



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

**Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae,
Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.**

Ana Claudia Silva Gondim

Orientador:
Benildo Sousa Cavada

Co-Orientador:
Kyria Santiago do Nascimento

Fortaleza
Julho – 2014

**Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae,
Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.**

Ana Claudia Silva Gondim

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioquímica como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientador: Dr. Benildo Sousa Cavada

Co-Orientador: Dra. Kyria Santiago do Nascimento

**Fortaleza
Julho – 2014**

ANA CLAUDIA SILVA GONDIM

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

-
- G635a Gondim, Ana Claudia Silva.
Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL / Ana Claudia Silva Gondim. – 2014.
135 f. : il., color., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profª. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Espectroscopia. 2. Agentes antivirais. 3. Antineoplásicos. I. Título.

CDD 574.192

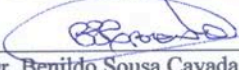
ANA CLAUDIA SILVA GONDIM

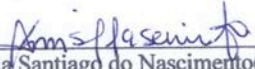
**Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae,
Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.**

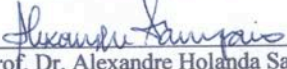
Tese submetida à coordenação do
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica como requisito parcial
para obtenção do título de doutor em
Bioquímica.


Aprovada em: 22/08/14


BANCA EXAMINADORA


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


Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Co-Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dra. Raquel Guimarães Benevides
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS


Dr. Francisco Vassiliepe Sousa Arruda
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus grandes incentivadores, Ari e Áurea que indiscutivelmente sempre, por toda minha vida, ensinaram duas palavras essenciais na minha formação: ética e humildade.

“I ask you to believe, to believe in yourselves, believe in each other. If we believe we cannot fail”.

Eu peço a vocês que acreditem, acreditem em vocês mesmos, acreditem uns nos outros. Se acreditarmos não fracassamos.

“Barack Obama”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado o dom da vida e a saúde para dedicação a este trabalho.

Aos meus pais, Arimathéia e Áurea pelos ensinamentos de vida.

A minha família, primeiramente a meu marido amado e companheiro na vida e na ciência, pelos muitos ensinamentos, ajuda e discussão científica, sem você eu não estaria no caminho onde estou, e segundo aos meus adorados e amados filhos Caio Henrique, Allan e pequeno Adrian, motivo maior de tudo.

Ao meu Orientador Benildo Sousa Cavada e a minha Co-Orientadora Kyria Santiago do Nascimento por toda paciência, conselhos, cobrança, confiança e, acima de tudo, encorajamento para a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador na Universidade de Warwick, Prof. Peter Sadler pelo apoio incondicional, pelos muitos pedidos concedidos, reuniões, conversas profissionais e pessoais.

As minhas duas grandes incentivadoras e amigas queridas Sâmia Fernandes e Raquel Guimarães, agradeço de alma e coração por toda ajuda pessoal e de trabalho, pelas lágrimas compartilhadas e incentivo ao término desse trabalho, muito obrigada!

Aos colegas do Biomol, cada um com sua contribuição diferenciada que também muito ajudaram na minha jornada.

Ao Prof. Dr. Jan Balzarini do Instituto Rega para Pesquisa Médica, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica, por haver realizado prontamente os estudos virais.

Aos colegas do grupo do Prof. Peter Sadler, Maria Romero, Jenny, Socorro, Carlos, Evyenia, Abraha, Youngmay, Katija, Isolda e todos os alunos do grupo pela ajuda, encorajamento, e treinamento dados no doutorado sanduíche na Universidade de Warwick.

A Prof. Dra. Cintia Renata Costa Rocha da Universidade de Pernambuco(UFPE) pelas análises de sequenciamento da DLasiL.

RESUMO

Muitos compostos isolados de plantas apresentam diversos tipos de atividades biológicas, como tem sido o caso de proteínas conhecidas como lectinas. Essas proteínas fazem parte de um grupo de moléculas que reconhecem e se ligam a carboidratos contidos na superfície das células de forma específica e reversível. Nas últimas décadas as lectinas vêm se tornando ferramentas promissoras com ação antitumoral e antiviral. Esse trabalho objetivou investigar a possível ação anticancerígena e antiviral das lectinas isoladas das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia marítima* (ConM), *Dioclea lasiocarpa* (DLasiL) e *Dioclea sclerocarpa* (DSclerL), o possível mecanismo inicial de ação anticancerígena da lectina DLasiL, além de estudar a estrutura da DLasiL através das técnicas de fluorescência e dicroísmo circular e seu mecanismo para atividade anticâncer. A lectina DLasiL foi particularmente caracterizada, apresentando 237 resíduos de aminoácidos com alta similaridade com as lectinas da subtribo Diocleinae. Ressonância paramagnética de elétrons mostrou sinal característico da presença do íon manganês (Mn^{2+}), enquanto medidas de ICP-MS confirmaram a quantidade deste íon, além de cálcio (Ca^{2+}), cuja quantidade foi inferior ao medido nas outras lectinas. Estudos de fluorescência intrínseca indicaram melhor acessibilidade aos triptofanos por moléculas neutras, provando que a vizinhança possui caráter não carregado, enquanto que fluorescência extrínseca usando Bis-ANS ilustrou a alteração conformacional provocada pela interação a açúcares, concluindo que é possível utilizar esse tipo de medida para a constatação desse fenômeno. Medidas de Dicroísmo Circular confirmam a significativa estabilidade térmica da DLasiL no qual perdeu 50% de sua atividade a 72 °C. Para investigar a ação antitumoral das lectinas em estudo, células de carcinoma de ovário humano (A2780), carcinoma caucasiano de pulmão humano (A549), carcinoma de mama humano (MCF7), carcinoma de próstata humano (PC3) foram cultivadas com DLasiL. Além disso, foi determinada a viabilidade celular. Os resultados mostraram que as lectinas foram efetivas em inibir o crescimento celular das linhagens testadas utilizando concentração nanomolar. Dentre as lectinas testadas, a mais efetiva em inibir o crescimento celular foi a DLasiL, demonstrando um maior índice de citotoxicidade contra células da linhagem A2780 com IC_{50} de 52 nM. O mecanismo de ação da DLasiL foi investigado através de ensaios específicos de apoptose. Dados de ciclo celular mostraram que a DLasiL apresenta mudanças significativas nos níveis S e G2/M. Adicionalmente, ensaios com uma série de conjuntos de vírus apresentaram resultados bastante promissores.

Palavras Chaves: Lectinas, espectroscopia, anticâncer e antivírus.

ABSTRACT

Several compounds isolated from plants, including proteins called lectins, have exhibited many types of biological activities. These proteins are specific recognizing and binding to carbohydrates found onto the cell surface. During the last decades, lectins have become promising sources for antitumor and antiviral studies. This study aimed to investigate legumineous lectins, ConBr (*Canavalia brasiliensis*), ConM (*Canavalia maritima*), DLasiL (*Dioclea lasiocarpa*) and DSclerL (*Dioclea sclerocarpa*) as potential anti-cancer and anti-viral agents, as well as studying structurally DLasiL using fluorescence, circular dichroism and its initial mechanism of anticancer activity. DLasiL lectin was characterized showing 237 amino acid residues with high similarity to lectin from the Diocleinae subtribe. Electron paramagnetic resonance of DLasiL showed a typical signal for manganese (Mn^{+2}), while ICP-MS provided its actual amount along with calcium (Ca^{2+}), whose values were below those found for the other lectins. Intrinsic fluorescence studies using three quenchers showed a better accessibility of neutral species to tryptophans of DLasiL, while extrinsic fluorescence using bis-ANS exhibited a dose-dependent conformational changes promoted by sugars. Circular dichroism showed very expressive thermal stability of DLasiL with mid-point for thermal denaturation at 72 °C. These lectins were used to treat human ovarian carcinoma (A2780), Human Lung Carcinoma (A549), Human Breast Carcinoma (MCF7), Human Prostate Carcinoma (PC3) and cell viability was determined. These proteins showed potent activity on inhibiting cell growth at nanomolar concentrations. Among these lectins, DLasiL was the most effective showing potent cytotoxicity against A2780 cell line with IC_{50} of 52 nM. The mechanism of cytotoxicity action of DLasiL was investigated by specific apoptosis assay. Cell cycle studies showed DLasiL causes significant changes in the levels of S and G2/M. A virus screening investigation was carried out showing promising antiviral activity.

Keywords: Lectins, spectroscopy, anticancer and antiviral.

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

A2780	Carcinoma de ovário humano
A549	Carcinoma de pulmão
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BcL/E1B	Proteína mitocondrial
BFL	Lectina de <i>Bauhinia forficata</i>
BNIP3	Gene membro do adenovírus BCL2/ E1B
CCID ₅₀	Dose viral necessária para infectar 50% de uma cultura celular
CD	Dicroísmo Circular
CEM	Linhagem celular derivada de células do sistema imune
CGL	Lectina de <i>Canavalia grandiflora</i>
ConA	Concanavalina A- lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConM	Lectina de <i>Canavalia marítima</i>
ddW	Água duplamente destilada
DLasiL	Lectina de <i>Dioclea lasiocarpa</i>
DGL	Lectina de <i>Dioclea guianensis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPmix	Mistura dos deoxi-nucleotídeos trifosfato
DSclerL	<i>Dioclea sclerocarpa</i>
ECACC	Coleção Européia de Cultura de Células Animais
FIPV	Vírus da Peritonite Canina Infecciosa
FY26	Composto organometálico de ósmio
G1, S, G2/M	Fases do ciclo celular
gp120/gp41	Glicoproteínas do envelope viral
HepG2	Células de hepatoma
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
I	Momento angular de spin nuclear
IARC	Organização Internacional para Pesquisa sobre o Câncer
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer
IC ₅₀ /EC ₅₀	Concentração de inibição de 50 %
ICP- MS	Plasma Acoplado Indutivamente/ espectrometria de massas
IPTG	Áçúcar isopropil-β-D-galactopiranosídeo

m/z	Relação massa/carga de um íon
MCF-7	Células de câncer de mama
ML-60	Células de leucemia
MOLT-4	Células de leucemia
MS	Espectrometria de massas
Ms	Número quântico de spin
P21	Proteína p21
PC3	Carcinoma de próstata
PCL	Lectina de <i>Polygonatum cyrtonema</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	Banco de dados de proteínas
pRB	Proteína reguladora
RIP	Proteína inativadora de ribossomo
RNA	Ácido ribonucleico
EPR	Ressonância Paramagnética de Elétrons
SARS-CoV	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda
SRB	Sulforodamina
TCA	Ácido tricloroacético
TxLC-I	Lectina de <i>Tulipa</i> sp.
UV	Ultravioleta
WGA	Aglutinina de germe de trigo
WHO	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática da interação lectina-carboidrato na superfície celular.	19
Figura 2:	Representação esquemática da classificação estrutural das lectinas vegetais.	23
Figura 3:	Representantes estruturais das famílias de lectina vegetais.	25
Figura 4:	β -sanduíche da lectina Concanavalina A.	28
Figura 5:	Variações da estrutura quaternária.	29
Figura 6:	Alguns exemplos de espécies dos gêneros <i>Canavalia</i> e <i>Dioclea</i> , família Leguminosae (Phaseolaceae) da subtribo Diocleinae	30
Figura 7:	Permuta circular durante a biosíntese da Concanavalina A (Con A).	31
Figura 8:	Leguminosa <i>Canavalia brasiliensis</i> MART.	34
Figura 9:	Estrutura tridimensional da lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).	35
Figura 10:	Leguminosa <i>Canavalia maritima</i> .	36
Figura 11:	Estrutura tetramérica da lectina de sementes de <i>Canavalia maritima</i> (ConM).	37
Figura 12:	Leguminosa da espécie <i>Dioclea lasiocarpa</i> .	38
Figura 13:	Leguminosa da espécie <i>Dioclea sclerocarpa</i> .	39
Figura 14:	Anatomia do Vírus da Imunodeficiência adquirida.	41
Figura 15:	Representação da progressão de uma lesão pré-cancerosa de tumor maligno.	43
Figura 16:	Organograma de obtenção das lectinas da subtribo Diocleinae.	48
Figura 17:	Representação esquemática do vetor pGEM-T Easy da (Promega).	52
Figura 18:	Representação esquemática da placa de 96 poços utilizadas nos testes de viabilidade celular de ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.	58
Figura 19:	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% de ConBr, ConM, DSclerL e DLasiL.	64
Figura 20:	Alinhamento da sequência de diferentes lectinas Diocleinae através do programa ESript2.0.	65
Figura 21:	DNA genômico de <i>Dioclea lasiocarpa</i> em gel agarose a 1%.	66

Figura 22:	Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR a partir do DNA genômico de <i>D. lasiocarpa</i> .	67
Figura 23:	Representação do sequenciamento da contig referente a pré-pro-lectina de <i>D. lasiocarpa</i> .	69
Figura 24:	Espectros de EPR para as leguminosas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, usando como referência MnCl ₂ .	73
Figura 25:	Espectros de EPR de A) ConBr, B) ConM, C) DLasiL e D) DSclerL.	75
Figura 26:	Razão estequiométrica para os metais abundantes por subunidade de proteína.	79
Figura 27:	Efeito do ambiente de triptofano do espectro de emissão.	80
Figura 28:	Estrutura tetramérica 3D da ConBr.	81
Figura 29	Espectro de emissão de fluorescência dos triptofanos, linha preta indica a DLasiL nativa que possui emissão máxima em 334 nm.	82
Figura 30:	Espectro de fluorescência da DLasiL nativa com a presença do aumento na concentração dos supressores.	83
Figura 31:	Espectros de fluorescência dos estudos de supressão para a DLasiL desnaturada com 6M Gdn-HCl, usando supressor neutro (acrilamida), um aniônico (íon iodeto, I ⁻) e um catiônico (íon céσιο, Cs ⁺).	86
Figura 32:	Espectros de fluorescência de afinidade com Bis-ANS.	88
Figura 33:	Efeito de afinidade por açúcares glicose e manose na DLasiL.	89
Figura 34:	Espectro de Dicroísmo Circular para a DLasiL na Região do UV próximo	91
Figura 35:	Espectro de Dicroísmo Circular da DLasiL nativa na região do UV distante.	92
Figura 36:	Espectro de dicroísmo circular para DLasiL aquecida em diferentes temperaturas de 30 a 90°C, em comprimento de onda entre 200-250 nm.	94
Figura 37:	Espectro de CD próximo ao UV em diferentes temperaturas.	96
Figura 38:	Estrutura da Sulforodamina B.	97
Figura 39:	Gráfico de IC ₅₀ .	100
Figura 40:	Análise de citometria de fluxo da investigação do mecanismo de ação da DLasiL.	103
Figura 41:	Ciclo celular em células de mamíferos	105
Figura 42:	Análise por citometria de fluxo para ensaio de ciclo celular.	106

Figura 43:	Testes antivirais nas lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.	107
Figura 44:	Ensaio antiviral com as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, em células CRFK, para o virus Corona Felino(FIPV) e Herpes Felino.	110
Figura 45:	Ensaio antiviral com as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, em células MDCK, para o virus da Influenza A H1N1, Influenza a H3N2 e influenza B.	111
Figura 46:	Ensaio antiviral com as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, em células MDCK, para o virus da Influenza A H1N1, Influenza a H3N2 e influenza B	112
Figura 47:	Estrutura do complexo de ósmio FY26.	

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Linhagens celulares, A2780, A549, MCF7 e PC3.
- Tabela 2:** Concentrações dos metais medidos por ICP-MS.
- Tabela 3:** Resultados dos Espectros de fluorescência da DLasiL desnaturada com de cloreto de guanidínio (Gdn-HCl) 6M, usando supressor neutro (acrilamida), gráficos Stern-Volmer para supressão com acrilamida, césio e iodeto.
- Tabela 4:** Atividade antiproliferativa das lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DsclerL contra células A2780, A549, MCF7 e PC3.
- Tabela 5:** Nível de potencialidade das lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL em ensaios de citotoxicidadea contra as células cancerígenas.
- Tabela 6:** Atividade antiviral para as lectinas contra os Vírus da Estomatite Vesicular, Vírus Coxsackie e Vírus Sincicial Respiratório.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 LECTINAS VEGETAIS	16
1.1.2 Ocorrência e funções	18
1.1.3 Reconhecimento Proteína-Carboidrato	20
1.1.4 Aplicações biológicas	21
1.1.5 Classificação de lectinas vegetais	22
1.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS	25
1.2.1 Características gerais	25
1.2.2 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas	26
1.2.3 Subtribo Diocleinae	29
1.3 ATIVIDADE ANTI-VIRAL DE LECTINAS	40
1.4 CÂNCER	42
1.4.1 Aspectos Gerais	42
1.4.2 Câncer x Lectinas	44
2. OBJETIVOS DO TRABALHO DE TESE	46
2.1 Objetivo geral	46
2.2 Objetivos específicos	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1 OBTENÇÃO DAS LECTINAS	47
3.1.1 Extração e purificação das lectinas de ConBr, ConM, DLasiL e DScler	47
3.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida	48
3.2 ESTUDOS ESTRUTURAIS	49
3.2.1 Determinação da sequência primária de DLasiL	49
- Extração de DNA	49
- Amplificação do gene para a lectina DLasiL	50
- Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T Easy	51
- Transformação bacteriana	52
- Análise da sequência do fragmento	53
3.2.2 EPR: Ressonância paramagnética eletrônica	53
3.2.3 Espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	54
3.2.4 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência	54
3.2.5 Dicroísmo circular	55
3.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS	56
3.3.1 Cultura celular	56

3.3.2 Ensaio de viabilidade celular com IC ₅₀	57
3.3.3 Investigação do mecanismo de ação da lectina de <i>Diclea lasiocarpa</i> (DLasiL)	59
3.3.4 Detecção do Ciclo Celular	60
3.3.5 Ensaio de Caspase 9	60
3.3.6 Ensaio antiviral	61
3.3.7 Terapia de combinação entre drogas FY 26 + DLL	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Extração e purificação das lectinas: ConBr, ConM, DSclerL e DLasiL	63
4.2 Estudos estruturais	64
4.2.1 Determinação da sequência primária de DLasiL	64
4.2.2 CD (Dicroísmo circular)	Erro! Indicador não definido.
4.2.3 EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica	69
4.2.4 ICP/MS	76
4.2.5 Espectroscopia de emissão de fluorescência	79
4.2.6 Espectroscopia por dicroísmo circular	89
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA	95
4.3.1 Atividade antiproliferativa em células A2780, A549, PC3, MCF7	95
4.3.2 Possíveis mecanismos de ação da DLasiL	100
4.3.3 Detecção do Ciclo Celular	105
4.3.4 Ensaio de Caspase 9	104
4.3.5 Ensaio antiviral	107
4.3.6 Terapia de combinação entre drogas FY 26 + DLasiL	114
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
7. TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	133

1. INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS VEGETAIS

1.1.1 Histórico e definição

Lectinas são proteínas com propriedades funcionais bem definidas, possuem origem não immune e têm especificidade por resíduos terminais ou subterminais de carboidratos se ligando reversivelmente sem, no entanto, mostrar atividade enzimática (KOCOUREK; HOREJSI, 1981). São ubíquas na natureza, sendo encontradas em quase todos os organismos, abrangendo desde vertebrados, invertebrados, bactérias e vírus (PEUMMANS; VAN DAMME, 1996). Em adição, são um grupo heterogêneo de proteínas que regula vários eventos fisiológicos e patológicos dependendo assim da sua capacidade de ligação a carboidratos (JAQUES *et al.*, 2013).

O marco inicial descrevendo lectinas data-se de 1860, quando Silas Weir Mitchell observou que misturando uma gota de veneno da serpente de *Crotalus durissius* e uma gota de sangue de pombo, este coagulava rapidamente (MITCHELL, 1860). No ano de 1888, Hermann Stilmark descobriu a capacidade de aglutinação de células sanguíneas de diferentes animais pelos extratos de sementes de *Ricinus communis*. Ele denominou a substância responsável por essa atividade de Ricina (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, James Sumner isolou a partir das sementes de *Canavalia ensiformis* uma proteína que ele denominou de concanavalina A (Con A) e obteve, dessa forma, a primeira lectina pura. Contudo, somente em 1936, Sumner e Howell demonstraram que a concanavalina A aglutinava eritrócitos. Eles demonstraram também que a hemaglutinação era inibida pela sacarose da cana-de-açúcar, demonstrando pela primeira vez a especificidade de uma lectina por açúcar (SHARON & LIS, 2004). Mas só em 1952 é que foi demonstrado que as propriedades hemaglutinantes de lectinas eram baseadas em uma atividade específica de ligação a carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952).

O marco seguinte na história das lectinas vegetais foi a descoberta de que algumas hemaglutininas exibem uma preferência por eritrócitos de um grupo particular de tipo sanguíneo dentro do sistema ABO, onde essas hemácias respondiam ao contato com essas hemaglutininas de maneira distinta (VAN DAMME *et al.*, 1998). A habilidade das aglutininas de plantas em distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou Boyd e Shapleigh a propor em 1954 o termo “lectina” (do latim “legere”, que significa selecionar ou

escolher) para nomear essas proteínas (SHARON; LIS, 2004). Outro grande marco na história das lectinas ocorreu em 1960, quando Petter C. Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* possui atividade mitogênica sobre linfócitos (SHARON; LIS, 2004).

Nos últimos anos, a partir dessas primeiras descobertas, a ciência da lectinologia vem aumentando exponencialmente. Esse interesse parte do princípio do uso de lectinas na detecção, isolamento e caracterização de oligossacarídeos, na tipagem sanguínea e na identificação de glicoconjugados. Ademais, lectinas são muito abundantes em vários organismos vivos, tornando-se de certa forma, fácil de serem purificadas.

No ano de 1980, Goldstein e colaboradores recomendaram uma definição para lectinas, que foi adotada em 1981 pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUMB). Assim, lectinas são definidas como proteínas de origem não imune, ligantes a carboidratos ou a glicoproteínas, capazes de aglutinarem células e/ou precipitarem glicoconjugados. Entretanto, esta definição recebeu várias críticas por se tratar de um conceito que caracteriza simplesmente uma definição com base em ensaios de atividade biológica *in vitro*, demonstrando um caráter puramente prático, uma vez que não se usa um conceito estrutural ou funcional (KOCOUREK; HOREJSI, 1981; VAN DAMME *et al.*, 1998).

Na década de 90, Peumans e Van Damme propuseram um conceito de lectinas, no qual abordaram propriedades estruturais tais como: merolectinas, hololectinas, e quimerolectinas, pela necessidade de descrever a presença ou não de sítios catalíticos de afinidade a carboidratos na própria molécula proteica, onde esta mesma molécula comportaria vários outros sítios de natureza não-catalítica (PEUMMANS & VAN DAMME 1995).

Com o avanço das pesquisas, as definições sobre lectinas foram modificadas, ampliando aspectos de sua atuação em sistemas biológicos, pois lectinas são as únicas proteínas capazes de reconhecerem e de se ligarem reversivelmente a carboidratos ou glicoconjugados de maneira bastante específica. Lectinas se diferenciam de enzimas ligadoras de carboidratos, porque não modificam a estrutura do açúcar ao qual se ligam, o que ocorre em processos enzimáticos, apesar de haver lectinas que, além do sítio de ligação lectínico, possuem um sítio enzimático (SINGH *et al.*, 1999). Além do mais, deve ser observado que a origem não-imune destas proteínas as distinguem de anticorpos. (LORIS, 1999; 2002; CUMMINGS, 1997).

Nos últimos anos, as lectinas começaram a serem consideradas moléculas bioativas, aumentando o interesse nas funções biológicas destas moléculas. A capacidade de

reconhecimento específico a determinados carboidratos, torna essa classe de proteínas diferentes de outras proteínas de plantas (LORIS, 2002, SHARON, 2007). Além disso, lectinas vem sendo usadas como terapia alternativa a medicamentos sintéticos, como por exemplo, a cisplatina, para diferenciar tumores benignos de malignos através da propriedade de reconhecimento a carboidratos (ARENAS, 1999, GORELIK; RAZ 2001).

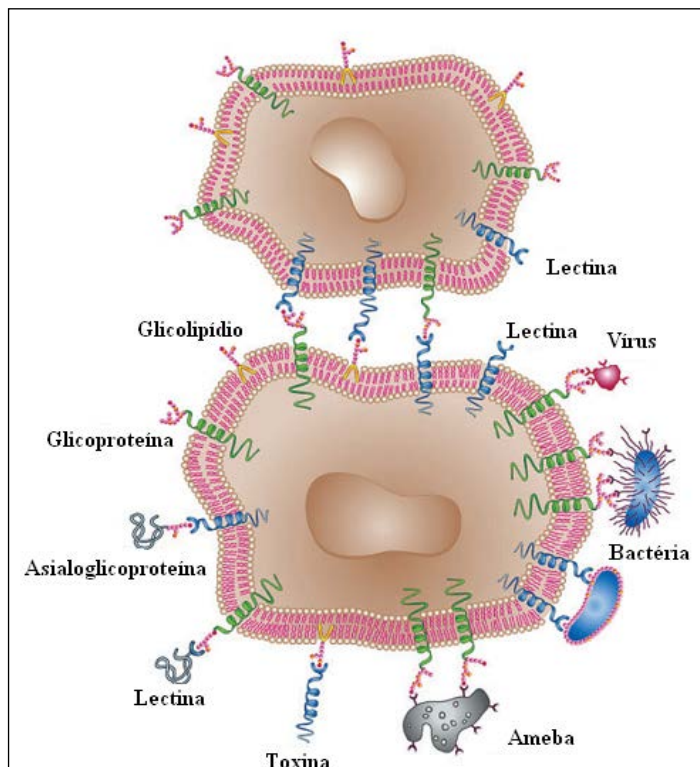
1.1.2 Ocorrência e funções

Lectinas podem ser encontradas nos mais diversos grupos de organismos como algas, plantas, bactérias, vírus, fungos, animais invertebrados e vertebrados. Desses organismos, diferentes proteínas já foram isoladas e caracterizadas mostrando o potencial de interação a diferentes carboidratos. Sendo assim, as lectinas representam uma classe de proteínas que podem ser utilizadas como ferramentas valiosas em diversos estudos.

A ubiquidade das lectinas reflete sua participação efetiva em atividades biológicas muito diversas atuando tanto intra como intercelularmente, tanto em processos fisiológicos, como em processos patológicos. As interações moleculares baseadas no reconhecimento específico entre lectinas e glicanos desempenham um papel chave em inúmeros processos celulares. Isso se deve, em parte, ao enorme potencial codificador da estrutura dos glicanos em comparação com outras macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos. Portanto, lectinas são também consideradas moléculas capazes de decodificar glicocódigos presentes nos mais diversos tipos celulares (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Os processos de interação das lectinas a carboidratos ocorrem, por exemplo, por meio de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas estabelecidas entre os carboidratos e os resíduos aminoacídicos do sítio ativo da lectina (WEIS, DRICKAMER, 1996). Devido a essa característica primordial de ligar-se a carboidratos, as lectinas desempenham várias atividades biológicas como citotoxicidade em células e organismo, adesão celular, interações célula-matriz, indução de apoptose e aglutinação de células e bactérias (SALES *et al.*, 2000; DANGUY *et al.*, 2002) (Figura 1).

Figura 1: Representação esquemática da interação lectina-carboidrato na superfície celular.



Fonte: SHARON; LIS, 2004.

Lectinas de plantas são um material que representam uma excelente fonte de moduladores imunológicos, que tem sido apontado como um nova estratégia para o combate de infecções causadas por microorganismos resistentes (HANCOOCK *et al.*, 2012). Comprovadamente, as lectinas possuem a capacidade de interferir no processo de formação de biofilmes microbianos (TEIXEIRA *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2011). Em adição algumas infecções são iniciadas por interações lectina-carboidrato, onde os patógenos desenvolvem mecanismos de adesão as células do hospedeiro, através desse mecanismo o qual é necessário pela própria célula de defesa, quando na eliminação do patógeno (SHARON; LIS, 1993). Ademais, esse tipo de estratégia leva um acesso mais facilitado a fontes nutricionais, evidenciando a melhora de substâncias tóxicas nos tecidos do hospedeiro e mesmo a penetração do patógeno nestes tecidos (KARLSSON, 1998).

Em algas, lectinas possuem atividade antifúngica e antiviral (CHEUNG *et al.*, 2014), atividade antimicrobiana (SINGH *et al.*, 2014) anticancerígena (TAN *et al.*, 2013), reconhecem e ajudam na aderência dos gametas sexuais durante a reprodução (HAN *et al.*, 2012) e estão envolvidas na simbiose e defesa desses organismos, como exibido por lectinas de plantas terrestres e outros invertebrados marinhos (KILPATRICK *et al.*, 2000). Também

são responsáveis pelo fenômeno de agregação de organelas celulares durante a formação de protoplasto após injúria celular (KIM *et al.*, 2005; GROSSMAN, 2005).

Em animais invertebrados as lectinas estão presentes principalmente na hemolinfa e nos órgãos sexuais. Já nos animais vertebrados as lectinas encontram-se distribuídas em todos os tecidos e órgãos, desempenhando as mais diversas funções como reconhecimento específico entre espermatozóide e óvulo na fecundação, interações entre células e célula-matriz extracelular, durante a embriogênese e no desenvolvimento do organismo, além de diferenciação e proliferação celular (GABIUS, 1997).

