



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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DA
CADEIA ALFA DA LECTINA RECOMBINANTE DE *Canavalia brasiliensis*

ANTÔNIA SIMONI DE OLIVEIRA

FORTALEZA

2017

ANTÔNIA SIMONI DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DA CADEIA
ALFA DA LECTINA RECOMBINANTE DE *Canavalia brasiliensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador (a): Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Co-orientador: Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2017

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)

- O45p Oliveira, Antônia Simoni de.
Produção e caracterização físico-química e biológica da cadeia alfa da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* / Antônia Simoni de Oliveira. – 2017.
73 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. lectinas. 2. recombinante. 3. Diocleinae. 4. *Canavalia brasiliensis*. I. Título.

CDD 660.6

ANTÔNIA SIMONI DE OLIVEIRA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DA CADEIA
ALFA DA LECTINA RECOMBINANTE DE *Canavalia brasiliensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Jorge Luis Almeida Correia (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras (Examinador)
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha (Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Cleane Gomes Moreira (Examinadora)

*Dedico à toda minha família, especialmente à
minha mãe Maria Delma do Nascimento e ao
meu noivo Adson Tavares por todo incentivo
e amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por sua bondade, por todas as graças alcançadas. Com fé no SENHOR consegui vencer todos os obstáculos.

A minha orientadora, Profa. Kyria Santiago do Nascimento, um verdadeiro anjo na minha vida. Sou imensamente grata pela oportunidade e confiança depositada em mim, por todos os ensinamentos, por toda fé, paciência e disposição na orientação dos experimentos, qualidades fundamentais para realização deste trabalho e por sempre me tranquilizar nos momentos de dificuldades.

Ao meu Co-Orientador, Prof. Benildo Sousa Cavada por sempre compartilhar conosco suas experiências de vida, que nos encoraja a buscar ser melhor a cada dia, não só como profissional, mas como pessoa.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Cintia Renata Costa Rocha, Prof. Dr. João Batista Cajazeiras, Profa. Cleane Gomes Moreira e Prof. Jorge Luis Almeida Correia que gentilmente se dispuseram a contribuir para conclusão deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Hadson, William, David, Lucas, Vinícius, Vanir, Mayara Queiroz, Messias, André, que sempre estiveram dispostos a ajudar. Além de uma equipe, somos uma família.

As minhas amigas, Ivanice, Gleiciane, Cleane, Clareane, Mayara e Cláudia, presentes que ganhei do BioMol. Este trabalho tem um pouco de todas. Muito obrigada pelo carinho e ajuda de todas.

A minha mãe Maria Delma, pelo exemplo de vida, educação doada com tanto amor, por todo sacrifício feito por nós e pelo incentivo durante toda essa trajetória. Aos meus irmãos Lucas, Maria, Derival, Deveraldo que sempre me apoiaram e pelos sobrinhos lindos que vocês me deram que enchem a nossa família de alegria. A toda minha família, vó, tios e primos que sempre torceram por mim e me deram força para continuar. Amo todos vocês!

Ao meu noivo Adson Tavares, por me dar forças nos momentos de dificuldades, pela paciência, por sempre me incentivar, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela cumplicidade e companheirismo, por todo amor e paz que me transmite.

A todos os meus amigos, Arethusa Vitorino, Anaglê Figueiredo, Allan Gualter, Rosineide Ferreira, Gabriel Brito, Karla Janaísa, Soraya Macedo, os quais eu não poderia deixar de lembrar, pois, estiveram ao meu lado durante essa etapa, me apoiando nos momentos de angústia, e desfrutando comigo de cada vitória alcançada. Vocês são muito importantes na minha vida.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo".

(Albert Einstein)

RESUMO

A capacidade de expressar e purificar a proteína recombinante desejada em grande quantidade permite a sua caracterização bioquímica e o uso em processos industriais. Numerosas lectinas vegetais têm sido produzidas em sistemas heterólogos, especialmente em *Escherichia coli*. Por reconhecer e se ligar especificamente a carboidratos, essas moléculas podem desempenhar diversas funções biológicas, como o reconhecimento célula-célula, adesão celular, fertilização e mecanismos de defesa. Dentre as lectinas vegetais, lectinas de leguminosas têm sido extensivamente investigadas. A lectina de *Canavalia brasiliensis*, isolada pela primeira em 1984 por Moreira e Cavada, é uma proteína amplamente estudada e mostrou efeito imunestimulatório, antidepressivo, antinociceptivo, antiproliferativo em linhagens celulares de leucemia humana e efeito neuroprotetor, dentre outras atividades biológicas testadas. Entretanto, as propriedades biológicas de muitas lectinas têm sido atribuídas a misturas de isolectinas, uma vez que é difícil separar isoformas utilizando técnicas convencionais. Neste estudo foi produzida a lectina recombinante (cadeia α) de *Canavalia brasiliensis* a partir do gene sintético inserido no vetor pET28a. As cepas DH5 α e BL21 (DE3) foram utilizadas para clonagem e expressão, respectivamente. A rConBr foi expressa em todas as condições testadas e foi escolhida a condição de 16°C, 16 horas e 1,0 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) para produção da proteína. A proteína foi purificada, sendo obtida na sua forma ativa. A lectina mostrou-se ativa quando testada contra eritrócitos de coelho e foi inibida por manose e α -metil-manopiranosídeo. A atividade da rConBr é ótima em pH 4,0 a 7,0, mantém-se estável até 60°C e não é dependente de cátion divalentes. Além disso, a rConBr não foi tóxica contra náuplios de *Artemia* sp. e não mostrou efeito citotóxicos em células de glioma linhagem C6.

Palavras-chave: Lectinas. Recombinante. Diocleinae. *Canavalia brasiliensis*.

ABSTRACT

The ability to express and purify desired recombinant proteins in large quantities allows its biochemical characterization and use in industrial processes. Numerous plant lectins have been produced in heterologous systems, especially in *Escherichia coli*. By recognizing and specifically binding to carbohydrates, these molecules can perform various biological functions, such as cell-cell recognition, cell adhesion, fertilization, and defense mechanisms. Among plant lectins, leguminous lectins have been extensively investigated. The lectin of *Canavalia brasiliensis*, isolated by the first time in 1984 by Moreira and Cavada is a widely studied protein and has shown an immunostimulatory, antidepressive, antinociceptive, neuroprotective, and antiproliferative effect in human leukemia cells, among other biological activities tested. The biological properties, however, of many lectins have been attributed to isolectin blends, since it is difficult to separate isoforms using standard techniques. In this study the recombinant lectin (α chain) of *Canavalia brasiliensis* was produced from the synthetic gene inserted in the vector pET28a e. The strains DH5 α and BL21 (DE3) were used for cloning and expression, respectively. The rConBr was expressed under all conditions tested and the condition of 16°C, 16 hours and 1,0 mM IPTG (isopropil- β -D-galatosídeo) was chosen for protein production. The protein was purified, being obtained in its active form. Lectin was active when tested against rabbit erythrocytes and was inhibited by mannose and α -methyl-mannopyranoside. The activity of rConBr is optimum at pH 4.0 to 7.0, remains stable up to 60 ° C and is not dependent on divalent cations. In addition, rConBr was not toxic against *Artemia* sp. and showed no cytotoxic effect on glioma cells C6 lineage.

Keywords: Lectins. Recombinant. Diocleinae. *Canavalia brasiliensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Classificação estrutural das lectinas vegetais.....	19
Figura 2-	Estrutura global de lectinas de leguminosas.....	22
Figura 3-	Modificações pós-traducionais durante a biossíntese da Concanavalina A (ConA)	23
Figura 4-	Oligomerização dependente de pH da lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>	24
Figura 5-	Estrutura geral do tetrâmero da ConBr gerada pelo programa MOLSCRIPT.....	26
Figura 6-	Sequência de aminoácidos da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> obtida no UniProt.....	38
Figura 7-	Mapa do vetor pET28a.....	38
Figura 8-	Perfil de expressão da rConBr em <i>E. coli</i> BL21 a 16 °C, 16 horas após indução com IPTG.....	48
Figura 9-	Purificação da rConBr.....	50
Figura 10-	Cromatografia de exclusão Molecular referente à purificação da rConBr (A) e da ConBr (B).....	51
Figura 11-	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da rConBr.....	53
Figura 12-	Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da ConBr.....	54
Figura 13-	Efeito do pH na atividade hemaglutinante da rConBr.....	55
Figura 14-	Efeito do pH na atividade hemaglutinante da ConBr.....	55
Figura 15-	Efeito das lectinas ConBr e rConBr na viabilidade de células de glioma C6.....	57
Figura 16-	Análise morfológica da linhagem C6 tratada com as lectinas ConBr e rConBr.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Lectinas de plantas produzidas em <i>E. coli</i>	30
Tabela 2-	Estratégias para superar problemas comuns encontrados durante o processo de produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	32
Tabela 3-	Atividade hemaglutinante da rConBr contra eritrócitos de coelho.....	50
Tabela 4-	Inibição da atividade hemaglutinante da rConBr e ConBr.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASAL	Lectina de <i>Allium sativum</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCA	Aglutinina de <i>Castanea crenata</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasisliensis</i>
ConM	Lectina de <i>Canavalia maritima</i>
CRLI	Lectina de <i>Cycas revoluta</i>
CRAMOL	Lectina de <i>Cratylia mollis</i>
Cvill	Lectin de <i>Canavalia villosa</i>
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
DBL	Lectina de <i>Dolichus biflorus</i>
DGL	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>
Dgui	Lectina de <i>Dioclea guianensis</i>
DLasiL	Lectina de <i>Diocela lasiocarpa</i>
DO	Densidade ótica
DRC	Domínio de reconhecimento de carboidratos
DSL	Lectina de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GNA	Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>
HPLC	High performance liquid chromatography
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilodáton

LB	Luria-Bertani
LMW	Low molecular weight
mA	Miliampere
mgP	miligrama de proteína
MTT	Sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
nm:	Nanômetros
NO	Óxido nítrico
PCL	Lectina de <i>Plygonatum cyrtonema</i>
PDB	Protein Data Bank
pH	Logarítmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Aglutinina de amendoim
PSL	Lectina de <i>Polyporus squamosus</i>
PVC	Policloreto de vinila
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
SALT	Lectina de <i>Oryza sativa</i>
SBA	Aglutinina da soja
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil sulfato de sódio
TEMED	N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
TxLC-I	Lectina do bulbo da tulipa
UH	Unidade de hemaglutinação
V e Vh	Volts e Volt hora
W	Whatts
WGA	Lectina do gérmen de trigo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	Histórico do estudo das lectinas	17
2.2	Lectinas vegetais	18
2.3	Lectinas de leguminosas	21
2.4	Lectinas da subtribo Diocleinae	22
2.5	A lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	25
2.6	Expressão da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> em sistemas heterólogos	28
2.7	Produção de lectinas recombinantes	28
2.7.1	<i>Escherichia coli</i> como sistema de expressão	30
2.7.2	<i>Expressão de proteínas recombinantes em corpos de inclusão</i>	33
2.8	Lectinas como agentes antitumorais	35
2.8.1	<i>Glioma</i>	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivos geral	37
3.1	Objetivos específicos	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Obtenção dos gene sintético da ConBr	38
4.1.1	<i>Preparo de células competentes</i>	39
4.1.2	<i>Transformação bacteriana e clonagem gênica</i>	39
4.1.3	<i>Confirmação das células transformadas</i>	40
4.1.4	<i>Expressão da proteína recombinante (rConBr)</i>	40
4.1.4.1	<i>Testes de expressão</i>	40
4.1.4.2	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio</i>	41
4.2	Produção da lectina rConBr	41
4.2.1	<i>Purificação da lectina rConBr</i>	42
4.2.1.1	<i>Preparo do extrato proteico</i>	42
4.2.1.2	<i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	42
4.3	Caracterização físico-química da lectina recombinante de	

	Canavalia brasiliensis	42
4.3.1	<i>Ensaio de atividade hemaglutinante</i>	42
4.3.2	<i>Especificidade por carboidratos</i>	43
4.3.3	<i>Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante</i>	43
4.3.4	<i>Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante</i>	43
4.3.5	<i>Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante</i>	44
4.4	Ensaio de toxicidade contra náuplios de Artemia sp.	44
4.5	Viabilidade celular da linhagem C6 expostas a ConBr e a rConBr	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Clonagem e expressão em <i>Escherichia coli</i>	46
5.2	Purificação da rConBr	49
5.2.1	<i>Obtenção de fração solúvel ativa</i>	49
5.3	Caracterização da rConBr	51
5.3.1	<i>Inibição da atividade hemaglutinante</i>	52
5.3.2	<i>Termoestabilidade da rConBr</i>	53
5.3.4	<i>Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da rConBr</i>	54
5.3.5	<i>Dependência de cátions divalentes</i>	55
5.4	Toxicidade contra náuplios de Artemia sp.	56
5.5	Efeito da rConBr na morfologia e viabilidade celular em células de glioma da linhagem C6	56
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Considerando as diversas doenças e agentes infecciosos que afetam a espécie humana e suas consequências, o campo da biotecnologia pesquisa por moléculas de bioreconhecimento de fontes naturais ou recombinantes com potencial para diagnóstico e terapêutico. A chave para a detecção, tratamento, e a cura das condições patológicas é o evento do bioreconhecimento. A identificação de porções de carboidratos na superfície da célula e de glicoconjugados podem ser realizados com o uso de lectinas (COELHO *et al.*, 2017). A clonagem e a expressão de lectinas de plantas servem para os seguintes propósitos: estabelecer suas estruturas primárias, estudar sua genética, evolução e biossíntese, examinar o papel de diferentes resíduos de aminoácidos nas lectinas no sítio de reconhecimento de carboidratos e na montagem da subunidade, produzir lectinas com novas especificidades e estudar a função das lectinas na planta (STREICHER e SHARON, 2003).

As lectinas são uma classe diversificada de proteínas distribuídas extensivamente na natureza. São proteínas que contêm pelo menos um domínio não catalítico que lhes permite reconhecer e se ligar seletivamente a glicanos específicos que estão presentes na forma livre ou fazem parte de glicoproteínas ou glicolipídeos (VAN DAMME *et al.*, 2008; 2011). Devido sua capacidade de reconhecer e se ligar a carboidratos, essas proteínas medeiam muitos eventos biológicos importantes como reconhecimento célula-célula, metástases tumorais, defesa do hospedeiro e inflamação (SHARON e LIS, 2007).

Como essas proteínas reconhecem e se ligam aos glicoconjugados específicos presentes na superfície das células e estruturas intracelulares elas podem servir como moléculas alvo potenciais para desenvolvimento de aplicações práticas nos campos da alimentação, agricultura, pesquisas na área de saúde e farmacêutica. Entre estas proteínas, lectinas de leguminosas apresentam uma variedade de características interessantes, incluindo atividade antimicrobiana, inseticida e antitumorais (LAGARDA-DIAZ *et al.*, 2017). Lectinas vegetais são facilmente purificadas e podem ser obtidas em grandes quantidades de suas fontes naturais. Entretanto um grande desafio enfrentado é a presença de isoformas ou isolectinas. O termo isolectinas pode ser aplicado para lectinas que são codificadas pelo mesmo gene, mas diferem por causa de variações nas modificações pós-traducionais. De acordo com Andrade (2015), essas isoformas podem ser consideradas coprodutos indesejáveis pois apresentam diferentes afinidades ou especificidade, o que pode resultar em uma

incoerência em suas atividades biológicas, inutilizando essas proteínas como ferramentas biomédicas e farmacológicas.

Numerosas lectinas vegetais têm sido produzidas em sistemas heterólogos, especialmente em *Escherichia coli*. Lectinas isoladas de plantas pertencentes a subtribo Diocleinae demonstraram importantes atividades biológicas como atividade pró-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e antitumoral e por isso tem recebido especial interesse para produção dessas proteínas em sistemas heterólogos. As lectinas de *Dioclea guinanensis*, *Dioclea grandiflora* (NAGANO *et al.*, 2008), *Cratylia mollis* (VAREJÃO *et al.*, 2010), *Canavalia brasiliensis* (precursor da proteína) (NOGUEIRA *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2008), *Canavalia ensiformis* (MIN *et al.*, 1992) e *Dioclea sclerocarpa* (ANDRADE, 2015; dados não publicados) já foram produzidas na forma recombinante.

A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi isolada pela primeira em 1984 por Moreira e Cavada e desde então tem sido amplamente investigada. É uma lectina da subtribo Diocleinae específica a manose/glicose que difere apenas em três resíduos de aminoácidos com relação a lectina de *Canavalia ensiformis* e por isso apresenta diferentes propriedades biológicas. Ao longo dos vários anos de pesquisa, inúmeras atividades biológicas já foram registradas para a ConBr. Dentre estas destacam-se, atividade antitumoral, atividade antidepressiva, atividade neuroprotetora e atividade antiparasitária. Todos esses efeitos biológicos demonstrados pela ConBr evidenciam a importância de continuar estudando o potencial dessa lectina e justifica a produção da mesma na forma recombinante, pois a atividade atribuída a essa proteína, na verdade pode ser elucidada por uma mistura de isoformas que podem variar de um lote a outro durante o isolamento e resultar em atividades biológicas variantes.

A produção de lectinas em sistemas heterólogos é uma alternativa para contornar o problema da presença de isoformas. Utilizando ferramentas de biologia molecular e engenharia genética a proteína de interesse pode ser produzida com alto grau de pureza e sequência de aminoácidos bem definida. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi produzir a cadeia α da lectina isolada de sementes de *Canavalia brasiliensis*, na forma recombinante utilizando *Escherichia coli* como sistema de expressão.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Histórico do estudo das lectinas

A presença de proteínas que possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos foi evidenciada pela primeira vez no final do século XIX. Tais proteínas foram referidas como hemaglutininas ou fitohemaglutininas já que foram originalmente encontradas em extratos de plantas (SHARON; LIS, 2004).

O primeiro estudo com hemaglutinina vegetal foi realizado com sementes de *Ricinus communis* (mamona) por Hermann Stillmark em 1888. Ao estudar a toxicidade do extrato proteico da mamona, Stillmark observou que um determinante proteico presente no extrato era responsável pela aglutinação dos eritrócitos, sendo este material inodoro e de cor branca denominada ricina. Posteriormente, ele percebeu que a fração proteica tóxica e hemaglutinante era na verdade formada por duas proteínas, uma denominada ricina (responsável pela atividade tóxica) e a outra denominada hemaglutinina (RCA - *Ricinus communis agglutinin*). Logo em seguida, H. Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica em extrato proteico de *Abrus precatorius* (feijão jequiriti) que foi chamada de abrina. Ricina e abrina logo se tornaram comercialmente disponível pela Merck (Alemanha) (SHARON; LIS, 2003).

