605-6611, set. 2002.
- NEILSON, E. H. et al. Plant chemical defense: at what cost? **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 250-258, mai. 2013.
- NEUMANN, D. et al. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 437-457, mar. 2004.
- NÓBREGA, R. B. et al. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 900-906, mar. 2012.
- NOWELL, P. Phytohemagglutinin: a initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, p. 462-446, mai.1960.
- OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda*. **Revista Brasileira de Botânica**, v.14, n. 1, p. 61-66. 1991.
- OTTENSOOSER, F. et al. Lectins detecting group C streptococci. **Infection and Immunity**, v. 9, n. 5, p 971-973, mai. 1974.
- PETROFF, O. A. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist**.v. 8, n. 6, p. 562-573, dez. 2002.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, n. 2, p. 347-352, out. 1995.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 1, p. 199-228, 1998.
- PEUMANS, W. J.; ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. M. The tomato lectin consists of two homologous chitin-binding modules separated by an extensin-like linker. **The Biochemical Journal**. v 376, n. 3, p. 717-724, dez. 2003.
- PLÁ, A. et al. Isolation of a lectin from *Cayaponia martiana* (Cucurbitaceae) fruits extract. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**. v. 16, mai. 2004

- PORRAS, F. et al. Isolation of the receptor for the *Amaranthus leucocarpus* lectin from human T lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, n.1-2, p. 155-162, abr. 2005.
- PRABU, M. M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins. **Proteins**, v. 35, n. 1, p. 58-69, abr. 1999.
- RAMOS, M.V et al. The carbohydrate-binding specificity and molecular modeling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 761-766, nov./dez. 1996.
- RIEGER, D. K. et al. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v. 122, p. 53-60, jul. 2014.
- ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 19, p. 11274-11277, out. 1982.
- ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13820-13824, nov. 1983.
- ROBERTS, D. D. et al. Specificity of Adenine Binding to lima bean lectin. **Phytochemistry**, v. 25, n. 3, p. 589-593. 1986
- ROCHA, B. A. M. et al. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 806-816, mai. 2011.
- RÜDIGER, H., Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica (Basel)**, v. 161, n. 1-4, p. 130-152, 1998.
- RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, n. 8, p. 589-613, ago. 2001.
- RUTENBER, E. et al. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. **Proteins**, v. 10, n. 3, p. 240-250, mar. 1991.
- SANZ-APARÍCIO, J. et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118, mar. 1997.
- ŠAŠEK, V. et al. β -aminobutyric acid protects *Brassica napus* plants from infection by *Leptosphaeria maculans*. Resistance induction or a direct antifungal effect? **European Journal of Plant Pathology**, v. 133, n. 1, p. 279-289, mai. 2012.

SCHÜTTELKOPF A.W.; VAN AALTEN D.M.F. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallography Section D**, v. 60, p. 1355-1363, 2004.

SCHUTTER, K. DE, VAN DAMME, E.J.M. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. **Molecules**. v.20, p. 9029-9053. 2015.

SCHMÜLLING, T. Cytokinin. In Encyclopedia of Biological Chemistry (Eds. Lennarz, W., Lane, M. D.) **Academica Press/ Elsevier Science**. 2004

SCHWARZENBACHER, R. et al.. The importance of alignment accuracy for molecular replacement. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, p. 1229-1236, jul. 2004.

SHARMA V.; SUROLIA A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, v 267, n. 2, p. 433-445, mar. 1997.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science** (New York, N.Y.), v. 246, n. 4927, p. 227–34, 13 out. 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legumes lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, n. 14, p. 3198-3208, nov. 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, v. 268, p. 82-88, jan. 1993.

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

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 1-16, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p 53R-62R, jun. 2004.

SIEGRIST, J.; OROBER, M.; BUCHENAUER, H. β -aminobutyric acid-mediated enhancement of resistance in tobacco to tobacco virus depends on the accumulation of salicylic acid. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, n. 3, p. 95-106. 2000.

SHETTY, K.N., et al. Affinity of a galactose-specific legume lectin from Dolichos lablab to adenine revealed by X-ray crystallography. **IUMBB Life**, v. 65, n. 7, p. 633-644, jul. 2013.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Sources, Activities and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p 145-178. 1999.