Em vegetais, a família das leguminosas é a mais bem estudada quanto ao isolamento e caracterização de lectinas. Essa família apresenta lectinas com alto grau de homologia e similaridade. São encontradas geralmente em cotilédones e endospermas, estando também presentes em folhas, raízes, tubérculos e flores. A grande maioria das lectinas conhecidas é proveniente de sementes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995b).

Fisiologicamente, acredita-se que as lectinas vegetais atuam como: transportadores e armazenadores de carboidratos (NAKAMURA *et al.*, 2004), ligação entre bactérias fixadoras de nitrogênio à raiz das plantas, inibição do crescimento de fungos, proteção das plantas contra ataque por insetos (WANG *et al.*, 2000) e regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento das plantas, entre outros (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

1.1.3 Reconhecimento Proteína-Carboidrato

O padrão de glicosilação presente na superfície celular (glicocálice) atua como um verdadeiro cartão de identificação da célula, armazenando informações valiosas a respeito do tipo celular e sobre seu estado metabólico. Entretanto, a forma como essa informação se apresenta é essencialmente diferente do que ocorre nos ácidos nucléicos e nas proteínas. Sequências de DNA, RNA e aminoácidos contém informações ordenadas de forma linear, enquanto os oligossacarídeos apresentam-se por sua vez ramificados. Dessa forma, os carboidratos apresentam-se capazes de gerar uma maior diversidade de conformações (apesar de constituídos também por unidades básicas) do que as estruturas de polímeros lineares (LORIS, 2002). Assim as interações entre proteínas e carboidratos servem como grandes vias de informação biológica, podendo ocorrer em diferentes contextos biológicos (GABIUS *et al.*, 2002).

As lectinas participam dessa interface como decodificadores, reconhecendo de forma específica mono ou oligossacarídeos ancorados a membrana celular. Entretanto, o processo de reconhecimento de estruturas glicídicas por proteínas apresentam algumas peculiaridades. Diferentemente dos 20 aminoácidos existentes, os blocos constituintes dos oligossacarídeos (monossacarídeos) são extremamente semelhantes, existindo apenas alguns poucos grupos funcionais para direcionar o reconhecimento (grupos OH, N-acetila, carboxilato, sulfato e pequenas cadeias alifáticas), porém, seu padrão de ramificação gera variedade conformacional suficiente para contornar esse problema (LORIS, 2002). Outro ponto centra-se na inflexibilidade natural dos glicanos (IMBERTY & PEREZ, 2000), o que torna as interações entre proteínas e carboidratos basicamente de baixa afinidade.

Uma característica bem difundida entre as lectinas é o fato de seus sítios de ligação apresentarem-se basicamente constituídos por sítios primários capazes de reconhecer especificamente um único monossacarídeo (com baixa afinidade). Entretanto, frequentemente existem sítios secundários que ligam-se a outros resíduos de monossacarídeos, ou mesmo a grupos hidrofóbicos, conectados ao mesmo monossacarídeo presente no sítio primário. A existência desses sítios adicionais aumenta a afinidade de ligação em uma ordem de magnitude que varia de duas a cinquenta vezes (LORIS *et al.*, 1998). Porém, na prática as lectinas fazem-se valer de múltiplos sítios de ligação (multivalência), uma vez que a maioria delas apresenta-se como dímeros ou tetrâmeros. Dessa forma, a conformação e disposição dos sítios de ligação, bem como dos epítopos por eles reconhecidos, são capazes de gerar uma interação de alta especificidade (SACCHETTINI *et al.*, 2001; BREWER & DAM, 2002).

1.1.4 Aplicações biológicas

Lectinas de diversas origens têm sido aplicadas em diversos modelos biológicos e apresentam as mais variadas utilizações. Dentre as aplicações elas têm sido usadas no estudo da arquitetura da superfície celular, tipagem de grupos sanguíneos e isolamento e caracterização estrutural de oligossacarídeos. Além disso, as lectinas apresentam efeitos biológicos de grande interesse como imunossupressão e mitogenicidade, por isso são amplamente utilizadas em imunologia e biologia celular (SHARON; LIS, 2004). Algumas lectinas discriminam diferentes tipos de células, incluindo conjuntos e subconjuntos de células linfóides (MACIEL *et al.*, 2004), e reconhecem células cancerosas em diferentes estágios de desenvolvimento (SHARON; LIS, 2004). Essas considerações têm induzido sua exploração como marcadores histoquímicos e como agentes para separação de células.

Diversas lectinas podem ainda apresentar aplicações terapêuticas, podendo ser utilizadas no combate de diferentes patógenos.

Recentemente algumas novas proteínas foram testadas com relação ao seu potencial antimicrobiano. Lectinas de sementes de *Archidendron jiringa* mostraram atividade inibitória contra *Bacillus subtilis* e *Streptococcus aureus*, mas não mostraram atividade contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2010). Na superfície celular desses microorganismos encontram-se diversos carboidratos, como por exemplo *N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina, que podem ser reconhecidos por lectinas que possuem especificidade por esses açúcares, essas proteínas apresentam a capacidade de aglutinar e/ou inibir o crescimento desses microorganismos pela ação sobre os carboidratos de membrana (YOSHIYUKI *et al.*, 2004).

Dentre outras aplicações biológicas podemos citar: agente anticâncer (EL AASSAR *et al.*, 2014), efeito antioxidante (JIMENEZ *et al.*, 2014), efeito inseticida (ROY *et al.*, 2014) formação de biofilmes microbianos (CAVALCANTE *et al.*, 2011; ISLAM *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2006; 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Várias infecções são iniciadas por interações lectina-carboidrato, como no caso da adesão celular e fagocitose de *P. aeruginosa* (IMBERTY *et al.*, 2004), *Neisseria gonorrhoeae* (SHARON, 2006) e *E. coli* (FIRON *et al.*, 1983). Lectinas são ainda capazes de participar do reconhecimento celular específico e atividade cancerígena antiproliferativa (WU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008), atividade antifúngica (ARAUJO-FILHO *et al.*, 2010), efeito tóxico sobre moluscos (SANTOS *et al.*, 2010), atividade antinociceptiva e efeito vasodilatador (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; ASSREUY *et al.*, 2009).

Nesse contexto, com o passar dos anos, mais e mais lectinas são descobertas aumentando o leque da possibilidade do uso de lectinas para uso como fonte de matéria – prima para terapias anti-câncer.

1.1.5 Classificação de lectinas vegetais

Baseado no conceito de lectinas proposto por Peummas e Van Damme (1994 e 1998), lectinas vegetais podem ser estruturalmente classificadas em quatro classes como: merolectinas, hololectina, quimerolectinas e superlectinas.

Merolectinas são proteínas simples e pequenas, constituídas exclusivamente de um único domínio de ligação a carboidrato. Devido a sua monovalência não precipitam glicoconjugados. Um exemplo dessa classe de proteínas é a lectina heveína purificada de

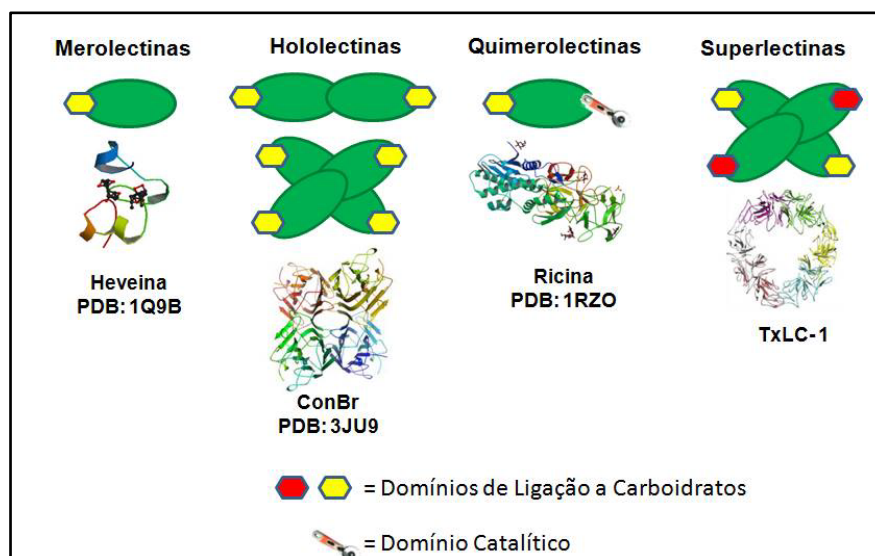
Hevea brasiliensis (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As **hololectinas** são compostas por mais de um domínio de ligação a carboidrato, que podem ou não serem homólogos entre si. Nesse caso as hololectinas são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas compreendem a maioria das lectinas de plantas e representam a classe de lectinas mais bem estudada, como exemplos podemos citar a lectina Concanavalina A (Con A) purificada das sementes de *Canavalia ensiformis*.

As **quimerolectinas** são proteínas de fusão, possuindo um domínio de ligação a carboidrato e um domínio não relacionado com uma atividade catalítica bem definida, agindo independentemente do domínio de ligação a carboidrato. Dependendo do número de sítios de ligação, quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. As RIPs do tipo 2 (proteínas inativadoras de ribossomos tipo II) são exemplos de quimerolectinas.

As **superlectinas** são as lectinas que apresentam pelo menos dois domínios distintos de ligação a carboidratos por molécula com a capacidade de reconhecer carboidratos estruturalmente diferentes, como exemplo podemos citar a lectina de tulipa denominada TxLC-I (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da classificação estrutural das lectinas vegetais: merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (Con-Br; PDB: 3JU9), quimerolectinas (Ricina; PDB: 1RZO; PPL2, PDB: 2GSJ) e superlectinas (TxLC-1, lectina de tulipa PDB: 2BMY).



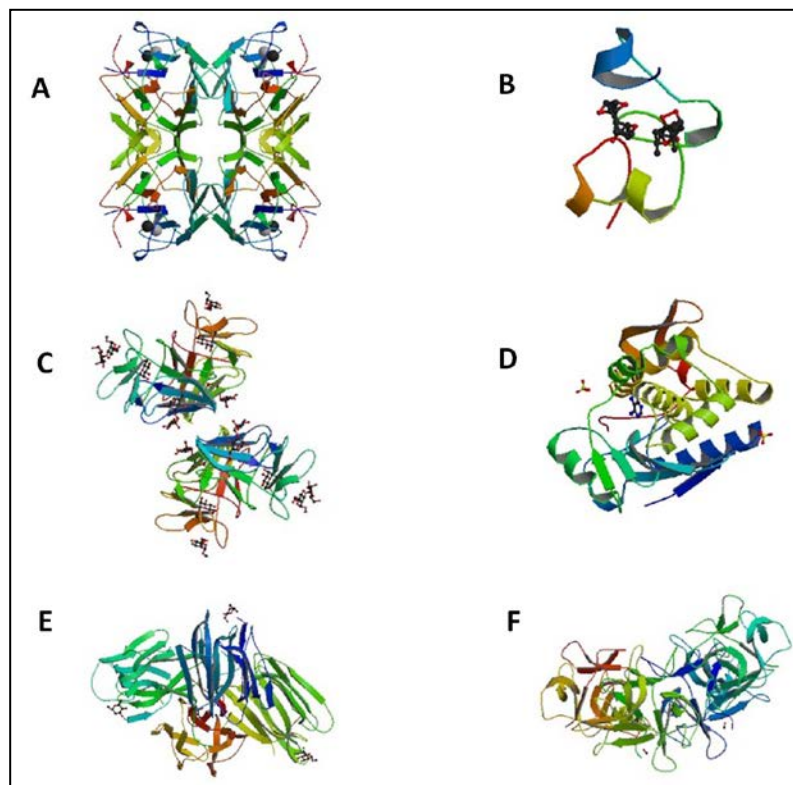
Fonte: Tese de Doutorado Helton Colares da Silva, Universidade Federal do Ceara, 2013.

Segundo Monteiro-Moreira (2002), ainda existem lectinas possuindo dois ou mais domínios ligantes a carboidratos, idênticos, mas que podem se ligar a açúcares diferentes. Criou-se um novo termo **Multilectinas** ampliando a classificação, como exemplo pode-se citar o caso da jacalina, lectina isolada das sementes de *Artocarpus integrifolia*, e da frutalina, lectina isolada das sementes de *Artocarpus incisa* (MOREIRA & AINOUS, 1977; MOREIRA *et al.*, 1998) que reconhecem tanto *D*-galactose como *D*-manose.

As lectinas vegetais podem ainda ser classificadas em sete famílias (Figura 3), de acordo com VAN DAMME *et al.* (1998), sendo elas:

- Lectinas de leguminosas: *Canavalia ensiformis*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Arachis hypogaea*, *Phaseolus limensis*, *Wisteria floribunda*, *Vicia cracca*, *Pisum sativum*, *Dolichos biflorus*, *Lens culinaris*, *Bauhinia purpurea* e *Ulex europaeus*.
- Lectinas ligantes a manose: *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia mallis* e *Pisum sativum*.
- Lectinas ligantes a quitina: *Triticum spp.*
- RIPs tipo 2: *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*.
- Lectinas relacionadas a jacalina: *Artocarpus integrifolia*.
- Lectinas relacionadas a amarantina: *Amaranthus caudatus*, *A. leucocarpus* and *A. cruentus*.
- Lectinas de floema de Curcubitacea: *Curcubita*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Sechium*, *Luffa spp.* e espécies de *Coccinia*.

Figura 3: Representantes estruturais das famílias de lectina vegetais. **(A)** Lectinas de leguminosas, *Canavalia ensiformis* (Con-A); **(B)** Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, Heveína; **(C)** Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA); **(D)** RIP's do tipo II, Ricina; **(E)** Lectinas relacionadas às Jacalinas, *Artocarpus integrifolia* (Jacalina); **(F)** Lectina da família da Amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA).



Fonte: Banco de dados de proteínas (PDB). Números de acessos: A) 1JBC (ConA), B) 1HEV (Heveína), C) 1NIV (GNA), D) 3OPZ (Ricina), E) 1UGW (Jacalina) e F) 1JLY (ACA).

1.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

1.2.1 Características gerais

A família Leguminosae é constituída por 727 gêneros e 19.325 espécies, tradicionalmente distribuídas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae. Ocupa distintos ambientes das regiões tropicais, subtropicais e temperadas, aparecendo como uma das famílias de maior riqueza em florestas neotropicais (SILVA *et al.*, 2013).

As lectinas de leguminosas são umas das mais bem estudadas entre as famílias de lectinas de plantas, pela facilidade de purificação dessas moléculas, abundância, propriedades moleculares e interações proteína-carboidrato. As lectinas de leguminosas formam uma família de proteínas homólogas (PARKIN *et al.*, 1996). Em sua maioria, são encontradas nas sementes, chegando a representar até 10% do total proteico, quantidade que depende do desenvolvimento da planta, do tipo de planta e do órgão vegetal (DAMODARAN *et al.*, 2008).

Lectinas de plantas participam dos mais diversos processos bioquímicos e biológicos, por meio disso, vem sendo estudadas por seus potenciais antifúngicos e inseticidas (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002). Além de tais características, pesquisas vem valorizando as interações proteína-carboidratos e, mais recentemente, as bases moleculares de tais interações (MALIK *et al.*, 2014). Várias lectinas da família das leguminosas foram purificadas e caracterizadas, na sua grande maioria lectinas de sementes (SHARON; LIS, 1990; VAN DAMME, *et al.*, 1998).

Lectinas de leguminosas apresentam afinidade por açúcares simples e complexos e seus diferentes grupos são reconhecidos através da especificidade a diferentes carboidratos (DAM; BREWER 2002). No grupo das leguminosas as lectinas são divididas pela especificidade a carboidratos em: manose-ligante, glicose-ligante e seus α -glicosídeos, galactose-ligante e *N*-acetilgalactosamina-ligante, *N*-acetilglicosamina-ligante, α -*L*-fucose-ligante e as ligantes a oligossacarídeos complexos.

1.2.2 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas

A família das lectinas de leguminosas tem sido estudada por várias décadas usando técnicas biofísicas e bioquímicas, considerando a especificidade de ligação a carboidratos, e particularmente a força que governa suas interações com vários sacarídeos, por isso é considerada um sistema modelo para estudos de interação proteína-carboidrato (BUTS *et al.*, 2001, GEETHANANDAN *et al.*, 2011). É a família de plantas mais bem descrita no Banco de Dados de Proteínas (PDB), com várias estruturas tridimensionais depositadas e resolvidas.

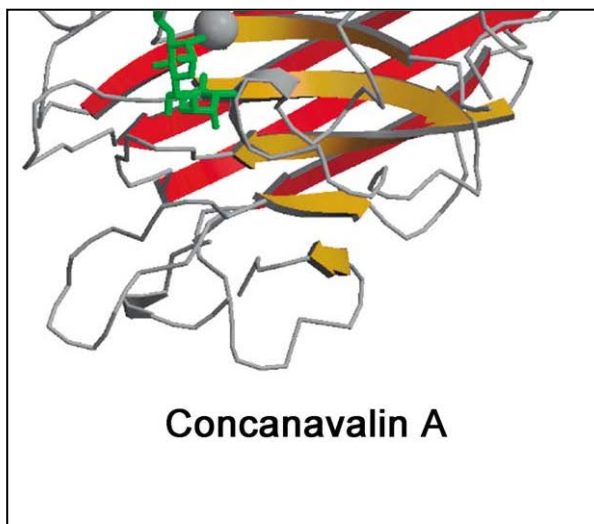
Lectinas de leguminosas possuem propriedades moleculares comuns, apesar das diferenças de especificidade a diferentes carboidratos (LIS; SHARON, 1986). Segundo Cavada (2001), lectinas de leguminosas apresentam alta similaridade estrutural, porém podem apresentar propriedades biológicas diferenciadas.

Estruturalmente, as lectinas de leguminosas são compostas por 2 ou 4 subunidades, sua massa molecular varia entre 25 a 30 kDa, onde várias dessas moléculas apresentam carboidratos em sua estrutura, sendo consideradas glicoproteínas, sendo ainda metaloproteínas por apresentarem íons, tais como Ca^{2+} e Mn^{2+} em sua estrutura (SHARON; LIS, 1989, SUREKUMAR; PRYIA, 2012). A lectina Concanavalina A é conhecida por apresentar três sítios específicos: um sítio para α -D-manose/glicose, outro para cátions divalentes (Ca^{+2} e Mn^{+2}), que ativam a proteína para a interação com o carboidrato, e outro sítio hidrofóbico. As lectinas de leguminosas usam Ca^{2+} e Mn^{2+} para estabilizar os sítios de ligação e fixar as posições dos aminoácidos que interagem com os açúcares ligantes. A coordenação ao cálcio fixa as cadeias laterais da proteína proporcionando uma ligação mais eficaz ao açúcar. Os cátions também estabilizam a arquitetura geral do sítio, fixando a posição dos elementos estruturais, ou seja, aqueles que interagem com outros grupos de proteínas que, por sua vez, possui o contato com o açúcar ligante. Assim, o Mn^{2+} não coordena nenhum resíduo que interage diretamente com a proteína, mas ao invés corrige a posição do Ca^{2+} (UETA; DINIZ, 2008).

As subunidades são comumente feitas por uma cadeia simples de polipeptídeos com aproximadamente 250 aminoácidos que carrega um ou dois oligossacarídeos *N*-ligados. A união entre esses aminoácidos é consolidada por forças não covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, que formam dímeros canônicos e estabilizam o tetrâmero pela união destes dímeros. As subunidades apresentam apenas um único sítio de ligação à carboidrato apresentando a mesma especificidade. Porém, algumas lectinas são formadas por 2 cadeias polipeptídicas. Assim, possuem um único centro de ligação a monossacarídeo por subunidade, no qual cada subunidade apresenta uma especificidade idêntica de açúcar, essas proteínas apresentam ainda como característica a presença de um elevado teor de aminoácidos acídicos e hidroxiaminoácidos, em contraste ao menor conteúdo de aminoácidos sulfurados. Estas lectinas são dímeros formados por duas subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α (10-12 kDa) e uma β (15 a 19 kDa) mantidas por ligações não-covalentes (SHARON; LIS, 1989; IMBERTY *et al.*, 2000; SHARON; LIS 2002; UETA; DINIZ 2008).

A estrutura das lectinas de leguminosas apresenta-se de uma forma complexa e estruturalmente relacionada com um motivo protéico chamado *jelly-roll*, que por sua vez está intimamente relacionado ao processo de reconhecimento a carboidratos. Este dobramento da estrutura é encontrado em muitas outras estruturas de proteínas LORIS (2002).

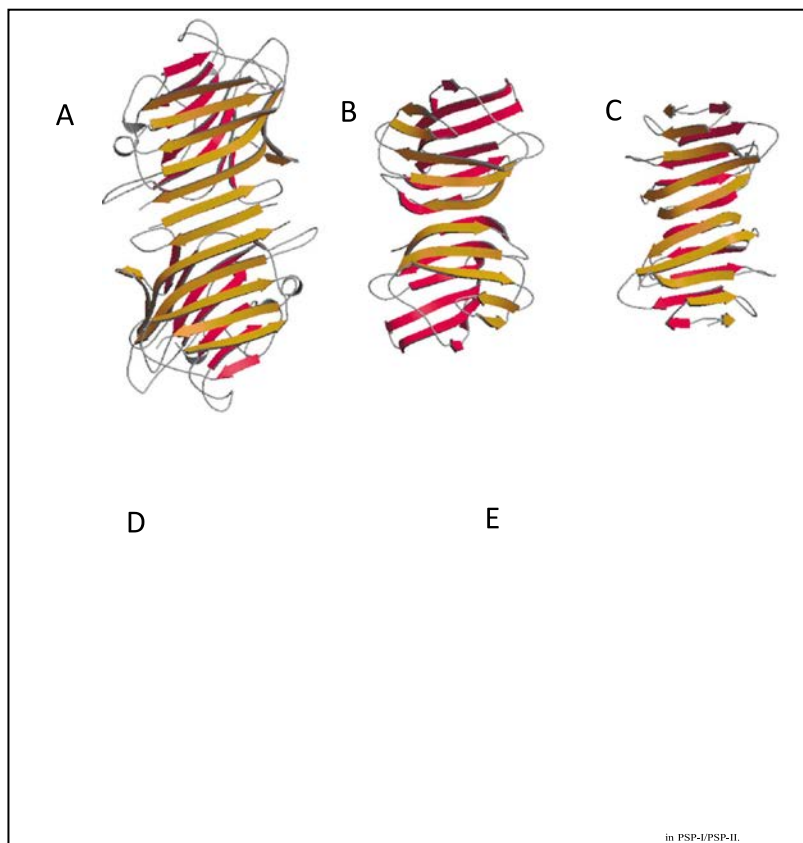
Figura 4: β -sanduíche da lectina Concanavalina A complexada com o trissacarídeo [Man(α 1-3)]Man(α 1-6)Man.



Fonte: LORIS (2002). Monômero simples da proteína multimérica, mostrando o motivo β -sanduíche da lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A). O carboidrato é mostrado em forma “ball-and-stick” e os íons metálicos são representados como esferas cinzas, e os ligantes mostrados em verde “ball-and-stick”.

Conforme Barnejee e colaboradores, (1996), a melhor descrição para as folhas beta envolve a presença de 3 folhas, uma β parcialmente estendida de seis fitas, uma outra β de sete fitas curvada, anti-paralelas e unidas por uma folha curta de 5 fitas, localizadas na parte superior do motivo. Todas as folhas estão conectadas por *loops*, a disposição desses *loops* depende da lectina. Esses *loops* estão presentes e dispostos em formato de sanduíche estabilizados por sítios hidrofóbicos. Essa estrutura foi primeiramente descrita para a concanavalina A (BARNEJEE *et al.*, 1996; CAVADA *et al.*, 2001; LORI, 2002) (Figura 4).

Figura 5: Variações da estrutura quaternária. O dímero canônico da lectina de leguminosa comparado com o dímero em galectinas humanas e com a espermadezina.



Fonte: LORIS, (2002). A) Lectina de lentilha, B) Galectina humana, C) Espermadezina, D) Tetrâmero da lectina de amendoim e tetrâmero da espermadezina.

A arquitetura dos sítios de ligação não são relacionados, arguindo contra a evolução divergente de um ancestral comum Figura 5 (LORIS, 2002).

Estudos recentes demonstram que além de sítios de ligação a carboidratos e sítios de ligação a metais, as lectinas de leguminosas também podem interagir com sítios hidrofóbicos, até mesmo interagindo com moléculas como o ácido aminobutírico. As ligações conservadas entre as lectinas de leguminosas são efetuadas através de uma região estrutural hidrofóbica, altamente conservada, onde por este motivo desempenham um papel biológico importante (DELATORRE *et al.*, 2007).

1.2.3 Subtribo Diocleinae

A subtribo Diocleinae é dividida em 13 gêneros (*Canavalia*, *Calopogonium*, *Camptosema*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Collea*, *Cratylia*, *Dioclea*, *Galactia*, *Herpiza*, *Luzonia*,

Macropsicanthus e Pachyrhizus), a partir do qual somente as duas últimas não estão presentes em áreas neotropicais. *Canavalia e Dioclea* são dois gêneros ao qual pertencem as espécies de estudo propostas neste trabalho.

O gênero *Canavalia* foi dividido em quatro sub-gêneros: *Canavalia*, *Catadonia*, *Maunaloa e Wenderothia*, e o gênero *Dioclea* em três sub-gêneros *Dioclea*, *Pachylobium e Platylobium* (MOREIRA *et al.*, 1995). Alguns exemplos de espécies pertencentes aos gêneros *Canavalia e Dioclea* (Figura 6).

Figura 6: Alguns exemplos de espécies dos gêneros *Canavalia e Dioclea*, família Leguminosae (Phaseolaeae) da subtribo Diocleinae.



Fonte: Elaborada pelo autor.

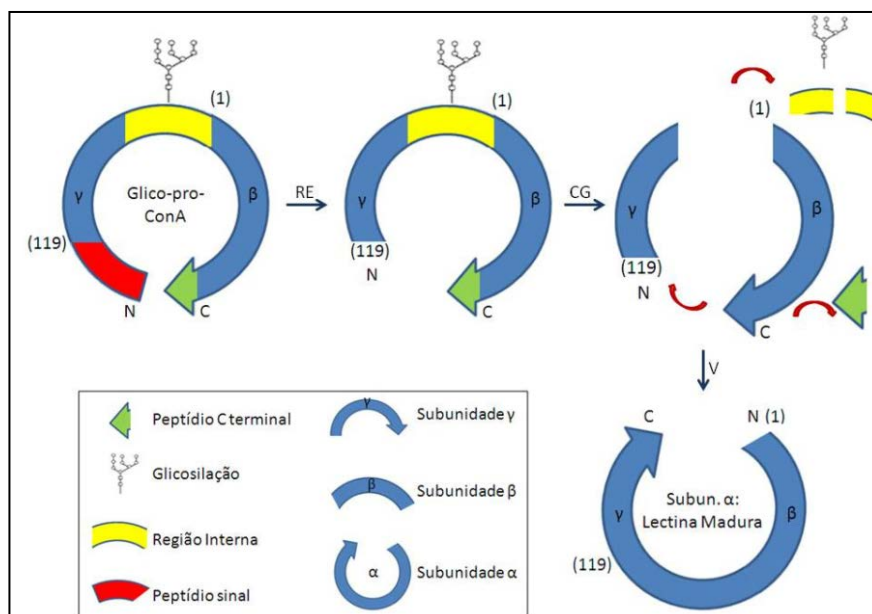
As lectinas presentes nas sementes da subtribo Diocleinae são na grande maioria glicose/manose específicas, podendo ser isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013, BARROSO-NETO *et al.*, 2014, VASCOLCELOS *et al.*, 2014, NASCIMENTO *et al.*, 2012, CORREIA *et al.*, 2011,).

Lectinas da subtribo Diocleinae são sintetizadas no retículo endoplasmático como pré-pro-lectinas agindo primeiramente como precursores glicosilados inativos. Apresentam um peptídeo sinal, com cerca de 30 resíduos de aminoácidos, perdendo-o no momento em que é transportado para o lúmen do retículo endoplasmático, dando origem a uma pró-lectina.

Logo após a perda da sequência sinal, a pró-lectina é endereçada ao complexo de Golgi, onde chega na forma de lectina ativa (proteína madura), esse processo envolve um mecanismo pós-traducional altamente complexo. Muitos autores postulam que a lectina madura e ativa não é glicosilada, pois a glicosilação inibiria a atividade de ligação a carboidrato da lectina (SHARON, 2007).

O mecanismo pós-traducional de permuta circular ocorre principalmente na subtribo Diocleinae, que se dá por meio de uma reação de transpeptidação de permuta circular. Logo após a formação da pró-lectina, esta sofre clivagens apresentando três fragmentos de aminoácidos, fragmento β (1118, 14 kDa), fragmento γ (119-237, 12 kDa) e por último uma extensão C-terminal de 9 resíduos de aminoácidos. O processo de maturação da lectina induz a retirada da porção C-terminal de nove resíduos de aminoácidos e de um peptídeo intermediário de 15 resíduos de aminoácidos, originando as cadeias γ e β , que são unidas novamente, mas de uma maneira inversa da que originalmente se encontravam no precursor, formando a cadeia α madura (CARRINGTON, 1985; NAGANO, 2008, GRANJEIRO, 1996) (Figura 7).