Na década de 1890, Paul Ehrlich foi capaz de estabelecer vários princípios fundamentais da imunologia usando as hemaglutininas ricina e abrina. Ao realizar testes com injeções subcutâneas em ratos, Ehrlich observou que os animais se tornaram imunes a uma dose letal de ricina ou abrina. Além disso, ele observou que o soro anti-ricina não protegeu os animais contra os efeitos tóxicos de abrina, e que o soro anti-abrina também não protegeu os ratos contra a ação de ricina. Esta foi uma evidência clara para a especificidade da resposta imune. A toxicidade se tornou uma característica das hemaglutininas (SHARON; LIS, 2003).

No entanto, a ideia de toxicidade foi abandonada em 1907 quando Landsteiner e Raubitschek encontraram hemaglutininas inofensivas em sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão-comum), *Pisum sativum* (ervilha) e *Lens culinaris* (lentilha). Em 1919, Summer isolou uma hemaglutinina presente em sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão de porco) denominando-a Concanavalina A (Con A) e obteve uma hemaglutinina pura pela primeira vez. Anos mais tarde, em 1936, ele demonstrou que a atividade hemaglutinante da ConA era inibida por sacarose de cana de açúcar, relatando pela primeira vez a especificidade de hemaglutininas por açúcares.

O estudo das hemaglutininas se firmou apenas no final de 1940, quando William C. Boyd juntamente com R. M. Reguera e, independentemente, Karl O. Renkonen relataram que certas sementes continham aglutininas específicas para os antígenos dos grupos sanguíneos humanos.

Na década de 1960, Nowell observou que a hemaglutinina isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris* (feijão), conhecida como fitohemaglutinina (PHA), era mitogênica, ou seja, induzia a mitose de linfócitos humanos, até então tidas como células que não se dividiam. Esta descoberta teve um impacto revolucionário na imunologia (SHARON; LIS, 2004).

Devido à capacidade de hemaglutininas de plantas distinguirem entre eritrócitos de diferentes tipos de sangue, Boyd e Shapleigh propuseram em 1954, o nome lectinas para essa classe de proteínas aglutinantes. O termo lectinas vem do latim “*legere*” que significa selecionar ou escolher. Este termo foi generalizado para todas as aglutininas, independentemente da origem e da especificidade ao tipo sanguíneo (SHARON; LIS, 1972).

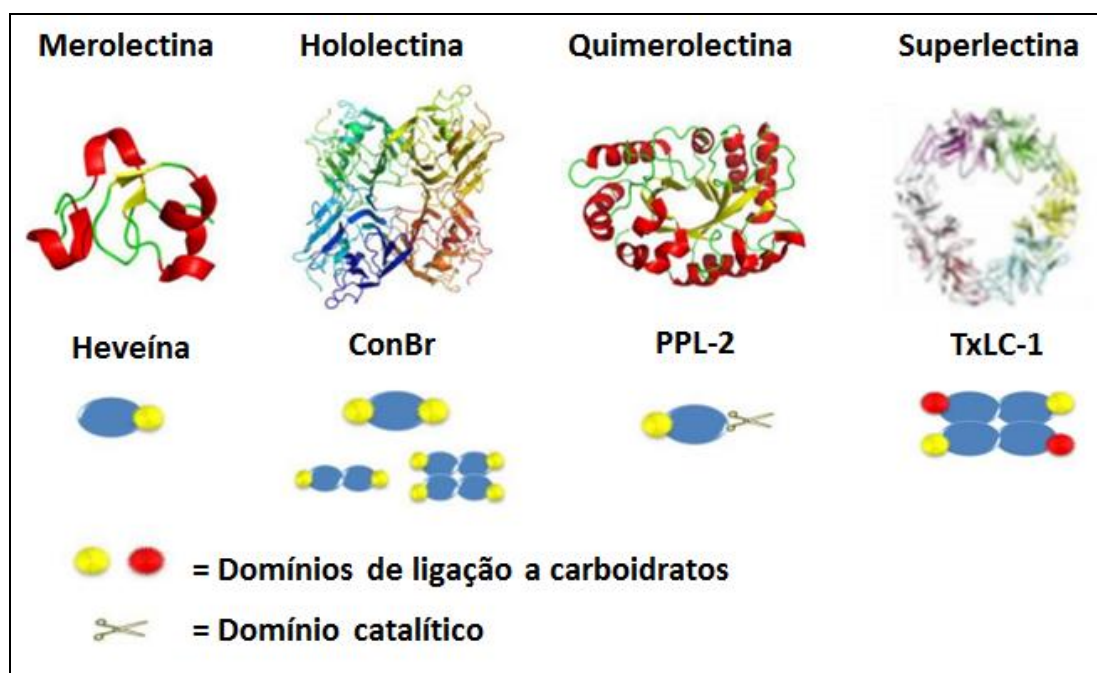
Posteriormente, várias definições foram propostas para lectinas. Van Damme et al. (1995) define lectinas como proteínas que contém pelo menos um domínio não catalítico que pode reconhecer seletivamente e se ligar de maneira específica e reversível a glicanos que estão presentes na forma livre ou são parte de glicoproteínas ou glicolipídios. Essas proteínas são distribuídas amplamente na natureza, sendo encontradas em animais, plantas, microrganismos (CALVETE *et al.*, 2000) e algas (BOYD, 1966). Plantas expressam um largo número de lectinas altamente diversas exibindo diferença na sua estrutura molecular e especificidade de ligação a glicanos endógenos, bem como, a glicanos de origem não-endógena (VAN DAMME *et al.*, 2011).

2.2 Lectinas vegetais

As lectinas vegetais são um grupo heterogêneo de proteínas. Estudos bioquímicos comparativos indicam que essas proteínas diferem com relação aos seus efeitos bioquímicos/físico-químicos e atividades biológicas. Entre as plantas, as lectinas tem sido purificadas de folhas, frutos, raízes, tubérculos, rizomas, bulbos, cascas, caules e predominantemente de sementes, onde constituem 10% do conteúdo total de proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1998). A maioria das lectinas de sementes maduras de leguminosas está localizada nos cotilédones, os quais funcionam como reserva de nutrientes, usados durante sua germinação (POVINELI *et al.*, 2002).

Com base na sua estrutura global, as lectinas vegetais foram inicialmente classificadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1) (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; 1998). **Merolectinas** consiste de lectinas que possuem um único domínio de ligação a carboidratos, por definição são monovalentes e monoméricas, conseqüentemente não apresentam atividade hemaglutinante ou capacidade de precipitar glicoconjugados. Um exemplo de lectina desse grupo é a heveína (VAN PARIJS *et al.*, 1991). **Hololectinas** são lectinas que apresentam dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, idênticos ou homólogos. São por definição divalentes ou polivalentes (oligoméricas) e, conseqüentemente, aglutina células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas conhecidas são hololectinas pois se comportam como hemaglutininas. **Quimerolectinas** são lectinas que apresentam pelo menos um sítio de ligação a carboidratos e um outro sítio não relacionado, que pode ser, por exemplo, um sítio catalítico. A atividade catalítica é bem definida e é independente do domínio de reconhecimento a carboidrato. Dependendo do número de sítios de ligação a açúcar, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). **Superlectinas**, apresentam dois domínios de ligação a carboidratos que são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados. Um exemplo de superlectina, é a lectina do bulbo da tulipa, que reconhece os açúcares manose e GalNac (PEUMANS e VAN DAMME, 1998).

Figura 1 –Classificação estrutural das lectinas vegetais.



Fonte: Elaborado pelo autor. Adaptado de Peumans e Van Damme, 1998.

Posteriormente, estudos estruturais e a clonagem de genes de lectinas forneceram informações sobre sequências de lectinas de plantas. A partir da análise dessas sequências e suas semelhanças estruturais essas proteínas foram distribuídas em sete famílias. Quatro dessas famílias foram classificadas como lectinas de leguminosas, lectinas de monocodiledôneas ligantes de manose, lectinas ligantes de quitina compostas por domínios heveínicos e RIPs tipo 2. As lectinas relacionadas a jacalina, a família de lectinas de amarantina e as da família Curcubitacea foram relatadas como pequenas famílias de proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Em 2008, Van Damme e colaboradores atualizaram seu esquema de classificação de lectinas de 7 a 12 famílias. Essa nova classificação abrange quase todas as lectinas conhecidas e certamente todas as lectinas de plantas bem caracterizadas. Este novo sistema incorpora homologia de seqüências e estruturais, bem como relacionamentos evolutivos para classificar as lectinas da planta. As famílias foram classificadas da seguinte forma: aglutininas homólogas de *Agaricus bisporus*, amarantinas, homólogas de quitinase classe V, família cianovirina, família *Euonymus eurapaeus*, família GNA (*Galanthus nivalis* aglutinina), proteínas com domínios de heveína, jacalinas, proteínas com domínios de lectinas de leguminosas, domínios de lisina, família *Nicotiana tabacum* e família ricina-B.

Com relação ao papel fisiológico, uma das teorias mais acreditadas sobre as lectinas de leguminosas, que se estende a todas as lectinas vegetais, considera essas proteínas como agentes de defesa contra predadores e patógenos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Uma característica essencial de um agente de defesa ativo é a capacidade de reconhecer especificamente o patógeno. Além disso, essas lectinas estão envolvidas em interações simbióticas entre plantas hospedeiras e micróbios, incluindo fungos micorrízicos e fixação de nitrogênio por rizóbios (HOLF *et al.*, 2009).

Lectinas de plantas têm demonstrado proteção contra insetos e essa atividade tem recebido atenção especial. A ingestão de lectinas em dietas artificiais ou sua expressão em plantas transgênicas reduziram o desempenho de insetos pertencentes a diferentes ordens, incluindo Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (VANDENBORRE *et al.*, 2011).

A maioria das lectinas de plantas expressas constitutivamente são sintetizadas como um peptídeo sinal e são sequestradas para o vacúolo ou secretadas para o espaço extracelular. De acordo com Lanno e Van Damme (2014), novos tipos de lectinas de plantas nucleocitoplasmáticas têm sido identificadas e caracterizadas. Essas lectinas são parte de uma resposta específica da planta a exposição a diferentes fatores de estresse, como mudança das condições ambientais e ataques de patógenos. Essas proteínas são conhecidas como lectinas

induzíveis e na ausência de estresse ambiental para a planta, estas proteínas não são expressas a níveis detectáveis.

A diferença na especificidade a carboidratos das lectinas vegetais permite que estas estejam envolvidas em diferentes atividades biológicas, como atividades antivirais, inseticida, anti-tumoral e anti-microbiana, levando a uma possível aplicação destas proteínas em áreas como a bioquímica, biologia celular e biomedicina (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2.3 Lectinas de leguminosas

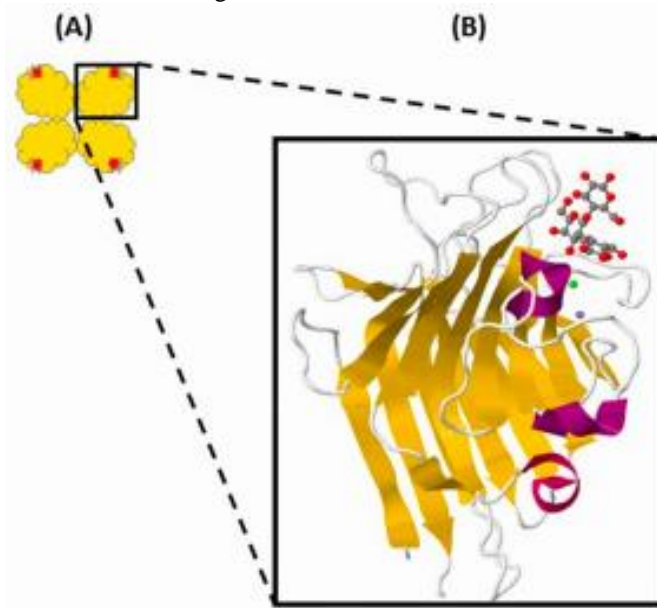
Dentre as lectinas de plantas, as lectinas de leguminosas são as mais estudadas. Compreendem uma família de proteínas abundantes, bem caracterizadas e estruturalmente relacionadas, quando comparadas com outras lectinas descritas na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2014). Estas proteínas são a base central para o estudo molecular e da especificidade proteína-carboidrato, além de serem fundamentais para a compreensão do reconhecimento célula-célula, adesão celular, disseminação tumoral, infecção bacteriana e viral, e inflamação (SHARON e LIS, 1995; RUDIGER *et al.*, 2000). Além disso, mostram conservação nas suas estruturas primárias, secundárias e terciárias. Geralmente, consistem em duas ou mais subunidades que variam de 25 a 30 KDa, apresentam diferentes especificidades a açúcares, apesar da alta similaridade na sequência de aminoácidos e requerem metais divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} para desempenhar suas atividades (LORIS *et al.* 2004, BRINDA *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2014).

As estruturas primárias das lectinas de leguminosas exibem homologias notáveis, demonstrando que essas proteínas têm sido conservados através da evolução. As estruturas 3D são semelhantes e caracterizadas por um elevado teor de folhas β , com pouca contribuição de α -hélices. A estabilidade de dímeros e tetrâmeros é conferida por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações de sal. Estas proteínas exibem várias dobras correspondentes a diferentes motivos de ligação a carboidratos (SHARON e LIS, 1990; VIJAYAN e CHANDRA, 1999).

Os diferentes monômeros de lectinas de leguminosas são extremamente semelhantes e sua estrutura é caracterizada pelo motivo “jelly roll” formado por três folhas- β antiparalelas. Um β -sanduíche consistindo de uma folha plana, de seis fitas (a folha de trás) e uma folha curva com sete fitas (a folha da frente). Uma terceira folha- β , composta por cinco fitas, mantém as duas folhas maiores juntas (LORIS *et al.*, 1998; BANERJEE *et al.*, 1996). O local de ligação ao açúcar está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, formado pela

folha- β dianteira curva, ao lado de um sítio duplo de ligação a metais. (HAMELRYCK *et al.*, 1999) (Figura 2). Esses metais estabilizam o sítio de ligação a carboidratos e fixam as posições dos aminoácidos que interagem com os carboidratos ligantes (WEIS e DRICKAMER, 1996). Apesar de possuir o mesmo motivo estrutural conhecido como “jelly roll” a nível monomérico, apresentam considerável variação na sua estrutura quaternária decorrente de pequenas mudanças em sua sequência (SRINIVAS *et al.*, 2001).

Figura 2 – Estrutura global de lectinas de leguminosas.



Fonte: Adaptado de Lagarda-Diaz *et al.* (2017). (A) tetrâmero com domínio de reconhecimento a carboidrato (vermelho); (B) Imagem ampliada do monômero com folhas- β (amarelo) e α -hélices (roxo), sítio de ligação a metais (esferas verde e cinza) e domínio de reconhecimento a carboidratos (molécula cinza e vermelha) (Protein Data Bank code 1GZ9).

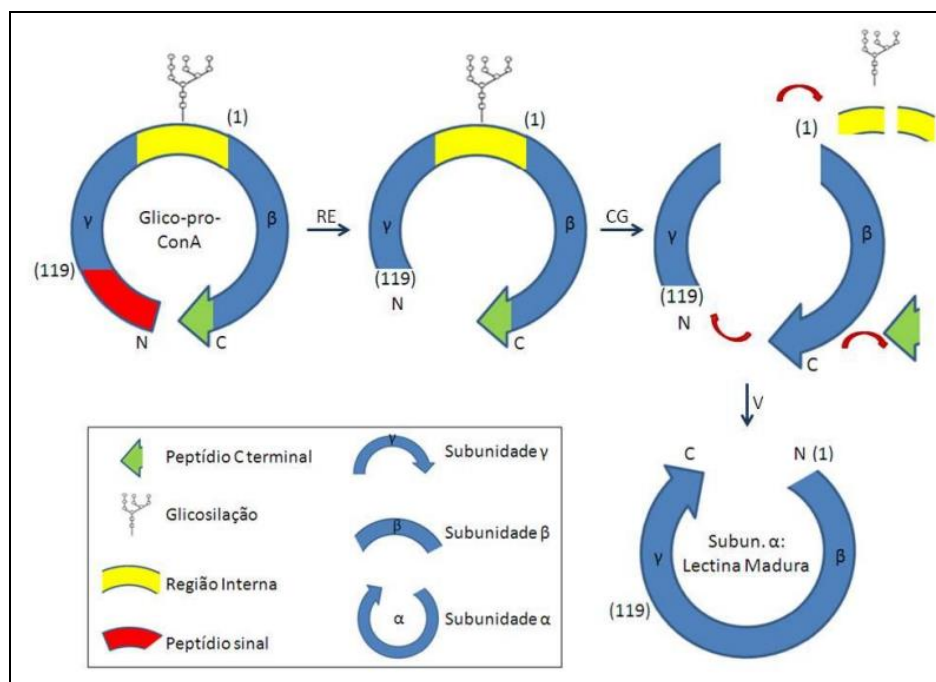
2.4 Lectinas da subtribo Diocleinae

Lectinas da subtribo Diocleinae possuem especificidade de ligação por glicosemanose e tem um elevado grau de homologia em sua sequência de aminoácidos, porém diferem em suas atividades biológicas (CAVADA *et al.*, 2001; ASSREURY *et al.*, 2009). Essa diferença em suas atividades biológicas têm sido atribuída a dois principais fatores: variação em resíduos de aminoácidos chave que influenciam na geometria do sítio de ligação a carboidratos e diferenças no perfil oligomérico da proteína dependente do pH (BEZERRA *et al.*, 2014).

Essas lectinas são sintetizadas na forma de pré-pro-lectinas ou pró-lectinas glicosiladas. Na lectina ConA (lectina de *Canavalia ensiformis*), por exemplo, após a entrada

no retículo, observa-se uma região correspondente aos aminoácidos 119-237, seguida de um pentadecapeptídeo contendo uma unidade oligomanose *N*-ligada, outra região correspondente aos aminoácidos 1-118 e por último, uma extensão C-terminal com nove resíduos de aminoácidos. Esta sequência proteica é então submetida a clivagens proteolíticas (modificações pós-traducionais), o pentadecapeptídeo é retirado durante a maturação, resultando em dois fragmentos: cadeia γ (119-237 aa) e cadeia β (1-118 aa). Parte dessas cadeias produzidas são covalentemente ligadas por uma reação de transpeptidação, que ocorre com a clivagem da extensão C-terminal, resultando, dessa forma em uma subunidade intacta, a cadeia α (1-237) (Figura 3). A união dos dois fragmentos γ e β está localizada entre os resíduos 118 e 119. Esses resíduos estão localizados no loop que faz parte do DRC (domínio de reconhecimento a carboidrato) (SHARON & LIS, 1990; SHARON, 2007).

Figura 3 – Modificações pós-traducionais durante a biossíntese da Concanavalina A (ConA).