SINHA, S. et al. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, .n. 5, p. 498–505, out. 2007.

SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1527, n. 3, p. 102-111, ago. 2001.

SOL, F. G. et al. Lectinas. **Investigación y Ciencia**, v. 361, p. 58-67, out. 2006.

STILLMARK, H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. **Inaugural Dissertation Dorpat**, Tartu, 1888.

STONE, J. M. et al. Ketamine effects on brain GABA and glutamate levels with ¹H-MRS: relationship to ketamine-induced psychopathology. **Molecular Psychiatry**, v. 17, p. 664-665, jul 2012.

SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p 227–237, ago. 1936.

SUSEELAN, K. N. et al. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 407, n. 2, p. 241-247, nov. 2002.

TEIXEIRA, C. S. et al. Crystal structure of the lectin of *Camptosema pedicellatum*: implications of a conservative substitution at the hydrophobic subsite. **Journal of Biochemistry**, v.152, n. 1, p. 87-98, jul. 2012.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3315-3321, jun. 2006.

TON, J.; et al. Dissecting the β -aminobutyric acid-induced priming phenomenon in Arabidopsis. **The Plant Cell**, 17: 987-999, mar. 2005.

TROTT, O., OLSON, A.J. Software new and update autodock vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J. Comp. Chem.** v. 31, p. 455-461. 2009

TSCHAMPEL, S. M., WOODS, R. J. Quantifying the role of water in protein-carbohydrate interactions. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.107, n. 43, p. 9175-9181, out. 2003.

USHA, R. et al. Macromolecular crystallography with synchrotron radiation: collection and processing data from crystals with a very large unit cell. **Journal of Applied Crystallography**, v. 17, p. 147-153, 1984.

VARGIN, A.; TEPLYAKOV, A. *MOLREP*: an automated program for molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 1022-1025, 1997.

VAN DAMME, E. J. et al. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *European Journal of Biochemistry*, v. 236, n. 2, p. 419-427, mar. 1996.

VAN DAMME, E. J. M.; et al. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p 575-592. 1998

VAN DAMME, E. J.; et al. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 20, n. 7-8, p. 449-460, 2004a.

VAN DAMME, E. J.; et al. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 484-489, out. 2004b.

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Spress. p. 653, 1999.

VASCONCELOS, I. M.; et al. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**. v 15, n. 2, p. 137-154, jun. 1991.

VRANOVA, V. et al. Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. **Plant and Soil**, v. 342, n. 1, p. 31-48, mai, 2011.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

VON HIPPEL, P.; SCHLEICH, T. **The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution**. In *Structure of biological macromolecules* (Timasheff, S. N.; Fasman, G. D., eds), New York : Marcel Dekker Inc, p .417-575, 1969.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, n. 1, p. 349-353, jan. 2006.

WATKINS, W.; MORGAN, W. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, p. 825–826, mai. 1952.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate Recognition. **Annual Review of Biochemistry**. v. 65, p. 441-473, 1996.

WINK, M. Plant breeding: importance on plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 75, n. 2, p. 225-233, jan. 1988.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A Lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, n. 2, p. 183-187, jan. 1998.

WRÓBLEWSKA, K. The Influence Of Adenine And Benzyladenine On Rooting And Development Of *Fuchsia Hybrida* Cuttings. **Acta Agrobotanica**, v. 65, n. 4, 2012: p. 101–108.

YANG, D. C. H.; GALL, W. E.; EDELMAN, G. M. Rotational correlation time of Concanavalin A after interaction with a fluorescent probe. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7018-7023, nov. 1974.

YOUNG, N. M.; OOMEN, R. P. Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of carbohydrate-binding sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 228, n. 3, p. 924-934, dez. 1992.

ZENTENO, E. et al. Specificity of the isolectins from the plant cactus *Machaerocereus eruca* for oligosaccharides from porcine stomach mucin. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, n. 5, p. 699-706, out. 1995.

ZHUANG, X., et al. Biosynthesis and emission of insect herbivory-induced volatile indole in rice. **Phytochemistry**, v. 73, n. 1, p. 15-22, jan. 2012.