



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

CÁSSIA FERREIRA RODRIGUES

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE UMA LECTINA DA SECREÇÃO DA GLÂNDULA
PAROTÓIDE DE *Rhinella schneideri*

FORTALEZA

2018

CÁSSIA FERREIRA RODRIGUES

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE UMA LECTINA DA SECREÇÃO DA GLÂNDULA
PAROTÓIDE DE *Rhinella schneideri*

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

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

FORTALEZA

2018

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)

R612e Rodrigues, Cássia Ferreira.

Estudos Estruturais de uma Lectina da Secreção da Glândula Paratóide de *Rhinella schneideri* / Cássia Ferreira Rodrigues. – 2018.

49 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

1. Anfíbio. 2. Caracterização Estrutural. 3. Lectina. I. Título.

CDD 660.6

CÁSSIA FERREIRA RODRIGUES

ESTUDOS ESTRUTURAIS DE UMA LECTINA DA SECREÇÃO DA GLÂNDULA
PAROTÓIDE DE *Rhinella schneideri*

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

Aprovada em: 30 / 08 / 2018

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Cleverton Diniz Teixeira de Freitas
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por renovar todos os dias as minhas forças, pela oportunidade de ter uma vida cheia de novas experiências, pelos momentos bons e ruins, pelos amigos e pela motivação diante dos obstáculos.

A minha mãe Joana, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

Ao meu pai Celso, pelo carinho, compreensão e permanecer sempre do meu lado.

Aos meus irmãos, Sales e Clélia, por todo o apoio de sempre.

Ao meu orientador, Bruno Anderson Matias da Rocha, pela fé demonstrada em mim. Pelo aprendizado e pelo exemplo que é como pessoa e como pesquisador.

Ao professor Rômulo Farias, pela imensa contribuição neste trabalho, pela paciência, pelos conselhos e pela amizade.

Ao Eduardo Salviano, por toda disponibilidade para me ajudar ao decorrer desse trabalho, pelos conselhos e, principalmente pela paciência. Muito obrigada!

Aos professores Cleverton Diniz, Jefferson Soares, Celso Nagano, Alexandre Holanda e André Luis, pela contribuição dada para esse trabalho.

À minha amiga Bianca, pelo apoio, amizade e ajuda na realização deste trabalho. Obrigada pelas palavras de conforto, e por sempre torcer e ficar feliz com as minhas conquistas.

A minha amiga e prima Deise, por todo o apoio e companheirismo durante mais de dez anos.

A minha amiga Patrícia (Pupila), por todo o companheirismo e ajuda durante esses anos.

A todos os integrantes do LaBiC. Em especial, aos meus amados Léo, Will, Danilo (Vida), Juh e Renally pelos momentos compartilhados, pela ajuda, os sorrisos mesmo diante de situações difíceis e pela força. Obrigada!

Aos meus colegas de mestrado: Alexandre, Messias, Rafael, Yasmine e Cecília pelos momentos de descontração durante o curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por formentar o desenvolvimento desse projeto.

A todos que contribuíram, seja de forma direta ou indireta, meu muito obrigada!

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

RESUMO

As lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de reconhecer carboidratos de forma específica, e interagir de maneira reversível, sem alterar suas estruturas. As lectinas vêm sendo estudadas por mais de um século, sendo encontradas tanto em organismos vegetais como em animais, distribuídas no citoplasma, no núcleo e nas membranas celulares das mais diversas células animais. As lectinas animais são classificadas em famílias, de acordo com a função que exercem, além de suas características funcionais e estruturais. Os anfíbios têm sido pouco estudados quanto a presença e distribuição de lectinas nas secreções de suas mais diversas glândulas. O objetivo deste trabalho foi determinar aspectos estruturais de uma proteína ligante a galactose e seus derivados presente na secreção da glândula paratóide do sapo *Rhinella schneideri*. Espécimes de *R. schneideri* foram coletados na cidade de Floriano, Piauí. A proteína foi isolada através de métodos clássicos de química de proteínas. É uma proteína heterogênea, pois apresentou subunidades com peso molecular distinto, com afinidade por 4-nitrofenil- α -galactosídeo, α -lactose, β -lactose, lactulose e mucina tipo 2. Através de cromatografia de exclusão molecular, a proteína apresentou duas subunidades com peso molecular diferente, 64 kDa e 40 kDa. O conteúdo de estrutura secundária foi analisado por dicroísmo circular. A proteína é constituída principalmente de folhas β , como já foi relatado para outras lectinas animais específicas de galactosídeos. A proteína em sua forma nativa, apresentou 62,5°C como temperatura de melting, evidenciando que a mesma possui estabilidade térmica diante de altas temperaturas. A proteína foi submetida a uma clivagem proteolítica. Os peptídeos de cada subunidade foram sequenciados parcialmente, e não apresentaram similaridades com qualquer das proteínas disponíveis nos bancos de dados, mas os peptídeos se sobrepõem quando relacionado uma subunidade com a outra, evidenciando que a proteína é heterogênea em sua forma pura, formada pelas subunidades. Diante do exposto, uma proteína específica de galactose e derivados foi isolada da secreção das glândulas paratóides de *R. schneideri* e parcialmente caracterizada quanto a estrutura.

Palavras-chave: Anfíbio. Caracterização estrutural. Lectina.

ABSTRACT

Lectins are defined as proteins or glycoproteins that have at least one non-catalytic domain able to recognize carbohydrates and interact with them in a reversible and specific way. Lectins have been studied for more than a century and are present in various organisms such as plants and animals, and have been found in the cytoplasm, nucleus and cell membranes of the most diverse animal cells. Animal lectins are classified into families, according to their function structural characteristics. The presence and distribution of lectins in the secretions of Amphibians` most diverse glands have been little studied. The objective of this work was to determine structural aspects of a galactose binding protein and its derivatives present in the secretion of the paratoid gland of the frog *Rhinella schneideri*. Specimens of *R. schneideri* were collected in the city of Floriádo, Piauí. Protein was isolated by classical methods of protein chemistry. This lectin is a heterogeneous protein because it has subunits of different molecular weight with affinity for 4-nitrophenyl- α -galactoside, α -lactose, β -lactose, lactulose and mucin type 2. Through size exclusion chromatography the protein presented two subunits with different molecular weight, 64 kDa and 40 kDa. The secondary structure content was analyzed by circular dichroism. The protein consists mainly of β -sheets, as has been reported for other animal lectins. The protein`s native form preseted to 62.5°C as melting temperature, evidencing that it has thermal stability in front of high temperatures. The protein was subjected to proteolytic cleavage. The peptides of each subunit were partially sequenced, and showed no similarities to any of the proteins available in the databases, but the peptides overlap when one subunit is related to the other, evidencing that the protein is heterogeneous, formed by the subunits. According to the above, a protein specific for galactose and derivatives was isolated from the secretion of the paratoid glands of *R. schneideri* and partially characterized as the structure.

Keywords: Amphibian. Structural characterization. Lectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Subfamílias de galectinas	16
Figura 2 – Topologia das galectinas.	17
Figura 3 – Funções intracelular e extracelular das galectinas.	18
Figura 4 – Sapo <i>R. schneideri</i>	21
Figura 5 – Cromatografia de troca aniônica em DEAE 5PW.....	27
Figura 6 – Eletroforese da lectina em gel de poliacrilamida.	30
Figura 7 – Cromatografia de exclusão molecular em matriz BEH SEC.	31
Figura 8 – Espectro do dicroísmo circular	31
Figura 9 – Temperatura de melting da lectina.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de purificação da lectina	27
Tabela 2 – Efeito inibidor dos carboidratos na atividade hemaglutinante da lectina	29
Tabela 3 – Sequência dos peptídeos da lectina.....	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
2.1	Lectinas	11
2.1.1	<i>Lectinas animais</i>	12
2.1.2	<i>Galectinas</i>	15
2.2	Classe Amphibia	19
2.2.1	<i>Rhinella schneideri</i>	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	Coleta e extração	23
4.2	Purificação da lectina	23
4.3	Dosagem de proteínas totais solúveis	23
4.4	Preparo dos eritrócitos, atividade hemaglutinante e atividade inibitória	24
4.5	Eletroforese e estimativa da massa molecular	24
4.6	Cromatografia de exclusão molecular e estimativa da massa molecular nativa ...	25
4.7	Dicroísmo circular	25
4.8	Digestão proteolítica, extração e sequenciamento dos peptídeos	26
5	RESULTADOS	27
5.1	Purificação da lectina	27
5.2	Atividade hemaglutinante e inibição	28
5.3	Caracterização Bioquímica	28
5.4	Sequenciamento dos peptídeos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

Uma característica da maioria das proteínas é sua capacidade de ligar-se especificamente a diversas outras moléculas (SHARON; LIS, 2004). De acordo com Kilpatrick (2000), as lectinas animais são proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e ligar-se de maneira específica a carboidratos, sem alterar a estrutura dos mesmos, e não pertencem a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas.

Em 1853, Charcot e Robin descreveram a primeira lectina ao observar estruturas semelhantes a cristais presentes em tecidos patológicos. Estes cristais eram observados, principalmente, em eosinófilos, macrófagos e em escarros de indivíduos com asma brônquica por isso foram considerados como marcadores de doenças do tipo leucemia mielóide aguda e asma. Essas estruturas cristalinas, que possuíam formas hexagonais e bipiramidais, ficaram conhecidas como cristais proteicos de Charcot-Leyden e se tratava de uma proteína em sua forma pura, a galectina-10 (CHARCOT et al., 1853; LEYDEN, 1872; ACKERMAN et al., 1993).

As galectinas, também denominadas como lectinas do tipo S, constituem uma das principais famílias de lectinas animais. As mesmas possuem alta especificidade por β -galactosídeos, sendo considerada uma característica marcante desta família (BARONDES et al., 1994). Essas proteínas vêm sendo amplamente estudadas, principalmente devido a sua afinidade por receptores presentes em células neoplásicas, e exercem diversas funções como induzir a apoptose, regular a progressão tumoral através da modulação do ciclo celular e metástase tumoral, que variam de acordo com a sua estrutura e localização (FU-TONG; RABINOVICH, 2005).

Em 2016, Sousa-Filho e colaboradores realizaram um estudo no qual analisaram o perfil proteico da secreção da glândula paratóide do sapo *Rhinella schneideri*, visto que a informação proteômica é limitada quando se trata dessa espécie. Através da análise dos dados obtidos na espectrometria de massas, observaram, dentre outras proteínas, a presença de uma proteína ligante a carboidrato, uma galectina.

Para um maior esclarecimento sobre a importância deste trabalho, a revisão da literatura irá abordar aspectos sobre o estudo das lectinas, em especial as lectinas animais com ênfase em galectinas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Lectinas

Em 1853, Charcot e Robin descreveram a primeira lectina ao observar estruturas semelhantes a cristais presentes em tecidos patológicos. Mas a primeira atividade lectínica foi observada apenas em 1860, quando S. Weir Mitchell estava trabalhando com veneno da serpente *Croatalus durissus*. E apenas em 1888, obtiveram uma fração oriunda do extrato de *Ricinus communis*, que além de ser tóxica apresentou aglutinação (STILLMARK, 1888).

A partir do século XX, foi relatada a presença de lectinas em diferentes organismos e assim algumas aglutininas foram purificadas, mesmo não sendo vistas como objeto de estudo relevante (SHARON; LIS, 2004).

Em 1960, foi relatado que a lectina PHA isolada das sementes de *Phaseolus vulgaris* estimulava os linfócitos a entrarem em mitose (NOWELL, 1960). Alguns anos depois, Aub e colaboradores relataram que WGA (*wheat germ agglutinin*) aglutinava preferencialmente células malignas (AUB et al., 1965), evidenciando que nas neoplasias ocorriam modificações nos padrões de glicosilação da superfície celular, e assim as lectinas foram se tornando mais relevante (SHARON; LIS, 2004).

Em 1954, o termo lectina foi empregado pela primeira vez por Boyd e Shapleigh, quando observaram que algumas aglutininas de plantas eram capazes de diferenciar grupos sanguíneos e aglutinar algumas células de maneira efetiva. A partir de então, essa classe de proteínas vem sendo definida por diversos autores baseados em suas observações. Mas a definição mais aceita até o momento foi proposta em 1995 por Peumans e Van Damme, onde diziam que as lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune com pelo menos um sítio de ligação não catalítico que reconhece e interage de forma reversível com carboidratos específicos.