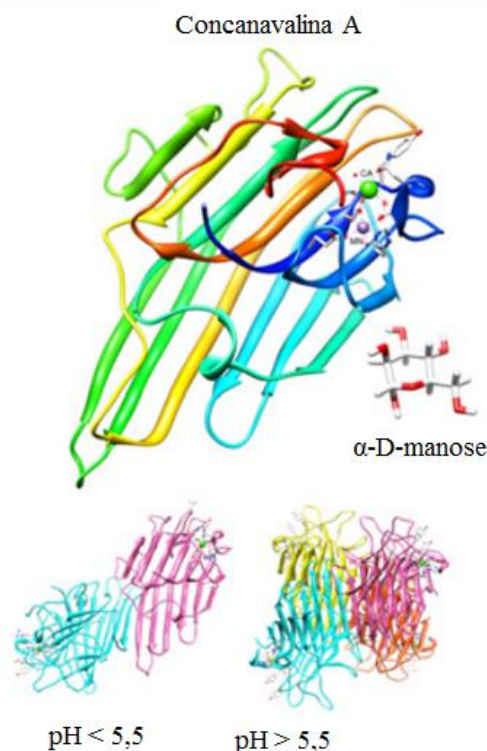
Fonte: Adaptado de CARRINGTON *et al.*, 1985. RE: retículo endoplasmático, CG: complexo de golgi, V: vacúolo.

Lectinas de Dicleinae apresentam equilíbrio dímero-tretâmero dependente de pH (Figura 4). A relevância fisiológica deste fenômeno permanece obscura. No entanto, vale a pena notar que a cavidade central cheia de água do tetrâmero de ConA e outras lectinas de leguminosas foram relatados por ligar vários compostos não polares, tais como a auxina de planta β -Ácido indolacético e citocininas (WANG e EDELMAN, 1978; ROBERTS e GOLDSTEIN, 1983). Auxinas e citocininas funcionam como hormônios de crescimento de

plantas e, portanto, as lectinas poderiam usar o equilíbrio dímero-tetrâmero como mecanismo de armazenamento ou transporte de hormônios (NAGANO *et al.*, 2008).

Dentro deste contexto, alguns pesquisadores clonaram e expressaram genes de algumas lectinas da Subtribo Diocleinae afim de avaliar se o processamento pós- traducional ocorrido na biossíntese da proteína no organismo de origem ocorreria também em outro organismo. Além disso, utilizaram mutagênese sítio dirigida para produzir genes de cadeia α para investigar o equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH ocorrido nessas proteínas. Dentre as proteínas estudadas estão as lectinas de *Dioclea guianensis*, *Dioclea grandiflora* (NAGANO *et al.*, 2008), *Cratylia mollis* (VAREJÃO *et al.*, 2010), *Canavalia brasiliensis* (NOGUEIRA *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2008), *Canavalia ensiformis* (MIN *et al.*, 1992) e *Dioclea sclerocarpa* (ANDRADE, 2015; dados não publicados).

Figura 4 – Oligomerização dependente de pH da lectina de *Canavalia ensiformis*.



Fonte: Adaptado de Fu *et al.* (2011).

Lectinas da subtribo *Diocleinae* têm mostrado resultados positivos em diversas atividades biológicas como, por exemplo, atividade pró-inflamatória (RANGEL *et al.*, 2012), anti-inflamatória (BEZERRA *et al.*, 2014), antibacteriana (CAVALCANTE *et al.*, 2011), antifúngica (VASCONCELOS *et al.*, 2014), antinociceptiva (HOLANDA *et al.*, 2009) e antiproliferativa (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012), entre outras.

2.5 A lectina de *Canavalia brasiliensis*

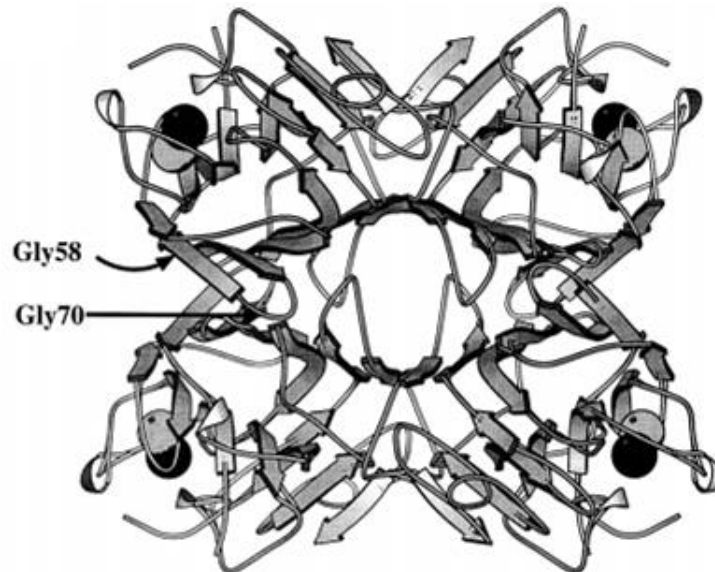
Canavalia brasiliensis é uma planta pertencente a subtribo Diocleinae, conhecida popularmente como feijão-de-porco, feijão bravo ou feijão bravo do Ceará. É uma planta trepadeira, cujos indivíduos podem atingir de 0,5 a 5,0 m (GUEDES *et al*, 2009). Essa espécie tem ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada no México, Paraguai, Argentina e regiões Nordeste e Sul do Brasil (SAUER, 1964).

A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi isolada pela primeira vez em 1984 por Moreira e Cavada. A ConBr foi purificada utilizando fracionamento por solubilidade e cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 e mostrou especificidade para os carboidratos D-manose e D-glicose, além de requerer metais divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para sua atividade.

A estrutura primária da ConBr foi estabelecida por clonagem molecular, sequenciamento de aminoácidos e espectrometria de massas. A sequência de 237 aminoácidos apresenta a heterogeneidade Ser/Thr na posição 96 indicando a presença de duas isoformas. O monômero da lectina ConBr maduro consiste da mistura de polipeptídeos predominantemente de comprimento completo (uma cadeia) e uma pequena porção dos fragmentos 1-118 (cadeia β) e 119-237 (cadeia γ). As isolectinas da ConBr e ConA diferem apenas nos resíduos das posições 58, 70 e 96. No entanto, os monômeros de ConBr associam-se em dímeros e tretâmeros de maneira diferente dependente do pH quando comparada com a ConA. A substituição desses resíduos de aminoácidos localizados nas interfaces das subunidades de lectinas estruturalmente relacionados, pode levar a diferentes conformações nas estruturas quaternárias (GRANGEIRO *et al.*, 1997).

A estrutura tridimensional da ConBr foi elucidada em 1997 por Sanz-Aparício e colaboradores (Figura 5). Este estudo sugeriu que diferenças na estrutura quaternária pode indicar diferentes propriedades biológicas de duas lectinas de leguminosas altamente relacionadas como a ConBr e a ConA. Essas lectinas se ligam a carboidratos que podem ser semelhantes ou idênticos, embora expostos de maneira diferente nas superfícies celulares, desencadeando dessa forma, diferentes respostas a populações celulares ou diferentes efeitos quantitativos nas mesmas células. Além disso, foi demonstrado que a substituição de um resíduo de aminoácido relacionado com o sítio de ligação à carboidrato foi responsável por deixar a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) mais aberta quando comparada com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), o que pode resultar em diferentes atividades biológicas.

Figura 5 – Estrutura geral do tetrâmero da ConBr gerada pelo programa MOLSCRIPT.



Fonte: Adaptado de Sanz-Aparicio *et al.* (1997). As bolas cinza representam íons Mn^{2+} e as bolas pretas íons Ca^{2+} . As posições dos resíduos Gly-58 e Gly-70, que em ConA são Asp e Ala, respectivamente.

Com relação ao seu potencial em atividades biológicas, a lectina de *Canavalia brasiliensis* tem sido amplamente investigada desde os primeiros anos após o isolamento até os dias atuais. Abaixo serão citadas algumas atividades biológicas comprovadas para a ConBr.

Em 1992, Rodriguez e colaboradores observaram que quando administrada intraperitonealmente, a ConBr estimulou a produção de macrófagos em camundongos. Logo em seguida, viu-se que a ConBr promoveu a imigração de leucócitos (BENTO *et al.*, 1993) e a liberação de histamina em macrófagos (GOMES *et al.*, 1994). Esses resultados sugerem uma atividade pró-inflamatória. Além disso, ConBr estimulou a proliferação de linfócitos e a produção de $IFN-\gamma$ por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de voluntários normais (BARRAL-NETO *et al.*, 1992).

Em 1996, Barral-Neto e colaboradores mostraram que a administração *in vivo* da lectina de *Canavalia brasiliensis* reduziu lesões de ratos BALB/c altamente susceptíveis infectados por *Leishmania amazonensis*. Dessa forma, a lectina mostrou atividade protetora contra *L. amazonensis*. Posteriormente, a ConBr foi avaliada quanto à estimulação da produção do óxido nítrico. Considerando que o óxido nítrico pode estar envolvido em atividades antitumorais e antiparasitárias é importante investigar o efeito da lectina nesse sentido. Nesse estudo foi confirmada a indução da produção de óxido nítrico pela ConBr

(ANDRADE *et al.*, 1999). Dessa forma, a atividade antiparasitária mostrada anteriormente pode estar relacionada com a indução da produção do óxido nítrico.

Baraúna e colaboradores (2006) avaliaram o efeito antidepressivo da ConBr administrada centralmente em ratos. Os resultados indicaram que o efeito da lectina depende de sua interação com os sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos e mostrou a importância de determinar o possível papel das lectinas endógenas na modulação da função do sistema nervoso central.

Em 2013, Pires e colaboradores investigaram o efeito antinociceptivo da ConBr. Quando administrada oralmente em modelos murinos de nocicepção, a ConBr apresentou atividade antinociceptiva, tanto periférica, quanto central mediada pelo sistema opióide.

O efeito vasodilatador de lectinas do gênero *Canavalia* foi investigado por Assreuy *et al.* (2009). A atividade edematogênica elucidada pela ConBr mostrou o envolvimento do óxido nítrico e de prostaglandinas e na relaxação da aorta, o envolvimento do óxido nítrico e de prostaciclina. O efeito da lectina foi revertido pelo açúcar ligante, mostrando a participação do domínio de reconhecimento a carboidrato na execução da atividade biológica.

As lectinas de *Canavalia ensiformis* e de *Canavalia brasiliensis* foram avaliadas quanto a estimulação do crescimento da cepa *Rhizobium tropici*. Entretanto, apenas a ConBr estimulou o crescimento bacteriano. A diferença na disposição espacial e do volume do DRC podem permitir as diferenças nas atividades biológicas entre as duas lectinas. De acordo com Vasconcelos e colaboradores (2012) a ConBr pode ser uma ferramenta promissora para estudos com ênfase na relação entre rizóbios e plantas.

Com relação a atividade antitumoral, a ConBr inibiu a proliferação celular seletiva de linhagens celulares de leucemia humana (MOLT-4 e HL-60), sendo a apoptose o principal mecanismo de morte (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012). Quando foi avaliada contra células B16F10 de melanoma murino foi capaz de reduzir a viabilidade celular e causar apoptose, além de induzir a produção de óxido nítrico e interleucina-12 (SILVA *et al.*, 2014). Portanto, essa lectina pode ser considerada uma molécula com um grande potencial para atividade antitumoral (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012).

A ConBr também foi investigada quanto a neuroproteção. A lectina mostrou atividade neuroprotetora contra ácido quinolínico em ratos (RUSSI *et al.*, 2012). Em seguida mostrou efeito neuroprotetor contra glutamato pela interação com oligossacarídeos e depende da via PI3K/Akt (JAQUES *et al.*, 2013). Além disso, mostrou ativar vias de sinalização e aumentar a expressão de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) e ainda efeito antidepressivo, evidenciando o envolvimento do sistema glutamatérgico. Isso pode indicar

que essa lectina é uma molécula multifuncional capaz de ativar vias de sinalização envolvidas na neuroplasticidade e neuroproteção (RIEGER *et al.*, 2014 a; RIEGER *et al.*, 2014b).

2.6 Expressão da lectina de *Canavalia brasiliensis* em sistemas heterólogos

A lectina de *Canavalia brasiliensis* foi produzida pela primeira vez na forma recombinante em *Escherichia coli* a partir do cDNA subclonado em vetor de expressão pET-15b. A lectina recombinante foi produzida nos corpos de inclusão (agregados insolúveis) e purificada por cromatografia de afinidade com metal imobilizado. Por SDS-PAGE e western blot a proteína mostrou-se altamente pura com massa molecular aparente de 37 KDa. A análise da sequência N-terminal revelou uma sequência única, confirmando a identidade da proteína expressa como pré-pro-ConBr (precursor) (NOGUEIRA *et al.*, 2002).

Durante a biossíntese da proteína no desenvolvimento das sementes de *Canavalia brasiliensis*, a lectina sofre uma inversão na ordem dos domínios N e C terminal. Afim de verificar se esse mecanismo ocorreria ao produzir a proteína em outro organismo, Bezerra e colaboradores (2006) estabeleceram um sistema heterólogo para produção da lectina na forma recombinante. O gene codificante da pré-pro-lectina (precursor da ConBr) foi clonado no vetor pPICZB e o plasmídeo recombinante foi inserido em *Pichia pastoris*. A análise de western blot das células transformadas detectou uma proteína intracelular de 34,5 KDa. A proteína recombinante mostrou-se ativa pela forte interação com restos celulares da levedura ricos em manose. No entanto, *P. pastoris* não foi capaz de realizar todo o processamento pós-traducional complexo necessário para a biossíntese da ConBr.

O gene precursor da ConBr também foi inserido em plantas de tabaco. As plantas transgênicas expressaram a proteína recombinante sendo confirmado por PCR e por análise de western blot. Entretanto, a massa molecular aparente da proteína recombinante (34 KDa) foi mais elevada do que a da proteína nativa (30 KDa), mostrando que não foi realizado o processamento proteolítico para produzir a pro-ConBr (proteína madura) (CARVALHO *et al.*, 2006).

2.7 Produção de lectinas recombinantes

Um grande número de lectinas têm sido purificadas de diferentes organismos. As propriedades biológicas de muitas lectinas têm sido definidas em misturas de proteínas, uma vez que é difícil separar isoformas de múltiplas lectinas por técnicas convencionais. Isoformas

com diferentes especificidades de ligação ao açúcar podem levar a uma variabilidade indesejada quando utilizamos estas proteínas como ferramentas biomédicas. Por exemplo, as duas isoformas de lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA-E e PHA-L) apresentam atividades significativamente diferentes com células de sangue humano. A isoforma PHA-E em baixas concentrações aglutina eritrócitos, enquanto que a isoforma de PHA-L é mitogênica para leucócitos (RAEMAEEKERS *et al.*, 1999). Portanto, o principal problema em utilizar lectinas isoladas de organismos vivos como ferramentas biotecnológicas está na variação de lote a lote no conteúdo de isoformas, o que pode originar resultados inconstantes em suas atividades biológicas (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Entretanto, as lectinas também podem ser produzidas através da tecnologia do DNA recombinante (LAM e NG, 2011). A expressão recombinante e a produção das lectinas em sistemas de expressão heterólogo pode melhorar estes problemas potenciais, permitindo a produção de lectinas com níveis mais altos de pureza e uma sequência de aminoácidos definida, e dessa forma, tendo uma maior controle das propriedades finais da proteína de interesse (GEMEINER *et al.*, 2009).

Dentre os sistemas de expressão, *Escherichia Coli* é o mais utilizado para produção destas proteínas. Diferentes estirpes têm sido escolhidas para a expressão de diferentes lectinas. Geralmente, *E. Coli* é transformada com vetores de expressão e crescida em meio de cultura esterilizado (BMGY e meio Luria-Bertani) num fermentador. A fermentação é realizada em valor de pH definido, temperatura, densidade óptica no momento da indução, concentração de indutor e tempo de expressão. O isopropil- β -D-tiogalactosídeo é o indutor mais frequentemente utilizado. Após indução, as células são colhidas por centrifugação. Em seguida, as lectinas são liberadas das células por resuspensão em tampão de lise seguida de sonicação. São necessários passos adicionais para a purificação das lectinas (UPADHYAY *et al.* 2010; TATENO *et al.* 2004).

Numerosas lectinas de diversos organismos, e especialmente de plantas, têm sido produzidas em bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*), células de insecto (células ovarianas de *Spodoptera frugiperda*), plantas e células de mamíferos. Além disso, a atividade de hemaglutinação, ligação de carboidratos e ensaios de citotoxicidade *in vitro* são conduzidos para avaliar a funcionalidade das lectinas produzidas por hospedeiros recombinantes e suas propriedades são frequentemente comparadas às correspondentes lectinas nativas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Na tabela 1 estão listadas as lectinas de plantas produzidas em *E. coli*.

Tabela 1 – Lectinas de plantas produzidas em *E. coli*.

ESPÉCIE	LECTINA	REFERÊNCIA
<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jacalina	SARASRABUDDHE <i>et al.</i> , 2004
<i>Allium sativum</i>	ASAL	UPADHYAY <i>et al.</i> , 2010
<i>Artocarpus incisa</i>	Frutalina	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009
<i>Arachis hypogea</i>	PNA	SHARMA e SUROLIA, 1994
<i>Canavalia brasiliensis</i>	ConBr	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2002
<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	DINCTURK <i>et al.</i> , 2001
<i>Castanea crenata</i>	CCA	NAKAMURA <i>et al.</i> , 2002
<i>Cycas revoluta</i>	CRLI	HARAGUCHI <i>et al.</i> , 2006
<i>Cratylia mollis</i>	CRAMOL 1	VAREJÃO <i>et al.</i> , 2010
<i>Dioclea guianenses</i>	Dgui	NAGANO <i>et al.</i> , 2008
<i>Diocela grandiflora</i>	DGL	NAGANO <i>et al.</i> , 2008
<i>Dolichus biflorus</i>	DBL	CHAO <i>et al.</i> , 1994
<i>Galanthus nivalis</i>	GNA	LUO <i>et al.</i> , 2005
<i>Glicina max</i>	SBA	ADAR <i>et al.</i> , 1997
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nictaba	VANDEBORRE <i>et al.</i> , 2008
<i>Oryza sativa</i>	SALT	BRANCO <i>et al.</i> , 2004
<i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	LI <i>et al.</i> , 2011
<i>Polyporus squamosus</i>	PSL	TATENO <i>et al.</i> , 2004
<i>Viscum album</i>	aviscumina	ZWIERZINA <i>et al.</i> , 2011

2.7.1 *Escherichia coli* como sistema de expressão

Escherichia coli é uma dos principais sistemas escolhidos para expressão de proteínas recombinantes. Sua manipulação está bem estabelecida e por isso tornou-se a plataforma de expressão mais utilizada. Diante disso, muitos protocolos e ferramentas tornaram-se disponíveis para produção de proteínas heterólogas, como por exemplo, um vasto catálogo de plasmídeos de expressão, um grande número de cepas manipuladas para produzir proteínas com diferentes características moleculares e muitas estratégias de cultivo (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

As vantagens de usar *E. coli* como sistema hospedeiro são bem conhecidas. Em condições ambientais ótimas, em cerca de 20 minutos a população celular duplica. Além disso, culturas de alta densidade celular são facilmente alcançadas, meios complexos podem ser preparados facilmente com componentes disponíveis e baratos e a transformação com DNA exógeno é rápida e fácil (LEE *et al.*, 1996; POPE e KENT, 1996; SEZONOV *et al.*, 2007).