Figura 7: Permuta circular durante a biosíntese da Concanavalina A (Con A). CG: Complexo de Golgi, RE: Retículo endoplasmático, V: Vacúolo.



Fonte: Tese de Doutorado Helton Colares da Silva, Universidade Federal do Ceara, 2013.

O processamento que converte a pro-concanavalina A glicosilada (pré-pro-lectina) em lectina madura (Figura 7) mostra as extremidades amino e carboxi terminal da lectina

madura que estão indicados por N e C, respectivamente, e o número em parênteses refere-se a resíduos da ConA madura. Durante o processamento na planta, a pró-proteína glicosilada (inativa) é deglicosilada resultando no surgimento da atividade de ligação a carboidrato. Uma endopeptidase cliva o peptídeo carboxiterminal e o espaçador da deglicosilação, destacados em verde e amarelo, respectivamente. Os resíduos 118 e 119 são ligados enzimaticamente (CARRINGTON *et al.*, 1985).

As lectinas purificadas a partir de sementes da subtribo *Diocleinae* apresentam um alto grau de identidade em suas sequências, entretanto mostram atividades biológicas que podem ser muito distintas, motivo esse que pode ser explicado por vários fatores. As diferenças mencionadas decorre através das posições relativas dos sítios de ligação a carboidratos e ao equilíbrio dímero tetrâmero pH-dependente (CALVETE *et al.*, 1999). A substituição de um resíduo de aminoácido relacionado ao sítio de ligação a carboidrato tem sido também responsável por um sítio de ligação mais aberto, como é o caso da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) comparada com a lectina de *C. ensiformis* (ConA). Esse fato resulta em atividades distintas entre ConA e ConBr (CALVETE *et al.*, 1999).

Mudanças menores na composição de aminoácidos também são responsáveis pelas diferenças de afinidades e atividades biológicas na lectina de *Canavalia maritima* (ConM) (BEZERRA *et al.*, 2014). Podemos exemplificar tais atividades como atividade anti-inflamatória (BEZERRA *et al.*, 2014), efeito antidepressivo (RIEGER *et al.*, 2014), efeito antiproliferativo em células B16F10 (SILVA *et al.*, 2014) e efeito vasorelaxante (OSTERNE *et al.*, 2014). Assim, lectinas como a ConA e a ConBr podem ligar-se a carboidratos similares ou idênticos expostos diferentemente na superfície celular. Ademais, como apenas a forma tetravalente dessas lectinas é capaz de causar ligações cruzadas entre receptores na superfície celular, as diferentes razões entre as formas diméricas e tetraméricas em um dado pH podem apresentar respostas biológicas diferenciadas (GALLEGO DEL SOL *et al.*, 2004).

1.2.4 *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia maritima*, *Dioclea lasiocarpa* e *Dioclea sclerocarpa*

Filogenia:

Família: *Fabaceae* (*Leguminosae*)

Subfamília: *Faboideae*

Tribo: *Phaseolae*

Subtribo: *Diocleinae*

Gênero: *Canavalia*

Espécie: *Canavalia brasiliensis*

Canavalia maritima

Dioclea lasiocarpa

Dioclea sclerocarpa

Fonte: http://species.wikimedia.org/wiki/Main_Page

Canavalia brasiliensis MART. (Figura 8), também conhecida como “*Brazilian jackbean*” ou Feijão bravo do Ceará (Brasil), pertence a família *Leguminosae*, Tribo *Diocleae* e subtribo *Diocleinae* (DAM *et al.*, 1998). O gênero *Canavalia* se distingue dentro da subtribo *Diocleinae* devido a caracteres morfológicos os quais servem de referência para sua rápida identificação dentre os gêneros desta subtribo, possuíram aproximadamente 60 espécies e é comum na América e Europa. É uma espécie com uma ampla área de distribuição natural, estendendo-se do Norte do Trópico de Câncer, em Sinaloa, México a 27 °S, até o Nordeste da Argentina, sendo encontrada ainda na América Central, México e Caribe, Paraguai e Nordeste da Argentina. No Brasil, *Canavalia brasiliensis* é encontrada nas regiões Sudeste e Nordeste, adaptando-se muito bem a solos de baixa fertilidade (CRUZ *et al.*, 1995). Pelo menos 4 espécies de *Canavalia* são cultivadas como forrageira e alimento, enquanto que as demais espécies são silvestres em seus respectivos habitats naturais (MATOS *et al.*, 2004). Fracamente perene, é classificada como leguminosa herbácea.

Figura 8: Leguminosa *Canavalia brasiliensis* MART.

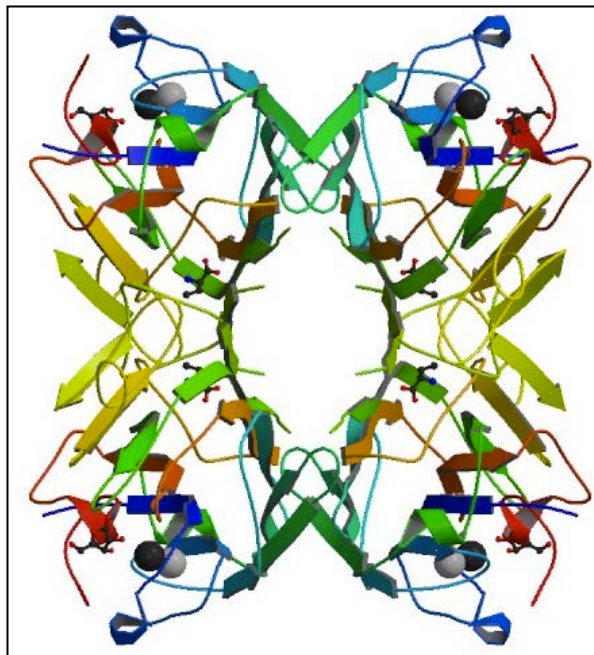


Fonte: CIAT. <http://ciat.cgiar.org/>.

A lectina ConBr, obtida das sementes de *Canavalia brasiliensis*, foi uma das primeiras lectinas a ser isolada e sequenciada e várias estruturas tridimensionais, de tal lectina complexadas com diferentes açúcares, encontram-se depositadas no Banco de Dados de Proteínas (PDB). ConBr é uma lectina *D*-glicose/*D*-manose-específica e apresenta Ca^{+2} e Mn^{+2} em sua estrutura. O monômero da ConBr contém 237 resíduos de aminoácidos. A lectina apresenta 99% de similaridade de estrutura primária com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), com mesma especificidade a glicose/manose. A análise da ConBr por eletroforese mostra uma banda maior de aproximadamente 30 kDa (cadeia α madura) e pequenos fragmentos de 16 kDa (cadeia β) e 12 kDa (cadeia γ) (MOREIRA & CAVADA, 1984; GRANJEIRO *et al.*, 1997; BARBOSA *et al.*, 2001; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

A estrutura cristalina da ConBr está representada na Figura 9. Somente dois resíduos de aminoácidos são substituídos com relação a ConA e esses resíduos não se localizam próximo do sítio de ligação a carboidratos (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997).

Figura 9: Estrutura tridimensional da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr).



Fonte : PDB. Número de acesso 4H55 (*Canavalia brasiliensis*). Os sítios de ligação a metais estão representados como esferas cinzas em cada monômero que compõe o tetrâmero.

Várias propriedades biológicas da ConBr foram descritas na literatura, tais como: efeito antiproliferativo em células de leucemia (FAHAEINA-MARTINS, 2012), efeito antinociceptivo (PIRES *et al.*, 2013), antibiofilme (CAVALCANTE *et al.*, 2011), ativação de linfócitos, apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001) e produção de óxido nítrico (NO) através de macrófagos (ANDRADE *et al.*, 1999), dentre outras.

A *Canavalia maritima*, também conhecida como feijão da praia (EDWARD, 1999) é uma vegetação rasteira e densa, comumente encontrada nas areias costeiras do sudeste da Flórida, sendo achada ainda na África, Ásia, Oceania, Austrália, América Central e América do Sul (MATOS *et al.*, 2004). Esta planta forma uma cobertura do solo, mas ocasionalmente pode ser encontrada escalando uma árvore pequena. É uma espécie comum em ambientes marinhos, sobretudo nas praias e costas tropicais e subtropicais. Nestes locais aparece sobre rochas ou matagais, onde é pioneira nos solos arenosos das dunas e praias (D'ARCY, 1980).

Figura 10: Leguminosa *Canavalia maritima*. Folhas, flores, sementes e vagem.



Fonte : <http://stuartxchange.com>

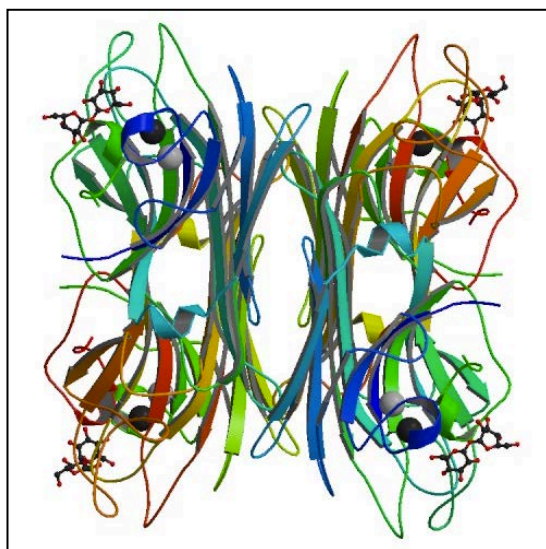
A lectina de *Canavalia maritima* (ConM) foi purificada e caracterizada como sendo uma hololectina, segundo Moreira e Cavada (1984) e possui especificidade pelos carboidratos maltose e trealose com maior afinidade por dissacarídeos em relação a monossacarídeos (DELATORRE *et al.*, 2006). ConM é uma proteína de 25,5 kDa, com 237 resíduos de aminoácido por monômero. Apesar do alto grau de similaridade 98%, entre a ConM e a ConA, diferenças significantes são pronunciadas em suas propriedades biológicas. Por exemplo, ConM e ConA promovem efeitos relaxantes em aorta, entretanto, ConM possui uma potência 3 vezes maior, resultando em liberação de óxido nítrico (NO), (GADELHA *et al.*, 2005). Podemos citar também, que ConA a 125 ug/mL inibe 100% do crescimento de *Streptococcus sanguis*, enquanto ConM foi incapaz de inibir na mesma concentração. Por outro lado, ConM a 100 ug/mL foi capaz de inibir significativamente a formação de biofilme de *Streptococcus mutans* e *S. sanguis*, enquanto ConA foi incapaz em nenhuma concentração testada obter tais resultados (BEZERRA *et al.*, 2007).

A ConM possui 8 pontes de hidrogênio que conectam o oligossacarídeo aos resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação a monossacarídeos.

A sequência primária de lectinas de Diocleinae mostra pequenas diferenças em alguns resíduos de aminoácidos, por esse motivo, pode-se levar a mudanças em estruturas quaternárias, levando a mudança estrutural e por final propriedades biológicas distintas. As

lectinas de ConM, CGL e ConA formam mais ligações de Van der Waals e hidrogênio, criando assim um contato maior na superfície do sítio de ligação promovendo alta afinidade por dimanosídeos (PINTO *et al.*, 2013).

Figura 11: Estrutura tetramérica tridimensional da lectina de sementes de *Canavalia maritima* (ConM), complexada com maltose.



Fonte: PDB, número de acesso 2CYF (*Canavalia maritima*). Em cada um dos monômeros podem ser vistos os *loops* superficiais e os sítios de ligação ao Ca^{2+} (bolas cinzas) e Mn^{2+} (bolas preta).

Comparando as estruturas primárias de lectinas de Diocleinae pode-se observar pequenas diferenças com relação a alguns resíduos de aminoácidos, o que pode levar a mudanças em suas estruturas quaternárias. As lectinas de ConM, *Canavalia grandiflora* (CGL) e ConA, formam mais ligações de Van der Waals e hidrogênio, criando assim um contato maior na superfície promovendo alta afinidade por dimanosídeos (PINTO *et al.*, 2013).

Pouco é reportado na literatura sobre a espécie de *Dioclea lasiocarpa*. A planta, em geral, é encontrada distribuída nas regiões da Caatinga e do cerrado do Nordeste brasileiro (Figura 12).

Figura 12: Leguminosa da espécie *Dioclea lasiocarpa*.



Fonte: <http://www.plantillustrations.org>

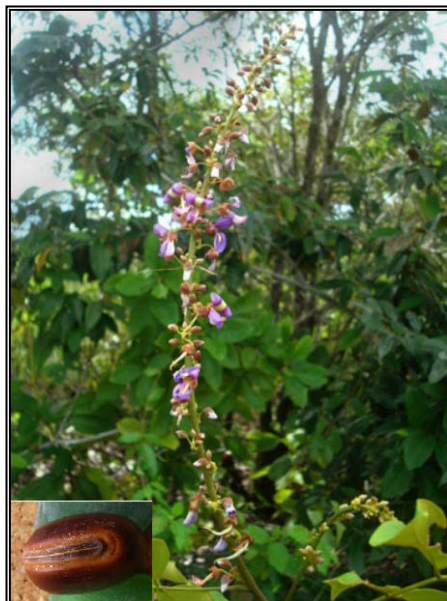
A lectina das sementes de *Dioclea lasiocarpa* foi purificada em um único passo por cromatografia de afinidade em uma coluna Sephadex G-50 de sendo nomeada DLasiL. A lectina aglutina fortemente eritrócitos de coelho e é totalmente inibida pelos açúcares *D*-glicose e *D*-manose, perfil de especificidade bastante semelhante a de outras lectinas da subtribo Diocleinae (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Dioclea lasiocarpa parece apresentar apenas uma lectina, composta de três cadeias de polipeptídeos com um peso de aproximadamente 30, 14 e 12 kDa. Como discutido anteriormente, a subtribo Diocleinae mostra um processamento pós-traducional de permutação circular, resultados que corroboram com análises de espectrometria de massas.

DLasiL foi cristalizada na presença de α -manose e sua estrutura tridimensional encontra-se em fase final de resolução pela técnica de difração de raios-X (dados não publicados).

Similar a *D. lasiocarpa*, pouco é reportado na literatura sobre a espécie de *Dioclea sclerocarpa*. A planta, em geral, é encontrada também nas regiões da Caatinga e do cerrado do Nordeste brasileiro (Figura 13).

Figura 13: Leguminosa da espécie *Dioclea sclerocarpa*.



Fonte: <http://fm2.fieldmuseum.org>

A lectina de sementes de *Dioclea sclerocarpa* (DSclerL) foi purificada também em um único passo cromatográfico por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. A estrutura primária, determinada por espectrometria de massas em *tandem*, revelou uma proteína com uma cadeia α apresentando 237 resíduos de aminoácidos e 81% de identidade com a ConA, classificando-a estruturalmente como uma *ConA-like*. Assim como outras lectinas de Diocleinae, DSclerL é um monômero com uma massa molecular de 25.606 Da, que se associa como tetrâmero. As cadeias β e γ pesam 12,873 Da e 12,752 Da, respectivamente. A atividade de hemaglutinação da DSclerL foi ótima entre pH 6,0 e 8,0, mas inibida após incubação com *D*-manose e *D*-glicose (CORREA *et al.*, 2011).

Através de alinhamento de sequências com o programa Esprit2.1 da DSclerL com outras espécies de lectinas de Diocleinae, foi comprovado o alto grau de homologia estrutural. O sítio altamente conservado de ligação a carboidrato e de ligação a metal na DSclerL contém os mesmos resíduos descritos para outras lectinas ConA-like. A proteína mais similar a DSclerL é a lectina das sementes de *D. megacarpa* que difere em apenas um resíduo de aminoácido na posição 155 (glutamina ao invés de ácido glutâmico).

O único relato descrevendo a atividade biológica das espécies de *Dioclea* propostas neste estudo foi o efeito vasodilatador da lectina de *Dioclea lasiocarpa* (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Necessita-se então de mais estudos sobre essas duas espécies. Pelo exposto, fica

claro o potencial biotecnológico de lectinas da subtribo Diocleinae, dessa forma, é proposto nesse trabalho, o estudo de prospecção de quatro lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL para o uso em drogas anticâncer e antiviral e o seu estudo estrutural de afinidade aos seus respectivos carboidratos de ligação.

1.3 ATIVIDADE ANTI-VIRAL DE LECTINAS

O vírus do tipo I e II da imunodeficiência humana (HIV I e II) é a causa da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), uma doença que é conhecida como a maior doença viral das três últimas décadas, com mais de 33,2 milhões de pessoas infectadas ao redor do mundo (OJEWOLE *et al.*, 2008).

HIV é classificado como um membro da família do lentivírus, baseado em sua morfologia, ciclo de vida e homologia de sequência genética a outros lentivírus. Os dois tipos de HIV conhecidos, HIV-1 e HIV2, manifestam sintomas clínicos similares e são transmitidos da mesma maneira. Entretanto, eles são diferentes em estrutura genética, antigenicidade e patogenicidade, onde o HIV-2 é menos patogênico se comparado ao HIV-1. Além disso, HIV-2 é transmitido menos eficientemente e é quase que exclusivamente achado no leste da África (PETROVA *et al.*, 2013).

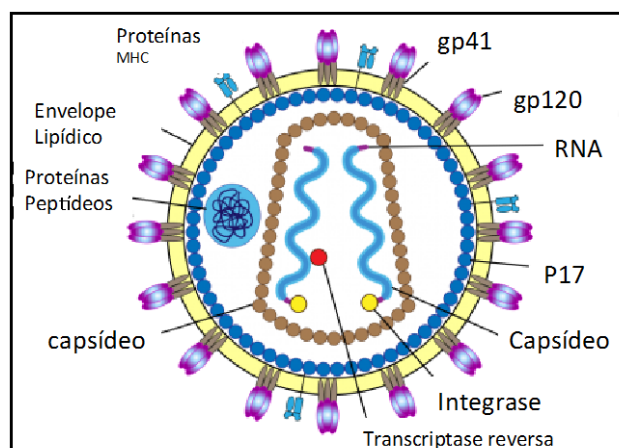
Infecções por HIV são caracterizadas pela resposta do hospedeiro que ativa tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, que parcialmente limitam a replicação do vírus. Os efeitos podem recair sobre a morfologia celular do hospedeiro, metabolismo e expressão genética alterando os níveis de proteínas bem como a produção de RNA mensageiro (WANGRONG *et al.*, 2005).

Resistência às drogas antivirais é uma das maiores razões para o fracasso da terapia contra a AIDS, assim como o avanço das cepas resistentes às diversas drogas. Desta forma, a procura por novas drogas que possam controlar, diminuir ou inibir a atividade viral, torna-se necessária. Neste contexto, compostos naturais e seus derivados são fontes inesgotáveis para o desenvolvimento de uma nova geração de terapias anti-HIV, muitas vezes mais efetivas com poucos efeitos colaterais (TANH-SANG & KIM, 2010). Interessantemente, lectinas possuem o potencial para bloquear a ligação do vírus HIV a moléculas alvo prevenindo a infecção e disseminação do mesmo (FÉRIR *et al.*, 2012).

A superfície dos retrovírus, como exemplo o HIV, é coberta por glicoproteínas codificado pelo vírus. As glicoproteínas, gp120 e gp41 presentes no envelope viral, são

altamente glicosiladas, com glicanos estimados em contribuir com 50% do peso molecular da gp120, como mostra a figura 14 . Lectinas podem então reconhecer de forma específica esses alvos, sejam elas intrínsecas ou externas ao organismo hospedeiro (MIZUOCHI *et al.*, 1988; JI *et al.*, 2006).

Figura 14: Anatomia do Vírus da Imunodeficiência Adquirida.



Fonte : <http://openwetware.org>

O passo inicial na infecção pelo HIV é a ligação que ocorre entre o receptor gp120 do envelope viral e a superfície das células-alvo. A exposição prolongada de agentes como as lectinas às células de vírus infectadas, causa deglicosilações no envelope viral, criando viriões que são altamente susceptíveis à neutralização por respostas imunogênicas. Esses viriões possuem baixa resistência a outras moléculas pequenas invasoras (MAHALIGAM *et al.*, 2011).

A atividade antiviral de lectinas parece depender da sua habilidade em se ligar a oligossacarídeos que contém manose presentes nas superfícies das glicoproteínas do envelope viral. Essas moléculas provocam distúrbios nessa interação (BOTOS; WLODAWER, 2005; BALZARINI, 2006). As lectinas que se utilizam deste mecanismo são conhecidas como lectinas ligante a manose (MBL) (LIU *et al.*, 2014). A lectina de ervilha (PNA) (LAM; NG, 2011) e a lectina de banana (BanLec) possuem atividade inibitória contra a infecção por HIV-1 (ALLEN *et al.*, 2009). Outros exemplos apresentados na literatura são a *Myrianthus holstii* (CHARAN *et al.*, 2000), as lectinas purificadas da jacalina (O'KEEFE *et al.*, 1997), a *Urtica dioica* (BALZARINI *et al.*, 1992), *Narcissus pseudonarcissus* (BALZARINI *et al.*, 1991) e a concanavalina A (HANSEN *et al.*, 1989).

Em adição, outros vírus também possuem papel importante no contexto de lectinas, como o coronavírus da síndrome respiratória aguda (SARS-CoV) e o vírus da peritonite canina infecciosa (FIPV). O SARS-CoV surgiu em 2002 como uma causa importante da infecção severa do trato respiratório em humanos, já a infecção FIPV causa a peritonite crônica e fatal em gatos. Experimentos com 33 lectinas de plantas diversas com diferentes especificidades por carboidratos foram realizados e mostraram que as lectinas possuíam propriedades antivirais marcantes contra o coronavírus, uma EC_{50} na faixa de nanomolar. A atividade mais alta anti-coronavírus foi encontrada em lectinas que se ligam a manose (KEYAERTS *et al.*, 2007).

Como mostra a literatura, as lectinas possuem um grande potencial contra vários tipos de vírus. Esses produtos naturais são fontes de matéria-prima e podem ser facilmente isolados e purificados. Para estes fins, lectinas podem ser aplicadas permitindo a produção de compostos com reduzidas citotoxicidade e alta especificidade. Ademais, essas evidências sugerem a possibilidade do desenho de novas drogas no combate a infecções virais com efeitos benéficos à saúde e gerando ingredientes ativos para a preparação de novos produtos farmacêuticos.

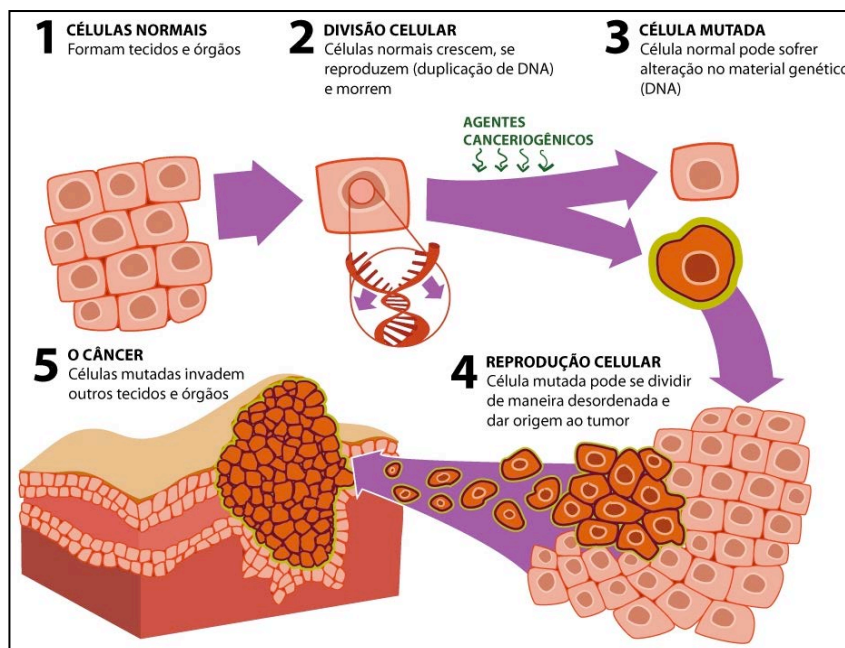
1.4 CÂNCER

1.4.1 Aspectos Gerais

O câncer é uma neoplasia degenerativa crônica que envolve um grupo de doenças que é desencadeada por crescimento celular desregulado. É considerado a segunda causa mais comum de morte em países economicamente em desenvolvimento. De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC), existem mais de 10 milhões de novos casos por ano no mundo. Em 2008, havia 12,7 milhões de casos de câncer e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a doença deverá causar 13,1 milhões de mortes em 2030 (FORMAN *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2014).

Segundo a OMS, o câncer surge a partir de uma única célula. A transformação de uma célula normal em uma célula de tumor é um processo multi-etapas. A figura 15 representa a progressão de uma lesão pré-cancerosas de tumores malignos.

Figura 15: Representação da progressão de uma lesão pré-cancerosa de tumor maligno, a partir de uma célula normal até a fase de metástese.



Fonte: Revista Nova Escola (<http://www.ihoba.com.br>).

As alterações, ilustradas na figura 15, são o resultado da interação entre fatores genéticos, comportamentais e meio-ambiente de uma pessoa, com três categorias de agentes externos, incluindo:

- 1:** Fatores cancerígenos físicos, tais como as radiações ultravioleta e ionizante;
- 2:** Fatores cancerígenos químicos, tais como amianto, componentes da fumaça do tabaco, a aflatoxina (um contaminante de alimentos) e arsênico (um contaminante de água potável) e,
- 3:** Fatores cancerígenos biológicos, tais como infecções de certos vírus, bactérias ou parasitas (KIARIS, 2006).

Algumas mudanças fisiológicas nas células neoplásicas descrevem o processo de progressão maligna tumoral, dentre essas mudanças podemos citar: 1) auto-suficiência em sinais de crescimento, 2) insensibilidade aos sinais anticrescimento, 3) evasão de apoptose, 4) potencial replicativo ilimitado, 5) angiogênese sustentada e 6) invasão de tecidos com metástases. Ademais, a maioria dos cânceres adquire o mesmo conjunto de capacidades funcionais durante o seu desenvolvimento, ainda que através de várias estratégias mecânicas (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Ao longo dos anos, as pesquisas vêm avançando e gerando vários tipos de tratamento contra o câncer. Contudo, com a clareza do mecanismo, prognóstico e tratamentos personalizados, o estudo do câncer vai se tornar uma ciência racional (VEER; BERNARDES 2008; SIMON; ROYCHOWDHURY, 2013).

1.4.2 Câncer x Lectinas

Nas últimas duas décadas, lectinas têm sido usadas como uma ferramenta de reconhecimento para diferenciar tumores malignos de benignos pela capacidade de reconhecer, dentre outros fatores, o grau de glicosilação de células, tecidos e proteínas, o que está diretamente associado à metástase. Em vários países, diferentes lectinas são utilizadas como terapia alternativa a drogas convencionais pelo seu uso comprovadamente eficiente. A lectina de *Viscum album* é usada em tratamentos clínicos alternativos contra melanoma maligno apresentando baixa mortalidade de pacientes durante o tratamento (AUGUSTIN *et al.*, 2005), sendo inclusive comercializada pela empresa Sigma-Aldrich. Assim, lectinas são indicadas para a redução de tratamentos associados a efeitos colaterais como agente auxiliar durante quimioterapia e radioterapia (VALENTINER *et al.*, 2003). Outro exemplo de terapia alternativa usando lectinas é o uso de lectinas de *mistletoe* para câncer de seio (GROSSARTH-MATICEK; ZIEGLER, 2008).

Apesar de se tratar de lectinas resistentes a digestão, de sobreviverem a passagem pelo intestino, e se ligar às células gastrointestinais, entram na circulação intactas, mantendo sua atividade biológica. Várias delas possuem atividade anticancerígena *in vitro* e *in vivo*, preferencialmente se ligam a membranas celulares de câncer ou a seus receptores, causando citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento do tumor. Elas podem também afetar o sistema imune pela alteração da produção de vários interleucinas, ou pela ativação de proteínas quinases. Diferentes lectinas podem ainda se ligar a ribossomos e inibir a síntese de proteínas, muitas delas modificam o ciclo celular pela indução não apoptótica dos mecanismos de acumulação da fase-G1, bloqueiam o ciclo celular G2/M e causam apoptose, podendo ainda ativar a cascata de caspases (MEJIA; PRISECARU, 2005).

Alguns mecanismos pelos quais as lectinas de plantas podem estimular a morte celular de células cancerígenas são sugeridos e incluem: apoptose e autofagia. Uma lectina isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PCL) mostrou alto potencial de inibição do crescimento de células MCF-7 de câncer de mama (MEJÍA; DIAS, 2010). Outro exemplo é a lectina purificada a partir das sementes de *Bauhinia variegata*, denominada BG2, que foi

capaz de inibir a proliferação celular de câncer de mama MCF-7 e de hepatoma HepG2, exibindo uma IC_{50} de 0,18 e 1,4 μ M, respectivamente (LIN; NG, 2008). A lectina de *Bauhinia forficata* (BFL) também mostrou capacidade de inibir a viabilidade celular de MCF7. BFL provocou necrose primária e necrose secundária, com inibição da caspase-9. Isso também faz com que o ácido desoxirribonucléico (DNA) de fragmentação, o que conduz a paragem do ciclo celular na fase G2/M, tenha uma diminuição na expressão de proteínas reguladoras pRb e p21 (SILVA *et al.*, 2014).