A definição postulada por Peumans e Van Damme é aceita por estudiosos de lectinas vegetais. Quando se trata de lectinas animais, esta definição é rejeitada pelo fato de considerar as lectinas como proteínas de origem não imune, pois as lectinas fazem parte do sistema imune dos animais, seja de forma indireta quando atuam no gerenciamento do tráfego de leucócitos ou na transmissão de sinais entre células, ou de forma direta como primeira linha de defesa (KILPATRICK, 2000). Estruturalmente, as lectinas são distintas dos anticorpos, mas existem imunoglobulinas que se ligam especificamente a carboidratos e são classificados como uma família a parte de lectinas (GALILU, 1993; KILPATRICK, 2000).

Em 2000, Kilpatrick definiu lectinas como proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos de maneira específica, sem alterar a estrutura dos mesmos, e sem pertencer a nenhuma das principais classes de imunoglobulinas. Esta definição é considerada a mais adequada quando se refere às lectinas animais.

As lectinas têm sido isoladas de todas as classes e famílias de seres vivos, como plantas, algas, vertebrados e invertebrados (GOLDSTEIN et al., 1980; RANATAPO; NGAMJUNYA PORN; CHU LAVATNATOL, 2001; FERNANDES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2017; CARNEIRO et al., 2017; MARQUES et al., 2017; OSTERNE et al., 2017; CHAVES et al., 2018), apresentam diversas formas e tamanhos, além de desempenhar papéis biológicos importantes (GALLEGO DEL SOL et al., 2005). Dentre as funções biológicas, são descritos na literatura: eventos de reconhecimento célula-célula, no processo de fertilização; simbiose; fenômenos relacionados à defesa celular; são ativamente envolvidas no transporte de carboidratos e fixação destes nos tecidos; elas também facilitam as ligações entre células e componentes da matriz extracelular (JIANG et al., 2006; SILVA, 2008; YOON et al., 2008; BULGAKOV *et al.*, 2011; HAN et al., 2012; CHANG et al., 2017).

2.1.1 Lectinas animais

Em 1853, a primeira lectina animal foi relatada, e a partir de então, os estudos com lectinas animais vêm se intensificando e, as mesmas têm sido encontradas no citoplasma, no núcleo, associadas às membranas de diversas organelas, e desempenham diversas funções que variam de acordo com o organismo de origem (LEHMANN et al., 1990). Há relatos de que as lectinas presentes nas membranas atuam como receptores na seletividade e adesão celular (ROSEN, 1989; LEHMANN et al., 1990), participam também, da indução de apoptose (BARBOSA et al., 2001), possuem propriedades anti-inflamatória e pró-inflamatória (FREIRE et al., 2003; ALENCAR et al., 2005), possuem efeito vasodilatador (ASSREUY et al., 2009), e ainda atuam no sistema imune do organismo (ROSEN, 1993; CASH et al., 2006).

A classificação das lectinas animais é baseada em sua função e características físico-químicas (KILPATRICK, 2000). São classificadas em 19 famílias distintas, onde cinco destas tem sido mais estudadas (CARNEIRO, 2013).

As anexinas constituem uma família de lectinas que são dependentes de Ca^{2+} e ligantes de fosfolipídeos (ISHITSUKA et al., 1998). Elas atuam na inibição da fosfolipase A2 e coagulação do sangue, regulação do tráfego de membrana e exocitose, ligação a proteínas do

citoesqueleto, atividade de canal de membrana e sinalização intracelular com um substrato de quinase (RAYNAL; POLLARD, 1994).

Calnexinas, também chamada de calreticurina, são proteínas que compreendem um sistema de chaperonas moleculares do retículo endoplasmático e que atuam na dobramento de glicoproteínas recém-sintetizadas. Possuem alta especificidade por glicoproteínas e um sítio de ligação para ATP, Ca^{2+} e ERp57, uma enzima que catalisa a formação de pontes de sulfeto (WILLIAMS, 2006).

Outra família de lectinas animais são as ficolinas, que são proteínas solúveis constituintes do sistema imune inato. Mas essa classificação de ficolinas como lectinas é controversa, pois o domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC), pode ligar-se tanto a carboidratos quanto a moléculas não glicídicas, como *N*-acetilglicina, devido o DRC ser específico para grupos acetil (DRICKAMER, 1999). As ficolinas humanas representam a primeira linha de defesa do sistema imune. Ligam-se a superfície de patógenos via interação com os carboidratos e desencadeiam a ativação de proteases serínicas que estão associadas a proteínas ligantes de manose, levando a eliminação do patógeno (ENDO et al., 2011).

As lectinas do tipo C, constituem uma superfamília de lectinas que contem um domínio lectínico do tipo C (CTLD - *C – type lectin like*). A estrutura do CTLD consiste de um *loop* duplo estabilizado por duas pontes de sulfeto altamente conservadas localizadas na base do segundo *loop* (ZELENSKY; GREADY, 2005).

As lectinas de teleósteos encontradas no muco secretado pelos peixes *Platycephalus indicus* e *Lophimus setigerus* são classificadas como Kaliklectinas. As mesmas possuem estruturas semelhantes às cadeias pesadas das calicreínas plasmáticas humana, que são proteases serínicas encontradas no plasma e tecido de mamíferos, e aos fatores de coagulação XI presentes nos mamíferos (TSUTASUI et al., 2011).

A lectina isolada de *Helix promatia* (HPA), a lectina do octocoral *Sinularia lochmodes* e as discoidinas isoladas de *Dictyostelium discoideum*, são exemplos de lectinas do tipo H, que possuem cerca de 30% de similaridade uma com a outra e ainda possuem afinidade por galactose (HAMMARSTROM et al., 1997).

As lectinas do tipo I, englobam as imunoglobulinas que são ligantes do ácido siálico e, por isso podem ser denominadas também de Siglecs (*Sialic acid-binding Ig-type lectins*). A maioria das siglecs é expressa em células do sistema hematopoiético, mas variam bastante quanto ao seu padrão de expressão, pois algumas são restritamente expressas enquanto outras são expressas por uma gama de células. As funções das siglecs variam de acordo com sua

especificidade por ácido siálico, visto que existe diferença significativa entre cada uma (VASTA; AHMED, 2008).

As lectinas do tipo F-box são um dos principais componentes do sistema de regulação das ubiquitinas. Estão relacionadas com a regulação, localização e atividade de proteínas citoplasmáticas mal formadas (DRICKAMER, 1999).

São classificadas como lectinas do tipo L aquelas que possuem apenas um DRC com alta similaridade com o DRC de lectinas de leguminosas. Mas as lectinas animais são proteínas de membrana que atuam no sistema de secreção do retículo endoplasmático, diferente das lectinas de leguminosas que são proteínas solúveis (ITIN et al., 1996). Vasta e Ahmed (2008) relataram que a maioria dos grupos de lectinas do tipo L atuam no tráfego e secreção de glicoproteínas.

As lectinas do tipo quitinases, também denominadas de Qui-lectinas, são proteínas solúveis e intracelulares. A diferença característica dessas proteínas com as quitinases verdadeiras é a ausência dos resíduos catalíticos (DRICKAMER, 1999).

A família de lectinas que possui estrutura altamente semelhante com as proteínas tóxicas, como ricina e abrina, oriundas de vegetais, é denominada de lectinas do tipo R (CARNEIRO, 2013).

As lectinas do tipo M são aquelas que apresentam grande similaridade com as α -manosidases, porém não possuem os resíduos para catálise e uma ponte de sulfeto que é essencial para a atividade enzimática (DRICKAMER, 1999).

Vasta e Ahmed em 2008 relataram que a principal característica das lectinas do tipo P é a presença de um DRC com afinidade para manose-6-fosfato (M6P), e por isso são designadas como “tipo P”.

As lectinas do tipo X são proteínas de alto peso molecular, dependentes de Ca^{+} e não apresentam um DRC do tipo C. A primeira lectina relatada dessa família foi identificada nos oócitos do sapo *Xenopus laevis*, ligante de galactose, com 45 kDa, que forma oligômeros de até 500 kDa (LEE et al., 1997).

As lectinas animais que possuem especificidade por L-ramnose e D-galactose são classificadas como lectinas ligantes de ramnose (KILPATRICK, 2002). São comumente encontradas em peixes ósseos (HOSONO et al., 1993), ouriços e ascídias (OZEKI et al., 1993; NAGANUMA et al., 2003; GASPARINI et al., 2008) e em diversos tecidos, de acordo com Tateno et al. 2002.

As proteínas animais que apresentam uma estrutura anelar semelhante às proteínas reativas C e os componentes séricos amilóides P, duas classes de proteínas humanas, que

possuem cinco subunidades idênticas, são constituintes de uma pequena família de lectinas denominada pentraxinas (STEELE; WHITEHEAD, 1994; GEWURZ; ZHANG; LINT, 1995).

As tachylectinas são proteínas animais que possuem seis domínios repetidos contendo de 33 a 38 resíduos de aminoácidos, e possuem habilidade de ligar-se a lipopolissacarídeos, o que está relacionado com a sua função de defesa (KILPATRICK, 2002).

As lectinas do tipo F são encontradas em vertebrados e invertebrados e possuem alta afinidade por fucose e um motivo de ligação a Ca^{2+} . Diante da resolução da estrutura tridimensional da lectina de enguia europeia, revelou um novo tipo de *fold* de lectinas, o *fold* tipo F. O mesmo consiste de um sanduíche β composto por duas folhas β de três e cinco fitas antiparalelas (BIANCHET; ODOM, 2002).

As galectinas, também denominadas como lectinas do tipo S, são proteínas galactose específicas, que conservam elementos estruturais e resíduos chaves do DRC (HIRABAYASHI et al., 2002). São amplamente estudadas e encontradas em diversos organismos tais como: peixes, ratos, humanos, ratazanas (HIRABAYASHI et al., 2002; ZHOU et al., 2016; ARASU et al., 2017), e até mesmo na secreção da glândula de anuros, como foi relatado em 2016 por Sousa-Filho et al.

2.1.2 Galectinas

Uma família de lectinas animais foi inicialmente denominada de lectinas do tipo S devido a presença de grupos tíóis livres. Algumas dessas lectinas depende de grupos tíóis reduzidos para exercer a sua função e outras não são dependentes. No entanto, essa característica pertence também as lectinas do tipo C, tipo I, entre outras. Diante disso, o tipo S passou a ser considerado como característica dessas lectinas (DRICKAMER, 1988; DODD; DRICKAMER, 2001).

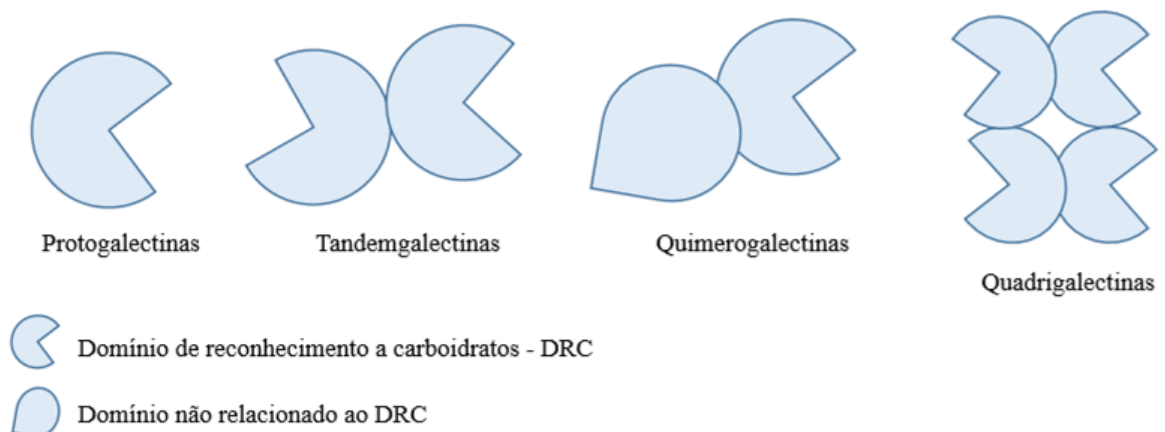
Então em 1994, o termo galectina foi introduzido para designar essa família de lectinas animais. A nomenclatura se deve a alta especificidade que a maioria delas possuem por β -galactosídeos não redutores pela bolsa de ligação primária (BARONDES et al., 1994). O estudo detalhado da sua especificidade para oligossacarídeos pelo local de ligação alargado revelou que os diferentes membros da família de galectina apresentam diferenças significativas nas suas propriedades de reconhecimento. Além disso, o N-terminal e C-terminal dos DRC das galectinas de repetição em tandem, exibem especificidades semelhantes mas ainda distintas para oligossacarídeos (DI LELLA et al., 2011; VASTA et al., 2015).