Com relação a escolha da estirpe para a produção da proteína recombinante, para iniciar o screening de expressão apenas um par de cepas de *E. coli* são necessárias: BL21(DE3) e alguma derivada da linhagem K12 (ROSANO e CECCARELLI, 2014). A estirpe escolhida para expressão da proteína de interesse do presente trabalho foi a BL21 (DE3) e vetor de expressão pET28a. De acordo com Derman e coladores (1993), a BL21 (DE3) e derivadas são as estirpes mais usadas para a produção de proteínas recombinantes.

As células BL21(DE3) e suas variantes competentes são estirpes de uso geral para expressão proteica de alto nível e fácil indução. Essas estirpes são ideais para expressão de proteínas que utilizam o promotor T7 para direcionar altos níveis de expressão, como por exemplo, os vetores pET. Derivadas de *E. coli* B, estas cepas de expressão são naturalmente carentes da protease Lon que pode degradar proteínas recombinantes e são engenheiradas para serem deficientes para uma segunda protease, a OmpT (AGILENT TECHNOLOGIES, 2015).

O sistema pET é o mais poderoso sistema desenvolvido para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Os genes alvo são clonados em plasmídeos pET sobre forte controle de transcrição. A expressão é induzida fornecendo uma fonte de T7 RNA polimerase na célula hospedeira. A T7 RNA polimerase é tão seletiva e ativa que quando induzida totalmente quase todos os recursos celulares são convertidos em expressão do gene alvo (NOVAGEN, 2003).

Após a escolha da estirpe e do plasmídeo para a produção da proteína de interesse, não há como garantir que a proteína será expressa em condições favoráveis. Portanto podem ser feitas otimizações no processo de produção para que o mesmo seja melhorado. A tabela abaixo resume as principais estratégias para superar dificuldades encontradas durante o processo de produção.

Tabela 2 – Estratégias para superar problemas comuns encontrados durante o processo de produção de proteínas recombinantes em *E. coli*.

PROBLEMA	POSSÍVEL EXPLICAÇÃO	SOLUÇÃO
Nenhuma ou baixa expressão	Proteínas podem ser tóxicas antes da indução	<ul style="list-style-type: none"> -Adicionar glicose quando usar vetores de expressão contendo promotores baseados em <i>lac</i>. -Usar meio com glicose como fonte de carbono. -Usar promotores com regulação mais forte.
	Proteína pode ser tóxica depois da indução	<ul style="list-style-type: none"> -Baixar o número de cópias do plasmídeo. -Controlar o nível de indução: promotores ajustáveis ou usar estirpes que permitam o controle da indução.
	Códon bias	<ul style="list-style-type: none"> -Baixar o número de cópias do plasmídeo. -Usar estirpes melhoradas para produção de proteínas tóxicas. -Direcionar proteínas para o periplasma. -Otimizar a frequência de códons no gene para refletir melhor o uso de códons do hospedeiro.
Formação de corpos de inclusão	Dobramento incorreto da proteína	<ul style="list-style-type: none"> -Co-expressão com chaperonas. -Remova o indutor e adicione meio fresco. -Baixar a taxa de produção:

		baixar a temperatura, se possível usar estirpes com chaperonas adaptados ao frio e/ou diminuir a concentração do agente indutor.
	Baixa solubilidade	Fusionar a proteína desejada um potencializador de solubilidade (cauda de fusão).
Inatividade da proteína	Dobramento incompleto	-Baixar a temperatura. - Acompanhar a formação de pontes dissulfeto e promover um posterior dobramento <i>in vitro</i> .
	Mutações no cDNA	Sequenciar os plasmídeos antes e após a indução. Se as mutações forem detectadas, as proteínas podem ser tóxicas.

Fonte: Rosano e Ceccarelli, 2014.

2.7.2 Expressão de proteínas recombinantes em corpos de inclusão

As células desenvolveram mecanismos complexos para proteger suas proteínas da agregação. No entanto, várias causas podem levar a falhas no mecanismo de defesa, entre estas, mutações, condições de estresse e altas taxas de síntese de proteínas, todas consequências comuns da produção de proteínas heterólogas. Como resultado, no citoplasma bacteriano várias proteínas são agregadas como corpos de inclusão (GATTI-LAFRANCONI *et al.*, 2011).

Corpos de inclusão são agregados proteicos que tem sido comumente observados em proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* desde a implementação da tecnologia do DNA recombinante. Estes foram rapidamente reconhecidos como o principal gargalo na produção de proteínas recombinantes e foram classificados como polipeptídeos desdobrados

ou altamente dobrados que não alcançaram sua conformação nativa (BANEYX e MUJACIC, 2004).

As proteínas de corpos de inclusão geralmente estão desprovidas de atividade biológica e necessitam de procedimentos elaborados para solubilização, redobramento e purificação para recuperar o produto funcionalmente ativo (RUDOLPH e LILIE, 1996). As primeiras tentativas de recuperar proteínas ativas dos corpos de inclusão bacterianos foram principalmente baseadas na solubilização de proteínas dos corpos de inclusão usando agentes caotrópicos seguidos de procedimentos de renaturação subsequentes (SINGH e PANDA, 2005; VALLEJO e RINAS, 2004). Geralmente, a solubilização de corpos de inclusão envolve apenas cloridrato de guanidina ou uréia e um reagente redutor. A renaturação, no entanto, é multifacetada, envolvendo vários procedimentos, condições físicas, e produtos químicos suplementados. As melhores condições para a renaturação dependem de propriedades individuais de cada proteína e ainda precisam ser estabelecidas por tentativa e erro (RINAS *et al.*, 2017).

Várias abordagens tem sido relatadas para redobrar proteínas agregadas em corpos de inclusão. Metodologias como diálise, diluição do agente desnaturante, uso de aditivos químicos como inibidores de agregação (arginina, prolina) e estabilizadores (glicerol, polietilenoglicol) e o sistema natural de chaperonas GroEL-GroES, tem sido utilizadas (YAMAGUCHI e MIYAZAKI, 2014). Mais recentemente, outras estratégias foram relatadas para redobrar proteínas como cromatografia de exclusão por tamanho (LI e JASON, 2004), sistema de micela reversa (SAKONO *et al.*, 2004) e sistema de absorção de zeólitos (NARA *et al.* 2009).

A proteína alvo geralmente representa a maior fração dos corpos de inclusão. Dessa forma, tentativas de redobramento podem ser feitas logo após a solubilização dos corpos de inclusão (VALLEJO e RINAS, 2004). Entretanto, a principal preocupação com o uso de corpos de inclusão como material de origem para propósitos industriais é que os procedimentos de redobramento não são universais e precisam ser adaptados para cada proteína específica. Além disso, o custo e a velocidade do processo nem sempre são convenientes em grande escala (MIDDELBERG, 2002).

Apesar da expressão de proteínas sob a forma de corpos de inclusão ser muitas vezes considerada indesejada, sua formação pode ser vantajosa, pois o isolamento do homogeneizado celular é uma maneira eficiente de purificar a proteína de interesse. As principais vantagens associadas à formação de corpos de inclusão são: (1) expressão de um alto nível da proteína, mais de 30% em alguns casos; (2) fácil isolamento dos corpos de

inclusão das células devido a diferença de tamanho e densidade em comparação com outros contaminantes celulares, (3) menor degradação da proteína expressa e (4) homogeneidade da proteína de interesse nos corpos de inclusão que ajuda na redução do número de etapas de purificação (SINGH e PANDA, 2005).

2.8 Lectinas como agentes antitumorais

O câncer é um processo complexo em que alterações genéticas modificam a capacidade de células normais de transmitir sinais e permite que essas células adquiram novas funções, como replicação além dos limites normais e invasão de outros tecidos (HANAHAN e WEINBERG, 2011; LEHRACH *et al.*, 2017). Atualmente, a maioria das drogas utilizadas para terapia anticancerígena são pouco seletivas e afetam tanto as células malignas, quanto células normais. A busca por drogas para tratar o câncer levou os pesquisadores a se concentrarem em drogas menos tóxicas e mais seletivas. A glicosilação da membrana, um dos fatos mais importantes do comportamento celular, foi apontado como alvo principal para o diagnóstico e tratamento do câncer (JULIEN *et al.*, 2012; MUNKLEY e ELLIOTT, 2016).

Lectinas de diferentes origens exercem efeitos citotóxicos tais como inibição da proliferação celular e ativação da via de morte celular, em diferentes tipos de células cancerígenas. Além disso, muitas lectinas anticâncer geralmente possuem baixa toxicidade para células não neoplásicas. Este fato pode estar associado a expressão distinta de glicanos na superfície celular do câncer e de células normais, permitindo que as lectinas reconheçam especificamente células malignas (PRZYBYLO *et al.*, 2002; VARKI *et al.*, 2009). O potencial terapêutico das lectinas baseia-se na atividade antitumoral e efeito citotóxico através da indução da morte celular programada, como apoptose e autofagia. Entretanto, os mecanismos de indução da morte celular ainda não foram totalmente esclarecidos (FU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015).

Muitas lectinas de leguminosas têm sido avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico em linhagem celulares do câncer. A lectina de *Viscum álbum* tem sido utilizada na Europa como agente alternativo na terapia do câncer, diminuindo os efeitos adversos da quimioterapia e radioterapia, e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (SHUMACHER *et al.*, 2003). As lectinas da subtribo Diocleinae, ConBr, ConM, DLasiL e DSL mostraram potencial anticancerígeno contra células neoplásicas A2780, A549, MCF7 e PC3 (GONDIM, 2014).

A lectina de *Canavalia ensiformis*, uma lectina de leguminosa bastante estudada em relação ao seu potencial anticancerígeno, induziu autofagia em células de hepatoma (ROY et al., 2014), exibiu efeito antiproliferativo em células de melanoma A375 (LIU et al., 2009) e foi avaliada também, juntamente com a ConBr, contra células de leucemia MOLT-4 e HL-60 (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). Essas lectinas foram capazes de inibir o crescimento das células cancerígenas.

2.8.1 Glioma

Os tumores primários do sistema nervoso central (SNC) são um grupo heterogêneo de condições neoplásicas que acometem todas as faixas etárias e podem ocorrer em qualquer ponto anatômico cerebral ou medular. São considerados a segunda causa mais importante de morte relacionada a doenças neurológicas, sendo superados apenas pelos acidentes vasculares cerebrais (BURGER e SCHEITHAUER, 2007; PRESTON-MARTIN et al., 1996).

Gliomas são tumores cerebrais primários de origem neuroglial de maior ocorrência. Caracterizam-se por sua alta invasão e proliferação, quimio e radiorresistência e altos índices de recorrência e morte. Evidências recentes sugerem que esses gliomas apresentam uma população de células tronco tumorais que estariam envolvidas na sua resistência a terapias (MAHER, 2001; BREDEL e ZENTNER, 2002).

Testes in vitro de citotoxicidade em células tumorais de glioma C6 mostraram que as lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis* (PEREIRA, 2005), *Canavalia villosa* (Cvill) (MOREIRA, 2017) e *Canavalia bonariensis* (CaBo) (CAVADA et al., 2017) diminuíram a viabilidade celular e a migração por indução de autofagia e morte celular. Esses dados mostram o potencial das lectinas contra células tumorais e enfatizam a importância de continuar investigando essas moléculas como possíveis fármacos para terapia contra o câncer.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa a produção recombinante da cadeia intacta (cadeia alfa) da lectina de *Canavalia brasiliensis* e a avaliação da citotoxicidade desta proteína recombinante contra náuplios de *Artemia* sp. e células de glioma da linhagem C6.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão heteróloga da cadeia α da lectina de *Canavalia brasiliensis* recombinante (rConBr) em *Escherichia coli*, purificação e caracterização físico-química e biológica.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter clones positivos de cepas *E. coli* (clonagem e expressão) transformados com o gene *ConBr*;
- ✓ Determinar a condição ideal de expressão da lectina recombinante;
- ✓ Purificar a lectina rConBr;
- ✓ Determinar as propriedades físico-químicas da lectina em estudo por meio de ensaios de atividade hemaglutinante, especificidade por açúcares, termoestabilidade, estabilidade da proteína em condições variáveis de pH e investigar a dependência da rConBr por metais divalentes para manutenção de sua atividade;
- ✓ Avaliar a toxicidade da rConBr contra náuplios de *Artemia* sp.;
- ✓ Investigar a toxicidade e efeitos morfológicos da rConBr em células de glioma da linhagem C6.
- ✓ Comparar a lectina recombinante com a lectina tipo selvagem em todos os experimentos realizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do gene sintético da ConBr

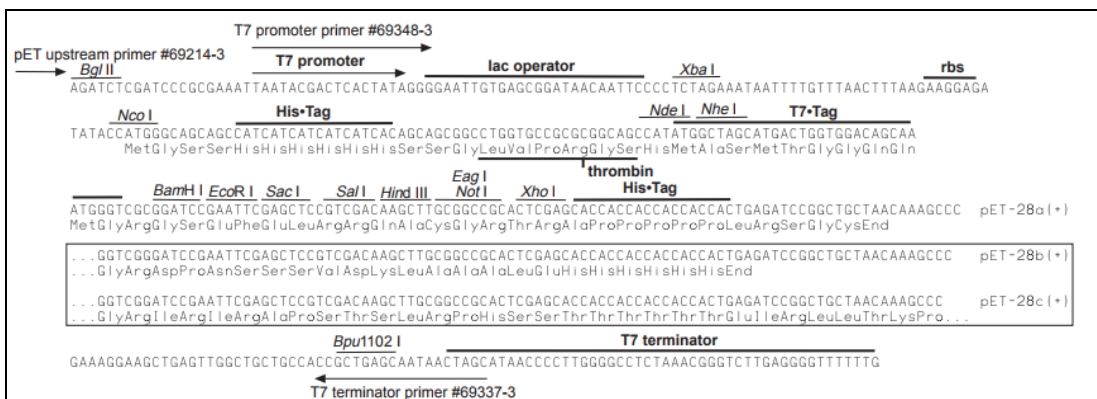
Para produzir a lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* foi construído um gene sintético a partir da estrutura primária da proteína tipo selvagem disponível no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) através do código P55915 (Figura 6). A estrutura primária da lectina de *Canavalia brasiliensis* de consiste de 237 aminoácidos.

Figura 6 – Sequência de aminoácidos da lectina de *Canavalia brasiliensis*.

```
>sp|P55915|CONA_CANBR Concanavalin-Br OS=Canavalia brasiliensis PE=1
SV=1
ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHI IYNSVGKR
LSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNLVPEWVVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST
HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTEGNLRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN
```

Para expressão da lectina em sistema procariótico foram feitas otimizações na sequência gênica. O gene sintético foi obtido no vetor pET28a (Novagen) que apresenta características que viabilizam a produção da proteína em altos níveis e sob forte controle da expressão. A região N-terminal do vetor possui um sítio de reconhecimento para a enzima de restrição *NcoI*, seguido por uma cauda de histidina que pode facilitar na purificação, um sítio de clivagem para trombina, um sítio de reconhecimento para as enzimas de restrição *NdeI* e *NheI*, um sítio múltiplo de clonagem e uma cauda de histidina na região C-terminal (Figura 7). A construção do gene *ConBr*-pET28a foi feita sem adição de cauda de histidina.

Figura 7 – Mapa do vetor pET28a.



Fonte: Novagen.

4.1.1 Preparo de células competentes

As células foram previamente preparadas para tornarem-se competentes a receber o plasmídeo. Para isso as células foram plaquedadas e crescidas overnight a 37°C. Uma colônia foi inoculada em 100 mL de meio LB e incubada a 37°C por 3 horas sob agitação constante. O crescimento foi monitorado (600nm) até atingir a densidade ótica de 0,4. Quando a densidade ótica necessária foi atingida, as células foram transferidas para tubos de 50 mL estéreis e mantidas no gelo por 10 minutos. Posteriormente, as células foram recuperadas por centrifugação a 2,700 x g, por 10 minutos a 4°C. O meio foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 30 mL de solução de CaCl₂ - MgCl₂ (80 mM MgCl₂, 20mM CaCl₂) gelada. As células foram novamente recuperadas por centrifugação a 2,700 x g, por 10 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL (para cada 50 mL de cultura) de CaCl₂ 0,1 M gelado e as células estocadas no -80 em alíquotas de 100 µL (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.1.2 Transformação bacteriana e clonagem gênica

A cepa *Escherichia coli* DH5α (Life Technologies®) foi utilizada como hospedeira de clonagem e a cepa BL21(DE3) (Novagen®) como hospedeira para expressão da proteína recombinante. Inicialmente, realizou-se a transformação bacteriana utilizando a cepa DH5α para clonagem do plasmídeo. O gene foi então purificado e utilizado para transformação da cepa de expressão BL21(DE3). Os genomas completos das cepas DH5α e BL21(DE3) estão disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information) através dos números de acesso NZ_JRYM01000004.1 e CP001509.3, respectivamente.

As bactérias foram transformadas pelo método de choque térmico, que consiste em adicionar o DNA plasmidial (DNAP) a suspensão de células bacterianas quimicamente competentes e submeter as células a um choque térmico. Após a adição do DNAP as células, as mesmas foram incubadas no gelo por 30 minutos, colocadas no banho-maria a 42°C por 30 segundos e novamente no banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, 900 µL de meio LB (Luria-Bertani) foi adicionado a suspensão de células transformadas seguido de incubação a 37°C por 1 hora e 30 minutos em agitação constante, sendo posteriormente plaqueadas (100 µL). Ao meio LB ágar (caseína, extrato de levedura, cloreto de sódio e ágar) foi adicionado canamicina, antibiótico de resistência do plasmídeo utilizado para viabilizar o crescimento apenas das bactérias transformadas (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.1.3 Confirmação das células transformadas

Algumas colônias presentes na placa foram selecionadas e transferidas para 5mL de LB líquido acrescido de antibiótico e incubadas a 37°C sob agitação overnight. A partir destes cultivos foram preparadas culturas estoque dos clones bacterianos e posteriormente realizada a extração de DNAp para a confirmação dos clones. As culturas estoque consistiram de 880 µL do cultivo de cada clone e 120 µL de glicerol 80%. Os estoques foram armazenados no freezer -80°C.

Para a extração do DNAp, os pré-inóculos obtidos a partir das colônias transformadas foram submetidos a uma extração de DNAp utilizando o kit AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Biosciences) de acordo com protocolo do fabricante.

A determinação da concentração e o grau de pureza do DNAp foram obtidas com a utilização do espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Os DNAs plasmidiais foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (EtBr). A corrida eletroforética realizou-se a uma voltagem constante de 100 V, e o gel submerso em tampão de corrida TBE (Tris-Borato 90 mM pH 8,8, contendo EDTA 2 mM). O DNAp foi visualizado na presença de um marcador de peso molecular com faixa de massa de 300 pb a 10.000 pb (Axygen) através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador (Amersham Bioscience).