A lectina de *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A (Con A), uma das mais bem estudadas lectinas derivada de leguminosas, modelo em diversos tipos de estudo, faz parte da mesma subtribo que as lectinas presentes nesse estudo. Con A induz autofagia em células de hepatoma, através da internalização, envolvendo uma proteína mitocondrial chamada de Bcl2/E1B de 19 kDa (ROY *et al.*, 2014). Con A também exibe efeito antiproliferativo em células de melanoma A375, onde os mecanismos de ação envolvem apoptose dependente de caspase-9 e caspase-3, no qual pode causar um colapso mitocondrial, levando a liberação de citocromo c e a ativação de caspase-9 e caspase-3 (LIU *et al.*, 2009).

Estudos mostram que Con A adere e se liga às membranas dos receptores celulares de carcinomas de pele de células de Merkel (SAMES *et al.*, 2001). Em adição, Con A pode induzir apoptose mitocondrial, apoptose 73-Foxola-Bim, autofagia mitocondrial mediada por BNIP3, eventualmente causando morte das células tumorais. Ademais, Con A também pode inibir a sobrevivência de células cancerígenas via IKK-NF-kB-COX-2, SHP-2-MEK-1-ERK, e SHP-2-Ras-ERK (SHI *et al.*, 2013).

A lectina purificada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, denominada ConBr, juntamente com ConA, foram testadas em células de leucemia MOLT-4 e HL-60. ConBr e ConA mostraram serem capazes de inibir o crescimento das células cancerígenas, no entanto, em linfócitos de sangue humano normais testados, as lectinas não foram citotóxicas, mesmo testadas a concentrações elevadas como 200 μ g/mL. ConBr e ConA produziram uma taxa de danos ao DNA superior a 80% em células HL-60 e MOLT-4 (LI *et al.*, 2011).

Mediante a busca por novas terapias, associadas a comprovada eficácia de lectinas em participarem eficientemente no tratamento contra o câncer, a presente tese propõe o aproveitamento da grande diversidade da fauna brasileira para o estudo de lectinas contra câncer e algumas cepas de vírus.

2. OBJETIVOS DO TRABALHO DE TESE

2.1 Objetivo geral

O propósito geral deste estudo foi investigar o potencial anticancerígeno e antiviral das lectinas da Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinae: *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *C. maritima* (ConM), *Dioclea lasiocarpa* (DLasiL) e *D. sclerocarpa* (DSclerL).

2.2 Objetivos específicos

- Purificar as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL através de técnicas cromatográficas diversas;
- Caracterizar os metais divalentes das lectinas: ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL através das técnicas de EPR e de ICP/MS;
- Determinar a massa molecular aparente da DLasiL;
- Determinar a estrutura primária de DLasiL;
- Verificar as mudanças estruturais e de afinidade por carboidratos da DLasiL, através de dicroísmo circular e fluorescência;
- Avaliar a atividade anticancerígena das lectinas: ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL;
- Averiguar o mecanismo inicial de ação da atividade anti-cancerígena de DLasiL e;
- Avaliar a atividade antiviral das lectinas: ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS LECTINAS

3.1.1 Extração e purificação das lectinas de ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL

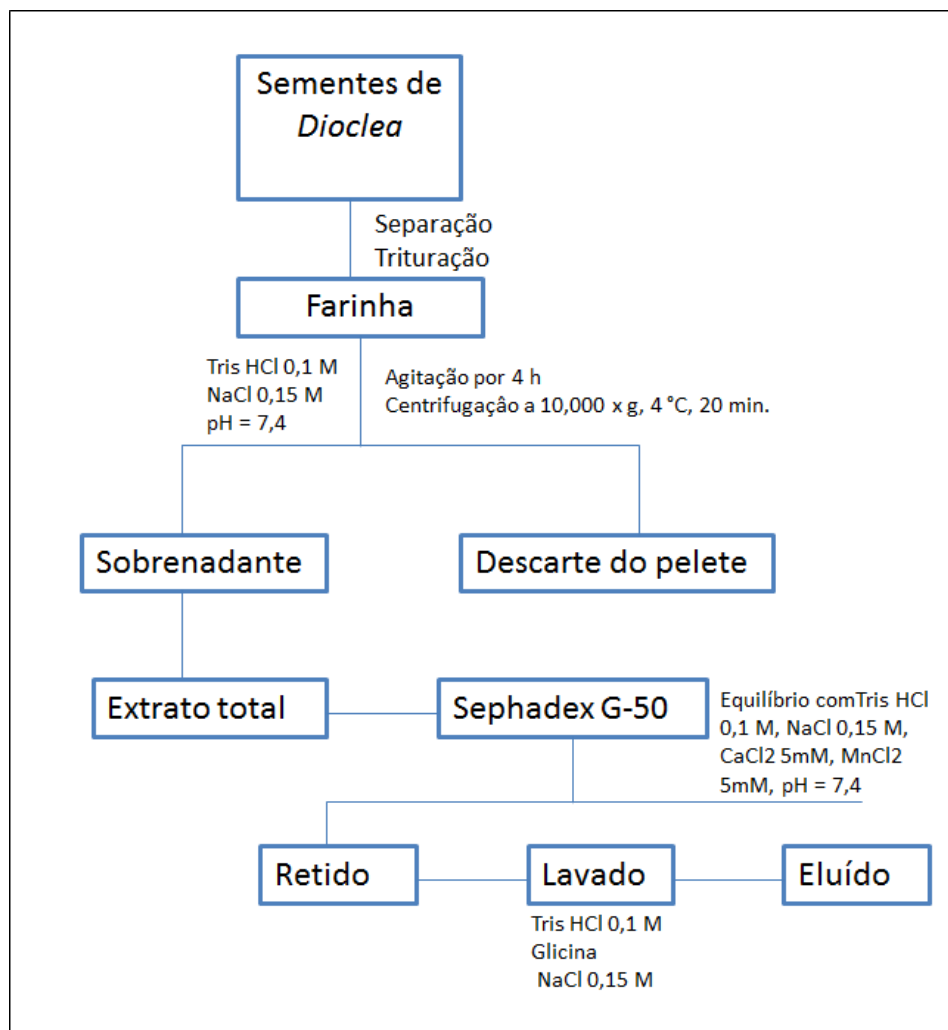
As lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL foram purificadas a partir das sementes das leguminosas *Canavalia brasiliensis*, *C. maritima*, *Dioclea lasiocarpa* e *D. sclerocarpa*, seguindo o protocolo determinado por (MOREIRA *et al.*, 1991; MOREIRA & CAVADA, 1984; NASCIMENTO *et al.*, 2012; CORREIA *et al.*, 2011). As sementes foram coletadas maduras, lavadas e secas em estufa por 24 h a 37 °C. Em seguida trituradas em moedor de café, peneiradas e a farinha fina foi mantida em embalagens plásticas para imediata purificação. As proteínas solúveis foram extraídas pelo contato com tampão Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,4, na proporção [1:10 p/v] em agitação por 4 horas. O material foi em seguida centrifugado a 10.000 x g e o sobrenadante denominado extrato total, foi então filtrado em papel de filtro e em seguida submetido a purificação em coluna cromatográfica por afinidade.

A cromatografia de afinidade é uma técnica que utiliza a habilidade de certas moléculas em se ligar especificamente a um determinado ligante, utilizando-se desta propriedade para a construção de colunas onde o ligante está covalentemente ligado a uma matriz. A técnica utiliza propriedades físico-químicas para separação dos componentes de uma mistura, no qual é usado uma fase móvel (extrato protéico) pela fase estacionária (Sephadex G-50). Dessa maneira, os componentes de uma mistura protéica são distribuídos de modo que eles são seletivamente retidos na fase estacionária. A eluição das proteínas ligadas à coluna é feita através da introdução de uma substância que se liga a fase móvel, removendo-a.

As lectinas foram purificadas através de cromatografia de afinidade. O extrato total, obtido da extração total de proteínas, foi aplicado em uma coluna Sephadex G-50 (a coluna é feita de cadeias poliméricas de dextrana por meio de ligações covalentes cruzadas). Sephadex G-50 foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM. Inicialmente, o material que não interagiu com a coluna foi removido com o mesmo tampão de equilíbrio e denominado P-I. Em seguida, o material retido, denominado PII, foi eluído com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 contendo D-Glicose 100 mM. A cromatografia foi realizada a um fluxo contínuo de aproximadamente 1 mL/min,

e os eluatos cromatográficos foram coletados em frações de aproximadamente 2,5 mL e monitorados a absorvância a 280 nm (Figura 16). As lectinas purificadas foram então dialisadas oito vezes contra água destilada e duas vezes contra água Mili-Q e, subsequentemente liofilizadas. A atividade hemaglutinante foi determinada utilizando eritrócitos tripsinizados de coelho.

Figura 16: Organograma de obtenção das lectinas da subtribo Diocleinae.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.1.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A massa molecular aparente de ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL durante as etapas de purificação foi acompanhada através de eletroforese em gel de poliacrilamida. A técnica

desenvolvida por LAEMMLI (1970) se baseia na migração de proteínas carregadas em um campo elétrico, onde a migração é afetada pela forma e tamanho das moléculas.

Amostras das lectinas liofilizadas foram ressuspensas a concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo de Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01% e SDS 2%, que desnatura e carrega negativamente as proteínas de maneira homogênea. Para os testes em condições redutoras, as mesmas foram acondicionadas em tampão contendo β -mercaptoetanol à concentração final de 5%. Antes da aplicação das amostras ao gel, as mesmas foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos.

As proteínas podem igualmente ter sido precipitadas com TCA 100% a fim de concentrá-las. Para isso, à amostra foi adicionado 1/10 do volume final de TCA 100% gelado, em seguida o material foi incubado por 15 minutos a 4 °C, seguido por centrifugação a 13.000 x g a 4 °C por 15 minutos. O pelete protéico foi então ressuspense no tampão de amostra. Um microlitro de NaOH 1 M foi adicionado para aumentar o pH a fim de manter a coloração azul da solução.

A eletroforese foi então feita em sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad), de potencia até 5W e voltagem aproximada de 200V e amperagem constante de 35 mA. O tampão de corrida utilizado foi Tris-HCl 25 mM, pH 8,8.

As amostras foram então depositadas no gel de poliacrilamida formado por um gel de concentração (acrilamida/bisacrilamida 5%, pH 6,8) e um gel de separação, no qual a porcentagem de acrilamida varia em função do peso molecular das proteínas a serem separadas, para este trabalho foi utilizado um gel de acrilamida/bisacrilamida 12%. Em seguida, o gel foi retirado do sistema eletroforético de corrida e fixado com uma solução de isopropanol 25% e ácido acético 10%, por 2 horas. Assim depois de fixadas as proteínas no gel, este foi corado em comassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água perfazendo uma proporção de 1:3, 5:8 (v/v/v). O descoramento foi realizado através de várias lavagens com água destilada morna.

3.2 ESTUDOS ESTRUTURAIS

3.2.1 Determinação da sequência primária de DLasiL

- Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado, em duplicata, a partir de folhas recém expandidas de *Dioclea lasiocarpa*, utilizando-se o método baseado no detergente brometo de

cetiltrimetilamônio (CTAB). As folhas recém expandidas de *D. lasiocarpa* foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O macerado foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL contendo 6 mL de tampão de extração CTAB (Tris 100 mM pH 8,0; CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; 2-mercaptoetanol 0,2% v/v) contendo de 1% de PVP (polivinilpirrolidona) pré-aquecido a 60 °C, o qual permaneceu em incubação por 1 hora a 60 °C, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (25:1, v/v), que permaneceu em agitação suave por 5 minutos. A emulsão foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 $\times g$ e a 4 °C. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo Falcon e foi adicionada a esta 0,3 volumes de isopropanol. O tubo foi invertido gentilmente e incubado no freezer -20 °C por 30 minutos. A mistura foi centrifugada para a precipitação do DNA genômico. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. O DNA foi recolhido e transferido para um microtubo e foi realizada outra centrifugação por 10 minutos, a 10.000 $\times g$ e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto à temperatura ambiente até total evaporação do álcool. O DNA isolado foi ressuspenso em 70 μ L de água ultrapura estéril e estocado em geladeira a 4 °C. Em seguida, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi submetida 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 DNA foi visualizado através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador. A quantificação da amostra obtida foi analisada mediante medição da absorbância (1 unidade de absorbância a 260 nm corresponde a 50 μ g de DNA cadeia dupla).

- Amplificação do gene para a lectina DLasiL

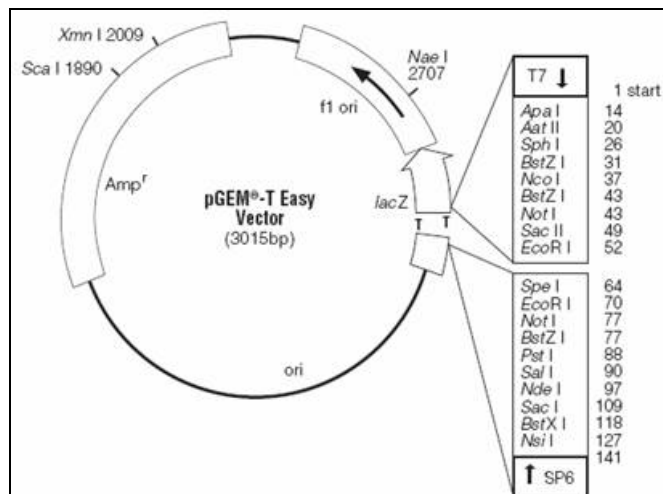
A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um microtubo 0,2 mL usando 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Scientific) e o oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os que flanqueiam a pauta de leitura (ORF) da lectina de *Dioclea guianensis* (NAGANO *et al.*, 2008). A reação reuniu o tampão da Taq DNA polymerase, cloreto de magnésio, dNTP Mix e o 100 ng de DNA genômico de *D. lasiocarpa*. A reação de amplificação ocorreu no termociclador *Eppendorf MaxyGene gradient*, programado para um passo inicial de desnaturação (5 min a 94 °C), seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a uma temperatura de 50 °C (anelamento) e 1 minuto a 72 °C (extensão). No último ciclo, realizou-se uma última fase de extensão prolongada de 72 °C por

7 min. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. A purificação do fragmento de interesse foi realizada segundo o manual do kitPureLink™ QuickGel Extration (Invitrogen™/Life Technologies). Para isso, uma pequena excisão do gel, contendo o fragmento de interesse, foi transferida para um microtubo 1,5 mL contendo o tampão L3 (tampão de solubilização), na proporção de 3:1, e incubado a 50 °C por 10 minutos até obter um homogeneizado. O homogeneizado foi transferido para um microtubo contendo uma coluna de extração (fornecido pelo fabricante) e centrifugado a 12.000 \times g por 1 minuto a 4 °C. O filtrado foi descartado e na coluna foi adicionado 500 μ L do tampão W1 (tampão de lavagem), seguido novamente por centrifugação. O filtrado foi descartado e foi feita uma nova centrifugação para retirar qualquer resíduo do tampão W1 da coluna. O DNA retido na coluna de Miniprep foi eluído adicionando 60 μ L de água mili-q e centrifugado por 12.000 \times g por 1 minuto a 4 °C. O produto purificado foi analisado por gel de agarose 1% e quantificado pelo NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences).

- Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T Easy

O produto amplificado e purificado do gel de agarose foi ligado ao plasmídeo pGEM-T *Easy Vector* (Promega, USA) (Figura 17), de acordo com as especificações do fabricante. O inserto foi ligado na região de inserção do sítio múltiplo de clonagem do tipo T/A dentro do sítio de restrição para a EcoRI. O vetor tem o marcador de seleção LacZ. A ligação foi realizada usando 64,16 ng de DNA com o vetor de clonagem pGEM-T-*easy* a 4 °C por 16 horas em termociclador *Eppendorf MaxyGene gradient*.

Figura 17: Representação esquemática do vetor pGEM-T Easy vector da promega



Fonte: Promega Corporation.

- Transformação bacteriana

O produto da reação de ligação foi submetido a uma transformação bacteriana, por choque térmico, com a cepa DH5 α de *Escherichia coli*. A transformação foi realizada em 200 μ L de CaCl₂ 200 mM contendo uma colônia de *E. coli* DH5 α , crescida em meio LB ágar, e o produto da reação de ligação. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos seguido de banho-maria a 42 °C por 90 segundos e novamente em banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, as células foram transferidas para um tubo falcon contendo 800 μ L de meio SOC (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM e glicose 20 mM) pré-aquecido a 37 °C e foram incubadas por 1 hora a 37 °C com agitação de 200 rpm. Em seguida, foram incorporadas 200 μ L das células transformadas com o produto da reação de ligação em placas de Petri contendo meio SOB (triptona 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,05%, KCl 2,5 mM e MgCl₂ 10 mM) ágar, ampicilina 100 μ g/mL, IPTG 0,5 mM e X-Gal 40 μ g/mL, sendo incubadas por 16 horas a 37 °C. Colônias brancas foram consideradas transformadas conforme o método de seleção LacZ do vetor pGEM-T-*easy*. Estas foram submetidas a extração do DNA plasmidial de acordo com o AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Biosciences). As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de caldo LB contendo ampicilina 100 μ g/ μ L e incubadas por 16 horas a 37 °C com agitação de 200 rpm. A cultura foi centrifugada a 4.000 \times g por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Ao precipitado de células foram adicionados 250 μ L do tampão de equilíbrio e as células foram resuspendidas com um agitador. Em seguida, foram adicionados 250 μ L do tampão de lise e a mistura foi invertida cuidadosamente. Foram

adicionados 350 μL do tampão de neutralização, novamente invertido cuidadosamente e centrifugado a $12.000 \times g$ por 10 minutos e a 4°C . O sobrenadante foi transferido para uma coluna de miniprep em um microtubo de 2 mL (fornecido), centrifugado a $12.000 \times g$ por 1 minuto a 4°C e o filtrado foi descartado. Na coluna foram adicionados 700 μL de tampão de lavagem, centrifugado a $12.000 \times g$ por 1 minuto a 4°C e o filtrado novamente descartado. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril e os plasmídeos foram recuperados em 50 μL de água ultrapura estéril e os clones foram confirmados através de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores T7 promotor senso e SP6 promotor anti-senso.

- Análise da sequência do fragmento

Os plasmídeos foram sequenciados em sequenciador automático MegaBACE (GE Healthcare). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram T7 promotor senso e SP6 promotor anti-senso para realização do sequenciamento por ambos os sentidos do plasmídeo. As *reads* foram analisadas pelo pacote Phred-Phrap-Consed (EWING *et al.*, 1998). As *contigs* formadas foram traduzidas em aminoácidos pelo programa Translate a DNA Sequence (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/translate/>).

3.2.2 Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A técnica de EPR foi realizada para confirmar a presença de íons Mn^{2+} nas lectina. As soluções para análise foram preparadas a partir da lectina liofilizada. As mostras continham aproximadamente 0,4 mM de concentração da proteína. Todos os espectros foram feitos em solução aquosa de 150 μL volume final em um espectrofotômetro Bruker EMX (X-band) a temperatura ambiente (25°C) em uma cavidade cilíndrica Tm110 (Bruker 4103TM). Um tubo de quartzo (*Spectrosil*) com diâmetro de 1,0 a 1,2 mm e selado com *T-Blu Tac*® foi usado para acoplar as amostras ao equipamento. Esse tubo foi inserido dentro de um outro tubo com diâmetro de 2,0 mm. Os parâmetros de análise usados nos experimentos de EPR foram: modulação de amplitude 10G, potência do microondas 0,63 mW, ganho do receptor $6,3 \times 10^5$, ganho de varredura 40,96 s, com resolução em X. O espectro foi analisado por Bruker WINEPR software.

3.2.3 Espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

A quantificação dos metais presentes na amostra de lectina foi realizada usando o equipamento Agilent 7500cx ICP-MS com um IAS (*Integrated Auto Sampler*) na central analítica de espectrometria de massas da Universidade de Warwick (Reino Unido). Os parâmetros usados foram: fluxo de gás plasma (Argônio): 15 L/min, gás auxiliar: 0,9 L/min, forward Power 1550W, ORC (*Octopole Reaction Cell*) usando modo de hélio, correção ISTD : ^{166}Er , e a amostra foi levada a: 0,3 rotações por segundo. Brevemente, as amostras foram tratadas com 5% de ácido nítrico para a digestão e quebra da proteína para análise do conteúdo de metal. O solvente usado foi água duplamente deionizada (DDW). Os metais analisados foram ^{12}Mg , ^{20}Ca , ^{25}Mn , ^{27}Co , ^{28}Ni , ^{30}Zn . Soluções padrão usadas foram adquiridas da empresa Sigma Aldrich.

3.2.4 Espectroscopia de Emissão de Fluorescência

Medidas de fluorescência foram feitas com equipamento Jasco FP 6500 (Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan), equipado com lâmpada de xenônio com capacidade de 150 Watts, usando uma cubeta de quartzo com volume total de 500 μL e caminho ótico de 1 cm. Nesses experimentos a largura das fendas empregadas para a excitação e emissão foram correspondentes de 5-10 nm. Medidas de fluorescência intrínseca envolvendo os resíduos de triptofanos da DLasiL foram realizadas usando valores máximos de absorvância $\text{OD}_{280\text{nm}} \leq 0,1$ sendo realizada excitação em 295 nm e coletando os espectros de emissão de 305-450nm, com velocidade de varredura de 1,0 nm. Adições crescentes de soluções estoques dos supressores (acrilamida, cloreto de cézio, iodeto de potássio e hidrocloreto de guanidina) foram efetuados na amostra contendo a DLasiL em tampão, sendo coletados suas respostas a fluorescência. A dependência da fluorescência dos triptofanos, sob adição dos supressores, foi medida a partir da diminuição de intensidade de fluorescência, obtida depois pela adição em série de pequenas alíquotas de soluções recém-preparadas dos estoques das amostras de DLasiL em 10 mM de solução tampão de fosfato de sódio contendo cloreto de sódio 2,7 mM, seguida por incubação por 2 minutos em compartimento escuro interno do equipamento. Para evitar a formação de triiodo (I_3^-) foi adicionado solução de tiosulfato de sódio 0,2 mM à solução estoque de iodeto de potássio. Para os experimentos, empregando-se DLasiL desnaturada, foi usado hidrocloreto de guanidina (Gdn- HCl) 6 M em temperatura ambiente mantida em contato com a proteína por 12 horas antes do experimento. Nos experimentos de fluorescência de afinidade da DLasiL por açúcar, as amostras da lectina foram mantidas na

presença dos açúcares, glicose ou manose, na concentração final de 0,1 M e sob contato por no mínimo 5 minutos antes de iniciadas as respectivas titulações. Os dados de fluorescência dos supressores foram analisados através das relações de Stern-Volmer e Stern-Volmer modificada (SWAMY *et al.*, 2006).

- $F_0 / F = 1 + K_{SV}[Q]$
- $F_0 / F = f_a^{-1} + 1 / (K_a f_a [Q])$

Onde F_0 e F são as intensidades relativas de fluorescência na ausência e na presença dos supressores, respectivamente, $[Q]$ é a concentração molar do supressor e K_{SV} é a constante de supressão de Stern–Volmer, ΔF é a diferença de fluorescência ($F_0 - F$), K_a é a constante de Stern-Volmer correspondente a fração de f_a dos fluoróforos acessíveis, e f_a é a fração dos fluoróforos totais acessíveis ao supressor.

BIS-ANS foi usado como uma sonda de fluorescência para avaliar cavidades não-polares da proteína e alterações conformacionais induzidas. A amostra de lectina foi incubada com BIS-ANS por no mínimo 2 minutos a 25 °C. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 390 nm e a emissão coletada de 410 a 700 nm. Todas as medidas foram corrigidas e subtraídas de seus respectivos brancos, sem a DLasiL, sendo realizadas em duplicata a 25 °C, cujos valores foram considerados reprodutíveis.

3.2.5 Dicroísmo Circular

Espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foi realizado em espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan) equipado com um termostato Peltier fornecido pelo fabricante. As amostras foram medidas em uma cubeta de quartzo retangular de 1 mm de caminho ótico. Para medidas na região próxima ao visível foi usado a região entre 250-300 nm e a concentração de DLasiL foi de aproximadamente 10 μ M, e para região distante do UV foi utilizada 190-250 nm e a DLasiL a uma concentração de 1 μ M. Para investigar as propriedades de desdobramento foi usado o espectro de CD na região próxima do UV e a diferentes temperaturas. A temperatura usada para os ensaios de termoestabilidade variou entre 20 e 90 °C com uma variação de 5 °C por minuto, a uma velocidade de 100 nm/min e o tempo de resposta foi de 2 s com 16 espectros de acumulação pelo monitoramento do sinal de CD a 290 nm para a região próxima ao UV bem como as região

afastadas de 205 nm. Todos os experimentos foram realizados em 10 mM de tampão fosfato de sódio e 2.7 mM de NaCl em pH 7,4 na presença e ausência do desnaturante cloridrato de guanidina, bem como na presença de glicose e manose.

3.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS

3.3.1 Cultura celular

Células de carcinoma de ovário humano (A2780), carcinoma caucasiano de pulmão humano (A549), carcinoma de próstata humano (PC3) e carcinoma de mama humano (MCF7) foram adquiridos da ECACC (*European Collection of Animal Cell Culture*, Salisbury, UK) (Tabela 1). As linhagens celulares A2780 e MCF7 foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1680) e as linhagens A549 e PC3 em Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM).

Tabela 1: Linhagens celulares

Name	Origem
A2780	Carcinoma humano de ovário
A549	Carcinoma caucasiano humano de pulmão
MCF7	Adenocarcinoma caucasiano humano de mama
PC3	Adenocarcinoma caucasiano humano de próstata

Fonte: Elaborada pelo autor.

As células foram crescidas em frascos de cultura de 75 cm² como monocamadas, suplementadas com soro fetal bovino 10%, L-glutamina 1% e penicilina 1% e estreptomicina e crescidas a 37 °C em uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. As células foram sub-cultivadas em intervalos regulares, e o tempo de duplicação celular foi de 24 horas, as passagens foram feitas tripsinizando as células entre 80-90% de confluência entre 2 a 3 vezes por semana (MARAMOSCH; HIRUMI 1979; DAVIS, 2002). Ao alcançar a confluência desejada, as células foram lavadas com 10x PBS, para remoção de células mortas, o PBS foi então sugado e adicionado tripsina/EDTA 0,25% (2 mL). O frasco de cultura foi

deixado por 2-3 minutos na estufa de CO₂ a 37 °C. Logo após, um hemocitômetro foi utilizado para determinação da concentração das células em suspensão.

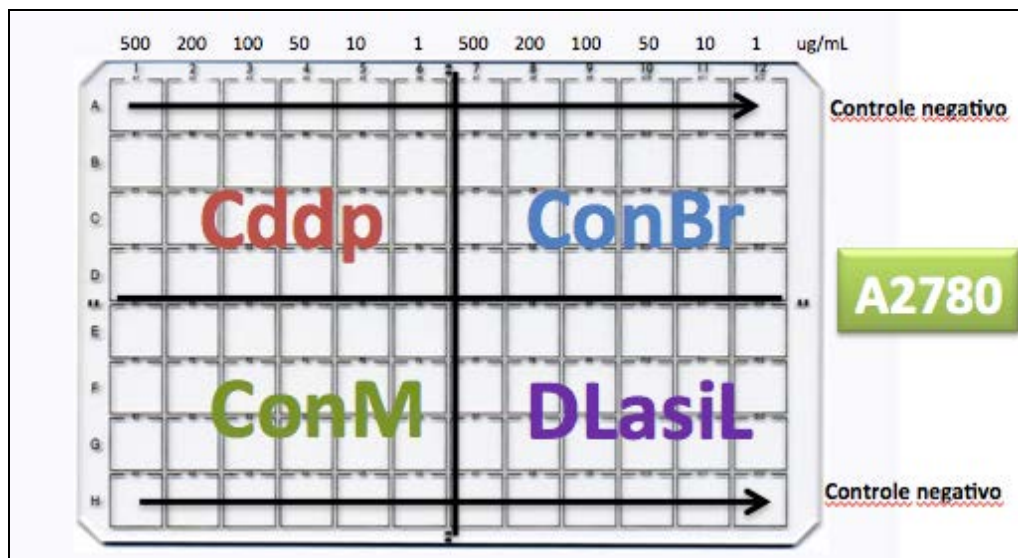
3.3.2 Ensaio de viabilidade celular com IC₅₀

Uma microplaca de 96 poços foi semeada com 5x10³ células por poço de cada linhagem celular (A2789, A549, MCF7 e PC3). As placas foram deixadas em incubadora a 37 °C por 48 horas em meio de cultura sem lectina.

A cisplatina (Sigma-Aldrich) foi usada como controle positivo por ser um composto antineoplásico largamente utilizado para tratamento de diversos tipos de câncer (KANG *et al.*, 2014, XU *et al.*, 2014, KHABOUR *et al.*, 2014). A solução contendo cisplatina 2 mM 5% DMSO e de solução (salina:media) 95%. Esse estoque é usado para preparar o resto das soluções por diluição com meio de cultura a uma concentração final de 200, 100, 50, 20, 10 e 1 µM. No controle negativo, as células neoplásicas foram crescidas na ausência das lectinas e contendo meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As soluções de lectinas (ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL) foram preparadas a partir de uma solução estoque e diluídas na concentração de (1, 10, 50, 100, 200 e 500 µg/mL). A cada poço foram adicionados, individualmente, 50 µL de lectinas, cisplatina, controle positivo ou controle negativo. Os experimentos foram realizados cada um em triplicata e suplementadas com soro fetal bovino 1%, para assegurar que o meio não competisse com a lectina (BANNER *et al.*, 2005). Em seguida, as células foram deixadas em contato com as lectinas por 24 horas (Figura 18).