As galectinas exibem uma sequência de reconhecimento de carboidratos permanente, constituída por aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos altamente conservados, dos quais apenas sete são idênticos em todas as galectinas, sendo considerada uma condição de toda galectina (COOPER, BARONDES, 1999). E, de acordo com a estrutura e quantidade de DRCs por cadeia polipeptídica, as galectinas são classificadas em diferentes subfamílias: as protogalectinas quando possuem um DRC por subunidade, que pode formar homodímeros; em quimerogalectinas quando possuem um domínio lectínico e outro de reconhecimento a colágeno (não lectínico); em tandemgalectinas, as quais possuem dois DRCs homólogos na mesma cadeia polipeptídica (KILPATRICK, 2002), e observou-se que galectinas presente em moluscos apresentaram quatro DRCs por subunidade, sendo classificadas como quadrigalectinas (SONG et al., 2011; TASUMI; VASTA, 2007 *apud* CARNEIRO, 2017) (FIGURA 1).

Para compreensão das interações que ocorrem entre a proteína e o seu ligante (carboidrato) e, conseqüentemente a função que exerce, é importante a resolução das estruturas dessas proteínas. Baseado na análise estrutural dos membros dessa família, observou-se que os DRCs das galectinas se enovela em um arranjo β -sanduíche disposto em uma topologia *jelly-roll* típica de galectinas (LÓPEZ-LUCENDO et al., 2004) (FIGURA 2).

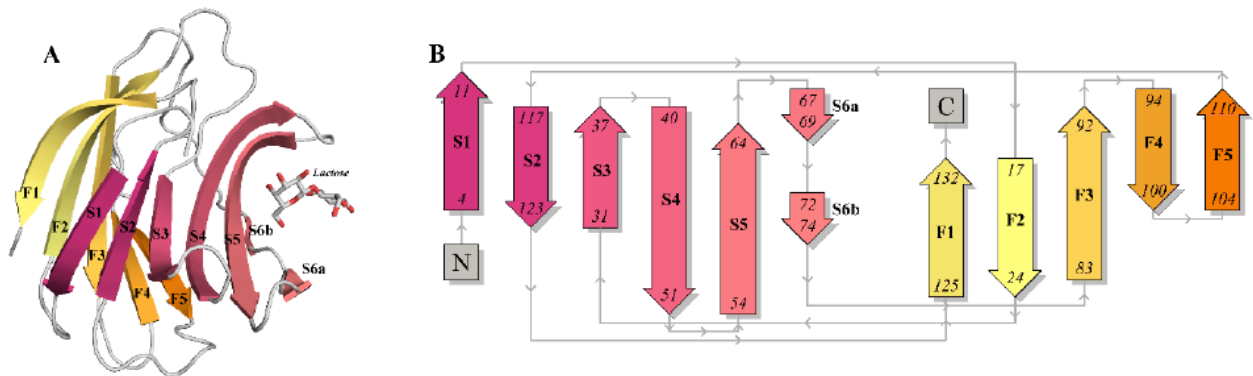
As estruturas primárias de galectinas não tem semelhanças com as estruturas de outras classes de proteínas. Enquanto, a estrutura terciária é bastante conservada entre os membros da família, e a quartenária pode diferir de acordo com a função e o ligante específico de cada galectina. (CUMMINGS; LIU, 2009).

Figura 1 - Subfamílias de galectinas.



Adaptado de HIRABAYASHI; KASAI, 1993 *apud* CARNEIRO, 2017.

Figura 2 - Topologia das galectinas.



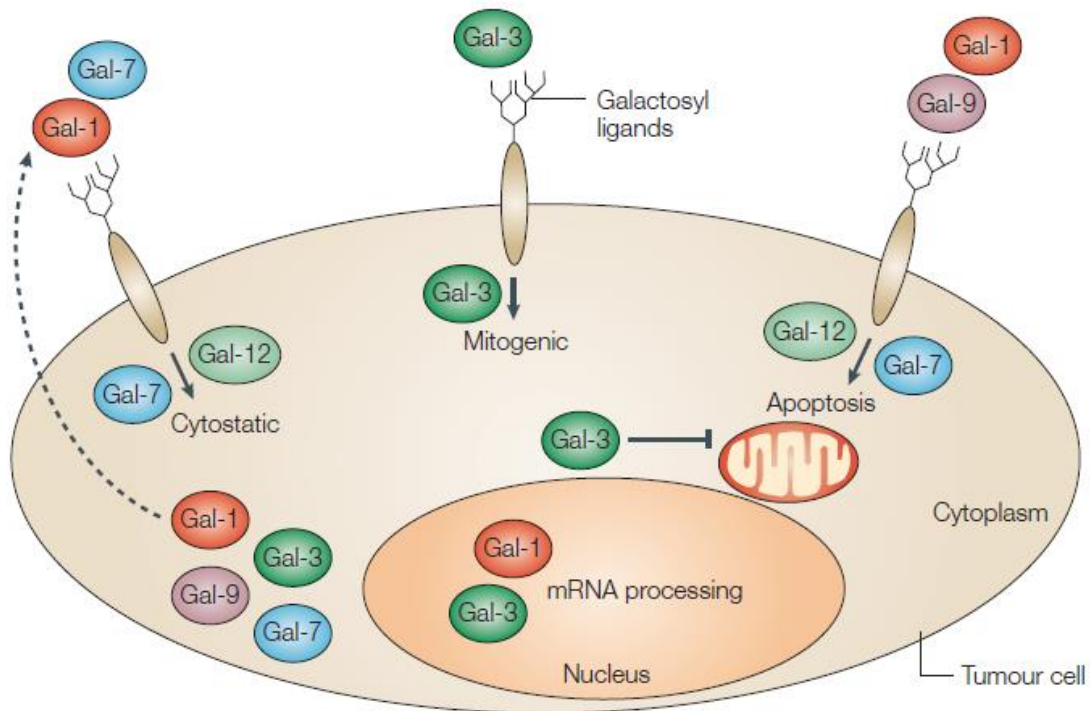
A: Representação em *cartoon* do monômero da estrutura cristalográfica da galectina-1 humana em complexo com a lactose. PDB: 1GZW. B: Representação da topologia da galectina-1 humana pelo gráfico gerado pelo banco de dados do PDBsum (BONALUMI, 2014).

As mesmas podem desempenhar diversos papéis em várias respostas biológicas, bem como a regulação do crescimento celular, na resposta inflamatória, na manutenção da homeostase imune, no desenvolvimento, diferenciação, adesão célula-célula, metástase tumoral, regula a expressão e secreção de citocinas e crescimento e imunossupressão de tumores (DANGUY; CAMBY; KISS, 2002; FARHAD; ROLING; REDMOND, 2018; GORDON-ALONSO; BRUGER; BRUGGEN, 2018).

As galectinas ligam-se a membranas ou receptores das células. Devido a essa característica de ligação e principalmente especificidade, estudos demonstram que as galectinas podem ser utilizadas no diagnóstico e terapia do câncer por se ligarem as membranas das células tumorais ou aos seus receptores, causando citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento das células tumorais, além de atuar no processo de splicing do mRNA (GONZÁLEZ DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; ZHU et al., 2013; LABRIE et al., 2015) (FIGURA 3). Os efeitos que as galectinas podem exercer sobre as células tumorais irão depender da fonte e da concentração destas moléculas, além da linhagem celular ou do tipo de câncer a ser tratado (FERRIZ-MARTINEZ; TORRES-ARTEAGA; BLANCO-LABRA, 2010).

As galectinas podem regular a apoptose, como é o caso das galectinas 1 e 9 que induzem a apoptose de células tumorais quando adicionadas de forma exógena a célula, e as galectinas 7 e 12 também promovem apoptose, mas através de mecanismos intracelulares (FU-TONG; RABINOVICH, 2005; BIRON-PAIN et al., 2013; KAUR et al., 2016).

Figura 3 - Funções intracelular e extracelular das galectinas.



Adaptado de Fu-Tong; Rabionovich, 2005.

A expressão da galectina-3 em tecidos normais de próstata, hiperplasia benigna da próstata e adenocarcinoma prostático, foi avaliada e observou-se que houve uma redução significativa da expressão da galectina-3 no adenocarcinoma. Em contrapartida, houve uma maior expressão dessa proteína nos fragmentos de tecidos normais quando comparados à contraparte maligna. De acordo com os dados obtidos deste estudo, os autores consideraram que a diminuição na expressão da galectina-3 está associada à progressão do câncer de próstata (ARAÚJO-FILHO et al., 2006). Sua expressão está relacionada ao surgimento de tumores e metástases (ALVES et al., 2010).

As galectinas, nas células tumorais, tem se tornado alvo para novas terapias antineoplásicas, devido as suas numerosas funções, principalmente o controle de adesão e interação celular, efeitos na proliferação e na apoptose celular e propriedades imunossupressivas. Observando assim, seu papel crucial na progressão tumoral (SCHULKENS; GRIFFIOEN; THIJSEN, 2012; THIJSEN et al., 2014).

As galectinas têm sido encontradas em diversos organismos, distribuídas em diversas células. Já foi relatado a presença das mesmas em animais marinhos, como moluscos e peixes; em diversas células humanas; em anfíbios (OZEKY et al., 1991; UCHIYAMA et al., 1997; SONG et al., 2011; TASUMI; VASTA, 2007, *apud* CARNEIRO, 2017; CHANG et al. 2017), sendo

relatada, também na secreção da glândula paratóide do sapo *R. schneideri* (SOUSA-FILHO et al., 2016).

2.2 Classe Amphibia

Os anfíbios constituem um grupo de vertebrados que possuem como principal característica a morfologia, bioquímica e fisiologia da pele muito complexa, isso devido à utilidade para a sobrevivência dos mesmos, pois ela atua no processo respiratório, na defesa contra microrganismos, na regulação de água, na excreção, controle de temperatura, reprodução, entre outras (CLARK et al., 1994; CLARKE, 1968; LAI et al., 2002).

A classe Amphibia possui, aproximadamente, mais de sete mil espécies já descritas. Dividida em duas ordens: Anura, que engloba os sapos e as rãs; Urodela, englobando as salamandras; e Gymnophiona, representada pelas cecílias (SAKATE; LUCAS-OLIVEIRA, 2000; KLAASSEN, 2001).

As espécies dessa classe são comumente observadas na água e em lugares úmidos, sendo mais abundantes em regiões tropicais, mas também são encontradas nas regiões temperadas úmidas. Possuem um sistema de glândulas distribuídas ao longo da superfície do corpo, que atuam na respiração, reprodução, proteção e ressecamento. Essas glândulas produzem secreção que são expelidas em pequenas quantidades, sendo considerada uma característica evolutiva na transição do ambiente aquático para o terrestre, com um arsenal químico de substâncias nocivas e tóxicas, como aminas biogênicas, alcalóides, peptídeos e proteínas com a função de combater as infecções e proteger o organismo contra predadores (SCIANI, 2013; MONTI; CARDELLO, 1994).

O sistema de glândulas é dividido em dois tipos: as glândulas granulares, também denominadas de serosas ou venenosas, por apresentarem uma secreção tóxica a diversos vertebrados, sendo assim responsáveis pela defesa passiva do anfíbio. E são divididas de acordo com a região em que estão localizadas, em paratóides (quando formam duas protuberâncias nas porções pós-orbitais) lombares e peitorais. E as glândulas mucosas que são, geralmente, menores que as glândulas granulares. A maior diferença que existe entre as glândulas é a natureza química da secreção que as mesmas produzem (TOLEDO; JARED, 1996).

As glândulas possuem vários poros pequenos e visíveis por onde o veneno, normalmente, espesso e leitoso ou cremoso de cor branca ou amarelada, dependendo da espécie, é ejetado (TOLEDO; JARED, 1996).

2.2.1 *Rhinella schneideri*

Os sapos do gênero *Bufo* são conhecidos por possuírem várias verrugas na pele, não possuem capacidade de saltos grandes e não possuem coloração viva (LUTZ, 1933). As espécies desse gênero são encontradas em diversos ambientes, mas a maioria se concentra em florestas tropicais e regiões temperadas úmidas (MONTI; CARDELLO, 1994). Por volta de 2008, o gênero *Bufo* se restringiu às espécies encontradas na Europa, Ásia e África. Nesse sentido, as espécies sul-americanas, que antes pertenciam ao gênero *Bufo*, passaram a compreender dois subgêneros, *Rhaebo* e *Rhinella*, que compreendem espécies distribuídas ao longo da América Central e do Sul, respectivamente (PRAMUK et al., 2008; MACIEL, 2008; AGUIAR et al., 2016).