4.1.4 Expressão da proteína recombinante (rConBr)

4.1.4.1 Testes de expressão

Para identificar a melhor condição de expressão para rConBr foram realizados testes variando a temperatura (16°C, 20°C, 25°C, 30°C e 37°C), o tempo de indução de expressão (2, 4, 6 e 16 horas) e a concentração do indutor de expressão (isopropil-p-D-tiogalactosídeo- IPTG) (0,5mM, 1,0 mM e 1,5mM). A partir da cultura estoque armazenada no freezer -80°C foi feito um pré-inóculo no qual 5µL de células foram cultivadas em 5mL de meio LB líquido acrescido de canamicina e incubadas a 37°C sob agitação constante até alcançar a fase exponencial (densidade ótica $_{600\text{ nm}} = 0,6-0,8$). Nessa fase foi induzida a expressão da proteína pela adição de IPTG nos pré-inóculos testados e um pré-inóculo na ausência de IPTG foi considerado como controle (amostra não induzida) para posterior comparação das proteínas expressas utilizando gel de poliacrilamida. Após a indução da expressão, a temperatura do sistema foi ajustada e as coletas realizadas conforme protocolo

pré-estabelecido. Após a coleta, 1 mL da cultura foi centrifugada a 12.000 x g por 1 minuto e o *pellet* submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

4.1.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

Para isso, o *pellet* foi resuspenso em 100 µL de tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 1%, Glicerol 10%, Bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol 5% seguido de incubação à 100°C por 5 min em temobloco (Bioer). Posteriormente, cada amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad; Milão, Itália). O gel de separação foi preparado com acrilamida/bisacrilamida (30:0,8) a 12%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%. O gel de empilhamento foi preparado com poliacrilamida 4%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%. O marcador de peso molecular utilizado foi o do kit LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare) composto por Fosforilase B (97 KDa), Albumina Sérica Bovina (66 KDa), Ovalbumina (45 KDa), Anidrase Carbônica (30 KDa) e Inibidor de Tripsina (20,1 KDa). As condições de corrida foram: corrente de 25 mA (mantida constante durante a corrida), potência de 5 W e voltagem variando até 150 V. Após a corrida os géis foram corados com Comassie Colloidal Blue G-250 a 0,1 %. A melhor condição de expressão considerada foi aquela que apresentou maior intensidade da banda proteica de interesse, referente a rConBr.

4.2 Produção da lectina rConBr

Após verificar a melhor condição para obtenção da proteína recombinante em sistema heterólogo foi realizada a produção em um volume maior de cultura. Para isso foi preparado um pré-inóculo de bactérias transformadas em 5 mL de meio LB contendo antibiótico a 37°C sob agitação constante, por um período de 16 horas. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da cultura foi inoculada em 1 litro de meio LB contendo canamicina e o meio foi incubado à 37°C e agitação constante até alcançar uma D.O._{600nm} de aproximadamente 0,6, seguido de adição de IPTG na concentração ideal e ajuste da temperatura. Após o período de indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 7.000 x g por 20 minutos. Os *pellets* foram armazenados no freezer -80°C para posterior utilização.

4.2.1 Purificação da lectina rConBr

4.2.1.1 Preparo do extrato proteico

Os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em 25 mL do tampão de lavagem Tris-HCl 20 mM pH 7,6 EDTA 10 mM Triton X-100 1% e, em seguida as células foram sonicadas (Homogeneizador ultrassônico DE-12207 Bandelin) em dois ciclos de 1 minuto a uma potência de 50% e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C. A fração solúvel (sobrenadante) foi submetida a diálise em tampão de refolding Tris-HCl 20 mM pH 7,6 NaCl 25 mM CaCl₂ 2 mM e, posteriormente, contra água destilada. Em seguida, o material proteico da diálise foi liofilizado (Liofilizador L101 – Liotop / Liobras) e submetido a determinação da integridade através de SDS-PAGE descrito anteriormente.

4.2.1.2 Cromatografia de exclusão molecular

A lectina recombinante rConBr foi purificada por cromatografia de exclusão molecular utilizando cromatógrafo HPLC (ACQUITY APC™ – Waters®). A lectina liofilizada foi resuspensa em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M na concentração 2mg/mL, centrifugada (*spin*) e o sobrenadante aplicado em uma coluna de sílica BioSuite™ 250 7.8 X 300 mm (Waters®) previamente equilibrada com tampão de solubilização da proteína. A eluição da proteína foi realizada em mesmo tampão em modo isocrático, fluxo de 0,45 mL/minuto e a absorção da proteína foi feita em 280 nm. Frações proteicas de 500 µL foram coletadas ao longo da cromatografia. A massa molecular aparente e o grau de pureza da rConBr foram avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), descrito anteriormente.

4.3 Caracterização físico-química da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis*

4.3.1 Ensaio de atividade hemaglutinante

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em tubos, a partir de uma adaptação ao protocolo descrito por Moreira e Perrone (1977). O procedimento consistiu em diluições seriadas de 100 µL da amostra em 100 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 contendo NaCl 0,15 M. Após as diluições, foram adicionados 100 µL da suspensão de eritrócitos a 2% nativos e tratados enzimaticamente. O ensaio foi mantido em repouso por

meia hora em estufa a 37°C e meia hora a temperatura ambiente, logo após foi observada a presença ou a ausência de hemaglutinação. Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de unidade hemaglutinante (U.H.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

4.3.2 Especificidade por carboidratos

A especificidade da rConBr por carboidrato foi determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante utilizando diferentes açúcares. A concentração inicial de cada carboidrato foi de 0,1 M e os seguintes açúcares foram testados: D-glicose, D-galactose, L-ramnose, D-ribose, D-manose, α -lactose, α -metil-D-manosídeo, L-fucose e N-acetilglicosamina. Para isso, cada carboidrato testado foi submetido a uma diluição seriada em duplicata em Tris-HCl 0,1 M NaCl 0,15 M. Em seguida, foi adicionado uma solução lectínica a uma concentração contendo 4 unidades de hemaglutinação (4 U.H.). O ensaio foi incubado em estufa a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado eritrócitos de coelho tripsinizado a 2%. Em seguida, o ensaio foi novamente incubado a 37 °C por 30 minutos. O resultado da inibição foi visto a olho nu, na ausência de hemaglutinação e o resultado expresso como a mínima concentração do açúcar capaz de inibir a hemaglutinação (concentração mínima inibitória, CMI).

4.3.3 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

Para analisar a termoestabilidade da lectina recombinante (rConBr), a mesma foi solubilizada em Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M a uma concentração final de 1 mg/mL, incubada em termobloco (Bioer) com temperaturas variando de 30 a 100 °C em intervalos de 10 °C, por 60 minutos. Posteriormente, as amostras foram arrefecidas a temperatura ambiente, centrifugadas e o sobrenadante submetido ao ensaio de atividade hemaglutinante (descrito anteriormente). Para efeito de comparação, a ConBr nativa foi também submetida a este ensaio nas mesmas condições que a rConBr.

4.3.4 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

A lectina rConBr (1 mg/mL) foi solubilizada em NaCl 0,15 M e dialisada por 24 horas contra tampões com valores de pH variando de 4,0 a 10,0, todos contendo NaCl 0,15 M. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 e 5,0; citrato de sódio 0,1 M pH

6,0; Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 e 8,0; e glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0 e 10,0. Após diálise, cada amostra foi centrifugada e o sobrenadante submetido ao ensaio de atividade hemaglutinante. A atividade hemaglutinante da rConBr tratada com diferentes tampões com diferentes valores de pH foi comparada com os resultados obtidos no ensaio de atividade hemaglutinante da lectina solubilizada em NaCl. Para efeito de comparação, a ConBr nativa foi analisada simultaneamente nas mesmas condições.

4.3.5 Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante

Para a avaliação da dependência da lectina por cátions divalentes, uma solução de rConBr foi preparada na concentração de 1mg/mL através da solubilização da lectina recombinante em solução salina (NaCl 0,15 M). Esta solução proteica foi submetida a diálise em solução de EDTA 100 mM contendo NaCl 0,15 M por um período de 24 horas. Posteriormente, a solução de lectina foi exaustivamente dialisada contra NaCl 0,15 M para remoção do excesso de EDTA. Em seguida, a solução proteica foi centrifugada e o sobrenadante foi submetido ao ensaio de atividade hemaglutinante em meio tamponante com e sem adição de NaCl 0,15 M contendo CaCl_2 e MnCl_2 10 mM. A atividade hemaglutinante da lectina foi avaliada antes e depois da diálise, bem como após a adição dos cátions divalentes. O mesmo teste foi realizado na lectina ConBr nativa.

4.4 Ensaio de toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp.

Para avaliação do efeito citotóxico da lectina, cistos de *Artemia* sp. foram submetidos à eclosão sob luz, em condições de aeração constante e temperatura controlada. Para isso, 20 mg de cistos de artêmia foram adicionados em um frasco de vidro contendo 200 mL de água do mar autoclavada e mantidos em condições descritas anteriormente por um período de 48 horas. Esse período pré-estabelecido é caracterizado como ideal de crescimento dos náuplios para experimentos de investigação da toxicidade. Para o ensaio, foi preparada uma solução da lectina em água do mar artificial na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$. Em uma placa de cultivo de células, foi adicionada uma alíquota da solução de proteína a fim de atingir as concentrações finais de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, e, em seguida, acrescentou-se a cada poço mais uma alíquota da solução de água do mar artificial contendo 10 náuplios, totalizando, ao final, 2 mL de solução por poço. O experimento foi conduzido em triplicatas, para cada condição, e o controle negativo foi feito da mesma forma, com água do mar

artificial, 10 exemplares de náuplios, volume final de 2 mL, porém sem a adição da lectina. Para efeito de inibição, a lectina (100 µg/mL) foi incubada em água do mar artificial contendo 0,1 M de α -Metil-manopiranosídeo, durante 1 h a 37 °C. Depois de 24 horas o número de náuplios mortos foram contados (ARRUDA *et al.*, 2013).

4.5 Viabilidade celular da linhagem C6 expostas a ConBr e a rConBr

Para avaliar a citotoxicidade das lectinas nativa e recombinante em células tumorais da linhagem C6 utilizou-se o método colorimétrico com sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (MOSMANN, 1983). Em células metabolicamente viáveis, as desidrogenases mitocondriais clivam o anel de tetrazólio, tornando um composto amarelo em azul escuro, o formazan, que são cristais insolúveis em água. Assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Um dia antes do experimento, o meio com as células foi tratado com tripsina. As células (50.000 células/ mL) foram distribuídas em placas de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ (5%). Após 24 h (houve a troca do meio e) as células nos poços foram tratadas com as diferentes concentrações das proteínas (10, 30, 50 e 100 µg/mL).

Após 24 h do tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas por uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose pH 7,4 (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM). Em seguida, o meio com MTT foi removido e foi então adicionado 100 µL de DMSO/poço para a solubilização dos cristais de formazan (MOSMANN, 1983). A absorbância foi medida por espectrofotometria a 540 nm em leitor de placas (Infinite M200-Tecan).

Os valores de absorbância, medidos para cada concentração de cada amostra, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X %), em relação à média dos controles celulares, considerados 100% viáveis. Os dados foram expressos como uma média \pm média do erro padrão (n=3). $p < 0,05$ comparado ao controle (*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Clonagem e expressão em *Escherichia coli*

Neste trabalho, o gene da cadeia α da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) foi clonado e expresso em *E. coli*, sendo a proteína rConBr obtida na forma ativa. O gene da proteína foi sintetizado a partir da sequência primária da lectina madura, que consiste de 237 aminoácidos, correspondente a cadeia alfa da ConBr tipo selvagem. Tentativas anteriores de produzir lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* foram feitas, no entanto, foram realizados experimentos para produção do precursor da lectina. A lectina de *Canavalia brasiliensis* foi produzida pela primeira vez na forma recombinante em *Escherichia coli* a partir do cDNA subclonado em vetor de expressão pET15b. A lectina foi produzida nos corpos de inclusão (agregados insolúveis) como pré-pro-ConBr (precursor) (NOGUEIRA *et al.*, 2002). Posteriormente, o gene codificante da pré-lectina (precursor da ConBr) foi clonado no vetor pPICZB e o plasmídeo recombinante foi inserido em *Pichia pastoris*. No entanto, *P. pastoris* não foi capaz de realizar todo o processamento pós-traducional complexo necessário para a biossíntese da ConBr (BEZERRA *et al.*, 2006). O gene precursor da ConBr também foi inserido em plantas de tabaco, utilizando o vetor pBI121 que foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens*. Entretanto, não foi detectada nenhuma atividade hemaglutinante quanto testada contra eritrócitos de coelho. Além disso, a massa molecular aparente da proteína recombinante (34 KDa) foi mais elevada do que a da proteína nativa (30 KDa), mostrando que não foi realizado o processamento proteolítico para produzir a pro-ConBr (proteína madura) (CARVALHO *et al.*, 2006).

Nesses trabalhos mencionados, o gene foi obtido por PCR e correspondia a cadeia proteica precursora da lectina de *Canavalia brasiliensis* madura, sendo a lectina expressa na forma do precursor, e muito provavelmente a ausência da sua atividade hemaglutinante se deveu ao fato dos organismos hospedeiros escolhidos terem sido incapazes de realizar as devidas modificações pós-traducionais (processamento proteolítico) necessárias para produzir a lectina na forma madura.

Para a expressão da lectina rConBr (cadeia madura) em bactérias, foram realizadas otimizações de códons na sequência gênica da ConBr. Códons raros em *E. coli* são frequentemente abundantes em genes heterólogos de eucariotos. A otimização dos códons da sequência exógena é uma estratégia para resolver o problema do códon bias. O códon bias surge quando a frequência de ocorrência de códons no DNA de um organismo exógeno é

significativamente diferente daquela do hospedeiro utilizado como sistema de expressão heteróloga. No momento da síntese completa da proteína recombinante, depleção de tRNAs de baixa abundância ocorre. Esta deficiência pode levar à inadimplência de aminoácidos e/ou truncamento do polipeptídeo, afetando assim os níveis de expressão da proteína e/ou sua atividade (GUSTAFSSON et al., 2004). Utilizando genes sintéticos, otimizações podem ser feitas na sequência para que a proteína de interesse possa ser produzida em sistema heterólogo sem ser tóxica para o organismo de escolha.

No presente trabalho, o gene da cadeia alfa da rConBr (lectina madura) foi obtido comercialmente na forma recombinante inserido no vetor pET28a. O vetor recombinante foi utilizado nas transformações bacterianas da cepa de clonagem *E. coli* DH5 α para amplificação do gene por clonagem *in vivo* e, em seguida, o plasmídeo clonado foi purificado com sucesso. Após purificação dos plasmídeos, que foram obtidos na forma pura e íntegros, os mesmos foram utilizados na transformação da cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3). A BL21 (DE3) é naturalmente carente em genes *lon*, uma protease que pode degradar proteínas recombinantes, e foi engenheirada para ser deficiente em uma outra protease, como a *Ompt*. Além disso, estas cepas possuem o lisogene DE3 que contém um fragmento de DNA correspondente ao promotor *lac*, o operador *lac* e o gene da T7 RNA polimerase. Quando vetores pET são utilizados em lisogene DE3, o repressor *lac* age tanto no promotor *lacUV5* no cromossomo bacteriano para reprimir a transcrição do gene da T7 RNA polimerase, quanto no promotor T7 *lac* no vetor para bloquear a transcrição do gene alvo por qualquer RNA polimerase. Na presença de IPTG ou análogos, a transcrição do gene da T7 RNA polimerase ocorre normalmente e conseqüentemente ocorrerá a transcrição do gene alvo.

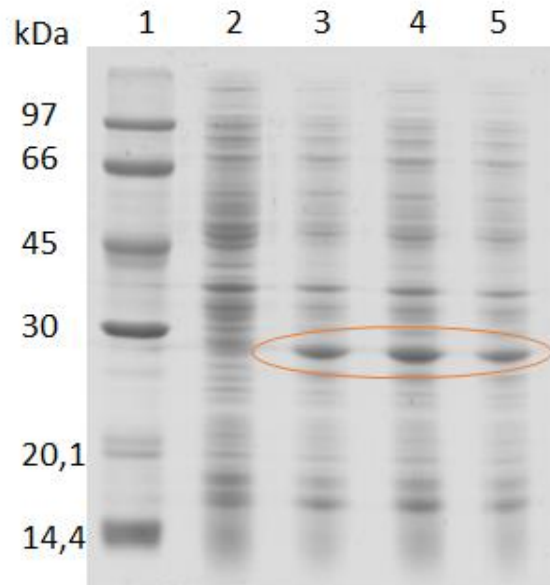
Vetores da família pET são comumente utilizados com sucesso na produção de proteínas recombinantes. O sistema pET foi engenheirado para transportar uma cópia do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7. A T7 RNA polimerase do bacteriófago, por sua vez, atuou sobre o promotor T7 que controlou a transcrição de genes alvo, neste caso o gene da cadeia alfa da lectina de ConBr. Essa construção proporcionou uma regulação rigorosa da expressão gênica em função da produção controlada da RNA-polimerase T7. A polimerase também foi muito eficiente e direcionou níveis elevados de expressão da maioria dos genes fusionados no promotor T7.

Através dos testes de expressão foi obtida a melhor condição de expressão da rConBr. Foram testadas condições variáveis de temperatura (16, 20, 25, 30 e 37°), concentração de IPTG (0,5, 1,0 e 1,5mM) e tempo de indução (2, 4, 6 e 16 horas) após adição do IPTG ao meio de cultivo. Por SDS-PAGE observou-se que a rConBr foi expressa em todas

as condições testadas e apresentou uma massa molecular aparente em torno de 30 kDa, correspondente ao esperado para a lectina tipo selvagem. Devido a superexpressão da proteína e possivelmente a formação de corpos de inclusão em temperaturas mais altas, foi escolhida uma condição de expressão em temperatura mais baixa.

Sabe-se que taxas mais lentas de produção das proteínas recombinantes dão tempo de proteínas recentemente transcritas se dobrarem adequadamente. Além disso, a redução da concentração da proteína celular favorece a dobramento correto e a expressão de proteínas em baixas temperaturas melhora a solubilidade e a atividade, evitando a formação de corpos de inclusão. Portanto, a maneira mais utilizada para reduzir a síntese proteica é diminuir a temperatura de incubação (SCHEIN e NOTEBORN, 1988; VASINA e BANEYX, 1997; VERA *et al*, 2007; SAHDEV *et al*. 2008). Dessa forma escolheu-se a temperatura de 16 graus para a produção da rConBr, com um tempo de indução de 16 horas e 1,0mM de IPTG (Figura 8).