Figura 18: Representação esquemática da placa de 96 poços utilizadas nos testes de viabilidade celular de ConBr, ConM e DLasiL e DSceL. Setas indicam os poços em que são usados os controles negativos, ou seja células A2780 sem tratamento com DLasiL. Cddp usado como controle positivo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Após 24 horas de contato, o meio foi sugado com o auxílio de uma bomba de sucção, e as células foram lavadas com PBS e foi adicionado novamente meio de cultura livre de lectina e deixadas em incubação por 72 horas a 37 °C.

O ensaio colorimétrico de Sulforodamina B (Sigma-Aldrich) foi usado para determinar a sobrevivência celular *in vitro* para rastreio de citotoxicidade com base na medição do teor de proteínas celulares. Esse ensaio é baseado na habilidade da sulforodamina B em se ligar eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos das proteínas celulares.

Inicialmente as células são fixadas a superfície dos poços com 50 µL de 50% de ácido tricloroacético (TCA) em cada poço da microplaca, depois a microplaca foi deixada em repouso dentro da geladeira a 4 °C por 1 hora. Logo depois, o ácido foi removido e a microplaca foi lavada com água corrente 10 vezes. O excesso de água contido na placa foi então seco com a ajuda de um secador de cabelo.

O ensaio colorimétrico foi realizado pela adição de alíquotas de 50 µL de corante de Sulforodamina (SRB) 0,4%, preparado em ácido acético 1%, adicionando em cada poço da placa e deixado em repouso por 30 minutos a temperatura ambiente para corar a biomassa celular presente em cada poço (KIRTIKARA *et al.*, 2006). Novamente, o excesso do corante

não absorvido pelas proteínas das células foi então removido por lavagem da microplaca com 1% de ácido acético por 5 vezes, o excesso de ácido acético, por sua vez, foi removido com a ajuda de um secador de cabelo.

Alíquotas de solução de Tris base 10 mM (200 μ L, pH 10,5) foi adicionado em cada poço e a microplaca foi deixada em repouso por 1 h, esse último passo ajuda na solubilização do corante ligado a biomassa. A medida da absorbância foi lida a 595 nm em um leitor de microplacas BioRad iMark de 96 poços. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 2 vezes independentemente. Paralelamente foram calculados os desvios padrões.

A determinação da viabilidade celular para cada composto e a porcentagem de sobreviventes foi obtida pela divisão dos dados de absorbância pela média das leituras do controle negativo multiplicando por 100. Assim, os dados foram plotados como porcentagem de sobreviventes versus o logaritmo da concentração expressa usada em unidades molares. Os dados experimentais foram ajustados usando-se parâmetros de curva sigmoidal com o software OriginPro 8.1, e o IC_{50} , como a metade da concentração inibitória máxima. Para validação de cada microplaca, o IC_{50} da cisplatina foi calculado em duplicata, e o seu valor determinado aproximadamente a $1,2 \pm 0,2$ mM.

3.3.3 Investigação do mecanismo de ação da lectina de *Dioclea lasiocarpa* (DLasiL)

Ensaio de apoptose por anexina V-FITC e coloração por iodeto de propídio (PI) (BioVision anexina V Apoptosis Detection Kit) foram utilizados para avaliar a apoptose em células A2780. Cerca de $1,5 \times 10^6$ células (em triplicata) foram semeadas em placas de 6 poços em duplicata por 24 horas. Logo após, as células foram tratadas com DLasiL durante 24 horas usando o dobro do valor de IC_{50} da lectina. Em experimentos preliminares, a lectina não mostrou dose efetiva nessa concentração. Como controle positivo, foram utilizados 10 μ L de staurosporina (Sigma, Reino Unido). Depois que o sobrenadante foi removido, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas a $1000 \times g$ durante 4 minutos e, em seguida, lavadas duas vezes com PBS. Para corar as células, o pellet foi ressuspenso em 500 μ L de uma solução de 1x solução tampão de ligação com 10 μ L de amostra de PI (Anexin V-FITC, apoptosis detection kit, Biovision). As células foram incubadas à temperatura ambiente, transferidas para tubos de citômetro de fluxo (Becton Dickinson FACScan) e lidas em canais FL1 (verde-anexina) e FL2 (vermelho-PI) para a detecção de fluorescência.

3.3.4 Detecção do Ciclo Celular

O ciclo de divisão celular foi detectado por citometria de fluxo. Em uma placa de 6 poços foram semeados $1,0 \times 10^6$ células da linhagem A2780. As células foram tratadas com duas vezes o valor IC_{50} de DLasiL pelo mesmo motivo que foi feito nos ensaios de apoptose, e deixadas em repouso por 24 horas. A lectina foi então removida, as células foram lavadas com PBS, coletadas e tripsinizadas. Em seguida, duas novas lavagens foram realizadas com PBS e então centrifugadas a $1000 \times g$ por 4 minutos. O pelete obtido foi ressuspensionado em etanol 70% resfriado e mantido em freezer a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. No dia 4 do experimento, as amostras foram centrifugadas, o etanol foi removido e as células lavadas com PBS, assim as células foram em seguida coradas e ressuspensas em tampão contendo PI, $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e RNase, $80 \text{ }\mu\text{g/mL}$ e deixadas no escuro por 30 minutos. A RNase foi usada no experimento para prevenir que o PI se ligasse a DNA nuclear, no qual poderá resultar em falso positivo. O Excesso de corante foi removido por centrifugação e o sobrenadante foi removido. PBS foi adicionado para a redução de *background* e as células foram transferidas para tubos de citômetro de fluxo e lidas a excitação de PI ligado a DNA em 536 nm e a emissão a 617 nm. Para análise dos dados foi usado o programa Flowjo.

3.3.5 Ensaios de Caspase 9

As células da linhagem A2780 foram crescidas no dia anterior ao início do experimento e semeadas em placas de Petri em triplicata, no total de 3×10^6 células por placa. Em seguida, as células foram tratadas com o dobro da concentração de lectina e deixadas em contato por 24 horas. No dia seguinte, as lectinas foram sugadas juntamente com o sobrenadante, e o meio de cultura foi repostado. O controle negativo (somente células A2780) foi deixado sem a troca do meio de cultura. No terceiro dia de experimento, ao controle positivo foi adicionado $10 \text{ }\mu\text{L}$ de estausporina e deixado em contato por 2 horas em atmosfera de CO_2 5%. A lectina foi removida por sucção e as células lavadas com 4 mL de PBS, em seguida o sobrenadante foi sugado, as células foram tripsinizadas com 1 mL de tripsina/EDTA e incubadas por aproximadamente 3 minutos.

Cerca de 1 mL de meio de cultura foi adicionado a cada placa de Petri, depois centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm , o sobrenadante foi sugado, o *pellet* foi lavado com PBS, centrifugado e lavado novamente, seguido por uma última centrifugação. As células foram resuspensas em $100 \text{ }\mu\text{L}$ de tampão de lise (Caspase-9 Colorimetric Assay kit, Biovision Inc.) gelado, pipetadas e mantidas em gelo por 10 minutos. Foram adicionado $50 \text{ }\mu\text{L}$ do 2x

tampão de reação (RB) (contendo 10 mM DTT) em cada amostra. Em seguida foi adicionado 5 μ L de 1 mM do substrato LEHD-AFC (concentração final de 50 μ M) e incubado a 37 °C por aproximadamente 1,5 horas. As Amostras foram levadas ao fluorímetro equipado com filtros de 400 nm para excitação e filtros a 505 nm para emissão.

3.3.6 Ensaio antiviral

Os ensaios de atividade antiviral foram conduzidos com diferentes linhagens virais adquiridas do *Rega Institute for Medical Research* (KU Leuven, Leuven, Bélgica).

As lectinas de ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL foram testadas quanto a sua capacidade antiviral em forma de “*screening*”. O ensaio colorimétrico baseado no teste Tetrazolium (BABA *et al.*, 1988).

Brevemente, para o grupo do HIV (HIV-1 R5, HIV-2 ROD), os vírus estocados foram titulados em cultura de células de linfócitos T humanos e expressos como 50% de cultura de células infectadas (CCID50, 1 CCID50 sendo a dose viral necessária para infectar 50% da cultura celular). As células foram suspensas em meio de cultura a 3×10^5 células por mL e foram infectadas pelo vírus HIV a 100 CCID50. Imediatamente após a exposição viral, 100 μ L da suspensão celular foi colocada em cada poço em uma placa de microtitulação contendo várias concentrações das lectinas testadas (ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL). Depois de quatro dias de incubação a 37 °C a formação de uma célula gigante foi microscopicamente determinada. As lectinas foram testadas em paralelo quanto ao seu potencial citostático contra culturas celulares CEM não infectadas. Um ensaio de cocultivação com as células HUT-78 infectadas persistentemente com HIV-1 foram misturadas com 5×10^4 células SUPT1, com uma concentração aproximada das lectinas teste. Depois de 20 horas, foi notada a formação de um sincício nas culturas celulares controle, e o número de sincícios foi determinado por microscopia. A EC_{50} foi definida como a concentração da lectina requerida para prevenir a formação do sincício em 50%.

Os outros ensaios antivirais foram baseados na inibição da citopaticidade induzida pelos vírus HEL [(Virus-1 simplex da Herpes (KOS), Vírus-2(G) simplex da Herpes, vírus Vacínia, vírus da Estomatite Vesicular, Virus-1 simplex da Herpes TK⁻ KOS ACV⁺], Vero (Parainfluenza-3, Reovírus-1, Sindibis, Coxsackie B4, e Punta Toro vírus), Hela (Vírus da Estomatitis Vesicular, Coxsackie B4 e Vírus Sincicial Respiratório) e CrFK (Virus Corona Felino (FIPV) e Vírus da Herpes Felino), MDCK (Influenza A subtipo H1N1, Influenza A subtipo H3N2 e Influenza B). Culturas de células confluentes em microplacas de 96 poços

foram inoculadas com 100 CCID₅₀ do vírus na presença de várias concentrações das lectinas (5000, 1000, 200 nM). A citopaticidade viral foi medida tão logo foi observado completamente a infecção em células controle que não foram infectadas (MAHALIGHAM *et al.*, 2011).

3.3.7 Terapia de combinação entre drogas FY 26 + DLasiL

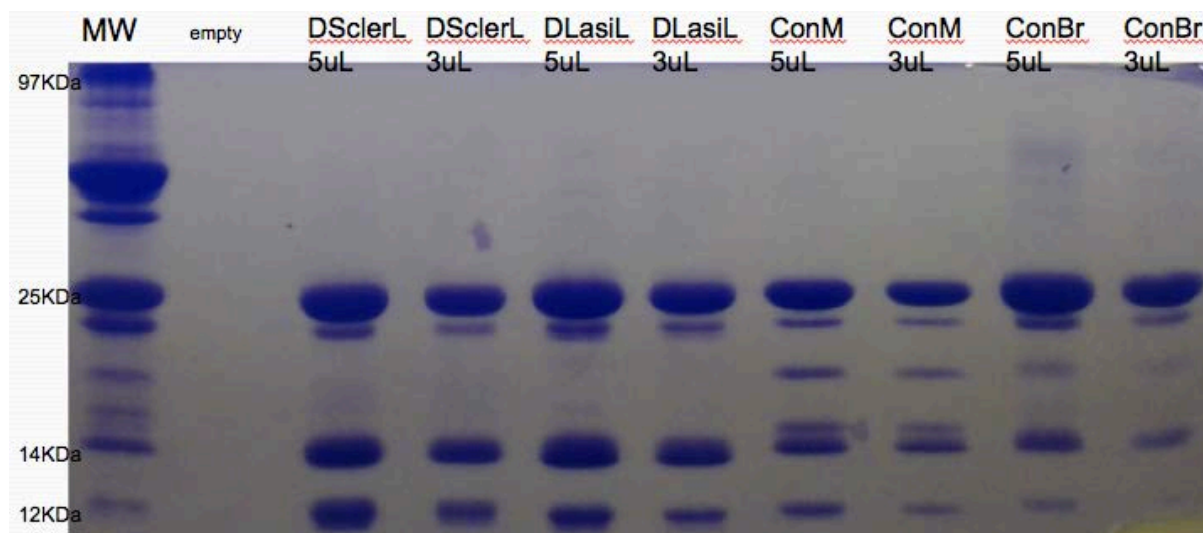
Brevemente, 5×10^3 células de A2780 (câncer de ovário) foram semeadas em uma microplaca de 96 poços a 25 °C e deixadas em incubadora por dois dias. Após 48 horas, o sobrenadante que continha as células foram coletadas, lavados com PBS e a droga e a lectina foi colocada em contato com as células de A2780. As drogas FY26+DLasiL ficaram em contato com as células cancerígenas por 24 horas. Assim, o sobrenadante foi removido por sucção e as células lavadas com PBS, seguido pela adição de meio de cultura RPMI Livre de drogas e deixadas a 25 °C por 72 horas. A viabilidade celular foi determinada por ensaio de SRB (suforrodamina) para determinação dos valores de IC₅₀ da combinação de drogas. Os experimentos foram determinados em duplicatas de triplicatas em dois diferentes experimentos e calculados seus desvios padrões.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e purificação das lectinas: ConBr, ConM, DSclerL e DLasiL

As lectinas ConBr e ConM, foram isoladas empregando-se cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (Pharmacia). As frações retidas na coluna (PII) apresentaram atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados e não tratados com enzimas proteolíticas (NASCIMENTO *et al.*, 2012; CORREIA *et al.*, 2011), semelhante aos resultados obtidos na literatura (MOREIRA *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 1995). As lectinas de DLasiL e DSclerL, também foram purificadas por cromatografia de afinidade com o mesmo tipo de coluna, todavia essas foram pela primeira vez isoladas e investigadas a partir deste trabalho de tese. Observou-se ainda evidente atividade hemaglutinante (NASCIMENTO *et al.*, 2012; CORREIA *et al.*, 2011). Ademais, o perfil eletroforético da ConBr, ConM, DSclerL e DLasiL mostra que todas as proteínas foram obtidas de forma pura e livre de contaminantes (Figura 19). Pode-se observar um perfil composto por três bandas protéicas de massa molecular aparente de 30 kDa (cadeia α), 14 kDa (cadeia β) e 12 kDa (cadeia γ), semelhante as lectinas purificadas de outras espécies de Diocleinae (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013, NASCIMENTO *et al.*, 2012; CORREIA *et al.*, 2011, DELATORRE *et al.*, 2006; GRANGEIRO *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 1993).

Figura 19: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% de ConBr, ConM, DSclerL e DLasiL.



Fonte: Elaborada pelo autor. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12 % sob condições desnaturantes e redutoras. 1 mg/mL de ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL; marcador de peso molecular LMW (GE Healthcare).

Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex-G50 é bastante utilizada para isolar lectinas da tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae, como por exemplo, as lectinas de *Dioclea grandiflora*, *D. guianensis*, *D. lehmanii*, *D. rostrata*, *D. violacea*, *D. virgata*, *C. bicarinata*, *C. bonariensis*, *C. brasiliensis*, *C. dictyota*, *C. ensiformis*, *C. gladiata*, (PEREZ *et al.*, 1990, BARRAL-NETO *et al.*, 1992, MOREIRA *et al.*, 1993, GOMES *et al.*, 1994, DAM *et al.*, 1998, CALVETE *et al.*, 1999, OLIVEIRA *et al.*, 1995) entre outras. Na maioria das purificações dessas lectinas um único passo cromatográfico em coluna de Sephadex-G50 é efetivo na purificação. Dessa forma, ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL foram purificadas em coluna de Sephadex-G50 e subsequentemente utilizadas nos experimentos de atividade anti-cancerígena e anti-viral, nos estudos estruturais, bem como na caracterização físico-química da DLasiL.

4.2 Estudos estruturais

4.2.1 Determinação da sequência primária de DLasiL

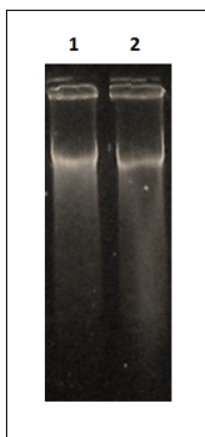
O objetivo de construção de uma proteína recombinante é muito semelhante ao que a natureza tem conseguido ao longo da evolução. Ambos buscam adaptação a uma nova tarefa específica. Na natureza, plantas por exemplo tem que se ajustar a novas condições, mecanismos semelhantes podem ser utilizados para manipular uma enzima para fins

científicos ou industriais. Assim o reconhecimento a nível celular leva a um melhor entendimento de seus mecanismos e ajuda no *design* de novos produtos com fins terapêuticos (EISENBEIS & HOCKER, 2010).

Determinar a sequência de aminoácidos a partir do conteúdo gênico é uma tarefa importante para que se possa melhor compreender e antever certas propriedades, empregando-se bioinformática bem como termos a possibilidade de realizar estudos futuros com proteínas recombinantes.

A extração do DNA genômico, em duplicata, a partir de 0,6 gramas de folhas de *D. lasiocarpa* pelo método do CTAB resultou em uma solução contendo 122,8 ng/ μ L de DNA. A eletroforese em gel de agarose está representada na figura 20 e mostra a integridade do DNA obtido durante as etapas de purificação.

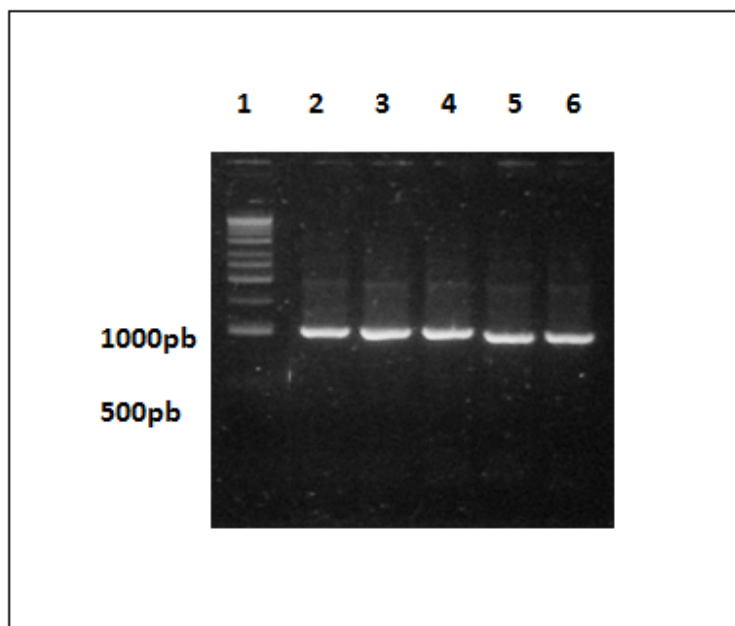
Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA genômico extraído de *Dioclea lasiocarpa*.



Poço 1 e 2 DNA genômico de *D. lasiocarpa*. Fonte: Elaborada pelo autor.

O fragmento correspondente a porção codificadora do gene para a lectina de sementes de *D. lasiocarpa* foi amplificado a partir do DNA genômico pela utilização dos iniciadores DguiFW (ATG GGT ATT TCA AAA AAA TC) e DguiRV (TCA GAC GAC GGA TGC AAT). Esses iniciadores foram desenhados com base na sequência codificante para a lectina de sementes de *D. guianensis*, em vista da alta similaridade entre as sequências de aminoácidos das duas lectinas (99%). O produto de amplificação consistiu em um único fragmento de aproximadamente 900 pb, evidenciando a especificidade da reação (Figura 21).

Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR a partir do DNA genômico de *D. lasiocarpa*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Poço 1: marcador de peso molecular 1 Kb ladder (Axygen), poços de 2 a 6: Produto de PCR obtido a partir do DNA genômico de *D.lasiocarpa*.

O amplicon de aproximadamente 900 pb corresponde ao precursor da lectina de *D. lasiocarpa* formado pelo peptídeo sinal da lectina, cadeia gama, peptídeo intermediário (Linker), cadeia beta e peptídeo C-terminal. Para a clonagem do fragmento de interesse amplificado por PCR foi realizada a purificação do fragmento a partir do gel de agarose 1% utilizando o *PureLink™ QuickGel Extration kit* (Invitrogen™ | Life Technologies). O produto da purificação resultou em uma solução contendo 32 ng/μL deste produto. A clonagem do fragmento purificado foi realizada no vetor pGEM-T-*easy* e transformado em células de *E. coli* cepa DH5α. A confirmação dos clones transformados foi realizada através PCR e de sequenciamento. As *reads* foram analisadas pelo programa Phred-Phrap-Consede que resultou na formação de uma *contig*. A tradução da *contig* resultou em uma sequência de 283 aminoácidos, correspondendo 28 aminoácidos ao peptídeo sinal, 119 aminoácidos à cadeia gamma, 15 aminoácidos ao linker de união entre as cadeias, 118 aminoácidos à cadeia beta e 11 aminoácidos ao C-terminal (Figura 22).

Figura 22: Representação do sequencia traduzida da *contig* referente a pré-pro-lectina de *D. lasiocarpa*.

1	M G I S K K S L M V P L L A F I T M F L M V V S R V S S S I
1	ATGGGTATTTCAAAAAAATCTCTGATGGTTCCCTTACTTGCCTTCATAACCATGTTCCCTGATGGTAGTGAGCAGGGTGAGCTCATCAATA
31	A D A N S L H F S F N Q F S Q N P K D L I L Q G D A T T D S
91	GCAGATGCAAATTCACCTCCATTTCAGCTTCAATCAGTTTAGCCAAAACCCAAAGGATTTGATCCTTCAAGGTGACGCCACCACCGATTCA
61	D G N L Q L T R V S S D G S P Q G S S V G R A L F Y A P V H
181	GATGGTAATTTACAACCTCACTAGGGTTCCAGTGATGGTAGTCCACAGGGAAGCAGTGTGGGCCGGGCTTGTCTACGCCCCAGTCCAC
91	I W E K S A V V A S F D A T F T F L I K S P D R D P A D G I
271	ATTTGGGAAAAATCTGCTGTGGTCGCAAGCTTCGATGCTACATTTACATTTCTGATTAAATCACCTGACCGTGATCCAGCTGATGGAATT
121	T F F I A N T D T S I P S G S G G R L L G L F P D A N I I K
361	ACCTTCTTCATTGCAAATACTGACACTTCAATCCCTAGTGGTCTGGTGGAAGACTCCTTGGACTCTTTCTGATGCAAATATCATTAAA
151	N S T N L D F N A A Y N A D T I V A V E L D S Y P N T D I G
451	AATTCAACTAATCTTGATTCAATGCTGCTTATAATGCCGATACTATCGTTGCTGTGAATTGGACTCTTACCCTAATACTGATATTGGA
181	D P S Y P H I G I D I K S I R S K A T A R W N M Q T G K V G
541	GATCCAAGTTATCCACACATTGGAATCGATATAAAGTCTATTCCGTTCCAAGGCAACTGCCAGATGGAACATGCAAACGGGAAGGTAGGA
211	T A H I S Y N S V A K R L S A V V S Y S G T S S T T V S Y D
631	ACTGCACACATAAGCTACAACCTCTGTCGCTAAGAGACTAAGTGTGTTGTTTCTTATTCTGGTACTAGTCTACCCTGTATCTTACGAT
241	V D L N N V L P E W V R V G L S A T T G L Y K E T N T I L S
721	GTTGACCTCAACAATGCTCCTTCTGAATGGGTTAGGGTGGTCTTCTGCTACAACCGGCTTTTACAAAGAAACCAATACCATTCTCTCT
271	W S F T S K L K T N E L Q D L K I A S V V -
811	TGGTCTTTTACTTCTAAGTTAAAGACCAACGAGCTCCAAGACTTGAAAATTGCATCCGTCGCTGA

Fonte: Elaborada pelo autor. Em vermelho corresponde à região de anelamento dos oligonucleotídeos senso e reverso, em amarelo corresponde ao peptídeo sinal, em verde a cadeia gama, em rosa o linker de união entre as cadeias, em azul a cadeia beta e em cinza o peptídeo C-terminal. Fonte: Elaborada pelo autor.

Segundo Barroso-Neto 2014, lectinas relacionadas filogeneticamente, da subtribo Diocleinae, possuem pequenas diferenças em algumas posições na sua estrutura primária, causando assim mudanças em suas propriedades biológicas. Os domínios de ligação a carboidratos (CRD's) nessa subtribo, aponta um dos principais motivos para a diferença dos efeitos biológicos dentro da subtribo, no qual afeta a sua forma modificando o volume de cada domínio, as características que afetam diretamente o reconhecimento de carboidratos e a capacidade para induzir efeitos biológicos. Outro ponto importante a se comentar, seriam as mudanças nas formas diméricas e tetraméricas quanto ao comportamento em diferentes pH's, o qual interfere diretamente na associação dos monômeros, mostrando também a preferência diferenciada por carboidratos localizados na superfície das células.

Como discutido anteriormente, permutação circular é um processo comum em lectinas da subtribo Diocleinae, onde ocorre um rearranjo na sequência de aminoácidos no

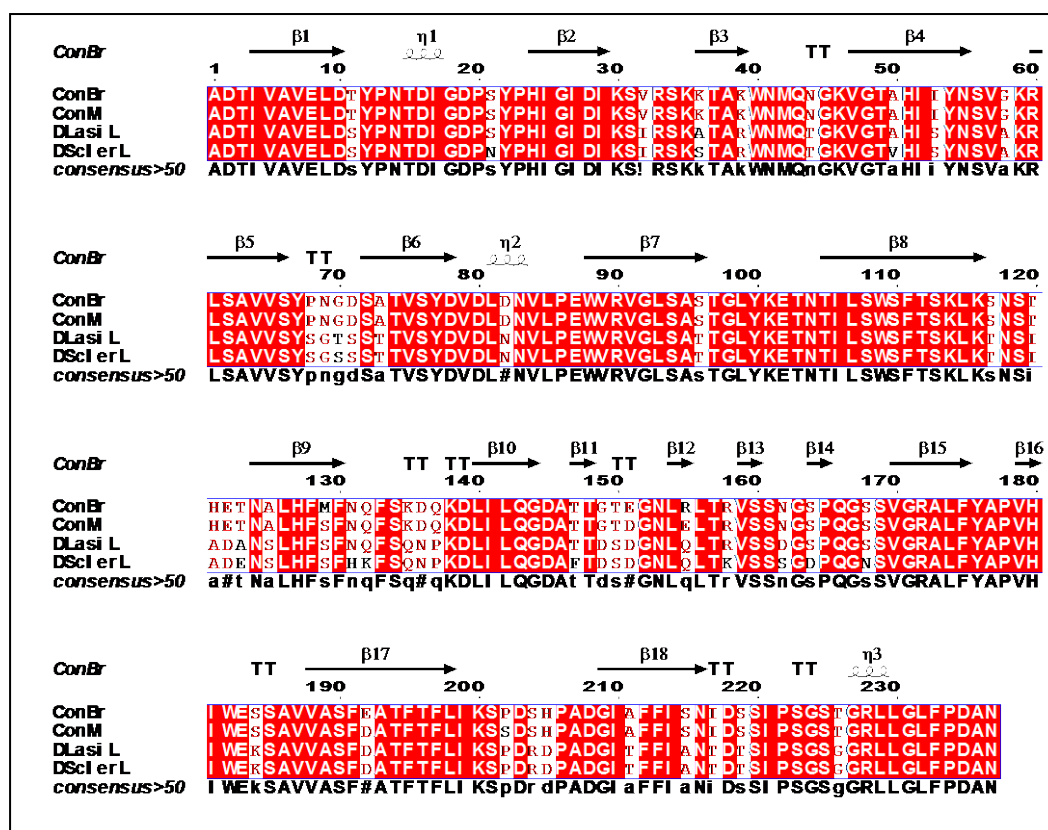
qual o N-terminal e C-terminal são unidos e um novo N-terminal é criado (EISENBEIS & HOCKER, 2010).

Através do programa de software ESPrIt 2.2, podemos comparar sequências e estruturas de lectinas de diferentes tribos (BARROSO-NETO *et al.*, 2014). Esta análise mostrou a similaridade entre as lectinas comparadas e a DLasiL, evidenciando um alto grau de similaridade, possibilitando a afirmação de que dentre as lectinas estudadas pode-se estabelecer uma relação evolutiva bem próxima, corroborando com a conservação estrutural que existe entre lectinas de leguminosas, até mesmo aquelas que apresentam permuta circular.

Devido ao processamento contínuo de enovelamento entre proteínas, as lectinas são consideradas como domínios únicos, devido a repetição de fitas adjacentes da sequência linear de aminoácidos, que restringe o rearranjo tridimensional da moléculas devido ao processamento pós-traducional (BOWLES *et al.*, 1986). Assim, espécies de lectinas como DLasiL mantêm sua estrutura conservada, motivo *Jellyroll* dentro da subtribo Diocleinae, tendência essa apresentada pelas lectinas de leguminosas.