A espécie *R. schneideri* foi descrita pela primeira vez em 1894, pelo zoólogo austríaco Franz Werner, dando o nome de *Bufo schneideri* e considerando como nativa do Paraguai. Em 1925, a espécie passou por uma revisão taxonômica, feita pelo zoólogo brasileiro Adolfo Lutz, na qual a espécie passou a ser chamada de *B. paracnemis*. Em 2007, os zoólogos Juan Carlos Chaparro, Jennifer Pramuk e Andrew Gluesenkamp fizeram outra revisão taxonômica, mudando o seu gênero de *Bufo* para *Rhinella*, sendo chamada a partir deste momento de *Rhinella schneideri* (CHARRAPO; PRAMUK; GLUESENKAMP, 2007).

De acordo com Jared e colaboradores (2009), o sapo *R. schneideri* pertence à família Bufonidae, encontrado na região da América do Sul, sendo considerada uma das espécies mais abundantes no Brasil. Está presente em lugares úmidos ou ambientes aquáticos (MONTI; CARDELLO, 1994) e a principal característica dessa espécie é a presença de glândulas na região pós orbital, as glândulas paratóides (FIGURA 4).

Na literatura, poucos trabalhos são encontrados quando se trata dos efeitos biológicos e tóxicos das moléculas presentes na secreção da glândula paratóide de *R. schneideri* (ANJOLETTE, 2011; CUNHA-FILHO et al., 2010; BALDO, 2010; FERREIRA, 2012).

Figura 4 - Sapo *R. schneideri*.



Adaptado de Jared; Antoniazzi, 2009. As setas indicam a glândula paratóide.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar aspectos estruturais de uma lectina presente na secreção da glândula paratóide de *R. schneideri*.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar a lectina presente no extrato bruto da secreção da glândula paratóide de *R. schneideri*;
- Avaliar a especificidade da lectina com diferentes carboidratos;
- Determinar a massa molecular aparente da lectina;
- Determinar o conteúdo de estrutura secundária;
- Avaliar o efeito de diferentes temperaturas sobre a estrutura secundária da proteína;
- Determinar a sequência de aminoácidos.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e extração

De acordo com Sousa-Filho e colaboradores (2016) os sapos *R. schneideri* foram capturados na cidade de Floriano, Piauí, Brasil (06°46'01" S 43°01'22" O), em acordo com a licença concedida pelo SISBIO, sob o seguinte número: 54501-4. A secreção da glândula paratóide de 16 animais (machos e fêmeas) foram coletadas em placas de petri por meio de compressão manual das glândulas para não causar danos aos animais. Em seguida, a secreção foi dialisada numa membrana de 8 kDa contra água deionizada e, após 24 horas foi liofilizada e denominada de extrato bruto.

4.2 Purificação da lectina

O extrato bruto da secreção foi solubilizado a uma concentração de 1,5 mg.mL⁻¹ em tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0, sob agitação durante 15 minutos. Posteriormente, o mesmo foi submetido a uma centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi transferido para um concentrador (VivaSpin 20 – Sartorius) e foi submetido a centrifugação a 3.500 x g por 30 minutos a 4°C, para retirada de moléculas com peso molecular abaixo de 10 kDa, como peptídeos, aminas biogênicas, entre outras.

O centrifugado foi submetido a uma cromatografia de troca aniônica em matriz cromatográfica DEAE 5PW (7,5 X 75 mm) acoplada a um sistema Acquity UPLC (Waters Corp, MA, EUA). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e foram coletadas frações de 2 mL. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio para eluir a fração não retida. Em seguida, para eluir a fração retida foi realizado um gradiente salino de 0 a 1 M de cloreto de sódio (NaCl) em tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0.

A fração retida oriunda da cromatografia de troca aniônica foi armazenada para análises futuras após ser concentrada com auxílio de um concentrador (VivaSpin 20 – Sartorius).

4.3 Dosagem de proteínas totais solúveis

A estimativa da concentração de proteínas totais foi determinada através do método de Bradford (BRADFORD, 1977), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão e os resultados foram expressos em mg/mL.

4.4 Preparo dos eritrócitos, atividade hemaglutinante e atividade inibitória

Os eritrócitos de coelho foram provenientes de animais adultos mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Eritrócitos foram suspensos em 0,15 M de cloreto de sódio (NaCl) e lavado oito vezes mediante centrifugação a 3.000 x g por cinco minutos. Após cada lavagem, o sobrenadante foi descartado e adicionado NaCl 0,15 M ao precipitado. Após as oito centrifugações, as hemácias foram suspensas em NaCl a 3% de concentração (v/v).

A atividade hemaglutinante (AH) e os ensaios de inibição foram realizados seguindo métodos preestabelecidos (Sampaio et al., 1998), utilizando eritrócitos de coelho, sendo expressa em título, em que uma unidade de hemaglutinação específica (UH) foi considerada a menor quantidade de proteína capaz de causar hemaglutinação visível a olho nu.

Para o teste de inibição foi usada a menor concentração de lectina que obteve atividade hemaglutinante. Os seguintes açúcares foram utilizados no ensaio de inibição: 4-*N*-phenyl- β -galactosidase (Sigma), α -metil-galactose (Sigma), 4-nitrofenil- α -galactose (Sigma), β -metil-D-galactopiranosídeo (Sigma), 2-nitrofenil- β -galactose (Synth), α -metil-manosídeo (Sigma), α -lactose (Dinâmica), L-fucose (Sigma), arabinose (Dinâmica), melibiose (Dinâmica), L-ramnose (Sigma), lactulose (Sigma), galactose (Synth), ácido galacturônico (Sigma), manose (Sigma), glucosamina (Sigma), mucina tipo 2 (Sigma), mucina tipo 3 (Sigma), β -metil tiogalactosídeo (Sigma), *N*-acetil glicosamina (Sigma), galactosamina (Dinâmica), glicose (Sigma), rafinose (Sigma), frutose (Synth), β -lactose (Dinâmica), ribose (Sigma) e sacarose (Synth).

4.5 Eletroforese e estimativa da massa molecular

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com Laemmli (1970). O gel de separação foi constituído por diferentes concentrações de acrilamida (7%, 10% e 12%). Foram preparadas amostras reduzidas, com a presença de β -mercaptoetanol, e amostras não reduzidas com ausência de β -mercaptoetanol. Foi realizada, também, eletroforese das amostras em condições nativas (PAGE NATIVA) com ausência de dodecil sulfato de sódio. A eletroforese foi conduzida sob uma corrente elétrica de

200 mA, com tensão de 60 V e 6 W de potência. Em seguida, o gel foi corado com Cromassie Brilliant Blue R-250 0,1%.

As massas moleculares das proteínas presentes nas amostras foram comparadas com os marcadores comerciais da GE Healthcare que apresentam o padrão: fosforilase b (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

4.6 Cromatografia de exclusão molecular e estimativa da massa molecular nativa

A lectina obtida no primeiro passo cromatográfico foi centrifugada e aplicada em coluna BEH SEC (4,6 x 300 mm) acoplada a um sistema Acquity UPLC (Waters Corp, MA, EUA) para estimativa da massa molecular nativa. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0 contendo ureia 8 M. Após a aplicação da amostra, a cromatografia foi conduzida no tampão de equilíbrio, a um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹ e monitorada a absorvância de 280 nm. O tempo de eluição da lectina foi determinado e comparado com os seguintes padrões: TBT (669.000 Da); apoferritina (443.000 Da); β -amilase (220.000 Da); vasopressina (150.000 Da); albumina sérica bovina (66.000 Da); anidrase carbônica (29.000 Da); lisozima (14.000 Da). O V_0 da coluna foi determinado pelo uso do azul de dextrana.

4.7 Dicroísmo circular

A medição espectroscópica do dicroísmo circular foi realizada em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco International Co., Tóquio, Japão) conectado a um peltier com temperatura controlada. A solução da lectina foi transferida para uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,5 mm. Os espectros foram adquiridos a uma velocidade de varredura de 50 mm/min com 1 nm de largura de banda. As análises das amostras foram realizadas em 200-240 nm (UV distante) e diferentes temperaturas (25-85°C). A análise dos dados estruturais foi realizada pelo servidor DICHROWEB (WHITMORE; WALLACE, 2008).

Os parâmetros termodinâmicos de dobramento e desdobramento da lectina foram calculados através do monitoramento das mudanças na elipicidade em 215 nm em função da temperatura (GREENFIELD, 2007).

4.8 Digestão proteolítica, extração e sequenciamento dos peptídeos

Para o sequenciamento da lectina, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no item 4.5. Após a descoloração do gel, as bandas referentes à lectina foram excisadas com auxílio de uma ponteira plástica e transferidas para microtubos.

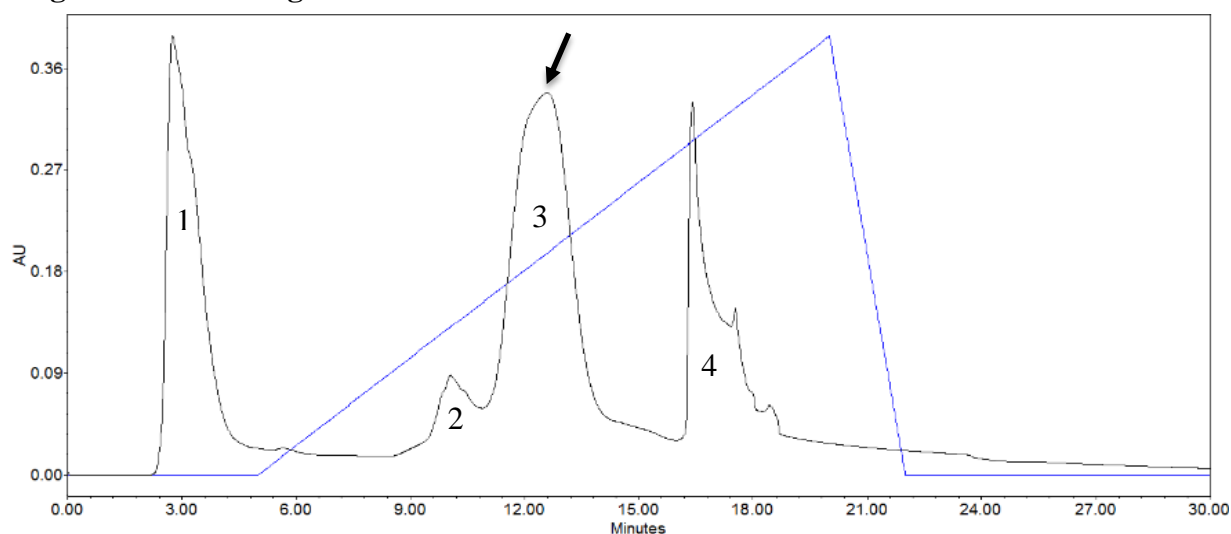
Após a excisão das bandas, as mesmas foram tratadas com soluções contendo ditioneitol (DTT) e iodoacetoamida (IAA), conforme descrito por Shevchenko e colaboradores (2006). A digestão com tripsina foi realizada conforme descrito por Carneiro et al., 2013. Os peptídeos foram extraídos de acordo com Shevchenko et al. 2006. Os peptídeos foram solubilizados em 0,2% de ácido fórmico (AF), e as soluções contendo os peptídeos da lectina, foram aplicadas em uma coluna de fase reversa C18 (75 μm x 200 mm) que por sua vez, foram eluídos através gradiente linear de 10% a 85% de acetonitrila (ACN) contendo AF 0,1%. Os espectros de massas foram adquiridos no espectrômetro de massas SYNAPT HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema ESI-Nano UPLC. Todas as análises foram realizadas usando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte NanoLockSpray. O espectrômetro de massas foi calibrado com uma solução GFP (320 fmol mL⁻¹). Os dados obtidos do ESI-QUAD-TOF foram processados usando o software ProteinLyns Global Server 2.4 (Waters), submetido ao programa de pesquisa da MASCOT (Matrix Science Ltd., www.matrixscience.com) usando o Banco de dados NCBI (FREITAS et al., 2016). Todos os espectros foram interpretados manualmente e pesquisas para similaridade foram realizadas *on-line* utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search) no site do NCBI.

5 RESULTADOS

5.1 Purificação da lectina

Uma lectina presente na secreção da glândula paratóide de um sapo foi purificada por cromatografia de troca aniônica numa matriz de DEAE 5PW acoplada a um sistema Acquity UPLC (Waters Corp, MA, EUA), a qual foi recuperada com alto grau de pureza após eluição das proteínas retidas com um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em Tris HCl 0,05 M pH 8,0 (FIGURA 5). O cromatograma apresentou quatro picos, sendo o primeiro a fração não retida, o segundo e o terceiro, eluído com 0,5 M de NaCl, referente a fração retida apresentando atividade hemaglutinante e o quarto correspondente a fração retida, porém não aglutinou os eritrócitos de coelho. O material oriundo da cromatografia de troca aniônica apresentou uma purificação de 2,07 vezes em relação ao extrato bruto, com incremento na atividade específica de 23,29 (TABELA 1).