Figura 8 – Perfil de expressão da rConBr em *E. coli* BL21 a 16 °C, 16 horas após indução com IPTG. 1 - Marcador molecular de baixo peso. 2 - Bactéria não induzida. 3 - Bactéria induzida com IPTG a 0,5 mM. 4 - Bactéria induzida com IPTG a 1,0 mM. 5 - Bactéria induzida com IPTG a 1,5 mM.



Minimizar a formação de corpos de inclusão é uma questão bastando discutida entre os pesquisadores. Reduzir a temperatura de crescimento, diminuindo a taxa de transcrição e a co-produção de moduladores de dobramento são estratégias bastante utilizadas na tentativa de diminuir a formação de corpos de inclusão (GARCÍA-FRUITÓS *et al.*, 2012; SORENSEN e MORTENSEN, 2005).

5.2 Purificação da rConBr

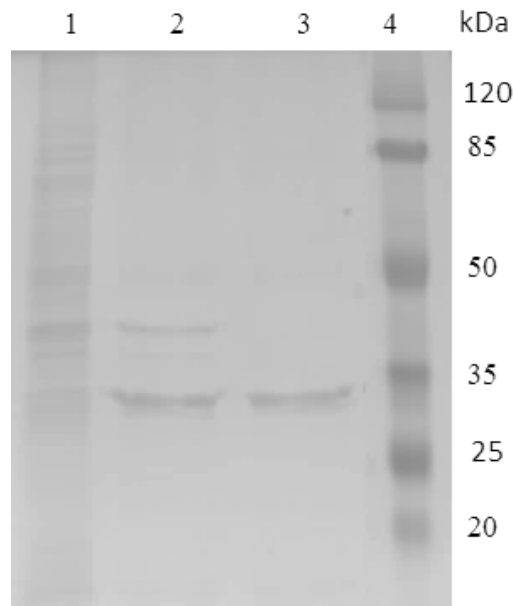
5.2.1 Obtenção de fração solúvel ativa

Após a indução da produção das proteínas recombinantes detectou-se que a proteína alvo estava em maior quantidade na fração solúvel, porém com pouca atividade. Na tentativa de melhorar a atividade da lectina presente nesta fração, a mesma foi submetida a solubilização em diferentes tampões para melhorar sua atividade. Neste trabalho, foi observada também a formação de corpos de inclusão, entretanto, a proteína foi purificada apenas da fração solúvel. De acordo com Carrio e Villa Verde (2002), corpos de inclusão resultam da falta de balanceamento entre a solubilização e a agregação proteica e são formados durante a superexpressão de genes heterólogos. A formação de corpos de inclusão em bactérias recombinantes tem sido frequentemente observada como resultado do dobramento impróprio de proteínas (BANEYX *et al.*, 2004).

Grande parte das proteínas expressas em *E. coli* são encontradas na forma insolúvel. Uma vez que a proteína alvo é frequentemente relativamente pura em um lavado de corpos de inclusão, o desafio não é tanto purificar o alvo, mas sim solubilizar os corpos de inclusão e redobrar a proteína em sua estrutura nativa, recuperando sua atividade completamente. Embora muitos dos passos para o processo de solubilização dos corpos de inclusão e redobramento proteico sejam gerais, as condições ideais para o redobramento adequado difere de proteína para proteína (BURGESS, 2009).

A obtenção de uma proteína a partir de fração solúvel evita que etapas adicionais e trabalhosas para determinar uma condição de ressolubilização da proteína a partir dos corpos de inclusão sejam necessárias. No caso da rConBr, uma grande quantidade da proteína pode ser detectada na fração solúvel porém com um baixo título de hemaglutinação. Após a expressão da proteína recombinante, deu-se o rompimento celular, seguido por centrifugação, coleta do sobrenadante e diálise. Por SDS-PAGE foram acompanhados todos os passos de purificação da proteína. A fração solúvel foi dialisada contra água destilada para remoção do agente solubilizante e então liofilizada. Como pode ser observado no perfil eletroforético, após todo o processo de solubilização do *pellet*, extração e diálise a proteína foi recuperada mostrando apenas uma banda no SDS-PAGE (Figura 9). Para avaliar a pureza da rConbr foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular em coluna de sílica BioSuite™. O cromatograma mostrou um único pico revelando a alta pureza da proteína, seguido de um pequeno pico (de baixíssima intensidade) (Figura 10).

Figura 9 – Purificação da rConBr. 1 – Extrato total após rompimento celular por sonicação; 2 - fração solúvel sem diálise; 3 - fração solúvel após diálise e centrifugação; 4 - marcador molecular prestained.



O rendimento da rConBr foi de 40 mg de proteína por litro de cultura bacteriana. É um rendimento esperado se levarmos em consideração outras lectinas recombinantes de espécies da subtribo Diocleinae produzidas em *E. coli*, como as lectinas recombinantes de *Dioclea guianensis* e *Dioclea grandiflora* (20 mg/L) (NAGANO *et al.*, 2008) e de *Dioclea sclerocarpa* (74 mg/L) (ANDRADE, 2015). Rendimento semelhante foi obtido para a lectina recombinante de *Galanthus nivalis* (GNA), entretanto essa lectina foi purificada dos corpos de inclusão (42 mg/L) (LUO *et al.*, 2005). De acordo com Vallejo e Rinas (2004) é comum que as proteínas depositadas na forma de corpos de inclusão se acumulem em níveis mais elevados em comparação com proteínas produzidas em forma solúvel, além disso, nos corpos de inclusão a proteína alvo encontra-se protegida de degradação proteolítica, o que favorece a produção da proteína.

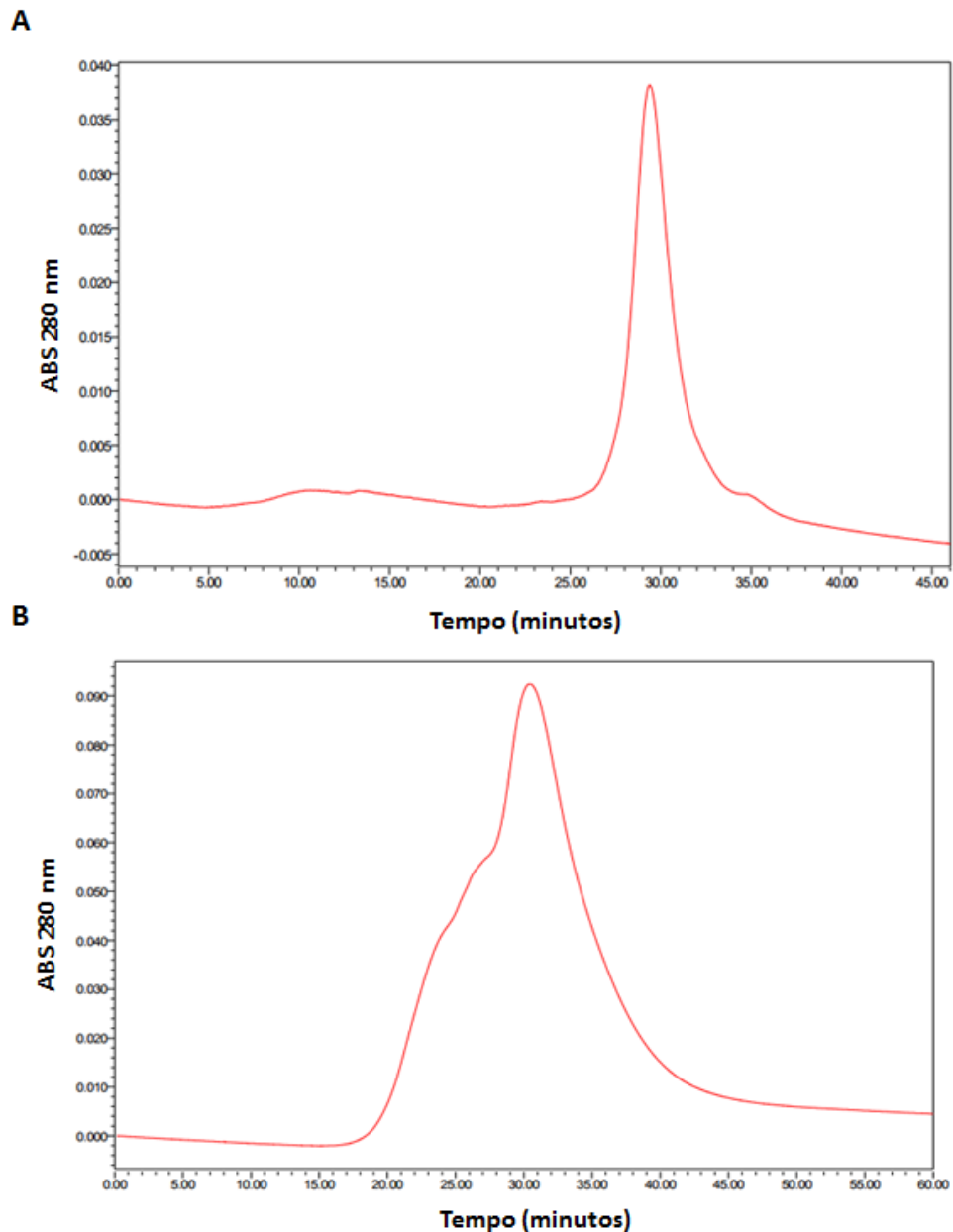
A rConBr purificada mostrou-se ativa quando testada sua atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho, apresentando uma melhor atividade com eritrócitos tratados com enzimas proteolíticas (Tabela 3)

Tabela 3: Atividade hemaglutinante da rConBr contra eritrócitos de coelho.

ERITRÓCITOS	U.H.	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U.H.*/mgP)
Nativos	8	96,38
Tratados com tripsina	64	771,08
Ttratados com papaína	64	771,08

*U.H.: Unidade de hemaglutinação: inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

Figura 10 – Cromatografia de exclusão Molecular referente à purificação da rConBr (A) e da ConBr (B) tipo selvagem.



Legenda: Perfil cromatográfico obtido através de matriz de exclusão molecular. As amostras foram solubilizadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 com NaCl 0,5 M a 2mg/mL e aplicadas em uma coluna de sílica BioSuite™ 250 7.8 X 300 mm (Waters®). As proteínas foram eluídas em modo isocrático em fluxo de 0,45 mL/minuto.

5.3 Caracterização da rConBr

Apesar de estar disponível na literatura informações sobre a lectina tipo selvagem, nesse trabalho, todos os experimentos de caracterização foram feitos tanto com a lectina recombinante, quanto com a lectina tipo selvagem para a obtenção de dados de uma mesma condição experimental. É importante ressaltar que uma lectina obtida na forma recombinante

tem atividades com resultados reprodutíveis e no caso da lectina tipo selvagem, devido a variação no conteúdo de isoformas e na porcentagem de composição dos fragmentos (β e γ), a lectina pode apresentar características que variam a cada lote de proteína obtido.

5.3.1 Inibição da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante da rConBr foi inibida pelos açúcares D-manose e α -metil-D-manosídeo, apresentando uma especificidade maior para α -metil-D-manosídeo que inibiu a atividade da proteína a uma concentração de 6,25 mM e confirmando a especificidade já registrada para ConBr nativa. No entanto, a atividade da rConBr não foi inibida por glicose, como demonstrado por Moreira e Cavada (1984) para a lectina tipo selvagem. É importante mencionar que a rConBr é composta apenas pela cadeia intacta da proteína enquanto a lectina tipo selvagem é composta por cadeia intacta mais seus respectivos fragmentos (beta e gama). Talvez, os fragmentos quando unificados em solução sejam responsáveis por essa especificidade a glicose ou o tetrâmero de rConBr composto apenas de cadeia alfa, apresente um rearranjo estrutural que impeça a entrada de glicose ao local de reconhecimento à carboidratos. Neste trabalho, o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante da ConBr mostrou que a atividade da lectina tipo selvagem foi inibida apenas por manose (25 mM) e por α -metil-D-manosídeo (6,25 mM), indicando um resultado muito semelhante ao encontrado para a lectina recombinante e enfatizando mais uma vez que a proteína tipo selvagem pode apresentar características que variam de a um lote a outro de proteína.

Tabela 4 – Inibição da atividade hemaglutinante da rConBr e ConBr tipo selvagem.

Carboidratos (0,1 M)	rConBr CMI (mM)	ConBr CMI (mM)
D-Glicose	ND	ND
D-Galactose	ND	ND
L-Ramnose	ND	ND
D-Ribose	ND	ND
α-Lactose	ND	ND
D-Manose	50	25
α-metil-D-Manosídeo	6,25	6,25
L-fucose	ND	ND
N-acetilglicosamina	ND	ND

CMI: concentração inibitória mínima.
 ND: não detectada.

5.3.2 Termoestabilidade da rConBr

A termoestabilidade das lectinas nativa e recombinante foram avaliadas simultaneamente para efeito de comparação. A rConBr manteve sua atividade mesmo após ter sido aquecida por 1 hora até 60 °C. Quando aquecida a 70°C a proteína perdeu 50% de sua atividade e perdeu totalmente a atividade a partir de 80°C. A rConBr mostrou ser bem semelhante a ConBr selvagem que mantém sua atividade até 70°C como mostrado nas figuras abaixo (Figuras 11 e 12).

As lectinas recombinante (rDSL) e selvagem de *Dioclea sclerocarpa* também apresentaram semelhança com relação a termoestabilidade. Ambas as lectinas mantiveram suas atividades até 80°C (ANDRADE, 2015). Outras lectinas de Diocleinae também se mostraram termoestáveis, como as lectinas DrfL (PEREIRA-JÚNIOR, 2014) que manteve sua atividade até 70 °C e CVill (MOREIRA, 2017) até 80 °C.

Figura 11 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da rConBr.

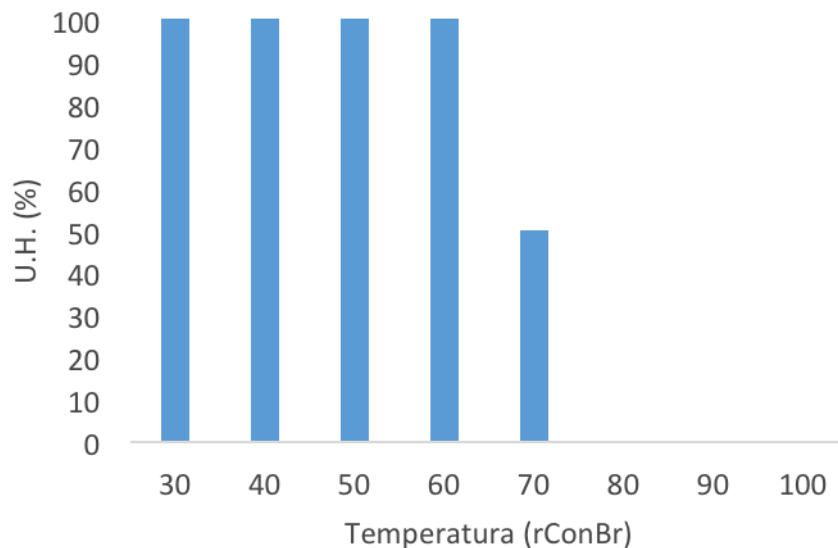
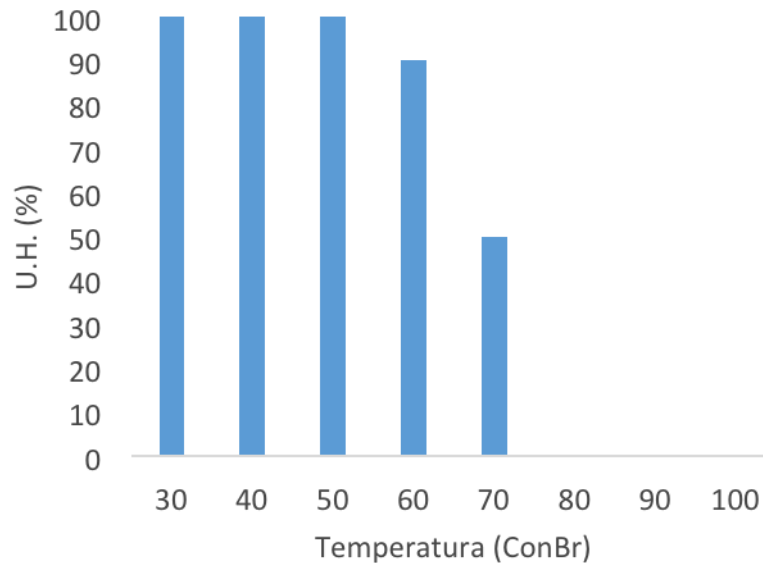


Figura 12 – Efeito da temperatura na atividade hemaglutinante da ConBr.



5.3.3 Efeito do pH na atividade hemaglutinante da rConBr

Com relação as variações de pH, a rConBr manteve sua atividade nos valores de pH 4, 5, 6 e 7, indicando que essa é a faixa de pH ótimo para atividade da proteína. No entanto, perdeu totalmente a atividade em pH mais alto (8, 9 e 10) (Figura 13). Já a ConBr tipo selvagem manteve sua atividade em toda faixa de pH testada e sua atividade ótima concentra-se na faixa de pH de 7 a 10 (Figura 14). Esses resultados podem se consequências da ausência dos fragmentos (beta e gama) na rConBr, sendo a lectina, composta apenas por cadeia alfa, é oligomerizada em meios tamponantes com pH entre 4-7. A oligomerização dos fragmentos muito provavelmente deve ser favorecida em ambiente básico, dessa forma, a lectina tipo selvagem apresentou atividade hemaglutinante também nos tampões com valores de pH entre 8 e 10. Resultados semelhantes foram encontrados para as lectinas de *Dioclea lasiophylla* (PINTO-JÚNIOR *et al.* 2013), *Canavalia oxyphylla* (SANTIAGO *et al.*, 2014), *Canavalia virosa* (OSTERNE *et a.*, 2014) e *Canavalia bonariensis* (SILVA *et al.*, 2014). É importante mencionar que a oligomerização tem impacto direto na ligação do açúcar ao sítio de ligação a carboidrato, isso foi visto em estudos de oligomerização sobre lectinas mutantes de *Dioclea grandiflora* (ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015).

Figura 13 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante da rConBr.