Adicionalmente, a topologia do sítio de ligação, apresenta-se como fator importante para determinação da principal característica das lectinas, reconhecimento e afinidade a carboidratos. Contudo, não se pode associar somente o conteúdo de aminoácidos como fator principal, o tamanho e a conformação das alças adjacentes também influem.

Figura 23. Alinhamento da sequência de lectinas de Diocleinae através do programa Esript2.0.



Fonte: Esript2.0, elaborada pelo autor. Número de acessos: 1AZD (*Canavalia brasiliensis*), 2CYF (*Canavalia maritima*), P81637 (*Dioclea lasiocarpa*), P58907 (*Dioclea sclerocarpa*), P58908 (*Canavalia ensiformis*), respectivamente. Espécies estudadas no presente trabalho de Tese.

Ademais, variações existentes nas alças, causam impedimento estérico às ligações a carboidratos que não são reconhecidos pelos sítios de ligação, talvez por esses motivos em uma mesma família como a de leguminosas, apesar da grande similaridade nos resíduos de aminoácidos ocorra a diferença entre propriedades biológicas (LORIS *et al.*, 1998).

4.2.2 EPR: Ressonância Paramagnética Eletrônica

O elemento manganês possui massa atômica 55, encontra-se na natureza combinada com outros elementos formando minerais, na sua maioria, óxidos (HAROLD & TAYLOR, 1994). Em sistemas biológicos, o estado de oxidação Mn^{+2} é o estado utilizado por organismos vivos para os processos biológicos mais essenciais. As enzimas de manganês desempenham importantes funções como, por exemplo, no processo de eliminação de radicais livres, como os superóxidos, sendo parte do sítio ativo de superóxido dismutases. Outro papel

essencial em biologia seria a utilização do manganês no desprendimento de oxigênio no processo de respiração das plantas fotossintéticas. Além de tudo isso, o elemento Mn^{+2} é necessário para os organismos vivos, entretanto se ingerido em grandes quantidades pode causar efeitos neurológicos irreversíveis (OVERTON *et al.*, 2003).

As lectinas de Diocleinae necessitam da presença de cátions divalentes, tais como Ca^{+2} , Mn^{+2} ou Mg^{+2} para exercerem suas atividades biológicas, caracterizando essas proteínas como metaloproteínas. Adicionalmente, a lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), necessita de Ca^{+2} , Mn^{+2} ou Mg^{+2} para se ligar ao carboidrato ao qual possui afinidade (KONOZY *et al.*, 2003, BOUCKAERT *al.*, 2000). A presença destes íons divalentes na lectina se torna importante para a manutenção da conformação “cis” da ligação Ala207-Asp208, a qual modula o sítio de ligação a carboidrato. Dessa forma, a demetalção da lectina causa a perda da capacidade de reconhecimento específico aos monossacarídeos (LORIS *et al.*, 2004). Em geral, a presença de cátions divalentes na estrutura da proteína aumenta a interação da lectina com o seu respectivo ligante, como foi observado para a ConA. Na presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} a interação da ConA com glicose e manose é significativamente aumentada. Na presença desses íons a proteína é denominada de *locked* ou ativa, na ausência desses íons o termo *unlocked* é utilizado (LORIS, 1998).

Quando os sítios metálicos são ocupados pelos íons divalentes ocorre uma modificação na estrutura tridimensional da lectina, conferindo assim o reconhecimento ao carboidrato pela qual a lectina possui afinidade, estabilizando a ligação e fixando os aminoácidos que interagem com o carboidrato (SHARON & LIS, 1990).

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica detecta espécies contendo elétrons desemparelhados, ou seja, espécies paramagnéticas que possuem um dipolo magnético *spin* resultante. A teoria consiste em excitar os spins dos elétrons através de campos magnéticos. Na presença de um campo magnético, a existência de um dipolo magnético do *spin* produz uma energia potencial de interação. Quando um único elétron está envolvido (como no caso de radicais livres representativos), o vetor do spin total **S** é simplesmente 1/2, e a energia potencial de interação pode ser reescrita em termos do número quântico (*m_s*), que é igual a +1/2 e - 1/2, ou seja alinhado ao campo magnético ou contrário ao campo magnético. Se irradiarmos uma amostra que tenha um elétron desemparelhado a qual esteja exposta a um campo magnético, a absorção de radiação com o comprimento de onda adequado fará o elétron passar do estado de energia mais baixo, *m_s* = +1/2 para o mais elevado *m_s*=-1/2. Quando a diferença de energia induzida pela interação magnética entre os

dois estados é igual à energia do fóton incidente, pode ocorrer a absorção de um fóton e dizemos que se estabelece um estado de *ressonância*. As transições devidas a desdobramento dos elétrons nos diferentes estados de spin ocorrem na região das microondas do espectro eletromagnético (cujas frequências são normalmente expressas nas unidades de gigahertz ou GHz).

O controle de radiação no microondas é relativamente fácil e existem espectrômetros disponíveis que exploram com vantagem as condições de ressonância. Espectros de EPR são normalmente obtidos irradiando uma amostra com radiação microondas monocromática, e variando o campo magnético. A condição de ressonância exige que a frequência da radiação eletromagnética coincida com o desdobramento provocado pelo campo magnético, como descrito pela equação abaixo:

$$E = h\nu = g\beta H m_s$$

Onde, E é a energia de ressonância do microondas, g é chamado de fator de Landé ou simplesmente fator g, β é uma constante chamada de magneton eletrônico de Bohr, H é o campo magnético aplicado a amostra para que seja observado ressonância e m_s é o número quântico magnético de spin do elétron (S), que para um elétron tem valor de 1/2.

O valor exato de g é conhecido com muita precisão para o elétron livre (g é aproximadamente 2,0023), mas esse valor pode sofrer mudanças para o elétron associado a átomos ou moléculas, e depende muito do ambiente local do elétron desemparelhado. Isso significa que a frequência exata da ressonância de absorção depende da molécula específica em estudo. Um fator essencial para o uso dessa técnica é a presença de elétrons desemparelhados, o que torna a técnica insensível a presença de espécies diamagnéticas, tais como Ca^{2+} , mas fortemente sensível a Mn^{2+} , por exemplo. Como os núcleos também têm *spin* existe uma interação ou acoplamento, entre o spin dos elétrons desemparelhados e o momento angular de spin nuclear chamado I, provocando desdobramentos nos sinais dependente dos elementos na vizinhança a essa espécie paramagnética. Em uma molécula possuindo vários núcleos com spins diferentes de zero, os spins nucleares podem acoplar, gerando um spin nuclear total da molécula e padrões de desdobramento úteis para identificação de elementos próximos ao centro paramagnético.

Cada orientação se acopla de maneira diferente com um elétron desemparelhado. Esse tipo de acoplamento é chamado de acoplamento *hiperfino*. Como os estados de spin

nuclear são quantizados, as energias de interação também são quantizadas, e com espaçamento relativamente iguais. É fácil definir a constante de *acoplamento hiperfino*, denominada a , com unidades T (tesla). Portanto, o campo magnético B do ambiente local é ligeiramente diferente do campo magnético B aplicado sobre a amostra. Essa diferença é um múltiplo quantizado da constante de acoplamento hiperfino. Estas constantes são, caracteristicamente, da ordem de militeslas, mas suficientemente grandes para serem detectadas por meio da moderna espectroscopia de EPR.

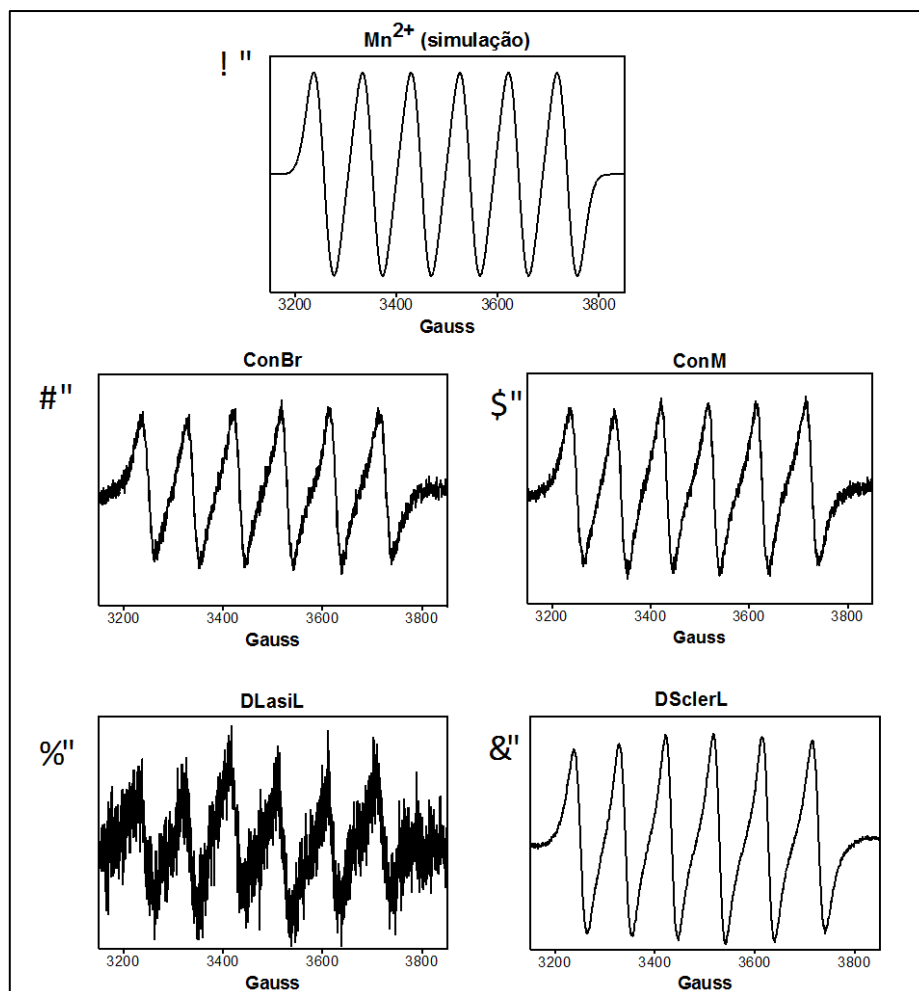
Considerando o íon Mn^{+2} , cuja massa molecular é de 55u, na última camada de valência apresenta configuração $3d^5$, ou seja 5 elétrons desemparelhados, apresentando assim paramagnetismo essencial para a técnica. O núcleo do Mn tem $I = 5/2$ e, portanto, contribui para o desdobramento hiperfino na técnica de EPR. Cada átomo de Mn tem $I = 5/2$, e as contribuições possíveis dos spins nucleares MI são $+5/2$ (todos os cinco spins nucleares na direção $+1/2$), $+1/2$, $-1/2$ e $-3/2$ (todos os três spins nucleares na direção $-1/2$). Portanto, são esperadas 6 linhas no espectro EPR do íon Mn^{+2} , e isso é o que se observa empiricamente.

Assim, ressonância paramagnética eletrônica é utilizada em vários ramos da ciência, na identificação e quantificação de radicais, na identificação de vias de reação química, em biologia e medicina na marcação de moléculas com sondas de *spin* e em bioquímica na identificação e caracterização estrutural de centros metálicos.

Ressonância paramagnética eletrônica aplicada ao estudo de lectinas, pode se tornar uma ferramenta bastante importante na investigação dos sítios de Mn^{+2} ligado a proteína, o qual conferem a estabilidade aos sítios de ligação a carboidratos (BREWER *et al.*, 1999). Íons metálicos como Mn^{+2} e Ca^{+2} parecem desempenhar um papel muito importante nos sítios de ligação a carboidratos, que através dessa ligação, determina sua geometria (KOENING *et al.*, 1983) (GOLDFARB *et al.*, 2003).

Nesta tese, a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi usada para indicar a presença dos sítios de ligação Mn^{2+} nas lectinas em estudo: ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, sendo realizadas medidas a temperatura ambiente com o objetivo de avaliar comparativamente os sinais de EPR gerados por essas amostra e preliminarmente buscar avaliar mudança provocada na presença de carboidratos ligados. Os espectros obtidos para amostras preparadas nas mesmas concentrações finais estão representados na figura 24 juntamente com uma amostra simulada para o sinal esperado de manganês (II).

Figura 24: Espectros de EPR para as leguminosas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, usando como referência o espectro simulado de $MnCl_2$.



Fonte: Elaborada pelo autor. Espectros de EPR: A) Simulação $MnCl_2$, B) ConBr, C) ConM, D) DLasiL e E) DSclerL.

O espectro típico de EPR para o cloreto de manganês ($MnCl_2$), usado como referência, mostrado na figura 24, mostra um sinal com $g = 2,0207$ (próximo a 3200 - 3800 gauss), um espectro de sexteto (6 picos), característico de Mn (II).

Os espectros das lectinas de leguminosas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL confirmam o padrão típico de amostras que contêm esse metal em sua estrutura, indicando que durante o processo de purificação das lectinas não ocorre completa demetalização do Mn^{+2} , mesmo durante as exaustivas etapas de diálise, e que esse elemento está associado a proteína. Para as lectinas, observa-se um sinal de EPR em $g = 2,0161$ para a ConBr; 2,0161 para ConM; 2,0190 para DLasiL e para a DSclerL 2,0149 (com janela próximo a 3200 - 3800 gauss), típico de espectros de Mn^{+2} , similar a referência usada de $MnCl_2$. Outras espécies

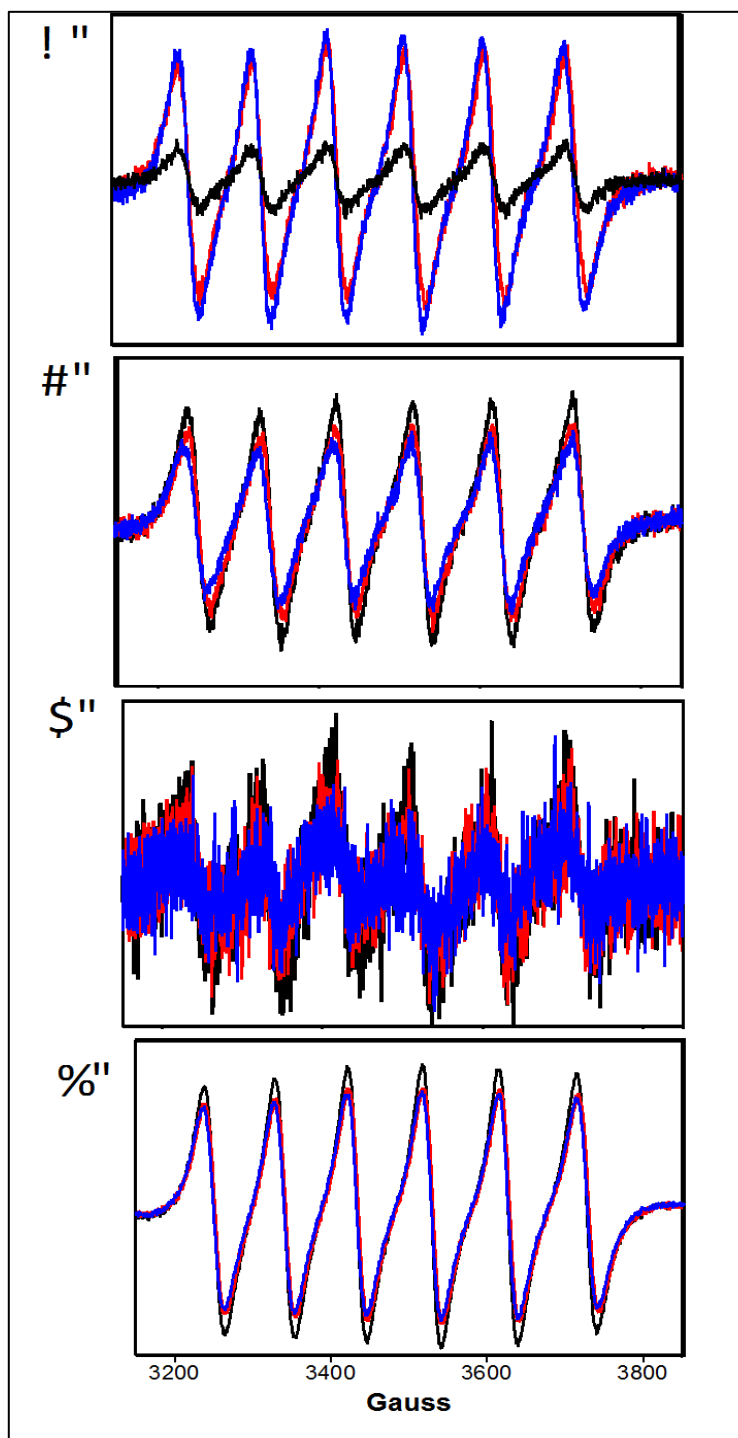
potencialmente paramagnéticas poderiam provocar sinais no EPR, tais como Fe^{2+} , Co^{2+} , todavia seus perfis seriam completamente distintos do observado para Mn^{2+} , além de que sua obtenção a temperatura ambiente não são triviais em metaloproteínas. Desta forma, tais medidas são claros indicativos da presença deste íon metálico associado as lectinas sob estudo.

Cálculos da constante de acoplamento para as lectinas mostram que a DLasiL ($a = 93,49$ G) apresenta um valor menor dentre as leguminosas estudadas, seguida da ConM ($a = 94,91$ G), da ConBr ($a = 95,14$ G), DSclerL ($a = 95,33$) e para o MnCl_2 ($a = 94,88$). O fator g calculado a partir dos espectros mostra também uma semelhança entre as lectinas, mas os resultados indicam diferenças sutis, $\pm 0,001$.

Curiosamente foi observado nos primeiros experimentos de EPR um sinal fraco de Mn^{+2} para a DLasiL, comparado as outras lectinas em estudo, como observado pelo expressivo aumento de ruído na medida. Experimentos posteriores empregando um aumento na concentração da DLasiL de 0,8 mM e 1,6 mM, não mostraram incremento significativo do sinal de EPR, possivelmente devido a dificuldade de alcançar tais elevadas concentrações mantendo a amostra plenamente homogênea. Desta forma, há suspeita de que o conteúdo final de manganês nesta proteína seja verdadeiramente inferior ao observado para ConM, ConBr e DSclerL, o que foi explorado posteriormente por ICP-MS (ver seção seguinte).

Outro experimento de ressonância paramagnética de elétrons foi realizado com as lectinas em contato com seus açúcares ligantes, glicose e manose, com o intuito de estudar a vizinhança do Mn^{+2} quanto à ligação das lectinas a seus açúcares de afinidade, os espectros obtidos estão representados na figura 25.

Figura 25: Espectros de EPR de A) ConBr, B) ConM, C) DLasiL e D) DSclerL.



Fonte: Elaborada pelo autor. Linha preta lectina nativa, linha azul lectina + Glicose, linha vermelha + manose.

A ConBr foi a única que mostrou um perfil diferenciado se comparado as outras lectinas. Ao adicionar os açúcares inibidores, glicose e manose, o sinal correspondente ao Mn^{+2} apresentou uma mudança bastante significativa se comparada a lectina sem os açúcares. Todavia, essa variação parece ser decorrência de um erro experimental de concentração, uma

vez que as outras lectinas não apresentaram o mesmo perfil. A observação de detalhes estruturais mais finos exige o emprego de outras técnicas de EPR (ex. ENDOR), e baixas temperaturas as quais não foram realizadas nesta tese.

Para as lectinas de ConM, DLasiL e DsclerL observou-se uma pequena diminuição no valor das intensidades dos sinais de EPR para o Mn^{+2} com a adição de 100 mM dos açúcares glicose e manose, o que poderia ser associado a alteração do sítio de ligação, ou simplesmente a uma pequena diluição da amostra quando adicionado os açúcares, o que exigiria outras técnicas de EPR para melhor elucidar esse fenômeno.

Apesar dos interessantes resultados obtidos usando EPR na banda X, a qual evidenciou a presença de manganês (II) nas amostras, medidas quantitativas desse elemento se tornam importantes para definir sua presença estequiométrica nestas lectinas, bem como o uso de outras técnicas quantitativas que indiquem a presença de outros íons divalente que sejam EPR silenciosos, como por exemplo Ca^{2+} , que não tem elétrons desemparelhados. A técnica selecionada para essas medidas quantitativas foi plasma indutivamente acoplado associado a espectrometria de massa (ICP-MS), como descrita em seguida.

4.2.4 ICP/MS

Devido aos metais constituírem cerca de um terço dos sítios funcionais de proteínas e serem cruciais para a manutenção de suas estruturas ou atividade biológicas, o estudo e quantificação de metais em proteínas se torna bastante importante, todavia, tais medidas ainda são escarsas (CHAI *et al.*, 2009). A dependência da atividade biológica das lectinas com esses íons metálicos é um fato comumente descrito para a maioria das lectinas vegetais, os quais modulam o reconhecimento desta proteína ao seu carboidrato específico. A lectina extraída a partir de sementes de *Talisia esculenta*, por exemplo, necessita de íons Ca^{2+} para desempenhar sua atividade biológica, bem como a ConBr (FREIRE *et al.*, 2002). Ocorre que estes cátions divalentes são responsáveis por estabilizarem a ligação ao domínio de reconhecimento de carboidratos e também por fixarem as posições dos aminoácidos que interagem com o açúcar ligante (WEIS & DRICKAMER, 1996).

As lectinas interagem com os carboidratos através de pontes de hidrogênio, devido ao grande número de hidroxilas disponíveis nas moléculas dos açúcares, que acabam por agir como doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals em sítios específicos da molécula lectínica, denominado domínio de

reconhecimento de carboidratos, também participam de ligações com os açúcares e outras moléculas pequenas (LORIS *et al.*, 1998).

A maioria dos elementos da tabela periódica podem ser ionizados e detectados por ICP/MS. Usando plasma de Argônio, os isótopos dos elementos podem ser facilmente ionizados em íons com carga positiva, onde são introduzidos no plasma dentro do analisador de massas, onde os íons são posteriormente separados pela razão massa/carga (m/z) (CHAI *et al.*, 2009).

Espectrometria de massas por plasma acoplado indutivamente é um tipo de espectrometria capaz de detectar metais a baixas concentrações, em torno de 10^{-12} (ppt) e possui a capacidade de medir concentrações elementares e abundâncias isotópicas a partir da maioria dos níveis constituintes, em amostras líquidas ou sólidas, sem a necessidade de inserir outras amostras dentro do espectrômetro (HANS *et al.*, 2013; FRASSEL *et al.*, 1986).

Os resultados coletados por EPR previamente indicaram a presença de manganês em todas as quatro lectinas, todavia de forma qualitativa. Diferenças de intensidade de sinais no EPR poderiam estar associados a conteúdos diferentes de manganês, além disso, a detecção de outros íons metálicos se tornam relevante para caracterização das lectinas. Inicialmente foi realizado uma varredura nas amostras de lectinas quanto ao seu conteúdo semi-quantitativo de metais. O resultado mostrou a presença semi-quantitativa de vários metais nas amostras, a partir desse resultado foi feito uma análise quantitativa para ^{12}Mg , ^{20}Ca , ^{25}Mn , ^{27}Co , ^{28}Ni , ^{30}Zn , os quais se mostraram mais abundantes nas lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, entretanto somente os três primeiros apresentaram quantidades significativas como observado na tabela 2, e as outras espécies apresentaram quantidade em traços.

Tabela 2 – Concentrações dos metais medidos por ICP-MS

	ConBr	ConM	DLasiL	DSclerL
Lectina (μM)*	4,11	4,23	5,49	5,08
Ca²⁺(μM)	0,73	0,49	0,32	1,44
Mn²⁺(μM)	3,93	3,49	1,46	17,35
Mg²⁺(μM)	1,82	1,45	1,81	1,62

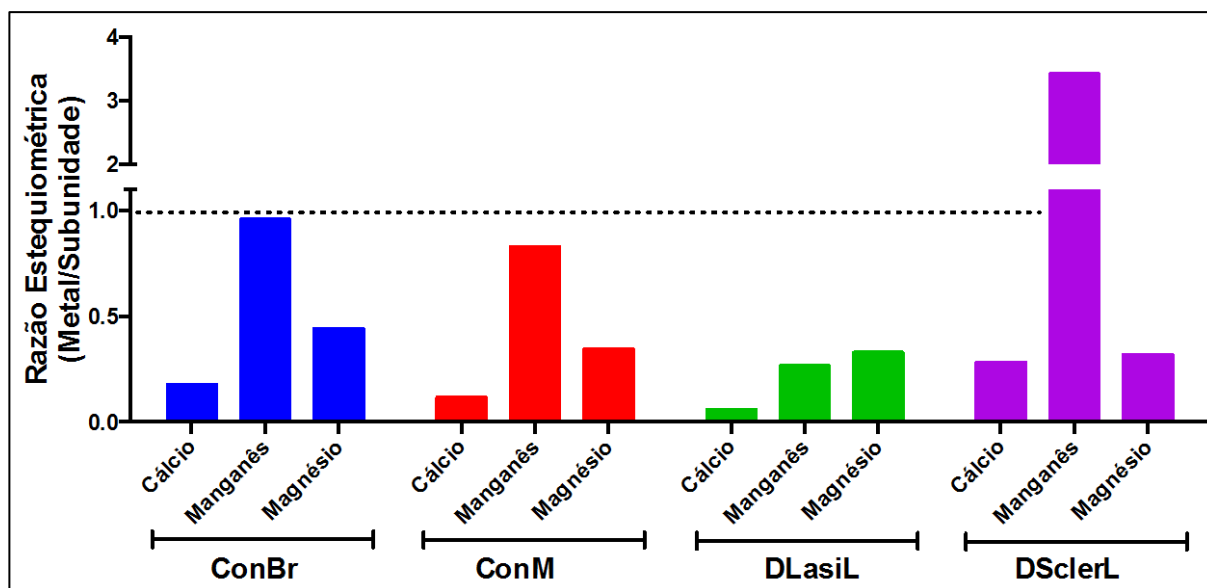
*Com base na concentração por subunidade de proteína.

Com base na tabela 2, as lectinas mostram valores em micromolar baseados nas medidas feitas por pesagem direta e diluição, as quais foram bastante próximas aos valores medidos em 280 nm, cujos valores para as proteínas empregadas neste ensaio foram: ConBr 4,11 μM , ConM 4,23 μM , DLasiL 5,49 μM e DSclerL 5,08 μM . Essas amostras apresentaram interessantes resultados para a quantificação dos metais nas proteínas. Primeiramente para Ca^{2+} observou-se que a DSclerL apresentou um conteúdo expressivamente maior para esse metal 1,44 μM , que a DLasiL 0,32 μM , seguido pelas outras lectinas, sugerindo que possivelmente haja limitação na técnica para quantificação específica desse metal (BOULYGA & BECKER 2001), levando-se em consideração que as duas espécies apresentam elevadas semelhanças estruturais, cuja expectativa seria de conteúdos similares de metais. Ainda assim, considera-se mais provável que a concentração se apresente diferente e significativamente pequena, com relação a expectativa estequiométrica, devido a um processo de demetalização parcial possivelmente durante o processo de purificação, e que cada uma delas tem diferentes afinidades para esse metal repercutindo nessas diferenças.

Com relação ao cátion divalente Mn^{2+} , a ConBr e ConM apresentaram valores bastante similares, enquanto a DLasiL apresentou valor bem menor, enquanto, surpreendentemente, para DSclerL observou-se um valor bastante elevado quando comparado as outras lectinas. O processo de purificação das lectinas da subtribo Diocleinae foram essencialmente os mesmos, nenhum passo de purificação foi alterado, seja removido ou incluído, mas o que se pode considerar seriam suas diferenças de interação com metais, o que repercutiria na sua capacidade de reter tais metais ligados após extensivas diálises, tal como realizadas durante a purificação. Poderia também se especular sobre alterações sazonais do conteúdo de metais das sementes coletadas em diferentes épocas do ano, assim possuírem estresses diferentes, apresentando processos de absorção de nutrientes diferenciados (GALEAS *et al.*, 2007), ademais como citado anteriormente nas etapas de purificação, a lectina poderia perder esses metais durante o processo de purificação. Por esses motivos discutidos anteriormente poderiam ser explicados tais variações nas quantidades dos metais presentes nas lectinas. Ainda assim, os sinais observados por EPR para manganês, empregando-se concentrações de lectinas similares já indicavam que os sinais eram mais intensos para DSclerL seguidos pela ConBr e ConM enquanto o sinal mais fraco era para DLasiL, consistente com a tendência quantitativa obtida por ICP-MS. Adicionalmente, a quantidade de metal divalente por subunidade pode ser checada fazendo-se a razão entre as suas concentrações e a concentração da proteína por subunidade, assim, observou-se para íon manganês(II) o conteúdo praticamente estequiométrico de 1 (um) íon Mn^{2+} por subunidade de ConBr e ConM,

enquanto que para a DLasiL o conteúdo é bem inferior ao estequiométrico indicando possível perda de metal, já para DSclerL haveria aproximadamente 4 íon Mn^{2+} por subunidade (Tabela 2 e Figura 26). Para esta última um estudo mais detalhado seria necessário para assegurar que este conteúdo não poderia ser decorrente de alguma contaminação.