Figura 5 - Cromatografia de troca aniônica em DEAE 5PW.



A coluna DEAE 5PW (7,5 X 75 mm) foi equilibrada com tampão Tris HCl 0,05 M pH 8,0. A cromatografia foi conduzida a um fluxo de 1 mL.min⁻¹ e frações de 2 mL foram coletadas. Foi realizado um gradiente salino (NaCl) de 0 a 1 M. A fração retida (indicada com a seta) foi eluída com 0,5 M de NaCl.

Tabela 1 - Tabela de purificação da lectina.

Fração	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Título (UH/mL)	Atividade total (UH)	Específica (UH/mg)	Rendimento (%)	Purificação (X)
EB	20	0,71	14,22	8	160	11,25	100	1
DEAE 5PW	10	0,68	6,87	16	160	23,29	48,31	2,07

EB: Extrato bruto; DEAE 5PW: dietilaminoetil.

5.2 Atividade hemaglutinante e inibição

A tabela 2 mostra os resultados da inibição da atividade hemaglutinante da lectina, que foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho na sua forma nativa. A atividade foi realizada com 35 carboidratos, onde apenas 5 inibiram sua atividade hemaglutinante. Os dissacarídeos α -lactose, β -lactose, lactulose com concentrações inibitórias mínimas (MIC) de 0,08 mM, 0,08 mM e 0,64 mM, respectivamente. A glicoproteína mucina do tipo 2 inibiu com MIC de 0,007 mM, sendo o inibidor mais potente. E 4-nitrofenil- α -galactosídeo com MIC de 0,04 mM.

5.3 Caracterização Bioquímica

5.3.1. Eletroforese e estimativa da massa molecular

A massa molecular relativa da lectina foi estimada por SDS-PAGE, PAGE nativo e cromatografia de exclusão molecular.

Foi realizada SDS-PAGE em diferentes concentrações de acrilamida, 12%, 10% e 7%, mas a separação das bandas proteicas foi eficiente na concentração de 7%, visto que nas demais concentrações observou-se que as proteínas não adentraram no gel com facilidade. A lectina mostrou-se heterogênea, apresentando três bandas, 45 kDa, 30 kDa e 14 kDa, que foram designadas como banda 1, banda 2 e banda 3, respectivamente, na presença e ausência de agente redutor (β -mercaptoetanol). Na PAGE nativa com 7% de acrilamida, foi obtido o mesmo perfil obtido na SDS-PAGE, onde foi possível observar a presença das três bandas novamente (FIGURA 6).

Na cromatografia de exclusão molecular ou gel filtração a separação dos componentes da amostra ocorre de acordo com o tamanho, as moléculas maiores não penetram no gel saindo primeiro e as moléculas menores penetram no gel saindo depois, ou seja, quanto menor a molécula maior será o tempo de eluição. Dessa forma, as moléculas são identificadas de acordo com seu tempo de eluição e correlacionadas com a curva padrão do tempo de eluição e o peso molecular das proteínas já conhecidas que são utilizadas para calibração da coluna. Mediante cromatografia de exclusão molecular usando matriz BEH SEC (4,6 x 300 mm) acoplada ao sistema Acquity UPLC (Waters Corp, MA, EUA), a lectina do presente estudo apresentou dois picos com uma massa molecular estimada de 64 kDa e 40 kDa cada um, sugerindo que a proteína seja formada por dímero ou, possivelmente ocorrendo a formação de oligômeros (FIGURA 7).

Tabela 2 – Efeito inibidor dos carboidratos na atividade hemaglutinante da lectina

	Carboidratos	Concentração	Resultado	*MIC
1	4- <i>N</i> -phenyl- β -Gal	100mM	NI	-
2	α -metil-Gal	100mM	NI	-
3	4-Nitrofenil- α -Gal	100mM	I	0,04mM
4	β -Metil- <i>D</i> -Galactopiranosideo	100mM	NI	-
5	2-Nitrofenil- β -galactose	100mM	NI	-
6	α -Metil-manosídeo	100mM	NI	-
7	α -lactose	100mM	I	0,08mM
8	L-fucose	100mM	NI	-
9	Arabinose	100mM	NI	-
10	Melibiose	100mM	NI	-
11	L-Ramnose	100mM	NI	-
12	Lactulose	100mM	I	0,64mM
13	Galactose	100mM	NI	-
14	Ácido Galactônico	50mM	NI	-
15	Manose	100mM	NI	-
16	Glucosamina	100mM	NI	-
17	Mucina tipo 2	1 mg/mL	I	0,07mM
18	Mucina tipo 3	100mM	NI	-
19	β -Metil tiogalactosideo	100mM	NI	-
20	<i>N</i> -acetil glicosamina (Glc Nac)	100mM	NI	-
21	Galactosamina	100mM	NI	-
22	Glicose	100mM	NI	-
23	Rafinose	100mM	NI	-
24	Frutose	100mM	NI	-
25	β -lactose	100mM	I	0,08mM
26	Ribose	100mM	NI	-
27	Sacarose	100mM	NI	-
28	Xilose	100mM	NI	-
29	Maltose	100mM	NI	-
30	Fenil- β -O-Galactopiranosideo	100mM	NI	-
31	<i>N</i> -acetil-galactosamina (Gal Nac)	100mM	NI	-
32	<i>N</i> -acetilmanosina (ManNac)	100mM	NI	-
33	Fetuína	100mM	NI	-
34	Manana	100mM	NI	-
35	Manose	100mM	NI	-

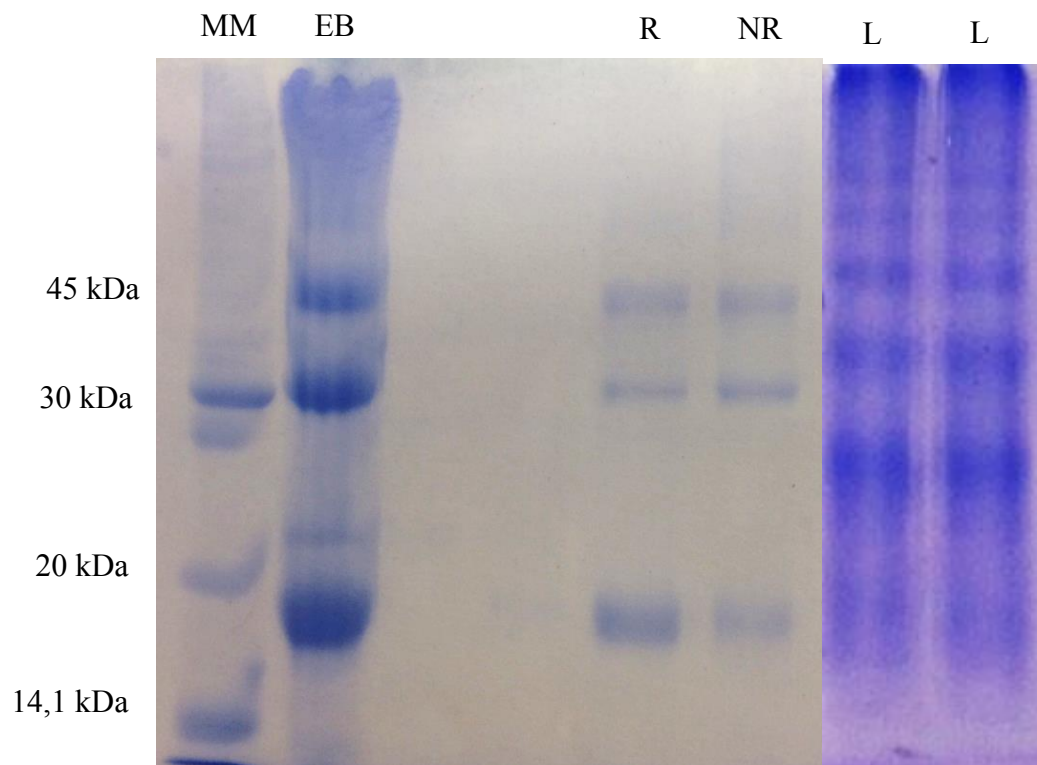
*MIC: concentração mínima inibitória. I: inibiu. NI: não inibiu.

5.3.2. Dicroísmo Circular

Espectros nativo em ultravioleta exibiram absorção mínima a 215 nm e máximo em 200 e 240 nm, evidenciando uma predominância de β -conformação na sua estrutura secundária, uma característica típica de lectinas de origem animal (FIGURA 8). A estrutura secundária consistia de 4,3% de alfa hélice, 44,4% de folhas β , 21,7 de voltas β e 29,6% de estruturas

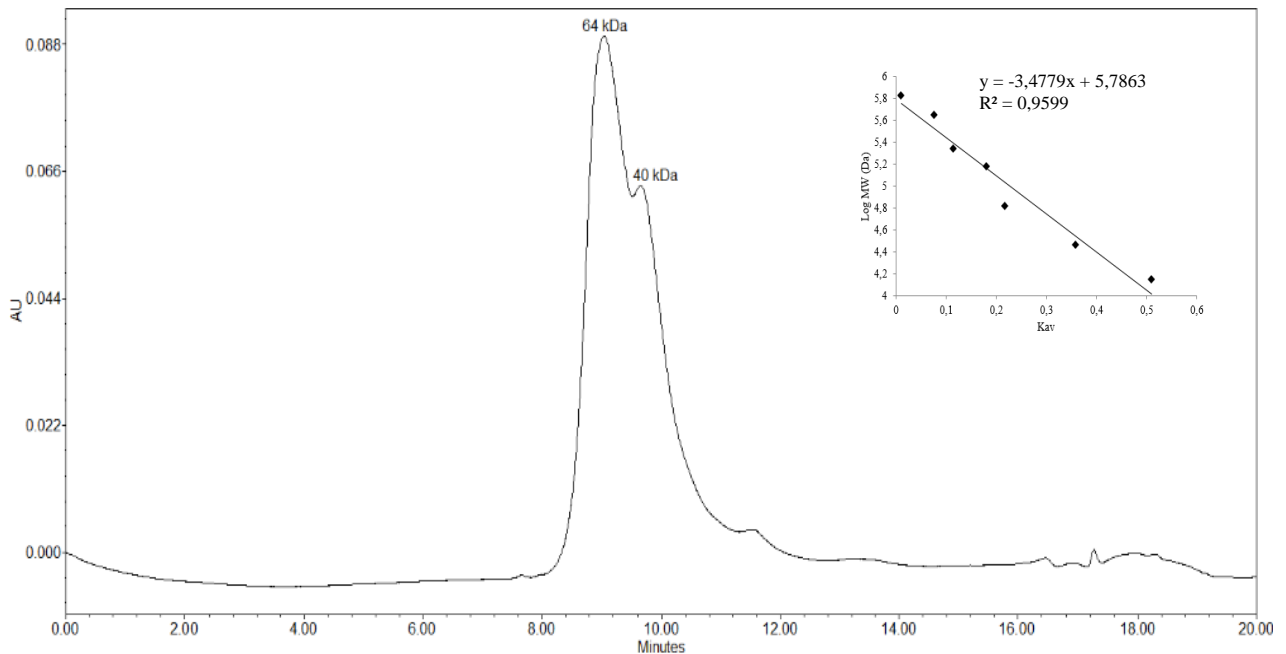
desordenadas como esperado para lectinas animais, de acordo com o método de previsão CONTIN (VAN STOKKUM et al., 1990), disponível online como parte do servidor DICROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>). As mudanças na estrutura secundária da lectina foram examinadas monitorando modificações nos espectros do dicroísmo circular como em função da temperatura. Os espectros de dicroísmo circular da lectina nativa mostraram estabilidade nos pontos 25°C a 61°C, não havendo assim, modificações na estrutura secundária da proteína. Após a desnaturação térmica, a lectina exibiu comportamento sigmoidal, com ponto médio de transição a 62,5°C (FIGURA 9) o que é comum entre lectinas animais.

Figura 6 - Eletroforese da lectina em gel de poliacrilamida.