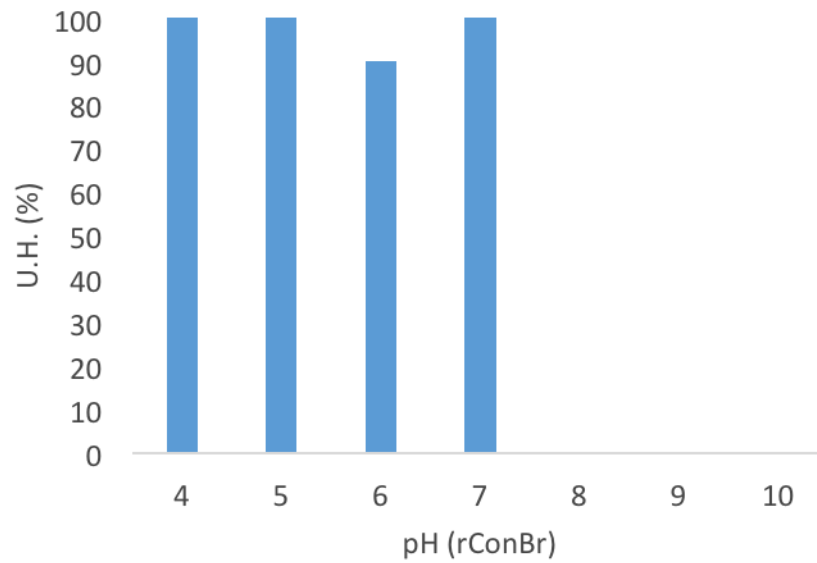
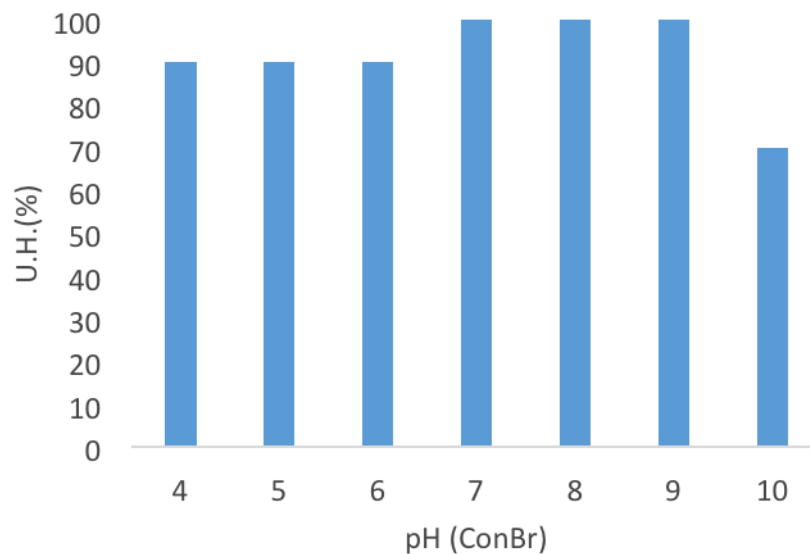


Figura 14 – Efeito do pH na atividade hemaglutinante da ConBr



5.3.4 Dependência de cátions divalentes

A atividade hemaglutinante da rConBr não foi afetada após a diálise da proteína contra EDTA e após adição dos metais não houve melhora na atividade da proteína, mostrando que a mesma não é dependente de cátions divalentes. Esta é uma outra evidência de que a proteína recombinante difere da nativa pois sabe-se que a ConBr tipo selvagem, assim como outras lectinas da subtribo Diocleinae, dependem de metais divalentes para

exercer sua atividade. Esses íons atuam estabilizando a estrutura do sítio de ligação a carboidratos e sua ausência resulta na perda da capacidade de se ligar a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004). Entretanto, a rConBr não necessita da adição desses metais para sua atividade, indicando uma possível diferença estrutural entre a lectina produzida no organismo de origem e a lectina recombinante produzida em sistema de expressão bacteriano.

5.4 Toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp.

A rConBr não provocou a morte dos náuplios de *Artemia* sp. em nenhuma das concentrações testadas, mostrando que a proteína não apresenta citotoxicidade contra este microorganismo. Já a ConBr tipo selvagem apresentou toxicidade com uma CL50 de 54,38 µg/mL demonstrado por Arruda e colaboradores (2013) e reconfirmados nos ensaios repetidos nesta tese. Trabalhos anteriores mostraram que as lectinas nativa e recombinante de *Dioclea sclerocarpa* (ANDRADE, 2015) também não apresentaram toxicidade, bem como a lectina de *Canavalia virosa* (OSTERNE *et al.*, 2014). O fato dessas proteínas não apresentarem toxicidade é benéfico, se levarmos em consideração as propriedades farmacológicas dessas proteínas.

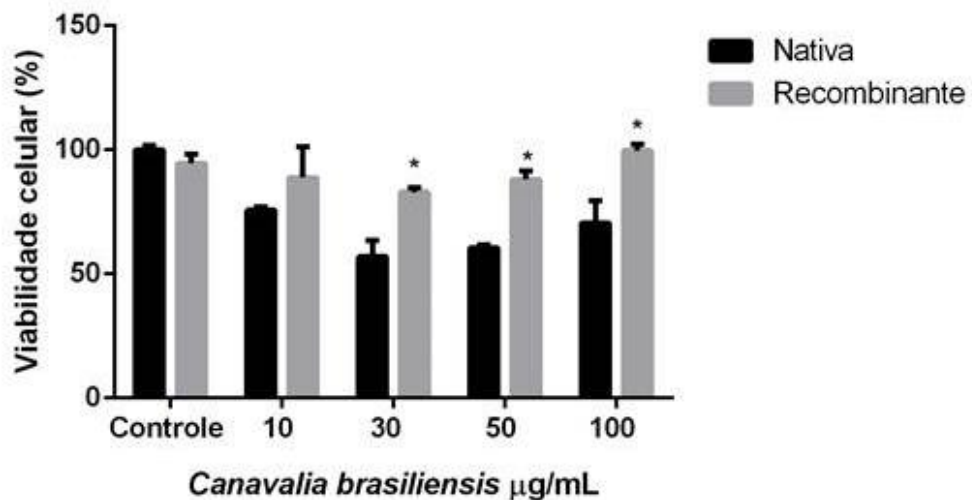
Artemia sp. é uma espécie de microcrustáceo pertencente ao filo Artropoda, São organismos de fácil aquisição, fácil cultivo em laboratório e são sensíveis a diversos tipos de substâncias. Por todas essas características, esses animais têm sido utilizados em testes de toxicidade (VEIGA; VITAL, 2002). Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias nos sistemas biológicos (BARBOSA *et al.*, 2003).

5.5 Efeito da rConBr na morfologia e viabilidade celular em células de glioma da linhagem C6

Para avaliar o efeito citotóxico em células C6, as lectinas nativa e recombinante foram testadas nas concentrações 10, 30, 50 e 100 µg/mL. Dessa forma, foi determinado o efeito das lectinas ConBr e rConBr sobre a viabilidade celular de células de glioma C6 através da avaliação da capacidade redutora do MTT. Para a rConBr, não foi observada nenhuma alteração morfológica ou diminuição da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Já a ConBr teve efeito sobre a viabilidade das células nas doses 30, 50 e 100 µg/mL, alterando a morfologia e induzindo a morte celular conforme pode ser visto nas figuras 15 e 16. As diferenças observadas nas características físico-químicas das lectinas rConbr e ConBr podem explicar os diferentes efeitos biológicos demonstrados por estas proteínas. Além disso, a

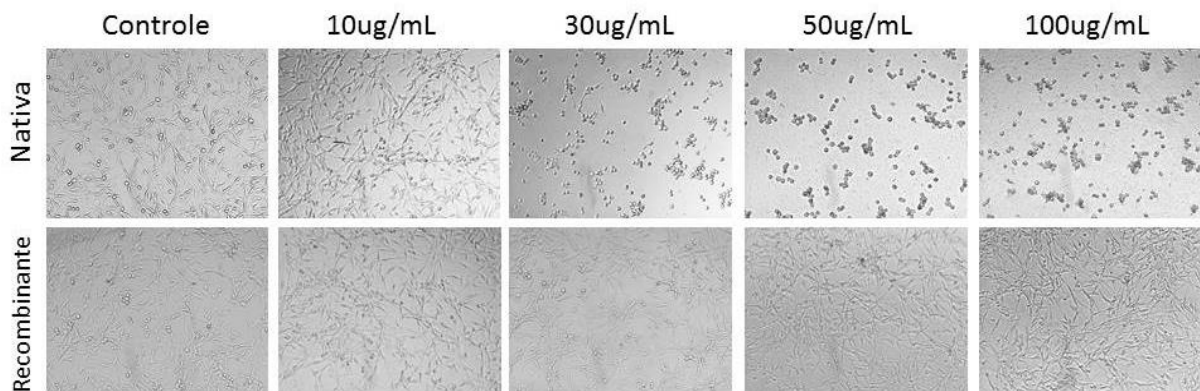
presença dos fragmentos beta e gama da ConBr provavelmente influenciaram nesse efeito sobre as células visto que a cadeia alfa intacta (rConBr) não apresentou nenhum efeito citotóxico ou alteração na morfologia celular. O meio celular também pode favorecer a ação dos fragmentos, pois eles podem estar ou não associados formando a cadeia alfa. A resolução da estrutura tridimensional da lectina recombinante é essencial para explicar essas diferenças observadas tanto nas características físico-químicas, quanto nos efeitos biológicos das lectinas recombinante e tipo selvagem. Para isso, a rConBr foi submetida a um screening de cristalização, entretanto, até o presente momento não foram obtidos dados suficientes para serem descritos neste trabalho.

Figura 15 – Efeito das lectinas ConBr e rConBr na viabilidade de células de glioma C6.



Fonte: Elaborado pelo autor. Células C6 foram tratadas com diferentes concentrações das proteínas (10, 30, 50 e 100 µg/mL) por 24 horas. Para o controle foram incubadas apenas em tampão HEPES-salina. A viabilidade foi determinada pela capacidade de redução do MTT. Os resultados representam média ± o erro padrão e são expressos como percentuais do controle (considerado 100%). n=3; ****p<0,0001.

Figura 16 – Análise morfológica da linhagem C6 tratada com as lectinas ConBr e rConBr.



Fonte: Elaborado pelo autor. As células foram visualizadas utilizando um microscópio óptico com uma câmera (Eclipse T2000-U, Nikon) acoplada.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi clonada e expressa pela primeira vez a cadeia α da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) em *Escherichia coli*. A proteína foi purificada e obtida na forma ativa. Com relação as propriedades biológicas, a rConBr não foi tóxica contra náuplios de *Artemia* sp. e não reduziu a viabilidade celular de células de glioma da linhagem C6, ao contrário da sua forma tipo selvagem.

REFERÊNCIAS

- ADAR, R.; STREICHER, H.; SHARON, N. Syntesis of soybean agglutinin in bacterial and mamaliam cells. **The Febs Journal**, v. 249, p.684-689, 1997.
- AGILENT TECHNOLOGIES, INC. Protein expression competente cell pack. **Instruction Manual** (Catalog 230246), 2015.
- AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; BENEVIDES, N.M.; FREITAS, A.L.P.; COSTA, F.H.F.; CARVALHO, M.R.; PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extract. **Botânica Marina**, v.35 (6):475-479, 1992.
- ANDRADE, J.L; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.
- ANDRADE, M. L. L. **Lectina recombinante de Dioclea sclerocarpa: produção, caracterização bioquímica e atividade vasorelaxante**. 2015. 109f. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Renorbio, Universidade Federal do Ceará.
- ARRUDA, F.V.S.; MELO, A.A.; VASCONCELOS, M.A.; CARNEIRO, R.F.; BARROSONETO, I.L.; SILVA, S.R.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; SAKER-SAMPAIO, S. Toxicity and binding profile of lectins from the genus *Canavalia* on brine shrimp. **BioMed Research International**, ID 154542, 7p., 2013.
- ASSREUY, A.M., FONTENELE, S.R., PIRES, A.F., FERNANDES, D.C., RODRIGUES, N.V., BEZERRA, E.H., MOURA, T.R., NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 380 (6), 509-21, 2009.
- BANERJEE, J.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **Journal Molecular Biology**, v. 259 (2), p. 281-296, 1996.
- BANEYX, F.; MUJACIC; M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, p.1399–1408, 2004.
- BARAÚNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 160-169, 2006.
- BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*. **Poluição e ecotoxicologia marinha**, 2003.
- BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by

legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M.; SANTOS, W.L.C.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; B.S. CAVADA; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonenses*. **Acta tropica**, v.60, p. 237-250, 1996.

BENTO, C.A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, v. 38, n. 1-2, p. 48-54, 1993.

BEZERRA, G. A., VIERTLMAYR, R., MOURA, T. R., DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., NASCIMENTO, K. S., FIGUEIREDO, J. G., BEZERRA, I., G., TEIXEIRA, C. S., SIMÕES, R. C., NAGANO, C. S., ALENCAR, N. M. N., GRUBER K., CAVADA, B. S. Structural studies of a anti-inflammatory lectins from *Canavalia boliviana* seeds in complex with dimannosides. **Plos one**, v.9 (e97015), 2014.

BEZERRA, W. M.; CARVALHO, C.P.; MOREIRA, R.A.; GRANGEIRO, T.B. Establishment of heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing, **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.216–223, 2006.

BOYD, W. C.; ALMODOVAR L. R.; BOYD, L. G. Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, v.6, p. 82-83, 1966.

BRANCO, A.T.; BERNABÉ, R.B.; SANTOS, F. B.; OLIVEIRA, M.V.; GARCIA, A.B.; SOUZA FILHO, G.A. Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein Expression and Purification**, v.33(1), p.34-38, 2004.

BREDEL, M.; ZENTNER, J. Brain-tumour drug resistance: the bare Essentials. **Lancet Oncology**, v.3, p. 397-406, 2002.

BRINDA, K.V., N. MITRA, A. SUROLIA, S. VISHVESHWARA, Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Sci. Publ. Protein Soc.**, 13 (7) 1735–1749, 2004).

BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.W. **Tumors of the nervous system. Atlas of tumor pathology**. 4th edition. Washington: American Registry of Pathology; 2007.

BURGESS, R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins. **Methods in Enzymology**, v.463, p.260-279, 2009.

CALVETE J. J.; COSTA F. H. F.; SAKER-SAMPAIO S.; MURCIANO, M. P. M. ; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. ; GRANGEIRO, T. B. ; RAMOS, M. V. ; BLOCH JR, C.; SILVEIRA, S. B. ; FREITAS, B. T. ; SAMPAIO, A. H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and molecular Life Sciences**, v. 57, p. 343-350, 2000.

CARVALHO, C. P.S.; ROCHA, C. S.; NEPOMUCENO, D. R.; OLIVEIRA, J. T.A.; GRANGEIRO, T. B. Expression of a *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) precursor in *Picchia pastoris*. **Protein and Peptide Letters**, 15(4), 327-332, (2008).

CARVALHO, P. S. C., CORREIA, T. O., RIBEIRO, S. M. S., SILVA, I. C., OLIVEIRA, J. T. A., GRANGEIRO, T. B. Expression of the *Canavalia brasiliensis* Lectin (ConBr) in Tobacco Plants. **Protein and Peptide Letters**, 13 (10), 1045-1049, 2006.

CAVADA B. S., BARBOSA, T., ARRUDA S., GRANGEIRO T. B., BARRALNETTO M. Revising proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from potential biotechnological use of the *Diocleinae* subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci**, 2001, 2, 123–135.

CAVADA, B.S.; SILVA, M.T.L.; OSTERNE, V.J.S.; PINTO-JUNIOR, V.R.; NASCIMENTO, A.P.M.; WOLIN I.A.V.; HEINRICH, I.A.; NOBRE, C.A.S.; MOREIRA, C.G.; LOSSIO, C.F.; ROCHA, C.R.C.; MARTINS, J.L.; NASCIMENTO, K.S.; LEAL, R.B. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular base of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. In press, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17, p. 32351-6, 2017.

CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during posttranslational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64-67, 1985.

CARRIO, M.M.; VILLAVARDE, A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. **Journal of Biotechnology**, v.96, p. 3–12, 2002.

CAVALCANTE, T. T. A., ROCHA, B. A. M., CARNEIRO, V. A., ARRUDA, F. V. S., NASCIMENTO, A. S. F., SÁ, N. C., NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S., TEIXEIRA, E. H. Effect of Lectins from *Diocleinae* Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, 16, 3530-3543, 2011.

CHAO, Q.M.; CASALONGUE, C.; QUINN, J.M.; ETZLER, M.E. Expression and Partial Characterization of *Dolichos biflorus* Seed Lectin in *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.313, p. 346-350, 1994.

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, P.M.S.; LIMA, V. L.M.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Hindawi (**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**), v. 2017, 22p., 2017.

DE BERNARDEZ, C. E.; SCHWARZ, E.; RUDOLPH, R. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. **Methods in Enzymology**, v.309, p.217-236, 1999.

DERMAN, A.I.; PRINZ, W.A.; BELIN, D.; BECKWITH, J. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Science**, v. 262, p. 1744–1747, 1993.

DINCTURK, H.B.; DUNN, A.J.; JONES, D.H. Recombinant pre-pro-Concanavalin A (jack bean) is stable but of low solubility. **Journal of Biosciences**, v.26, p.635-640, 2001.

EMSLEY, P., COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallograf. D. Biol. Crystallograf.** 60: 2126-2136 (2004).

EVANS, P.R. "Data reduction", Proceedings of CCP4 Study Weekend, **Data Collection & Processing**, 114-122, (1993).

FAHEINA-MARTINS, G. V., SILVEIRA, A. L., CAVALCANTI, B. C., RAMOS, M. V. RAMOS, MORAES, M.O., PESSOA, C., ARAÚJO, D. A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxology in Vitro**, 26, 1161-1169, 2012.

FU, L.L.; ZHOU, C.C.; YAO, S.; YU, J.I.; LIU, B.; BAO, J.K. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The international journal of biochemistry and cell biology**, v. 43, p. 1442-1449, 2011.

GATTI-LAFRANCONI, P.; NATALELLO, A.; AMI, D.; DOGLIA, S. M.; LOTTI, M. Concepts and tools to exploit the potential of bacterial inclusion bodies in protein science and biotechnology. **The FEBS Journal**, v.278, p.2408-2418, 2011.

GEGG, C. V., ROBERTS, D. D., SEGEL, I. H., ETZLER, M. E. Characterization of the adenine binding sites of two *Dolichos biflorus* lectins. **Biochemistry**, 31, 6938-42, 1992.

GEMEINER, P., MISLOVICOVÁ, D., TKÁČ, J., SVITEL, J., PATOPRSTÝ, V., HRABÁROVÁ, E., KOGAN, G., KOZÁR, T. Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, 27 (1), 1-15, 2009.

GOLDBERG, M.E.; RUDOLPH, R.; JAENICKE, R. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. **Biochemistry**, v.30, p.2790-2797, 1991.

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

GONDIM, A.C. Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de leguminosas (Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocelineae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará.

GRANGEIRO, T. B., ALBERT, S., CALVETE, J. J., RAIDÁ, M., URBANKE, C., BARRAL-NETTO, M., CAVADA, B. S. Molecular Cloning and Characterization of ConBr, the Lectin of *Canavalia Brasiliensis* Seeds. **FEBS**, 248 (1), 43-48, 1997.

GUEDES, R.S; QUIRINO, Z. G. M.; GONÇALVES, E. P. Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**, v. 22 (1), p 27-37, 2009.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHULL, J. Codon bias and heterologous protein expression. **Trends Biotechnology**, v.22, p.346-353, 2004.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v.144, 646–674, 2011.

HARAGUCHI, T.; NOMURA, K.; YAGI, F. Cloning and Expression of a Mannose-Binding Jacalin-Related Lectin from Leaves of Japanese Cycad (*Cycas revoluta* Thunb.). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.70, p.2222-2229, 2006.