Figura 26: Razão estequiométrica para os metais mais abundantes por subunidade de proteína empregando-se ICP-MS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

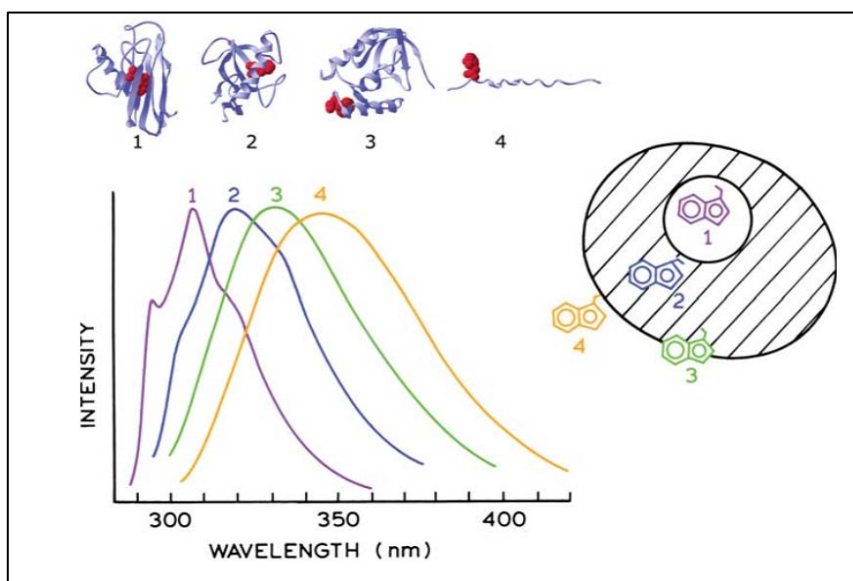
4.2.5 Espectroscopia de emissão de fluorescência

O fenômeno de emissão de fluorescência ocorre quando um elétron de uma molécula é excitado e absorve energia passando do seu estado fundamental (S_0) para o estado excitado (S_1) emitindo radiação, liberando energia em excesso (VOGEL *et al.*, 2002).

A espectroscopia de emissão de fluorescência tem sido bastante utilizada para investigação de mudanças conformacionais em proteínas, cujas mudanças podem ser monitoradas quando há alteração do microambiente nas proximidades de resíduos fluorescentes, particularmente os resíduos de triptofano, surgindo assim como interessante ferramentas biofísica (SWAMY *et al.*, 2006). Em proteínas, como as lectinas, o ambiente do triptofano pode ser estudados através de estudos de mudanças nos espectros de emissão, cuja exposição a ambiente aquoso ou internalização em ambiente hidrofóbico gera mudanças tanto na intensidade de emissão de luz quanto no comprimento de onda máximo de emissão deste

resíduo. Adicionalmente, tem sido bastante empregado agentes supressores de fluorescência como forma de investigar a acessibilidade destes resíduos, natureza do microambiente e mudanças conformacionais. Convém mencionar que tais estudos de dinâmica molecular associados a estruturas de raios-X, que são “imagens estáticas”, podem auxiliar na melhor compreensão mecânica de ação destas proteínas (LAKOVICZ *et al.*, 2009).

Figura 27: Efeito do ambiente do resíduo de triptofano no espectro de emissão. O espectro de emissão de 1-4 ilustra um ambiente hidrofóbico com a mudança para ambiente totalmente exposto, hidrofílico. Fonte: LAKOVICKZ (2006).



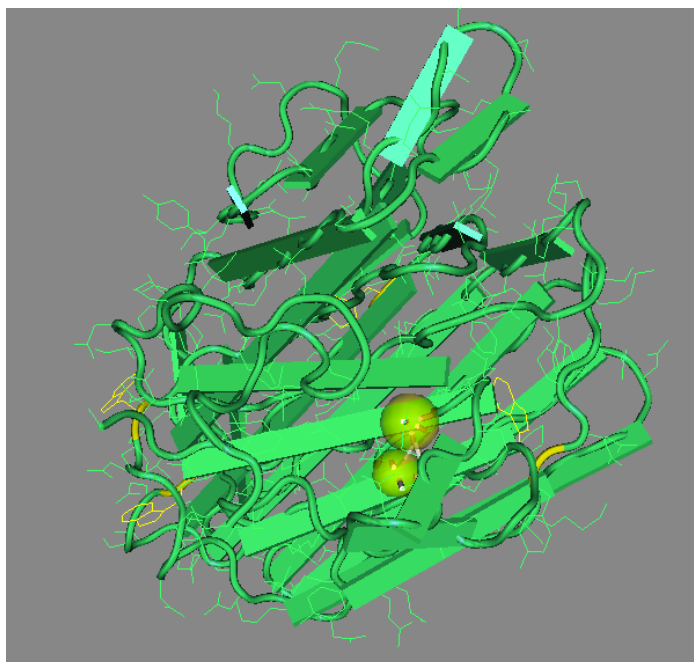
Fonte: LAKOVICKZ (2006).

O uso de supressores de fluorescência tais como acrilamida, iodeto de potássio e cloreto de cézio é bastante difundido, os quais tem possibilidade de indicar a natureza do microambiente dos triptofanos, se em microambientes hidrofóbicos, hidrofílicos ou carregados positivamente ou negativamente, bem como podem refletir mudanças conformacionais promovidas por algum agente, no caso das lectinas os carboidratos, metais divalentes ou mesmo agentes desnaturantes. A alta sensibilidade da espectroscopia de fluorescência investigando a emissão dos triptofanos têm proporcionado inúmeras oportunidades para estudos da função e estrutura de proteínas, enovelamento e suas dinâmicas (LAKOVICZ *et al.*, 2009). Além do uso de fluoróforos intrínsecos, no caso o triptofano, o emprego de sonda de fluorescência extrínsecas como o fluoróforo bis-ANS tem sido amplamente estudado. Este composto tem sua fluorescência marcadamente alterada ao

interagir com cavidades não-polares da proteína, podendo relatar alterações conformacionais induzidas, associação a subunidades, ligação a substratos ou desnaturação (LAKOVICZ et al., 2006; LAKOVICZ et al., 2009).

As lectinas investigadas apresentam quatro triptofanos (W) em posições bastante conservadas: Trp40, Trp88, Trp109 e Trp182, se comparada a estrutura 3D da ConBr, retirada do PDB número de acesso 1AZD. Na Figura 28 abaixo, podemos observar na estrutura tetramérica da ConBr, em destaque observa-se os triptofanos da estrutura monomérica em amarelo, as duas esferas amarelas representam os metais divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}).

Figura 28: Estrutura de raios-X da ConBr (PDB 1AZD), em destaque na figura somente uma subunidade da estrutura tetramérica (software usado Cn3D)

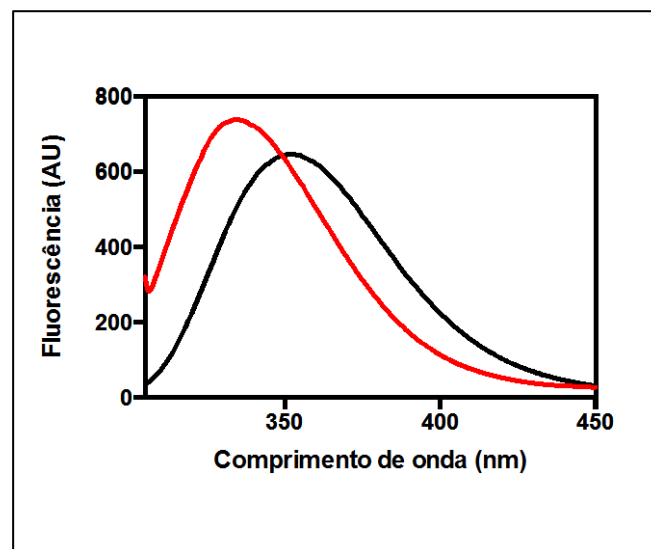


Fonte: Elaborada pelo autor. As duas esferas amarelas representam os metais divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}).

Os espectros de fluorescência intrínseca para a lectina DLasiL foram medidos em tampão fosfato pH 7,4, mimetizando o ambiente fisiológico, sendo excitada em 280 nm e provocando emissão máxima (λ_{max}) dos triptofanos em 334 nm, indicando um significativo ambiente não-polar ao redor das cadeias laterais indólicas dos resíduos de triptofano. Por outro lado, a DLasiL desnaturada com cloreto de guanidínio (Gdn-HCl) deve provocar o desenovelamento da cadeia protéica expondo seus triptofanos ao solvente, o que foi confirmado através do máximo de emissão em 352 nm, observado na Figura 29. O tratamento

de desnaturação provocou um deslocamento batocrômico na emissão máxima dos triptofanos (para maiores comprimentos de onda) com variação de 17 nm. Essa diferença de emissão entre lectina nativa e desnaturada, se deve a exposição dos triptofanos localizados na estrutura da proteína. Lectina de *Dolichos lablab* (DLL) (SULTAN *et al.*, 2006), em contrapartida, possui valores para emissão máxima dos triptofanos na lectina nativa em 328 nm e para desnaturada em 352 nm, com variação de 24 nm, evidenciando que existem diferenças ainda maiores entre as duas DLL e DLasiL, mostrando que para o caso da DLL os triptofanos parecem estar menos expostos a superfície da proteína do que a DLasiL, como sugere a figura 29, todavia ambas alcançam idêntico estado desnaturado, como esperado com emissão em 352 nm.

Figura 29: Espectro de emissão de fluorescência para DLasiL.

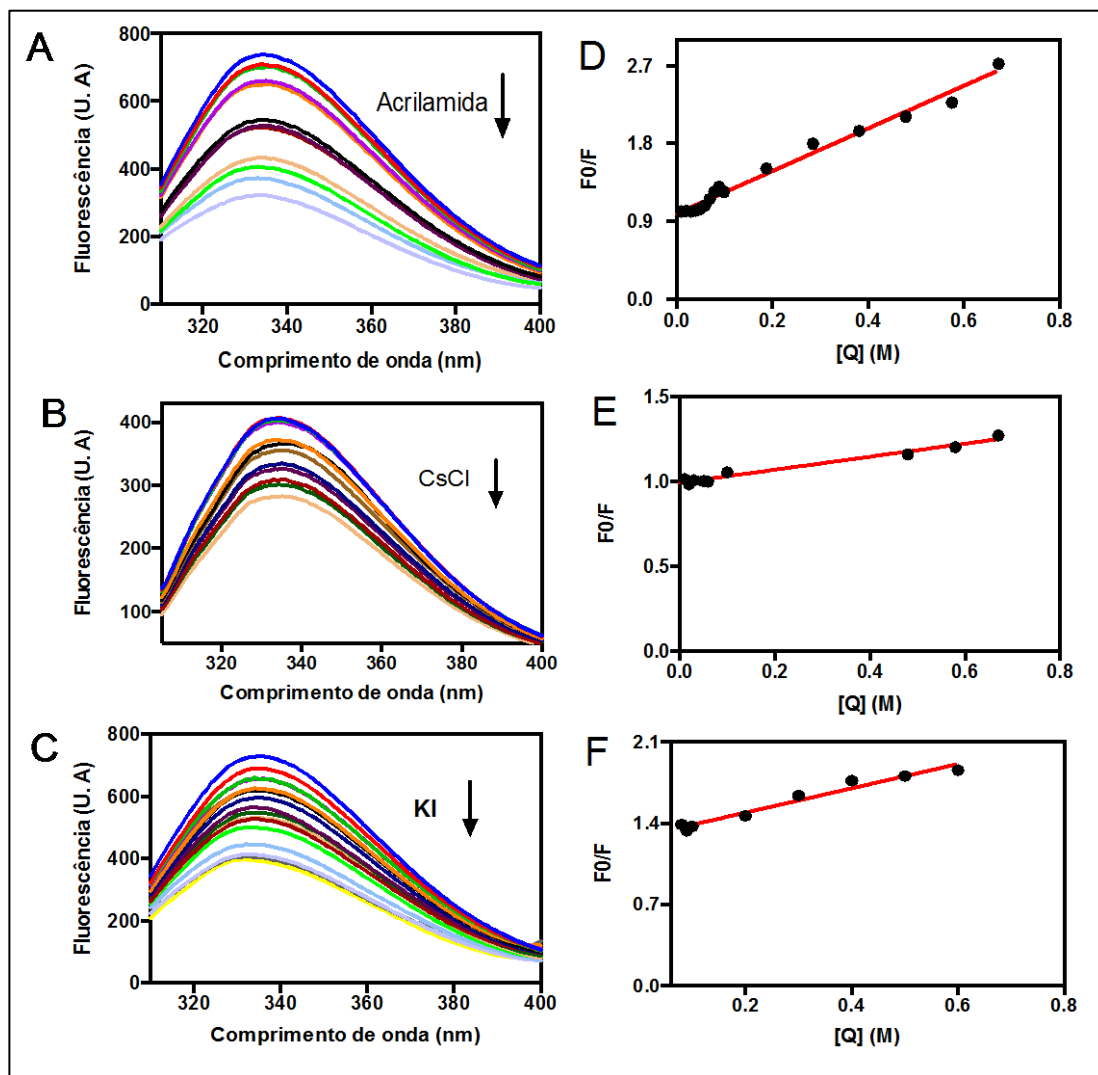


Fonte: Elaborada pelo autor. Linha preta indica o espectro de emissão da DLasiL nativa (máximo emissão em 334 nm), enquanto a linha vermelha se refere ao espectro de emissão da lectina desnaturada (máximo de emissão em 352 nm) com cloreto de guanidínio (GdN-HCl 6M) (excitação em 280 nm).

O espectro de emissão de fluorescência mostra a influência sofrida nos triptofanos, onde observa-se que a DLasiL nativa possui emissão máxima em 334 nm e a DLasiL desnaturada com espectro de emissão máximo em 352 nm.

A amplitude de supressão de fluorescência para DLasiL nativa foi observada com o uso de diferentes supressores a uma concentração final de 0,70 M como mostrado na figura 30.

Figura 30: Espectro de fluorescência da DLasiL nativa com a presença de concentração crescente dos supressores.



Fonte: Elaborada pelo autor. A) supressor acrilamida, B) supressor íons céσιο, C) supressor íons iodeto, D) gráfico Stern-Volmer para supressão com acrilamida, E) gráfico Stern-Volmer para supressão com céσιο e F) gráfico Stern-Volmer para supressão com iodeto. A concentração final dos quenchers é de 0,7 M. (valores corrigidos com relação a diluição).

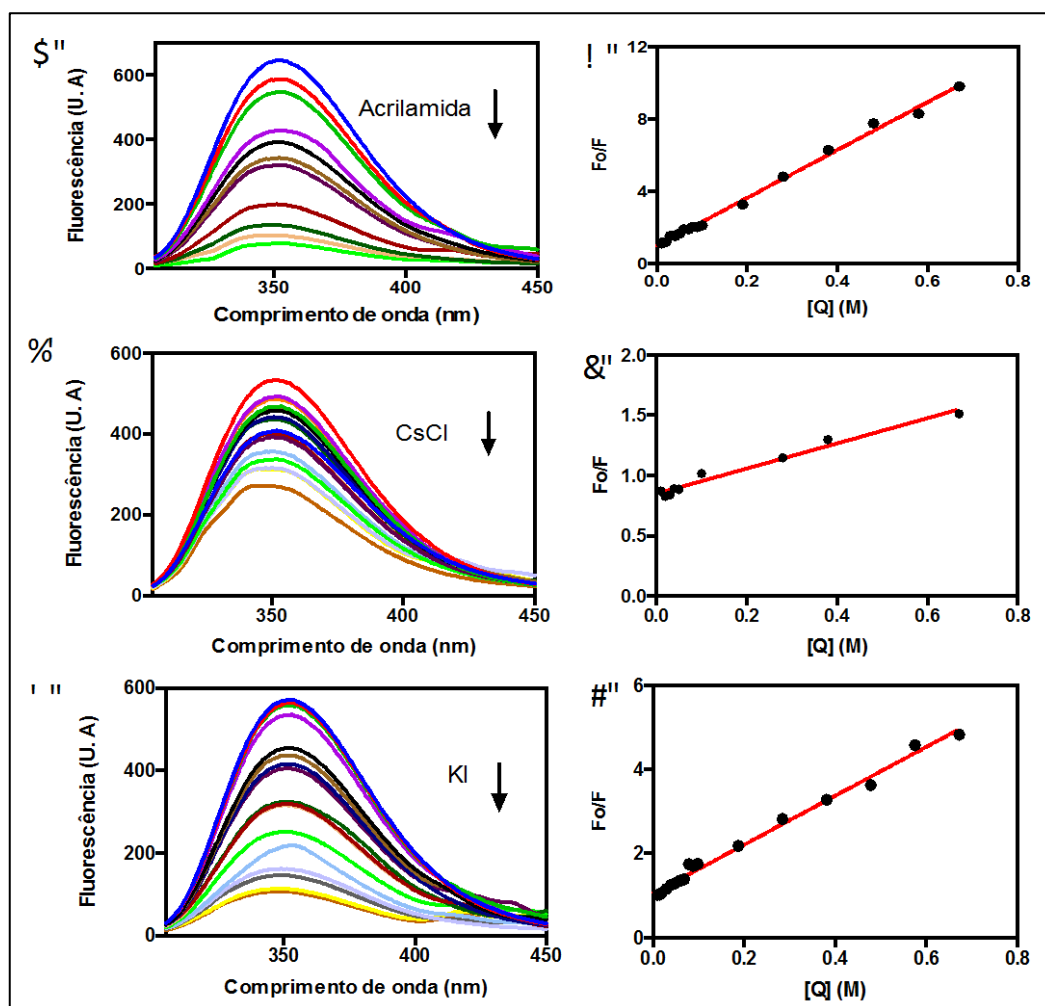
Observa-se nitidamente a supressão do sinal de fluorescência ao adicionar concentrações crescentes de acrilamida, que suprime emissão de triptofanos localizados em microambientes neutros, segundo os dados da tabela 3 esse valor de supressão foi de 56,45%. Para o íon céσιο Cs^+ que suprime regiões carregadas negativamente o valor de supressão foi

de 30,54%, e para o íon iodeto que suprime regiões carregadas positivamente foi de 44,58%. Os valores de supressão indicam que o supressor mais eficiente é acrilamida, seguido pelo íon iodeto e por final o íon céσιο. As supressões menores para o íon iodeto e íon céσιο podem indicar que os ambientes carregados positivamente e negativamente da proteína encontram-se num ambiente mais protegido, escondendo mais os resíduos de triptofano em uma região mais apolar ao redor das cadeias laterais indoles. Os menores valores de supressão para Cs^+ e Γ indicam que a acessibilidade aos triptofanos não se deve pela marcante presença de resíduos carregados positivamente ou negativamente, sendo sugerido um ambiente médio mais neutro a acessibilidade das cadeias laterais do anel índole. Ademais, com relação a natureza dos supressores, o tamanho dos mesmos não parece afetar a extensão da supressão, uma vez que a acrilamida que possui o maior raio ainda sim provoca maior supressão, os resultados não mostram um padrão entre maior raio iônico/molecular e menor supressão, já que para o Cs^+ com menor raio (1,8 Å) foi o supressor menos eficiente. Curiosamente, a lectina DLL apresentou forte supressão proporcionada pela acrilamida (49%), enquanto iodeto (11%) e céσιο (2%) foram muito baixos, indicando um ambiente predominantemente neutro, o que está em alinhamento com o valor de 328 nm para emissão dos triptofanos. Comparativamente a DLasiL, cuja emissão máxima dos triptofanos foi em 334 nm, já sugeria um ambiente mais exposto ao solvente, conseqüentemente sujeito a mais resíduos hidrofílicos e carregados. Os valores de supressão expressivos tanto para céσιο quanto para iodeto em comparação a DLL dão sustentação a essa proposta, indicando que em média ainda haveria um ambiente neutro todavia cargas devem ser presentes.

Ao ser comparado o espectro de fluorescência para a lectina DLasiL nativa e desnaturada, observou-se um deslocamento do máximo de emissão λ_{max} da lectina nativa de 334nm para 352 nm com a lectina desnaturada usando Gdn-HCl 6M, Figura 29. Estudo de supressão foi também realizado com a amostra desnaturada. A figura 31 mostra que para o espectro da DLasiL desnaturada a quantidade de supressão é expressivamente mais alta, indicando claramente que ocorreu desenovelamento da proteína conferindo um aumento significativo na acessibilidade dos resíduos de triptofanos para os supressores, evidenciado pelo forte aumento nos valores de supressão e nas constantes de Stern-Volmer. O processo de desnaturação significa também um aumento na extensão da supressão de fluorescência com outros tipos de supressores, tais como Γ e Cs^+ . Os resultados mostram que as cadeias laterais indólicas dos resíduos de triptofano na DLasiL se tornam mais expostas a solução aquosa após desnaturação, sustentando a supressão moderada da forma nativa.

A constante de Stern-Volmer reflete a eficiência da supressão decorrente da acessibilidade do fluoróforo aos supressores neutros, positivos ou negativos. As constantes de Stern-Volmer foram calculadas na presença dos três supressores tanto para a DLasiL nativa como para a DLasiL desnaturada. Os gráficos se mostraram mais condizentes com um perfil linear, podendo assim serem utilizados dados de supressão de Stern-Volmer sem usar as equações de Stern-Volmer modificadas, o que demonstra que as regiões onde se localizam os triptofanos são em média similares. Os valores observados para as constantes de Stern-Volmer da DLasiL desnaturada são maiores em todos os casos, o que é condizentes com o desenovelamento da cadeia protéica dando mais acessibilidade aos triptofanos logo maior supressão de fluorescência.

Figura 31: Espectros de fluorescência da DLasiL desnaturada com 6M de cloreto de guanidínio (Gdn-HCl), usando supressor neutro (acrilamida), aniônico (íon iodeto, I^-) e catiônico (íon césio, Cs^+), em concentração crescentes dos supressores.



Fonte : Elaborada pelo autor. A) supressor acrilamida, B) supressor íons césio, C) supressor íons iodeto, D) gráfico Stern-Volmer para supressão com acrilamida, E) gráfico Stern-Volmer para supressão com césio e F) gráfico Stern-Volmer para supressão com iodeto. A concentração final dos quenchers é de 0,7 M.

Tabela 3: Resultados dos espectros de fluorescência da DLasiL desnaturada com 6M de cloreto de guanidínio (Gdn-HCl), usando supressor neutro (acrilamida), gráficos Stern-Volmer para supressão com acrilamida, céσιο e iodeto.

Supressor	DLasiL nativa		DLasiL desnaturada	
	Ksv (M ⁻¹)	Supressão (%)	Ksv (M ⁻¹)	Supressão (%)
Acrylamida	2,41 ± 0,07	56	13,28 ± 0,21	88
Césio (Cs ⁺)	0,16	30	1,04 ± 0,06	50
Iodeto (I ⁻)	0,77 ± 0,03	44	5,82 ± 0,14	80

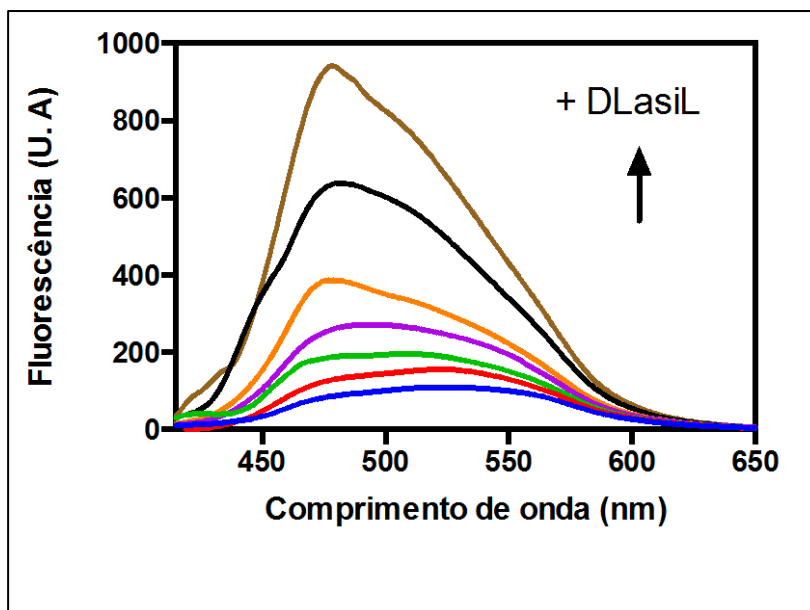
Fonte: Elaborada pelo autor.

O fluoróforo bis-ANS é uma sonda molecular usada como modelo para avaliar a interação a cavidades não-polares em proteínas, o qual apresenta elevada afinidade por tais ambientes hidrofóbicos. Essa propriedade torna o bis-ANS um indicador fluorescente apropriado para diversos estudos tais como enovelamento protéico, mudanças conformacionais e outros processos que modificam a exposição da sonda a água. Esse agente apresenta baixa emissão de luz em água, todavia, quando na presença de proteínas observa-se um deslocamento hipsocrômico expressivo (para comprimentos menores de onda) seguido de um aumento na intensidade de emissão, o que está associado a interação da sonda bis-ANS aos sítios hidrofóbicos da proteína (HAWE *et al.*, 2008).

Estudos de fluorescência usando a sonda bis-ANS foram realizados, sendo inicialmente feito ensaios para avaliar a concentração adequada de DLasiL, por meio de titulação com concentrações crescentes de DLasiL para garantir sinal significativo e proximidade a um nível de saturação da proteína.

A Figura 32 apresenta a titulação fluorimétrica de DLasiL numa amostra contendo bis-ANS, cuja emissão foi crescentemente deslocada para o azul, de aproximadamente 545nm para 482 nm ($\Delta = -63$ nm), e expressivamente intensificada sua emissão em cerca de 1000%, tal como descrito na literatura para outras proteínas, indicando a interação de bis-ANS a sítios hidrofóbicos da proteína (KUMAZAWA-INOUE *et al.*, 2012).

Figura 32: Espectros de fluorescência para bis-ANS na presença de concentrações crescentes da lectina DLasiL, excitando em 390 nm.

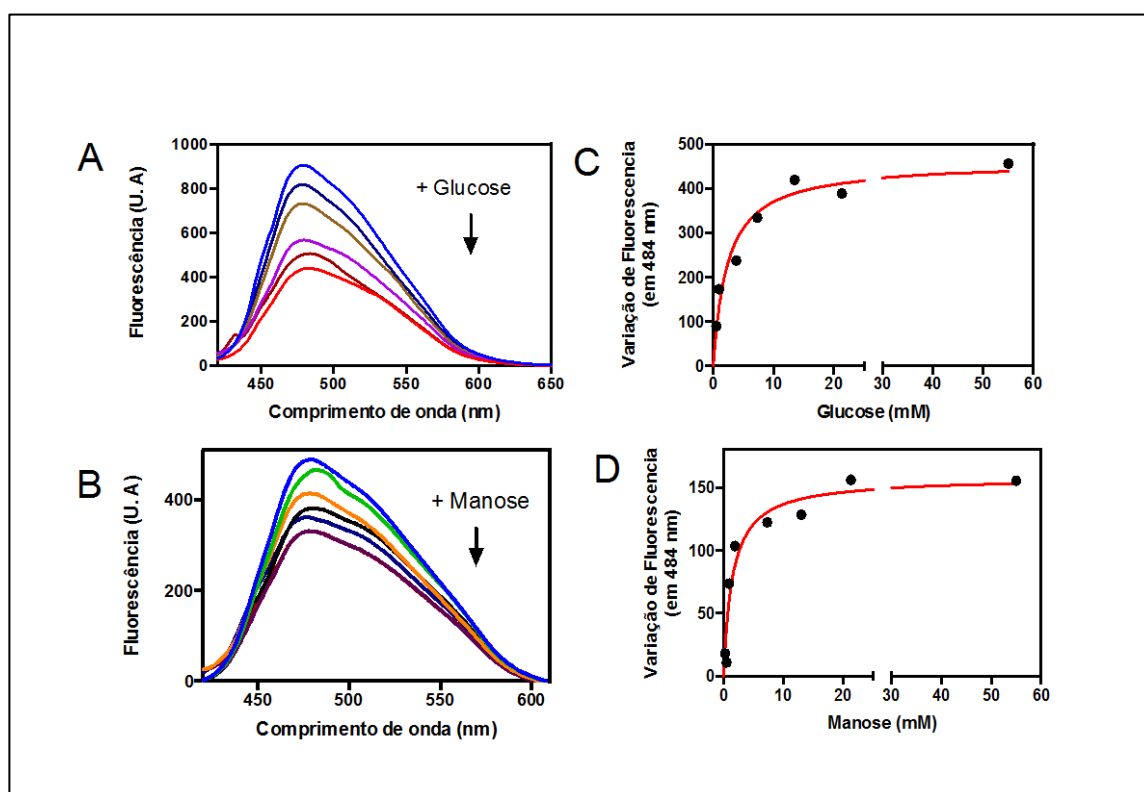


Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma vez que fora observado expressivo aumento na emissão de luz pela sonda bis-ANS associada com o deslocamento de seu máximo de emissão com a adição da lectina (Figura 32), há possibilidade de se usar esta medida para investigar diversos fenômenos, inclusive a interação e afinidade dos açúcares a lectina, o que pode provocar alterações conformacionais susceptíveis ao monitoramento indireto proporcionado por esta técnica (ROY *et al.*, 2014). Tentativa de estudos de afinidade foram realizados com a adição de açúcares a uma mistura contendo bis-ANS e DLasiL, Figura 33 A e B. Observou-se que a adição de açúcares diretamente provocou expressivas alterações na intensidade da fluorescência do bis-ANS ligado a proteína, ou seja, há alterações induzidas na proteína pelo açúcar perturbando sua interação com a sonda fluorescente, de forma que parece está associado a constante de dissociação destes açúcares. Na presença de cerca de 0,1 M de glicose, que se liga especificamente a DLasiL, o espectro mostra claramente que esse açúcar induz alterações na emissão da sonda sugerindo mudanças conformacional na proteína, o que se mostra consistente com a interação deste açúcar a DLasiL. A titulação fluorimétrica com este açúcar (glicose) mostrou um comportamento consistente com a associação do açúcar a DLasiL, a qual provoca alteração na intensidade sinal da bis-ANS, desta forma mediu-se a afinidade deste açúcar, cuja constante de dissociação para a glicose foi de $K_d = 2,35 \pm 0,5$ mM. Para a manose, observa-se um efeito menos pronunciado quanto a supressão da

fluorescência, todavia uma maior afinidade observada com menor constante de dissociação deste açúcar a DLasiL foi medida com $K_d = 1,50 \pm 0,4$ mM. Curiosamente, glicose e manose exibiram diferenças na resposta máxima de emissão com essa sonda, o poderia justificar possíveis diferenças na força de interação e conformações particulares promovidas na proteína. Convém mencionar que estes valores de afinidade estão nas vizinhanças medidas para outras lectinas, além disso, a adição de metais divalentes a amostra de DLasiL poderia eventualmente incrementar sua interação com os açúcares reduzindo tais valores o que merecer posteriores estudos.