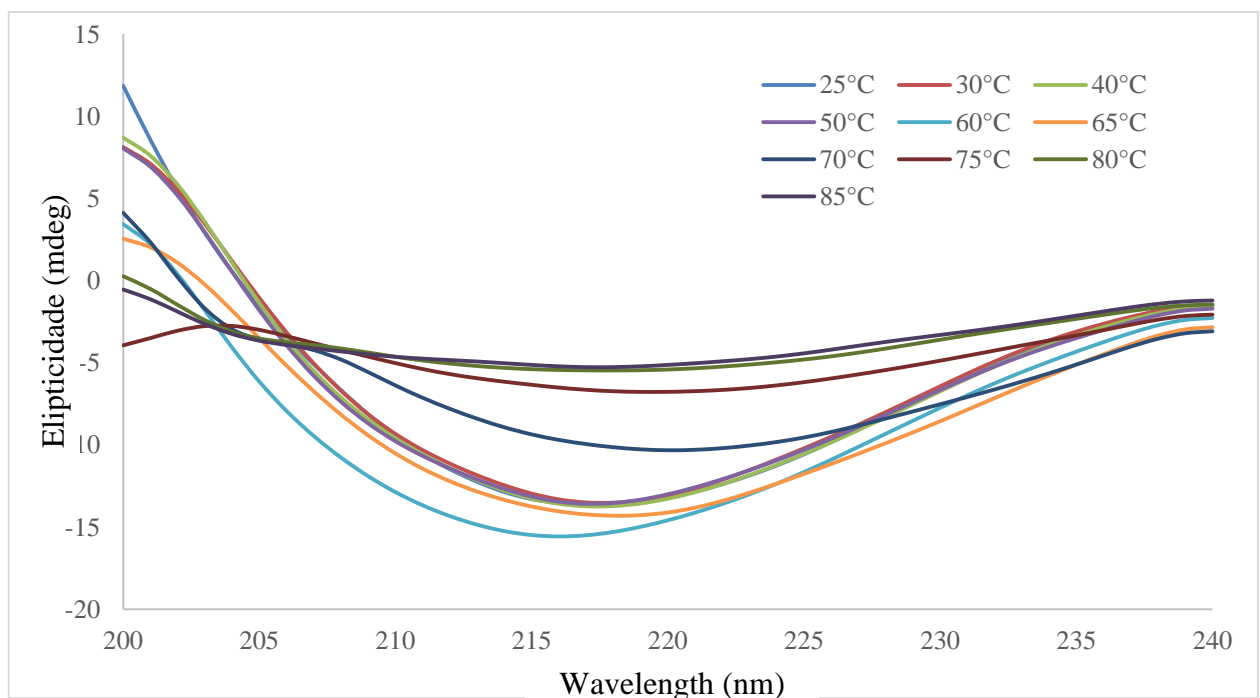
SDS-PAGE 7%: foram aplicados 10 μ L da solução do extrato bruto e da proteína purificada (200 μ g/ μ L) Linha MM: marcador de massa molecular (fosforilase B 97.000, albumina 66.000, ovoalbumina 45.000, anidrase carbônica 29.000, inibidor de tripsina 21.000, α -lactoalbumina 14.400). EB: extrato bruto; R: lectina tratada com agente redutor (β -mercaptoetanol); NR: lectina não tratada com agente redutor; L: lectina na forma nativa (ausência de dodecil sulfato de sódio - SDS e β -mercaptoetanol). Corada com Coomassie Brillant Blue R-250.

Figura 7 - Cromatografia de exclusão molecular da lectina em matriz BEH SEC.

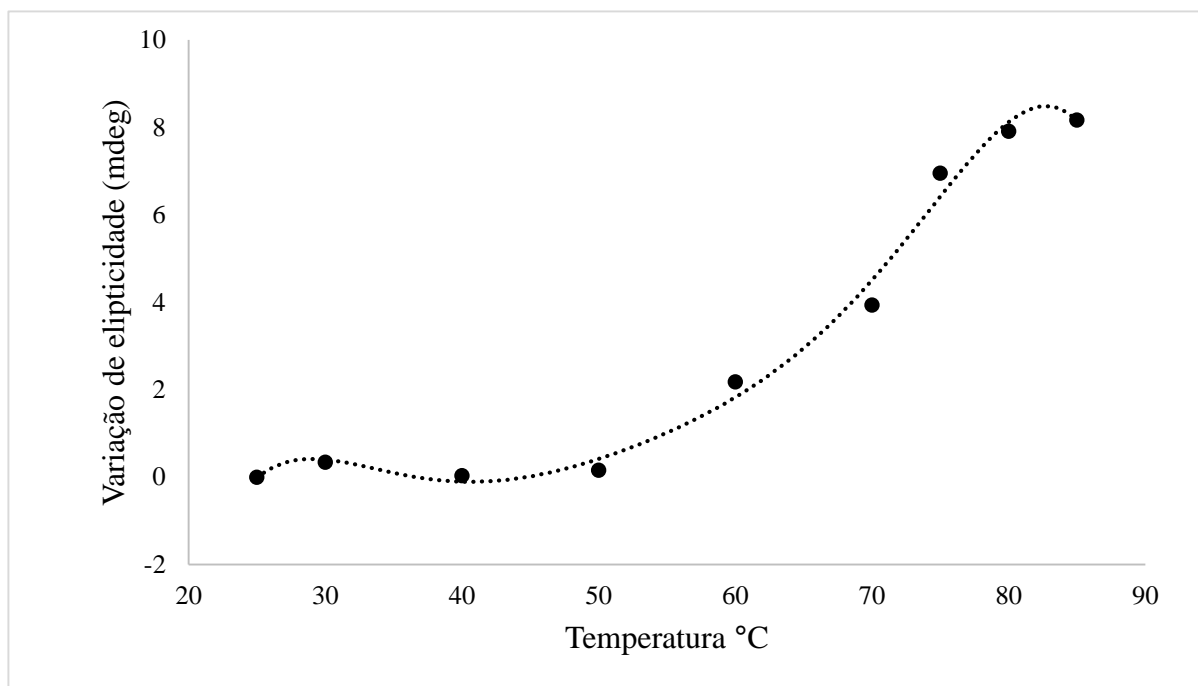


A matriz foi equilibrada e a cromatografia foi conduzida em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo 8 M de ureia. Foram aplicados 687 μ g de lectina purificada. **Adendo.** Curva de calibração da coluna BEC SEH (4,6x300 mm).

Figura 8 - Espectro do dicroísmo circular da lectina.



O dicroísmo circular foi realizado na UV-distante em diferentes temperaturas e os dados analisados pelo DICHROWEB.

Figura 9 - Temperatura de melting da lectina.

A temperatura de melting (T-melting) da lectina nativa.

5.4 Sequenciamento dos peptídeos através de espectrometria de massas sequencial (MS/MS)

A lectina foi digerida com a enzima tripsina e com isso foram obtidos 4 peptídeos da banda 01, 04 peptídeos da banda 02 e 06 peptídeos da banda 03. Os peptídeos obtidos da digestão foram submetidos ao sequenciamento de aminoácidos, resultando em sequências que não apresentaram semelhança com proteínas conhecidas (Tabela 3), através de busca *on-line* utilizando BLAST no site do NCBI. Mas a inexistência de similaridade com outras lectinas se deve ao sequenciamento incompleto devido a formação de possíveis oligômeros. Os peptídeos relacionados a cada uma das bandas se sobrepõem em todas as bandas, sugerindo dessa forma que as três bandas são constituintes da mesma espécie molecular, tratando-se de uma proteína purificada.

Tabela 3 - Sequência dos peptídeos da lectina

	Sequência	Observado	Calculado	Δ
Peptídeos banda 01				
T1	LLFTSQEYK	1127,5483	1127,5863	0,04

Tabela 3 - Sequência dos peptídeos da lectina (continua)

	Sequência	Observado	Calculado	Δ
T2	NGFYDVNEER	1241,5289	1241,5313	0,00
T3	FTFLDYQPH	1166,6157	1166,5397	-0,08
T4	xxxFLLNGTLPPLPDR	1808,0670	1415,8136	-356,30
Peptídeos banda 02				
T1	TSSWLDTLR	1077,5642	1077,5454	-0,02
T2	VNVEEVGWALGR	1327,6871	1327,6885	0,00
T3	NGFYDVNEER	1241,5289	1241,5313	0,00
T4	xxxFLLNGTLPPLPDR	1808,0670	1415,8136	-356,30
Peptídeos banda 03				
T1	WPLVTPFVVGLK	1354,8884	1354,8013	-0,09
T2	NGFYDVNEER	1241,5289	1241,5313	0,00
T3	xxxFLLNGTLPPLPDR	1808,0670	1415,8136	-356,30
T4	FTFLDYQPH	1166,6157	1166,5397	-0,08
T5	LCGTVPATK	1058,6268	1058,5795	-0,05
T6	LLFTSQEYK	1127,6184	1127,5864	-0,03

6 DISCUSSÃO

A secreção de anuros vêm sendo explorada em busca de moléculas bioativas com atividades biotecnologicamente úteis, isso devido à grande diversidade bioquímica, sendo considerada uma excelente fonte natural de biomoléculas. Os estudos realizados evidenciam que as mesmas possuem propriedades farmacológicas e terapêuticas e que seus efeitos estão diretamente relacionados com a estrutura da molécula. A maioria das moléculas utilizadas como objeto de estudos são as aminas biogênicas, alcalóides e peptídeos. E assim, as informações sobre o conteúdo proteico presente nas secreções das glândulas são limitadas (ANJOLETTE, 2011; CUNHA-FILHO et al., 2010).

Algumas lectinas de sapo têm sido purificadas de tecidos como gônadas e pele de diferentes espécies, através de cromatografia de afinidade, principalmente (OZEKY et al., 1991; AHMED et al., 1996; UCHIYAMA et al., 1997). A cromatografia de afinidade separa proteínas pela sua afinidade a resíduos de oligossacarídeos presentes na matriz utilizada. Tais como a lectina isolada de embriões e oócitos do sapo *Xenopus leavis* (ROBERSON; BARONDES, 1982). Em 1987, Cabutti e colaboradores isolaram uma galectina do ovário do sapo *Bufo arenarum*. A galectina dos ovos de *Rana catesbeiana* também foi purificada através de métodos cromatográficos de afinidade (OZEKI et al., 1991). Desde que foi implantada a cromatografia de afinidade para a purificação de lectinas, esta têm sido a técnica mais empregada para o isolamento destas proteínas devido a facilidade de purificação quando se trata de lectinas (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965).

Em relação as lectinas de anuros, principalmente oriundas da secreção das glândulas, poucos estudos tem sido realizados. Sousa-Filho e colaboradores, em 2016, relataram a presença de uma proteína ligante a carboidrato na secreção da glândula paratóide de *R. schneideri* que foi parcialmente identificada como sendo membro da família das galectinas. No presente estudo, a proteína ligante de carboidrato presente na secreção foi purificada através de técnicas de química de proteínas e parcialmente caracterizada.

As proteínas das secreções das glândulas diferem em suas localizações, solubilidade, massa molecular, exigência catiônica e especificidade de sacarídeos. E algumas lectinas de origem animal tem sido isoladas utilizando outros métodos alternativos que não incluem cromatografia de afinidade. Os métodos alternativos para a purificação têm sido bastante empregados especialmente para lectinas com afinidades por carboidratos complexos (CARNEIRO, 2013).

A lectina desse estudo foi obtida em sua forma pura com apenas um passo de purificação a partir de cromatografia de troca aniônica em matriz DEAE 5PW, que têm como base a troca de ânions da matriz com as moléculas presente na amostra sendo eluída com solução salina (NaCl) em diferentes concentrações. Corroborando, assim, com os dados obtidos por Peavy, Hernandez e Carroll, em 2003, quando isolaram a lectina dos ovos de *Lepidobatrachus leavis*, específica de galactose, através de cromatografia de troca aniônica mediante um único passo cromatográfico.

Outras lectinas foram isoladas pela combinação de diferentes passos cromatográficos, dentre eles através de troca iônica, como foi relatado por Ahmed et al., em 1996, ao isolar uma galectina do ovário do sapo *Bufo arenarum* através de cromatografia de troca iônica, e por conseguinte cromatografia de afinidade. E Rieira et al. em 2003, isolou uma lectina da pele do sapo *B. arenarum* utilizando cromatografia de exclusão molecular. Em 2013, Carneiro e colaboradores isolaram uma lectina oriunda da esponja *Haliclona caerulea*, através da combinação de uma cromatografia de troca aniônica seguida por uma cromatografia de troca catiônica. E ainda purificaram da mesma espécie outra lectina, que possuía especificidade por um derivado de galactose, *N*-acetil-galactosamina, combinando dois passos cromatográficos: cromatografia de interação hidrofóbica seguida por uma cromatografia de troca iônica. A lectina de *Andrias davidianus* (Urodela) foi isolada pela combinação de cromatografia de afinidade seguido por uma cromatografia de exclusão molecular (QU et al., 2015).