HAMERLRYCK, T.W., LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; DAO-THI, M.H.; STRECKER, G. IMBERTY, A.; FERNANDEZ, E., WYNS, L., ETZLER, M.E. Carbohydrate binding quaternary structure and a novel hydrophobic binding site two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*. **Journal Molecular Biology**, v. 286, p. 1161-1177. 1999.

HOLANDA F. R., COELHO-DE-SOUSA, A. N., ASSREUY A. M., LEAL-CARDOSO, J. H., PIRES, A. F., NASCIMENTO, K. S., TEIXEIRA, C. S., CAVADA, B. S., SANTOS, C. F. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein and Peptide Letters**, 16(9):1088-92, 2009.

HOLF, P L., BRILL, L. M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Mol Genet Genomics**, 282(1): 1–15 (2009).

JACQUES, A.V.; RIEGERA, D.K.; MAESTRIA, M.; LOPES, M. W.; PERES, T.V.; GONÇALVES, F. M.; PEDRO, D. Z.; TASCA, C. I.; LÓPEZ, M.G.; EGEEA, J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B. S.; LEAL. R.B. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 836-842, 2013.

JIANG, Q.L.; ZHANG, S.; TIAN, M.; ZHANG, S.Y.; XIE, T.; CHEN, D.Y.; CHEN, Y.J.; HE, J.; LIU, J.; OUYANG, L.; JIANG, X. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell Proliferation**, v.48, p.17–28, 2015.

JULIEN, S.; VIDEIRA, P.A.; DELANNOY, P. Sialyl-Tn in cancer: (How) Did we miss the target? **Biomolecules**, v. 2, p.435–466, 2012.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A.M.; VAZQUEZ-MORENO. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, v. 1242, p.1-18, 2017.

LAM, S. K., NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** 89: 45-55 (2011).

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

LANNON, N., VAN DAMME, E. J. M. Lectins domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in plant science**, vol. 5, art. 397, 2014.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v.14, p. 98–105, 1996.

LEHRACH, H.; KESSLER, T.; OGILVIE, L.; SCHÜTTE, M.; WIERLING, C. **Modelling Molecular Mechanisms of Cancer Pathogenesis: Virtual Patients, Real Opportunities**. In *Mechanisms of Molecular Carcinogenesis*; Haybäck, J., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, v. 2, p. 359–374, 2017.

LEITÃO, C.C.G. **Caracterização estrutural parcial e biológica de duas lectinas do gênero *Canavalia***. 2015. 80f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará,

LI, C.Y.; LUO, P.; LIU, J.J.; WANG, E. Q.; LI, W.W.; DING, Z.H.; MOU, L.; BAO, J.K. Recombinant expression of *Polygonatum cyrtoneuma* lectin with anti-viral, apoptosis-inducing activities and preliminary crystallization. **Process Biochemistry**, v.46. p.533-542, 2011.

LI, M.; SU, Z.G.; JANSON, J.C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. **Protein Expression and Purification**, v.33, p.1-10, 2004.

LIU, B.; MIN, M.W.; BAO, J.K. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**. v.5, p. 432-3, 2009.

LORIS R., VAN, W. I., G. H., BEECKMANS, S., DEBOECK, F., WYNS, L., BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. **Journal of Molecular Biology**, v.335, p.1227–1240, 2004.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36. 1998.

LUO, S.; ZHANGSUN, D.; TANG, K. Functional GNA expressed in *Escherichia coli* with high efficiency and its effect on *Ceratovacuna lanigera* Zehntner. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.184, 2005.

MACEDO, M. L. R., OLIVEIRA, C. F. R., OLIVEIRA, C. T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, 20, 2014-2033 (2015).

MAHER, E.A.; FURNARI, F.B; BACHOO, R.M.; ROWITCH, D.H.; LOUIS, D.N.; CAVENEE, W.K.; DEPINHO, R.A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. **Genes Development**, v. 15(11), p.1311-1333, 2001.

MIDDELBERG, A.P. Preparative protein refolding. **Trends Biotechnology**, v. 20(10), p.437-443, 2002.

MIN W. ; DUNN, A. J.; JONES D. H. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. **EMBO J.**, 11(4): 1303–1307 (1992).

MOREIRA, C.G. **Purificação, caracterização físico-química, estrutural e biológica de uma lectina de sementes de *Canavalia villosa* Benth.** 2017. 84f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais), Universidade Federal do Ceará.

MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation and characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, 26 (2), 113-120, 1984.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNKLEY, J.; ELLIOTT, D.J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**, v.7, 35478-89, 2016.

NAGANO, C.S., CALVETE, J. J., BARETTINO, D., PÉREZ, A., CAVADA, B. S., SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochemical Journal**, v.409, p. 417-428, 2008.

NAKAMURA, S.; IKEGAMI, A.; MATSUMURA, Y.; NAKANISHI, T.; NOMURA, K. Molecular Cloning and Expression of the Mannose/Glucose Specific Lectin from *Castanea crenata* Cotyledons. **The Journal of Biochemistry**, v.131, p. 241–246, 2002.

NARA, T.Y.; TOGASHI, H.; SEKIKAWA, C.; KAWAKAMI, M.; YAGINUMA, N.; SAKAGUCHI, K.; MIZUKAMI, F.; TSUNODA, T. Use of zeolite to refold a disulfide-bonded protein. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.68, p. 68-73, 2009.

NOGUEIRA N. A, GRANGEIRO, M. B., CUNHA R. M., RAMOS M. V., ALVES M. A., TEIXEIRA, E. H., BARRAL-NETTO, M., CALVETE J. J., CAVADA B. S., GRANGEIRO, T.B. Expression and Purification Of The Recombinant Conbr (*Canavalia Brasiliensis* Lectin) Produced In *Escherichia coli* Cells. **Protein and Peptide Letters**, 9(1), 59-66, 2002.

NOVAGEN. pET System Manual. TB055 10th Edition Rev. B 0403, 2003.

OLIVEIRA, C., TEIXEIRA, J. A., DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application - the frutalin case study. **Frontiers in Plant Science**, vol. 5, 94-99, 2014.

OLIVEIRA, C.; COSTA, S.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. cDNA Cloning and Functional Expression of the α -d-Galactose-Binding Lectin Frutalin in *Escherichia coli*. **Molecular Biotechnology**, v.43, p.212-220, 2009.

OLIVEIRA, J. C., TEIXEIRA, J. A. DOMINGUES, L. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interactions biosynthetic tools. **Critical Reviews in Biotechnology**. 33 (1): 66-80 (2013).

OSTERNE, V.J.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.; LEITÃO, C.C.; CARNEIRO, R.F.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; VASCONCELOS, M.A.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; BRINGEL, P.H.S. F.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342-3353. 2014.

PEREIRA, S.F. **Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais.** 2005. Dissertação (Programa de Pós-graduação e Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N. Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* HOOK F. 103 f. Tese de doutorado - Universidade Federal do Ceará, 2014.

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

PEUMANS, W. J.; VAM DAMME, E. J. M; BARRE, A. ROUGÉ, P. Plants lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical reviews in plant sciences**, v.17:6, p.572-692, 1998.

PINTO-JÚNIOR, V.R.; DE SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.D.S.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; CAJAZEIRAS, J.B.; VASCONCELOS, M.A.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, A.S.F.; MIGUEL, T.B.A.R.; MIGUEL, E.C.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* mart. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10857-10869. 2013.

PIRES, A. F. ASSREUY, A. M. S., LOPES, CELODÔNIO, E. A. B., N. R., SOARES C. E. A., RODRIGUES, N. V. F. C., SOUSA, P. L, BENEVIDES, R. G., NAGANO, C.S., CAVADA, B. S., LEAL-CARDOSO, J. H., COELHO-DE-SOUZA, A. N., SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundamental e Clinicl Farmacology**, 27 (2), 201-209, 2013.

POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v.24, p. 536-537, 1996.

POVINELLI, K. L.; FINARDI FILHO, F., The multiple functions of plant lectins. **Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.** São Paulo-SP. v. 24: 135-136 (2002).

PRESTON-MARTIN, S.; MACK, W.J. **Neoplasms of the nervous system.** In: SCHOTTENFELD D, FRAUMENI JF. Cancer epidemiology and prevention. 2nd edition. New York: Oxford University Press; 1996. p. 1231-81.

PRZYBYŁO, M.; HOJA-LUKOWICZ, D.; LITYNSKA, A.; LAIDLER, P. Different glycosylation of cadherins from human bladder nonmalignant and cancer cell lines, **Cancer Cell International**, v.2, article 6, 2002.

RAEMAEEKERS RJ, DE MURO L, GATEHOUSE JA, FORDHAM-SKELTON AP. Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. **Eur J Biochem** v. 265: 394-403, 1999.

RANGEL, T. B. A., ROCHA, B. A. M., BEZERRA, G. A., ASSREUY, A. M. S., PIRES, A. F., NASCIMENTO, A. S. F., BEZERRA, M. J. B., NASCIMENTO, K. S., NAGANO, C. S., SAMPAIO, A. H., GRUBER, K., DELATORRE, P., FERNANDES, P. M. B., CAVADA, B.

S. Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl. **Biochimia**. 94: 525-532 (2012).

REZNIKOFF, W.S. The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm. **Molecular Microbiology**, v.6, p.2419–2422, 1992.

RIBEIRO, A.C., MONTEIRO, S.V., CARRAPICO, B. M., FERREIRA, R. B. Are vicilins another major class of legume lectins? **Molecules** 19, 20350–20373 (2014).

RIEGER, D.K.; COSTA, A.P.; BUDNI, J.; MORETTI, M.; BARBOSA, S.G.; NASCIMENTO, K.S., TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v.122, p.53-60, 2014b.

RIEGER, D.K.; CUNHA R.M.; LOPES, M. W.; COSTA, A.P.; BUDNI, J.; RODRIGUES, A.L.; WALZ, R.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. **Journal of Molecular Recognition**, v.12, p.746-754, 2014a.

RINAS, U.; GARCIA-FRUITÓS, E.; CORCHERO, J.L.; VÁZQUEZ, E.; SERAS-FRANZOSO, J.; VILLAVARDE, A. Bacterial Inclusion Bodies: Discovering Their Better Half. Article in press. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017.

ROBERTS, D.D.; GOLDSTEIN, I.J. Adenine binding sites of the lectin from Lima beans (*Phaseolus lunatus*). **The journal of biological chemistry**, v. 258, p. 13820-13824, 1983.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA B.S.; ABREU DE OLIVEIRA, J.T.; DE AZEVEDO ;MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v. 25(8), p.823–826, 1992.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p. 1-17, 2014.

RUDIGER, H.; SIEBERT, H. C.; SOLÍS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH C.W.; DIAZ-MARIÑO, T.; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medicinal Chemistry**, 7, 389-416, 2000.

RUDOLPH, R.; LILIE, H. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**, v.10 p.49-56, 1996.

RUSSI, M. A., VANDRESEN-FILHO, S., RIEGER, D. K. COSTA, A. P., LOPES, M. W., CUNHA, R. M. S., TEIXEIRA, E. H., NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S., TASCA, C. I., LEAL, R. B. ConBr, a Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds, Protects Against Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice. **Neurochem Res.**, 37, 288-297, 2012.

SAHASRABUDDHE, A. A.; GAIKWAD, S. M.; KRISHNASASTRY, M.V.; KHAN, M. I. Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin. **Protein Science**, v.13(12), p. 3264–3273, 2004.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S.K.; SAINI, K.S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 307, p. 249–264, 2008.

SCHEIN, C.H.; NOTEBORN, M.H.M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. **Biotechnology** v. 6, p. 291–294, 1988.

SAKONO, M.; KAWASHIMA, Y.; ICHINOSE, H.; MARUYAMA, T.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Direct refolding of inclusion bodies using reversed micelles. **Biotechnology Progress**, v.20, p. 1783-1787, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. 3rd edition. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 3 volume set, 2344 p., 2001.

SANZ-APARICIO J., HERMOSO J., GRANGEIRO T. B., CALVETE J. J., CAVADA B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Lett**, 405: 114–118, 1997.

SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.; LOSSIO, C.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, H.C.; ARRUDA, F.V.S.; PEREIRA, L.P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & LO Williams. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 3, p. 117-123. 2014.

SAUER, J. Revision of *Canavalia*. **Brittonia**, v.16, n. 2, p.106-181, 1964.

SCHUMACHER, K.; SCHNEIDER, B.; REICH, G.; STIEFEL, T.; STOLL, G.; BOCK, P.R.; BEUTH, J. Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrospective cohort study. **Anticancer Research**, v.23, p. 5081–5087, 2003.

SCHUTTER K.; VAN DAMME, E. J. M. Protein-Carbohydrate Interactions, and Beyond ... **Molecules**, 20, 15202-15205 (2015).

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 8746–8749, 2007.

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

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J. Biol. Chem.** 282: 2753–2764. 2007.

SHARON, N., LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugarspecific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-959, 1972.

SHARON, N., LIS H. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**, 30:59-75, 1995.

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

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. 3. ed. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2003. 454 p.

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

SILVA, F.O.; SANTOS, P.D.; FIGUEIRÔA E.O.; MELO, C.M.; ANDRADE, L.N.J.K.; ARRUDA, F.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA B.S.; PORTO, A.L.; PEREIRA, V.R. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, v. 96(2), p. 276-82, 2014.

SINGH, S. M.; A. K. PANDA. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, p. 303–310, 2005.

SILVA, M.; SILVA, S.; NASCIMENTO, K.; NAGANO, C.; CAVADA, B. Physico-chemical characterization and partial sequence of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lindl seeds. **BMC Proceedings**, v. p. 227, 2014.

SORENSEN, H.P.; MORTENSEN, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v.115, p.113–128, 2005.

SRINIVAS, V.R.; REDDY, G.B.; AHMAD, N.; SWAMNATHAM, C.P.; MITRA, N.; SUROLIA, A. 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 (2), p. 102-111, 2001.

STREICHER, H.; SHARON, N. Recombinant plant lectins and their mutants. **Methods enzymology**, v.363, p.47-77, 2003.

STUDIER, F.W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, p.37–44, 1991.

TATENO H., WINTER. H. C., GOLDSTEIN, I. J. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant Neu5- Acalpha2, 6Galbeta1, 4GlcNAc-specific high-affinity lectin and its mutants from the mushroom *Polyporus squamosus*. **Biochem J**, 382:667–675, 2004.

TEIXEIRA, C. R., CAVASSANI, K. A., GOMES, R. B., TEIXEIRA, M. J., ROQUE-BANDEIRA, M. C., CAVADA, B. S., SILVA, J. S., BARRAL, A., BARRAL-NETO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Elsevier**, 24 (15), 3001-3008, 2006.

UPADHYAY S. K., SAURABH S., RAI P., SINGH, R., CHANDRASHEKAR, K., VERMA, P. C., SINGH, P. K., TULI, R. SUMO fusion facilitates expression and purification of garlic leaf lectin but modifies some of its properties. **Journal of Biotechnology**, 146:1-8, 2010.

VALLEJO, L. F.; RINAS, U. Strategy for recovery of active protein through refolding of bacterial inclusion body proteins. **Microbial Cell Factories**, v.3, p. 2–12, 2004.

VAN DAMME, E. J. M., FOUQUAERT, E., LANNOO, N., VANDENBORRE, G., SCHOUPE, D., PEUMANS, W. J. “Novel concepts about the role of lectins in the plant cell,” in *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3*, Vol. 705, ed. A. M. Wu (New York: Springer), 295–324, 2011.

VAN DAMME, E. J. M., LANNOO, N., PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Adv. Bot. Res.** 48, 107–209, 2008.

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

VAN P.J.; BROEKAERT W.F.; GOLDSTEIN I.J.; PEUMANS W.J. Hevein: a antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183(2), p. 258-264.

VANDENBORRE, G., SMAGGHE, G., VAN DAMME, E. J. M. Plant lectin as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, 72: 1538-1550 (2011).

VANDENBORRE, G.; LANNOO, N.; SMAGGHE, G.; DANIEL, E.; BREITE, A.; SOIN, T.; JACOBSEN, L.; VAN DAMME, E. J. M; SATO, J. D. Cell-free expression and functionality analysis of the tobacco lectin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.44(7), p.228-235, 2008.

VAREJÃO, N., ALMEIDA, M. D. A. S, DE CICCIO, N. N., ATELLA, G. C., COELHO, L. C., CORREIA, M. A., FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochim Biophys Acta** 1804: 1917–1924 (2010).

VARKI, A.; KANNAGI, R.; TOOLE, B. P. **Glycosylation changes in cancer, in Essentials of Glycobiology**, Eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2nd edition, 2009.

VASCONCELOS, M. A., ARRUDA, F. V. S., CARNEIRO, V. A., SILVA, H. C., NASCIMENTO, K. S., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S., TEIXEIRA, E. H., HENRIQUES, M., PEREIRA, M. O. Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **BioMed Research International**, ID 365272, 2014.

VASCONCELOS, M.A.; CUNHA, C.O.; ARRUDA, F.V.; CARNEIRO, V.A.; MERCANTE, F.M.; NASCIMENTO- NETO, L.G. ;SOUSA, G.S.; ROCHA, B.A.; TEIXEIRA, E.H., CAVADA, B.S.; SANTOS, R.P. Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) is a

valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro. **Molecules**, v.17(5), p. 244-54, 2012.

VASINA, J.A.; BANEYX, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: A comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. **Protein Expression and Purification**, v. 9, p. 211–218, 1997.

VEIGA, L. F. ; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.). **Métodos em Ecotoxicologia Marinha**. São Paulo, p. 111-112, 2002.

VERA, A.; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N.; ARÍS, A.; VILLAVARDE, A. The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. **Biotechnology Bioengineering**, v. 96, p. 1101–1106, 2007.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Curr. Opin. Struct. Biol**, 9, 707–714(1999).

WANG, J.L.; EDELMAN, G.M. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. I. monovalent, divalent, and tetravalent derivatives stable at physiological pH. **Journal of biological Chemistry**, v. 253, p. 3000-3007, 1978.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of a lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review Biochemistry**, v. 65 p. 441-473, 1996.

YAMAGUCHI, H.; MIYAZAKI, M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. **Biomolecules**, v.4(1), p. 235–251, 2014.

ZAMORA-CABALLERO, S.; PÉREZ, A.; SANZ, L.; BRAVO, J.; CALVETE, J.J. Quaternary structure of *Dioclea grandiflora* lectin assessed by equilibrium sedimentation and crystallographic analysis of recombinant mutants. **FEBS Letters**, v. 589(18), p. :2290-2296, 2015

ZWIERZINA, H.; BERGMANN, L.; FIEBIG, H.; AAMDAL, S.; SCHOFFSKI, P.; WITTHOHN, K.; LENTZEN, H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: a potential anticancer drug. **European Journal of Cancer**, v.47(10), p.1450-1457, 2011.