Na avaliação da inibição da atividade hemaglutinante, a lectina em estudo foi inibida pelos seguintes carboidratos: α -lactose (Gal β 1-4 α -Glu), β -lactose, lactulose, mucina de estomago suíno tipo 2 e 4-nitro-fenil- α -galactosídeo, sugerindo que a lectina é específica a galactosídeos,. As galectinas de vertebrados foi definida baseado no seu reconhecimento conservado por β -galactosídeos não redutores. Mas foi realizado um estudo detalhado da sua especificidade para oligossacarídeos pelo local de ligação alargado, e revelou que os diferentes membros da família da galectina apresentam diferenças significativas nas suas propriedades de reconhecimento. Além disso, o N-terminal e o C-terminal do DRC das galectinas de repetição em tandem, exibem especificidades semelhantes mas ainda distintas para oligossacarídeos (DI LELLA et al., 2011). O sítio de ligação estendido leva a uma maior afinidade por glicanos com múltiplas unidades de lactosaminas, e com a sua substituição da porção de galactose terminal não redutora com oligossacarídeos do grupo sanguíneo (Fuc α 1,2; GalNAc α 1,3 e Gal α 1,3; Fuc α 1,2) (VASTA, 2012). Evidenciando que algumas galectinas possuem afinidade por α -galactosídeos de acordo com a estrutura do DRC, e assim indica que a lectina do presente estudo

pode ser da família de galectinas, como mostrou as evidências de Sousa-Filho et al. 2016, visto que a lectina, neste estudo, apresentou alta afinidade por galactosídeos.

A lectina em estudo, apresentou três bandas (45 kDa, 30 kDa e 14 kDa) quando submetida a SDS-PAGE e PAGE nativo, e apenas dois picos (64 kDa e 40 kDa) quando submetida a cromatografia de exclusão molecular. Como podemos observar, a massa estimada por cromatografia de exclusão molecular diferiu da massa por SDS-PAGE. Foi relatado também por Ahmed et al., 1996, quando isolou a lectina do ovário do sapo e a mesma apresentou um peso molecular de 14,5 kDa quando submetido a SDS-PAGE reduzida, e apresentou duas bandas, 14,5 kDa e 32 kDa cada, quando foi realizado a espectrometria de massas. Os autores do referido estudo explicaram que essas divergências ocorreram devido a formação de oligômeros intercadeias devido a presença de cisteínas livres. E para evitar a formação de oligômeros a proteína deveria ser tratada com agentes redutores, reduzindo as cisteínas para evitar que as mesmas realizem ligações (BIANCHET et al., 2000). Corroborando assim, com os dados obtidos no presente estudo, visto que a lectina não foi tratada com agente redutor durante o processo de purificação. Outra lectina de sapo, a Jeltraxina, isolada do ovo da rã *L. laevis*, foi previamente demonstrada como um complexo oligomérico de aproximadamente 250 kDa composto por subunidades que estavam associadas, demonstrando por MALDI-TOF que a configuração é devida a um complexo decamerico de subunidades de 27,7 kDa (PEAVY et al., 2003).

O Dicroísmo Circular é uma técnica espectroscópica utilizada para estudar a conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições, como por exemplo, temperatura, força iônica, pH, presença de solutos ou pequenas moléculas (MURAKAMI; RULLER, 2016). A técnica de dicroísmo não pode fornecer detalhes estruturais como outras de alta resolução, como é o caso de cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear, mas fornece uma boa estimativa da fração de resíduos na estrutura que estão envolvidos em α -hélice, folha- β e estrutura desordenada. Muitos métodos como o CONTIN-CD, SELCON, DICHROWEB, DICROPROT e K2D2 têm sido desenvolvidos para prever estrutura secundária de proteínas através dos espectros de dicroísmo circular (MURAKAMI; RULLER, 2016).

A análise do conteúdo de estrutura secundária da lectina da secreção da glândula paratóide do sapo *R. schneideri* foi realizada através de dicroísmo circular. A lectina alvo deste estudo, possui 50% da sua estrutura secundária desestruturada aos 62,5°C e apresentou conformações β em abundância (66,1%), típico de lectinas ligantes a β -galactosídeos, onde os DRCs das galectinas são ricos em topologia *jelly-roll*, evidenciado dessa forma, que a lectina

em estudo possui características semelhantes a galectinas (LÓPEZ-LUCENDO et al., 2004). Dados semelhantes foram observados em lectinas do veneno da serpente *Bothrops leucurus* que apresentou 68% de estrutura β (NUNES et al., 2011). Lectina isolada da esponja *Aplysina lactuca*, apresentou conformações β , predominantemente (CARNEIRO et al., 2017). Corroborando, também com Rutguel e colaboradores, em 2016, quando relataram que a galectina-4 apresentou conformações β em seu conteúdo de estrutura secundária, uma característica de galectinas. Diversos domínios estruturais de proteínas são formados por essa predominância, alguns dos quais estão presentes em lectinas animais, como *jelly roll* e β -sanduíche, domínios típicos das lectinas dos tipos de S e R, respectivamente (VASTA; AHMED; ODOM, 2004).

As galectinas possuem a característica de conservar os resíduos de aminoácidos do DRC, sendo sete idênticos para todas as galectinas. Em comparação com a galectina-1 humana, a galectina do cogumelo *Coprinus cinereus* é cerca de 20% idêntica e, as galectinas de 14 kDa e 16 kDa em galinhas, são ambas cerca de 60% idênticas (CUMMINGS; LIU, 2009). Em 1996, Ahmed e colaboradores, relataram que a sequência de aminoácidos de *Rana*, que possuía 93 resíduos de aminoácidos mostrou 49% de identidade com a sequência da galectina de *Xenopus* sp. (MARSCHAL et al., 1992) e da galectina de *Bufo* sp. (AHMED et al., 1996). Para a lectina em estudo, presente na secreção da glândula paratóide de *R. schneideri*, os peptídeos foram sequenciados, mas não apresentaram similaridades com as demais galectinas já descritas. Mas devido a presença de peptídeos idênticos nas bandas, sabe-se que se trata de uma espécie molecular única. A falta de similaridades com outras lectinas/galectinas disponíveis nos bancos de dados é justificada pela sequenciamento incompleto de um peptídeo que está presente nas três bandas da proteína, que foi causa da formação de oligômeros visto que Ahmed e colaboradores (1996) relataram a presença de cisteínas livres na galectina por eles purificada e, que levou a formação de oligômeros dificultando os estudos estruturais.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, pela primeira vez uma lectina foi isolada da secreção da glândula paratóide de *R. schneideri*. Foi caracterizada e suas propriedades físico-químicas foram avaliadas. A lectina apresentou abundância de estruturas β , com topologia *jelly-roll* e afinidade a galactosídeos. Através de SDS-PAGE a sua massa aparente foi de 45, 30 e 14 kDa e exclusão molecular mostrou picos com 64 e 40 kDa. Através do sequenciamento dos peptídeos foi possível determinar que as três bandas presentes no SDS-PAGE são da mesma espécie molecular em sua forma pura. A referida proteína apresentou similaridades com lectinas da família de galectinas.

Outros estudos podem ser realizados no sentido de se descobrir mais sobre a estrutura primária e terciária da lectina e avaliar se o agente redutor como o β -mercaptoetanol evita a formação de oligômeros.

REFERÊNCIAS

- ABREU, T. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the lectin from marine red alga *Solieria filiformis*. **Planta Medica**, New York, v. 82, n. 07, p. 596-605, 2016.
- ABREU, T. M. et al. Cytokine production induced by marine algae lectins in BALB/c mice splenocytes. **Protein & Peptide Letters**, Florida, v. 19, p. 975-981, 2012.
- ACKERMAN S. J. et al. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot – Leyden crystal protein (lysophospholipase). **J. Immunol.**, USA, v.150, p.456– 468, 1993.
- AGRAUWAL, B. B. L.; GOLDSTEIN, I. J. Specific Binding of Concanavalin A to Cross-Linked Dextran Gels. **Biochemical Journal**, [S.I.], v. 96, n. 1959, p. 23-25, 1965.
- AGUIAR, M. F. R. Avaliação do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório, antidepressivo e ansiolítico dos venenos de *Rhinella marina* e *Rhinella jimi* em camundongos suíços. 2016. 77 f. Dissertação (Mestrado Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Rondônia.
- AHMED, H. et al. The Primary Structure and Carbohydrate Specificity of a β -Galactosyl-binding Lectin from Toad (*Bufo arenarum* Hensel) Ovary Reveal Closer Similarities to the Mammalian Galectin-1 than to the Galectin from the Clawed Frog *Xenopus laevis*. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 271, n. 51, p. 33083–33094, 1996.
- ALENCAR, V. B. M. et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Londres, v. 37, n. 9, p. 1805–1814, 2005.
- ALVES, C. M. O. S. et al. Immunobiology Galectin-3 plays a modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. **Immunobiology**, Reino Unido, v. 215, p. 475–485, 2010.
- ANJOLETTE, F. A. P. Isolamento e caracterização bioquímica do componente presente no veneno de *Rhinella schneideri* com atividade sobre o sistema de complemento. 2011. 36 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ARAÚJO-FILHO, J. L. S. et al. Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 6, p. 469-475, 2006.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Alemanha, v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009.
- AUB, J. C. et al. Studies on reactivity of tumor and normal cell to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Science**, USA, v.54, p. 396-399, 1965.
- BARBOSA, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 673–678, 2001.

BARONDES, S. H. et al. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, USA, v. 76, n. 4, p. 597–598, 1994.

BIANCHET, M. A.; ODOM, E. W.; VASTA, G.R.; AMZEL, L.M. A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. **Nat Struct Biol**, New York, v.9, p.628–634, 2002.

BIANCHET, M. A.; AHMED, H.; VASTA, G. R.; AMZEL, M. Soluble β -galactosyl-binding lectin (Galectin) from toad ovary: Crystallographic studies of two protein – sugar complexes. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, USA, v. 40, p. 378-388, 2000.

BONALUMI, J. K. R. **Caracterização estrutural e avaliação de aspectos funcionais de galectinas humanas do grupo tandem-repeat**. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, USA, v. 72, p. 248-534, 1977.

CABUTTI, N. E. F. et al. Purification and some characteristics of a β -galactoside binding soluble lectin from amphibian ovary. **FEBS Letters**, Alemanha, v. 223, n. 2, p. 330-334, 1987.

CARNEIRO, R. F. et al. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, United Kingdom, v. 45, n. 12, p. 2864–2873, 2013.

CARNEIRO, R. F. **Lectinas da esponja marinha *Haliclona (Soestella) caerulea***. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

CASH, H. L. et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. **Science**, USA, v. 313, n. 5790, p. 1126–1130, 2006.

CHARRAPO, J. C.; PRAMUK, J. B.; GLUESENKAMP, A. G. A new species of arboreal *Rhinella* (Anura: Bufonidae) from cloud forest of southeastern Peru. **Herpetologia**, São Paulo, v. 63, n.2, p. 203-212, 2007.

CLARK, D. P. et al. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bull frog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic polymyxin. **The journal biological chemistry**, USA, v. 269, n. 14, p. 10849-10855, 1994.

CLARKE, M. H. G.; FREEMAN, T. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. **Clinical Science**, Londres, v. 35, n. 2, 1968, 403 p.

COOPER, D. N. W.; BARONDES, S. H. God must love galectins; He made so many of them 2. **Glycobiology**, United Kingdom, v. 9, n. 10, p. 979–984, 1999.

CUNHA-FILHO, G. A. et al. Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Toxicon**, Australia, v. 56, p. 339-348, 2010.

- DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et biophysica acta-general subjects**, USA, v. 1572, n. 2-3, p. 285-293, 2002.
- DI LELLA, S., et al. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. **Biochemistry**, United Kingdom, v. 50, p. 7842–7857, 2011.
- DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: Implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, United Kingdom, v. 11, n. 71, 2001, 90 p.
- DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, USA, v.9, p. 585-590, 1999.
- DRICKAMER, R. Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 263, n. 9, p. 557-560, 1988.
- ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **J. Biochem. Cell. Biol.**, USA, v.43, n.5, p.705-712, 2011.
- FARIAS, R. et al. Isolation, biochemical characterization and antibiofilm effect of a lectin from the marine sponge *Aplysina lactuca*. **International Journal of Biological Macromolecules**, USA, v. 99, p. 213–222, 2017.
- FERRIZ-MARTINEZ, R. A.; TORRES-ARTEAGA, I. C.; BLANCO-LABRA, A. Lectins as Anticancer Agents In: **New Approaches in the Treatment of Cancer**, California, p. 71-89, ISBN, 978-1-61728-304-8, 2010.
- FREIRE, M. G. M. et al. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, Australia, v. 42, n. 3, p. 275–280, 2003.
- FREITAS, C. D. T. Et al. First insights into the diversity and functional properties of chitinases of the latex of *Calotropis procera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, USA, v. 108, p. 361-371, 2016.
- FU-TONG, L. RABINOVICH, A. Galectins as modulators of tumor progression. **Natural reviews cancer**, USA, v. 5, p. 29-41, 2005.
- GALILU, U. Interaction of natural anti-Gal antibody with alpha galactosyl epitopes; a major obstacle for xenotransplantation in humans. **Immunology Today**, USA, v.14, p. 480-482, 1993.
- GALLEGO DEL SOL, F. et al. Energetics of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-mannose binding to the *Parkia platycephala* seed lectin and its use for MAD phasing. **Acta Cryst.**, USA, v. F61, p. 326-331, 2005.
- GASPARINI, F. et al. Novel rhamnose-binding lectins from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri*. **Dev. Comp. Immunol.**, USA, v. 16, p. 944-953, 2008.
- GEWURZ, H.; ZHANG, X. H.; LINT, T. F. Structure and function of the pentraxins. **Current Opinion in immunology**, USA, v. 7, p. 54-64, 1995.
- GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, USA, v.285, p. 66, 1980.

- GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in câncer treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Holanda, v. 45, p. 425-445, 2005.
- GREENFIELD, N. J. Determination of the folding of proteins as function of desnaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism. **Nature Protocols**, USA, p. 2733-2741, 2007.
- HAN, J. W. et al. Isolation and characterization of a sex-specific lectin in a marine red alga, *Aglaothamnion oosumiense* Itono. **Appl. Environ. Microbiol.**, USA, v. 78, n. 20, p. 7283-7289, 2012.
- HATAKEYAMA, T. et al. Oligomerization of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* induced by the binding of carbohydrate ligands. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 271, p. 16915-16920, 1996.
- HATAKEYAMA, T. et al. Purification and characterization of four Ca²⁺ dependent lectins from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*. **J. Biochem.**, Ubited Kingdom, v. 116, p. 209-214, 1994.
- HAMMARSTROM, L.; HEIJI, L.; GESTRELIUS, S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. **J. Clin. Periodontal.**, Alemanha, v. 24, n. 9, p. 669-677, 1997.
- HIRABAYASHI, J. et al. Oligosaccharide specificity of galectins: A search by frontal affinity chromatography. **Biochim Biophys Acta**, USA, v. 1572, p. 232-254, 2002.
- HOSONO, M. et al. Three rhamnase-binding lectins from *Osmerus eperlanus mordax* (Olive rainbow smelt) roe. **Biol. Pharm. Bull.**, USA, v. 16, p. 239-24, 1993.
- ISHITSUKA, R. et al. Glycosaminoglycan binding properties of annexin IV, V e VI. **The Journal of biological chemistry**, USA, v.273, n.16, p.9935-9941, 1998.
- ITIN, C. et al. ERGIC-53 is a functional mannose-selective and calcium-dependent human homologue of leguminous lectins. **Mol. Biol. Cell.**, USA, v. 7, p. 483-493, 1996.
- JARED, C. et al. Parotid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, Australia, v. 54, n. 3, p. 197-207, 2009.
- JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; JORDÃO, A. E.; SIVA, J. R.; GREVN, H.; RODRIGUES, M. T. Paratoides macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, Australia, v. 54, n. 3; p. 197-207, 2009
- JIANG, J. F. et al. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryzasativa*. **Toxicon**, Australia, v. 47, p. 133-139, 2006.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, USA, v. 1572, p. 187- 197, 2002.
- KILPATRICK, D. C. **Handbook of animal lectins, properties and biomedical applications**. Eddinburg: British library, 2000. 468p.
- KLAASSEN, C. D. **Casarett and doull's the basic science of poisons**. 6ª Ed. Editora McGraw-Hill Companies, New York, 2001.

- LAI, R. et al. Comparative study of the biological activities of the skin secretions from six common chinese amphibians. **Zoological Research**, Kunming, v. 23, n. 2, p. 113-119, 2002.
- LEE, J. K. et al. Cloning and expression of a *Xenopus laevis* oocyte lectin and characterization of its mRNA levels during early development. **Glycobiology**, United Kingdom, v. 7, p. 367–372, 1997.
- LEHMANN, S. et al. An endogenous lectin and one of its neuronal glycoprotein ligands are involved in contact guidance of neuron migration. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Estados Unidos, v. 87, p. 6455-6459, 1990.
- LÓPEZ-LUCENDO, M. F. et al. Growth-regulatory Human Galectin-1: Crystallographic Characterisation of the Structural Changes Induced by Single-site Mutations and their Impact on the Thermodynamics of Ligand Binding. **Journal of Molecular Biology**, USA, v. 343, p. 957–970, 2004.
- LUTZ, A. Notas sobre espécies brasileiras do gênero Bufo. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 1933.
- MACIEL, N. M. Sistemática e biogeografia do grupo *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) (Anura: Bufonidae). 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) –Universidade de Brasília, Brasília.
- MARSCHALS, P. et al. Sequence and Specificity of a Soluble Lactose-binding Lectin from *Xenopus laevis* Skin. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 267, n. 18, p. 12942–12949, 1992.
- MITCHELL, S. W. **Researches upon the venom of the rattlesnake**. Colombia, Smithson. Contrib. Knowl. p. 89-90, 1860.
- MONTI, R.; CARDELLO, L. Bioquímica dos venenos de anfíbios. In: BARRAVIEIRA, B. (ed.) **Venenos animais- uma visão integrada**. Rio de Janeiro, EPUC, p. 225-232, 1994.
- NAGANUMA, T. et al. Importin-mediated nuclear translocation of galectin-3. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 281, n. 51, p. 39649–39659, 2003.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin - Initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Research**, Pensilvânia, v.20, p.462-466, 1960.
- NUNES, E. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, Netherlands, v. 159, p. 57–63, 2011.
- OZEKI, Y. et al. Amino acid sequence and molecular characterization of a D-galactoside-specific lectin purified from sea urchin (*Anthocidaris crassispina*) eggs. **Biochemistry**, United Kingdom, v. 30, p. 2391–2394, 1993.
- PEAVY, T. R.; HERNANDEZ, C.; CARROLL, E. J. Jeltraxin, a Frog Egg Jelly Glycoprotein, Has Calcium-Dependent Lectin Properties and Is Related to Human Serum Pentraxins CRP and SAP. **Biochemistry**, United Kingdom, n. 1, p. 12761–12769, 2003.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, USA, v.109, p.347-352, 1995.

- PRAMUK, J. B. et al. Around the world in 10 million years: biogeography of the nearly cosmopolitan true toads (Anura: Bufonidae). **Global Ecology and Biogeography**, Estados Unidos, v. 17, p. 62-83, 2008.
- QU, M. et al. Purification of a secreted lectin from *Andrias davidianus* skin and its antibacterial activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, Netherlands, v. 167, p. 140–146, 2015.
- RANATAPO, S.; NGAMJUNYA PORN, W.; CHU LAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant. Sci. California**, v. 160, n. 4, p. 739-744, 2001.
- RAYNAL, P; POLLARD, H. B. Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. **Biochim Biophys Acta**, USA, v.1197, p. 63-93, 1994.
- RIERA, A. S. et al. Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. **Biocell**, Argentina, v. 27, n. 1, p. 37–46, 2003.
- ROBERSON, M. M.; BARONDESG, S. H. Lectin from Embryos and Oocytes of *Xenopus laevis*. **The Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 257, n. 13, p. 7520–7524, 1982.
- ROSEN, S. D. Cell surface lectins in the immune system. **Sem Immunol**, USA, v.5, p.237–247, 1993.
- ROSEN, S. D. Lymphocyte homing: Progress and prospects. **Curr. Opin. Cell Biol.**, USA, v.1, p.913–919, 1989.
- RUSTIGUEL, J. K. et al. Recombinant expression, purification and preliminary biophysical and structural studies of C-terminal carbohydrate recognition domain from human galectin-4. **Protein Expression and Purification**, USA, v. 118, p. 39-48, 2016.
- SAKAKIBARA, F. et al. Egg Lectin of *Rana japonica* and Its Receptor Glycoprotein of Ehrlich Tumor Cells. **Cancer Research**, Pensilvânia, n. 39, p. 1347–1352, 1979.
- SAKATE, M.; LUCAS DE OLIVEIRA, P. C. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **Journal of venomous animals and toxins**, Botucatu, v. 6, n. 1, 2000.
- SAKATE; OLIVEIRA, 2000;
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**, França, v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.
- SCIANI, J. M. et al. Differences and Similarities among Parotoid Macroglad Secretions in South American Toads: A Preliminary Biochemical Delineation. **The Scientific World Journal**, USA, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- SCIANI, J. M. et al. Differences and similarities among parotoid macroglad secretions in South American toads: a preliminary biochemical delineation. **Sci. World J.**, USA, p. 1–13. 2013.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognize molecules. **Glycobiology**, United Kingdom, v.14, n.11, p.53-62, 2004.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, USA, v. 1, n. 6, p. 2857-2860, 2006.

SILVA, M. D. C. **Aplicações Biotecnológicas das lectinas claveLL (*Cladonia verticillaris* leaf lectin) e BmoLL (*Bauhinia monandra* leaf lectin)**. 2008. 211 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2008.

SONG, X. et al. A galectin with quadruple-domain from bay scallop *Argopecten irradians* is involved in innate immune response. **Developmental and Comparative Immunology**, USA, v. 35, n. 5, p. 592–602, 2011.

SOUSA-FILHO, L. M. et al. Biochemical Profile, Biological Activities, and Toxic Effects of Proteins in the *Rhinella schneideri* Parotoid Gland Secretion. **Journal of Experimental Zoology**, Austria, p. 1-13, 2016.

SOUSA-FILHO, L. M. et al. Biochemical profile, biological activities, and toxic effects of proteins in the *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion. **Journal Experimental Zoology (Part A)**, Austria, v. 1, p. 1-13, 2016.

STEELE, D. M.; WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-reactive proteins serum amyloid P componente and serum amyloid A protein. **Immunology Today**, USA, v. 15, p. 81-88, 1994.

STILLMARK, H. Uber Ricin, ein giftiges ferment aus den Samen von Ricinus comm. L. und einigen anderen Euphorbiaceen. **Thesis**, Dorpat, 1888.

TATENO, H. et al. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Japão, v. 66, p. 604–612, 2002.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Review: Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 111, n.1, p. 1-29, 1996.

TSUTAUI, S. et al. A new type of lectin discovered in a fish, flathead (*Platycephalus indicus*), suggests an alternative functional role for mammalian plasma kallikrein. **Glycobiology**, United Kingdom, v. 21 n. 12, p. 1580-1587, 2011.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: A new story. **Trends in Plant Science**, USA, v. 9, n. 10, p. 484–489, 2004.

VAN DAMME, E. J. M. Lectins as tools to select for glycosylated proteins. **Gel-Free Proteomics**, Estados Unidos, p. 289-297, 2011.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; ODOM, E. W. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. **Current Opinion in Structural Biology**, USA, v. 14, p. 617–630, 2004.

VASTA, G.; AHMED, H. **Animal lectins: A functional View**. New York: CRC Press, 2008. 596 p.

VASTA, G. R.; FENG, C.; BIANCHET, M. A.; BACHVAROFF, T. R.; TASUMI, S. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse. **Fish Shellfish Immunol.**, Japão, v. 46, n. 1, p. 94-106, 2015.

- VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology**, [S.I.], Elsevier, 2009.
- WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases, **Biopolymers**, França, p. 392-400, v. 89, n. 5, 2007.
- WILLIAMS, D. B. Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmatic reticulum. **Journal of Cell Science**, França, v.119, p.615-623, 2006.
- YOON, K. S. et al. Molecular characterization of the lectin, Bryothealin, involved in protoplast regeneration of the marine alga *Bryopsis plumose* (Chlorophyta). **J. Phycol.**, USA, v. 44, n. 1, p. 103-112, 2008.
- ZACCONE, G. et al. Lectin binding patterns in amphibian skin epithelium. **Acta Histochemica**, Itália, v. 101, n. 3, p. 317–326, 1999.
- ZACHARIUS, R. M.; ZELL, T. E. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Short Communications**, USA, v. 35, p. 148-152, 1968.
- ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like superfamily. **FEBS Journal**, Alemanha, v. 272, p. 6179-61217, 2005.
- ZHANG, P. et al. Quality of evaluation of traditional Chinese drug toad venom from different origins through a simultaneous determination of bufogenins and indole alkaloids by HPLC. **Chem. Pharm. Bull.**, Japão, v. 53, p. 1582-1586, 2005.