Figura 33: Efeito de afinidade por açúcares glicose e manose na DLasiL.



Fonte: Elaborada pelo autor. A) DLasiL + Glicose, B) DLasiL + Manose, C) Variação da fluorescência em 484 nm em presença de glicose e D) Variação da fluorescência em 484 nm em presença de manose, excitação em 390 nm.

4.2.6 Espectroscopia por Dicroísmo Circular

Dicroísmo circular é uma ferramenta importante na caracterização estrutural de proteínas e especificamente para determinação de estruturas secundárias. Para proteínas, uma vez que possuem centros quiróforos (grupo amida ligado a carbono α assimétrico) de estrutura desconhecida, dados de CD podem ser úteis para serem usados em conjunto com

outras técnicas de análise estrutural, ajudando a definir possíveis estruturas secundárias daquela proteína (HIRST *et al.*, 2007).

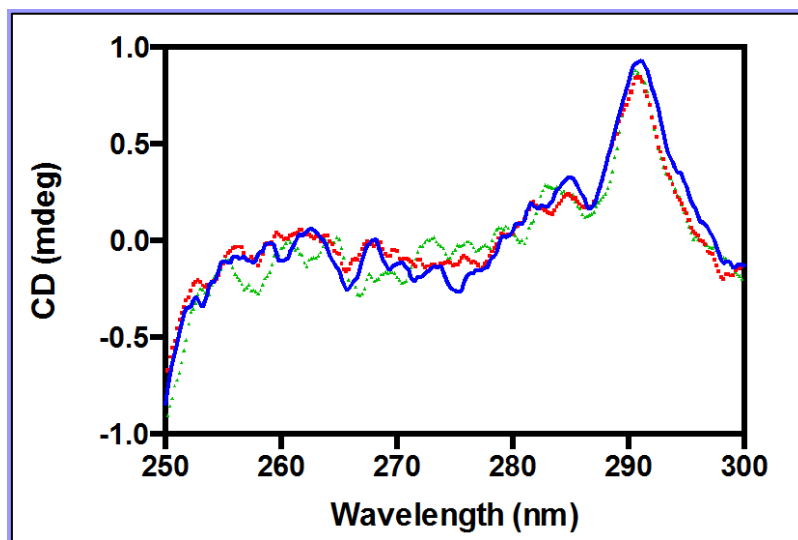
A técnica é descrita como a absorção diferenciada da luz circularmente polarizada à direita e à esquerda. Ocorrerá esse efeito de absorção diferencial quando um cromóforo quiral (opticamente ativo) ou, (a) por razões estruturais, (b) por estar covalentemente ligado a um centro quiral ou (c) ou estar localizado em um centro assimétrico. A radiação do plano polarizado é gerada e dividida em dois componentes do plano polarizado, no qual o instrumento de CD (espectropolarímetro) detecta as duas componentes separadamente, que assim combinadas resultarão em uma luz elipticamente polarizada, caracterizando o fenômeno (PRICE & KELLY, 2000).

Quando a luz polarizada circularmente colide com uma proteína, a estrutura eletrônica da proteína produz um aumento característico nas bandas em certas regiões no espectro de CD, resultando na absorção dessas energias eletrônicas. Elementos estruturais secundários como α -hélices, β -sheets, β -turns e estruturas helicoidais aleatórias se apresentam sinais em regiões do ultravioleta distante (180 a 250 nm), onde as transições $n-\pi^*$ (em torno de 210 nm) e $\pi-\pi^*$ (em torno de 190 nm) da amida estão compreendidas. Além disso, as ligações peptídicas são os principais grupos que absorvem nessa região. Na região do ultravioleta próximo (250-290 nm), as cadeias laterais de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) absorvem nesse comprimento de onda. A estrutura terciária também pode ser monitorada por espectroscopia de CD, podendo assim servir como impressões digitais características da estrutura nativa das proteínas (PRICE & KELLY, 2000), (SWAMY *et al.*, 2006).

Essa técnica não é usada somente para caracterização de proteínas, mas também para o estudo de interações com outras moléculas ou alvos, como por exemplo açúcares. Ademais esses estudos se tornam importantes para o entendimento da interação proteína-açúcar, sendo usadas para elucidar mecanismos de ação molecular, tornando-se assim modelo para estudos lectina-açúcar para aplicações biotecnológicas.

A interação entre DLasiL e os diferentes açúcares (glicose e manose), foi estudado por espectroscopia de CD. A Figura 34 mostra o espectro de dicroísmo circular para a DLasiL nativa na região do ultravioleta próximo em azul, e a DLasiL nativa obtida na presença de glicose 100 mM e manose 100 mM em vermelho e verde respectivamente. O espectro é caracterizado pela presença de um máximo em torno de 290 nm e um outro próximo a 280 nm. Essa característica do espectro da DLasiL é provável que surja devido as contribuições das cadeias laterais dos resíduos de triptofano e tirosina, que absorve em torno da região de 270-300 nm. Entretanto a ligação aos carboidratos que a lectina possui maior afinidade, mostra que a interação de ligação não parece perturbar os sinais a níveis altos, o que percebe-se é um pequeno deslocamento do espectro, podendo ser atribuído a uma fraca interação lectina carboidrato. Uma vez que estudos de modificação química tem alterado as cadeias laterais dos resíduos de tirosina e conseqüentemente havendo mudança na atividade de ligação dos carboidratos. Na DLasiL, os resíduos de tirosina envolvidos na interação, não significam que se reorientam, pelo menos quando a DLasiL se liga a glicose e manose.

Figura 34: Espectro de Dicroísmo Circular para a DLasiL na Região do UV próximo. (—) DLasiL nativa, (.....) DLasiL + 100 mM de Glicose e (.....) DLasiL + 100 mM de Manose.

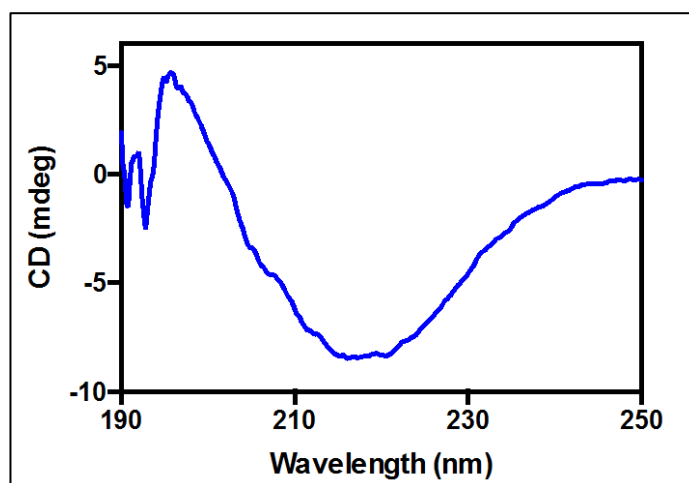


Fonte: Elaborada pelo autor.

O espectro de dicroísmo circular da DLasiL nativa na região 190-250 nm é mostrado na figura 35. Na região distante do UV, o espectro mostra uma banda larga e negativa em torno de 224 nm, que é característica de proteínas ricas em folhas β (VAREJÃO et al., 2011).

Uma outra banda positiva aparece em 200 nm e uma última banda cruzada negativa-positiva em 209 nm. Com o aparecimento de uma só banda larga e negativa, não se pode estimar com certeza a presença de estruturas helicoidais juntamente com elementos estruturais secundários. Uma análise mais detalhada sobre os tipos de estruturas secundárias, ou seja, um detalhamento mais quantitativo e uma informação mais precisa sobre os diferentes elementos secundários pode ser feita empregando-se três diferentes métodos, chamados de CDSSTR (PROVENCHER AND GLOCKNER, 1981; VAN STOKKUM et al., 1990), CONTINLL (SREEREMA and WOODY, 1993; SREEREMA et al., 1999), and SELCON3 (LOBLEY and WALLACE, 2001; LOBLEY et al., 2002) empregando o software disponível no DICHROWEB (www.cryst.bbK.ac.uk/cd/web/html), (REES, 1990; MOREIRA et al., 1997).

Figura 35: Espectro de Dicroísmo Circular da DLasiL nativa na região do UV distante.



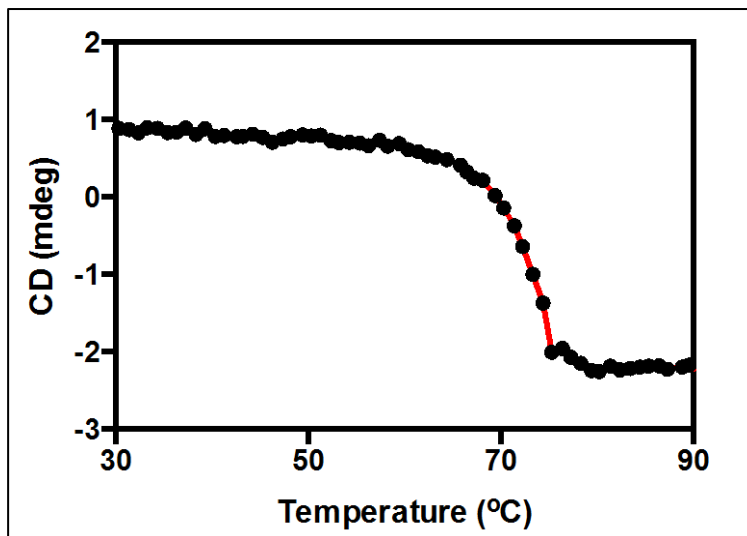
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a estimativa do conteúdo de diferentes tipos de estruturas secundárias na DLasiL usou-se o espectro de dicroísmo Circular da figura 35 da lectina nativa em um comprimento de onda de 190-250 nm. Um conjunto de base contendo 43 proteínas foi utilizada como referência para a montagem do espectro experimental. Entre os três métodos utilizados, o melhor resultado foi obtido com SELCON3, um método que é muito recomendado para determinação de conformação de proteínas em solução. (OLIVEIRA et al., 2002). O conteúdo de várias estruturas secundárias obtidos para DLasiL nativa por este método são: 40,2% folha β antiparalela, 4,6% folha β paralelo, 7,2% α -hélices, 17,3% voltas, e 28,7% de estruturas desordenadas com uma raiz quadrada da média inferior a 1%. Esses resultados sugerem a similaridade com outros tipos clássicos de lectinas que contem

grande parte de estruturas secundárias segundo Loris et al., 1998. Ademais, a predominância das estruturas em folhas β (44.8%), sugerem a grande semelhança entre lectinas de leguminosas gênero *Dioclea* segundo Correia et al., 2011.

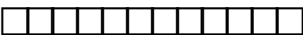
Outro aspecto explorado usando-se a técnica de CD se refere a termoestabilidade de proteínas. A DLasiL foi aquecida em diferentes temperaturas entre 30 e 90 °C, para o estudo de sua termoestabilidade, monitorada pelo sinal de CD no comprimento de onda de 290 nm. O CD mostra que a DLasiL é uma proteína resistente ao aquecimento, começando a mudar o seu perfil nas temperaturas entre 50-80 °C, cujo ponto médio de desnaturação se encontra em 72 °C, e em torno 80-90 °C já possui sua estrutura completamente danificada pelo aquecimento. Ao redor de 50 °C, a DLasiL inicia seu processo de desnaturação, uma vez que a intensidade do sinal de CD inicia um declínio. A termoestabilidade que a DLasiL apresenta é uma característica comum a lectinas de leguminosas (SRINIVAS et al., 2001), o que as torna bastante atrativa para fins biotecnológicos. Esse estudo pode também ser correlacionado a estudos de hemaglutinação em diferentes temperaturas. ConA também é uma proteína que apresenta o seu ponto de desnaturação (fusão) na mesma faixa de temperatura que a DLasiL, mais uma vez indicando similaridade da lectina em estudo e lectinas da subtribo Diocleinae (GEETHANADAN et al., 2013).

Figura 36: Espectro de Dicroísmo Circular para DLasiL aquecida em diferentes temperaturas de 30 a 90 °C, em comprimento de onda de 290 nm.



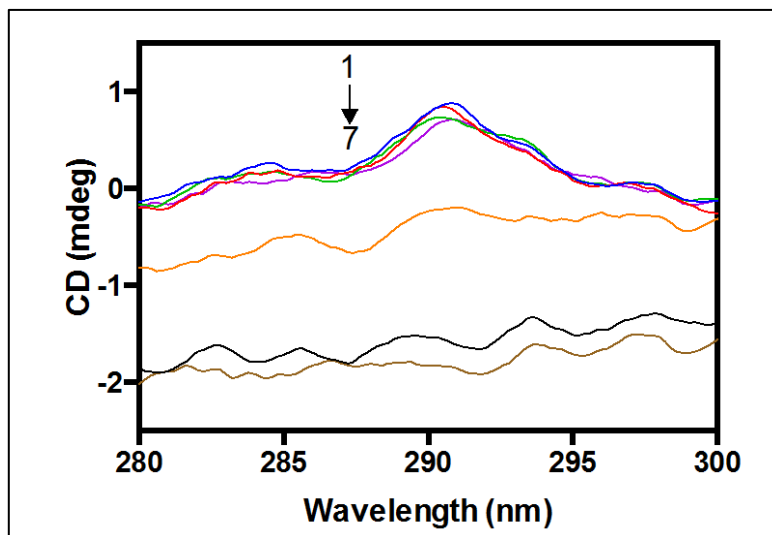
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para investigar a desnaturação térmica da DLasiL na região do UV próximo, foram realizadas medidas com temperaturas diferentes. Espectros de CD foram gravados a 20, 30, 50, 60, 70, 73 e 80 °C e são mostrados na figura 37. Enquanto em temperaturas de 20, 30, 50 e 60 °C o espectro mostrou mudanças muito moderadas, na temperatura de 70, 73 e 80 °C pode-se ver mudanças mais pronunciadas, sugerindo a ocorrência de desenovelamento da estrutura que ocorre nessa faixa entre 70 e 80 °C, consistente com as medidas anteriores em 290 nm. O espectro para uma amostra de lectina nativa normalmente encontra-se em torno de zero, mas ao redor de 80 °C, a DLasiL começa a precipitar em solução e o espectro começa a distorcer indicando que a altas temperaturas a DLasiL inicia o processo de desnaturação de suas estruturas. Essa observação pode ser nitidamente vista na figura anterior (figura 37).

A termoestabilidade da DLasiL nesta faixa do espectro CD foi em aproximadamente 75 °C, consistentemente indica que a lectina é uma proteína estável. A maioria das lectinas de sementes de leguminosas investigadas tem sido relatadas, em geral, como estáveis a desnaturações térmicas com ponto médio entre 56 a 92 °C para diferentes lectinas. Apesar disso, os mecanismos de desenovelamento apresentam-se diferentes. Assim o mecanismo de desenovelamento da DLasiL pode ser similar a mecanismos encontrados para proteínas relatados previamente na literatura. Por exemplo a lectina de ConA, possui dois estados de transição (enovelado tetrâmero e ) monomérico com seu ponto de fusão

entre 87-92 °C, a lectina de amendoim em contrapartida apresenta dois pontos de fusão um entre 56-61 °C e outro em 63 °C (SULTAN *et al.*, 2006), (CHATTERJEE *et al.*, 2003).

Figura 37: Espectros sobrepostos de CD próximo ao UV em diferentes temperaturas. O espectro é numerado de 1 a 7 correspondendo as temperaturas de 20, 30, 50, 60, 70, 73 e 80°C.



Fonte: Elaborada a pelo autor.

O que se pode perceber é que a DLasiL possui uma termoestabilidade elevada, o que corrobora com os dados da literatura para a mesma subtribo.

4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.3.1 Atividade antiproliferativa em células A2780, A549, PC3, MCF7

O teste de citotoxicidade *in vitro* através da cultura de células neoplásicas é uma ferramenta importante para o estudo de agentes anticâncer, utilizado assim como método que se soma aos testes farmacológicos, bem como durante a fase de *screening* para avaliação de agentes anticâncer, o que tem reduzido a experimentação *in vivo* em animais (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991; CINGI *et al.*, 1991).

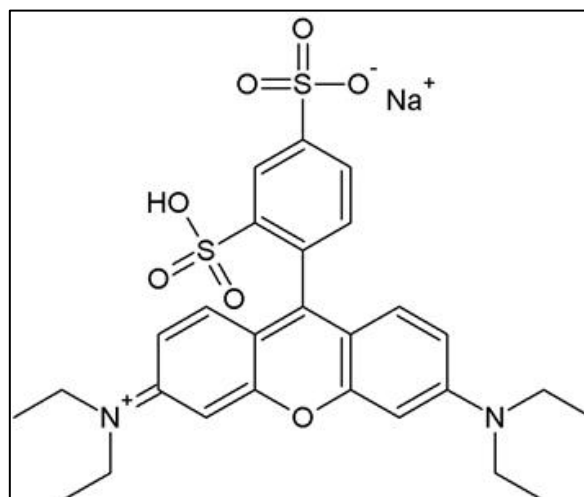
Um teste bastante difundido na investigação de agentes anti-tumorais é o ensaio colorimétrico usando Sulfrodamina B (SRB), amplamente usado como rotina de triagem pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) (RUBINSTEIN *et al.*, 1990, HOUGHTON *et al.*, 2007). O SRB é um corante roxo, empregado amplamente para avaliação

de citotoxicidade e proliferação de células em ensaios de microplacas (LIN *et al.*, 1999). A ligação ocorre de forma estequiométrica entre aminoácidos básicos das proteínas celulares e dissocia-se em condições básicas, sendo que a quantidade de corante final retirado das células coradas é diretamente proporcional a massa total de proteína na célula, assim correlacionada com o número de células (VICHAI & KIRTIKARA 2006). O ensaio de SRB utiliza a medida do conteúdo de proteína para determinar, o crescimento celular ou a viabilidade, supõe-se então que as células mortas ou lisadas, são removidas durante o procedimento, ou de outra forma que não contribuem para o ponto final colorimétrico (RUBINSTEIN *et al.*, 1990). A vantagem maior deste método, está na estabilidade da placa para leitura, onde as células primeiramente são fixadas, coradas e a medida da absorbância pode ser realizada até várias semanas após o término do ensaio (SKEHAN *et al.*, 1990).

Outra metodologia existente para quantificação de viabilidade celular é o método do MTT. O ensaio do MTT é um ensaio colorimétrico para medida de atividade enzimática celular baseado na redução metabólica do corante 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) na sua forma insolúvel formazan, produzindo uma cor púrpura. Nos últimos anos, o método do MTT tem sido adotado em muitos laboratórios de cultura de célula ao redor do mundo.

Muitos autores avaliaram entre os dois métodos qual seria o melhor para testes *in vivo* para *screening* de viabilidade. O método do SRB oferece maiores vantagens práticas sobre o método do MTT, ou outros métodos que utilizam o tetrazolium, como por exemplo: (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolio (MTS) ou sais solúveis de tetrazolio em água (WSTs). Notavelmente, os ensaios com tetrazolium envolvem um passo a mais no ensaio onde as células são incubadas com tetrazolium e o número de células viáveis são estimadas com base na produção de formazan produzido pela reação entre as células e o tetrazolium. Para laboratórios que utilizam o ensaio de MTT em grande escala, com acúmulo de muitas microplacas para leitura, se torna difícil. No ensaio de SRB, as células nos poços são quimicamente fixadas no final do ensaio, permitindo assim a fixação simultânea do corante e futuros processo em larga escala laboratorial.

Figura 38: Estrutura da Sulforodamina B



Fonte: <http://www.gbiosciences.com>

Adicionalmente, existem questões biológicas que podem afetar a escolha entre o ensaio de SRB e MTT. Os ensaios com Tetrazólio produzem uma reação entre células viáveis que reduzem tetrazólios a formazan, onde as células mortas ou seus produtos não reduzem o tetrazólio. Vários outros problemas são detectados como uma redução química do tetrazólio por outros agentes ou interferência química com algum tipo de redução celular.

O IC_{50} é a medida da efetividade de um composto em inibir 50% do crescimento celular em um determinado processo biológico. A inibição do crescimento celular, através da adição das lectinas às linhagens celulares neoplásicas, é um indicador de citotoxicidade que foi visualizada em células neoplásicas A2780, A549, MCF e PC3 (KIRTIKARA *et al*, 2006).

A atividade antiproliferativa foi determinada através de ensaios colorimétricos empregando SRB, para o qual o protocolo é descrito em detalhes na parte experimental. Inicialmente foram testadas concentrações entre 500 – 1 ($\mu\text{g/mL}$) de lectinas. Para esses ensaios, valores de IC_{50} de aproximadamente 500 ($\mu\text{g/mL}$) equivale a dizer que a lectina em estudo seria considerada inativa, enquanto valores entre 200-100 $\mu\text{g/mL}$, a lectina seria considerada moderadamente ativa, e abaixo de 50 $\mu\text{g/mL}$, a lectina seria definida como um composto ativo. Apesar de algumas referências bibliográficas expressarem números de IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$, e no procedimento experimental ter sido usado esta unidade, neste estudo foram reportados resultados em nanomolar pela praticidade de comparação com fármacos já utilizados no tratamento de câncer e auxiliar a avaliar sua efetividade molar. Além disso, uma vez que estamos lidando com proteínas puras, diferentemente de medidas feitas em extratos, podemos apresentar tais valores em molaridade. A Tabela abaixo mostra os resultados para os ensaios realizados.

Tabela 4: Atividade antiproliferativa das lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DsclerL contra células A2780, A549, MCF7 e PC3. Valores de IC₅₀ em nanomolar.

Lectina	IC₅₀ (nM)			
	A2780	A549	MCF7	PC3
ConBr	108	95	1146	529
ConM	67	62	1382	176
DLasiL	52	224	275	167
DsclerL	64	103	1250	264

Fonte: Elaborada pelo autor.

Primeiramente, as lectinas em estudo mostraram uma alta capacidade citotóxica contra as células cancerígenas em estudo, onde quanto menor a concentração necessária para matar 50% das células cancerígenas (IC₅₀), melhor será a sua capacidade em ser uma candidata a fármaco anti-cancerígeno. Dentre as lectinas estudadas, destacou-se a DLasiL para a linhagem de câncer de ovário A2780 com o menor índice de IC₅₀ de 52 nM, seguida da DsclerL com 64 nM, ConM com 67 nM e por final 108 nM para ConBr, indicando assim um alto reconhecimento das lectinas da subtribo Diocleinae pelos carboidratos contidos nas células neoplásicas de ovário A2780. Outra linhagem celular que merece destaque nesse estudo é a de câncer de pulmão A549, onde as lectinas também mostraram um IC₅₀ bastante baixo. A linhagem de câncer de próstata PC3 e a de câncer de mama MCF7 mostraram valores de IC₅₀ menos promissores, mas ainda assim interessantes como candidatos também ao estudo futuro de suas rotas mecânicas e potencialidades como futuros fármacos.

Tomando como base os resultados apresentados, a Tabela 5 pode ser apresentada.

Tabela 5: Nível de potencialidade das lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL em ensaios citotóxicos contra as células cancerígenas.

Lectina	A2780	A549	MCF7	PC3
ConBr	Moderadamente Ativo	Moderadamente Ativo	Inativo	Inativo
ConM	Ativo	Ativo	Moderadamente Ativo	Inativo
DLasiL	Ativo	Moderadamente Ativo	Moderadamente Ativo	Moderadamente Ativo
DSclerL	Ativo	Moderadamente Ativo	Inativo	Moderadamente Ativo

Fonte: Elaborada pelo autor.

Há uma interessante diferença entre o IC₅₀ das lectinas ConM, DSclerL e ConBr para células de câncer do ovário versus de cancer de mama, cuja capacidade de provocar morte celular chega a ser quase 20 vezes diferente, o que para DLasiL fora de pouco mais de 5 vezes. Esse interessante comportamento deve estar associado ao reconhecimento diferencial que tais lectinas promovem em glicoe estruturas destas células ou a indução de mecanismos de morte celular distintos. O padrão de ligação de lectinas a tumores celulares varia entre diferentes especificidades de ligação a açúcares (MEJÍA & PRISECARU 2005). Tal comportamento diferencial poderia também abrir caminho para o possível uso destas lectinas na diferenciação de tipos distintos de células cancerígenas.

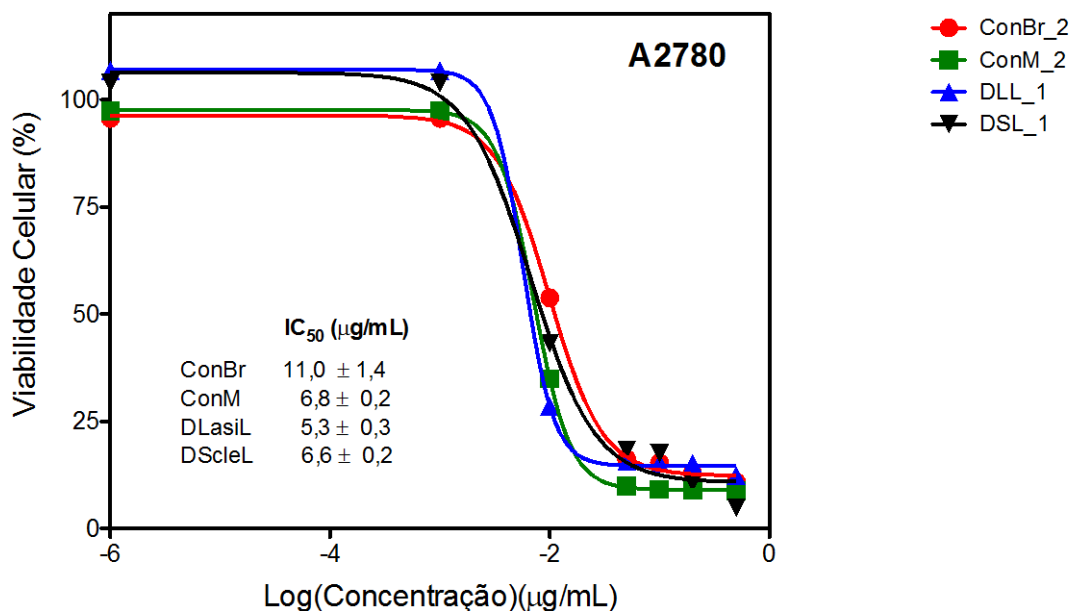
Konno *et al.*, (2002), demonstraram que linfonódulos e metástase peritoneal são correlacionados com ligação de lectinas de Gal/GalNAc como *Maclura pomifera*, *Arachis hypogaea* e *Vicia vilosa*, indicando que arquivos de expressão de carboidratos de células cancerígenas são relevantes para rotas de disseminação e para seus padrões de metástase. Outro exemplo é a lectina de *Helix pomatia* (HPA), que reconhece GalNAc e glicanos de *N*-acetilglucosamina e é um bom preditor de metástases e mau prognóstico em um número grande de adenocarcinomas, incluindo câncer de mama (BROOKS AND CARTER, 2001).

Devido ao bioreconhecimento de carboidratos específicos as lectinas podem ser usadas como carregadores para alvos específicos como *drug delivery*, dependendo do padrão de glicosilação das células e tipo de lectinas (WROBLEWSKI *et al.*,2001).

Curiosamente, a lectina em principal foco neste trabalho, DLasiL, apresentou

comportamento bastante distinto das outras e mostrou na grande maioria das células investigadas melhor comportamento anticancerígeno (Figura 39).

Figura 39: Gráfico de IC₅₀ das lectinas contra células neoplásicas



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Possíveis mecanismos de ação da DLasiL

Vários estudos mostram que os glicoconjugados da superfície das células são funcionalmente importantes para a interação entre o tumor com o seu ambiente. A identificação desses resíduos é possível usando lectinas como ferramenta de marcação em diferentes tipos de células cancerígenas. A glicosilação alterada na superfície de glicoproteínas é uma característica comum de transformações malignas. A alteração na superfície celular dos carboidratos é relacionada com o potencial de metástese de tumores experimentais. Uma vez circulando na corrente sanguínea, as células cancerígenas podem aderir em outras partes do corpo formando novas colônias de novos tumores. Lectinas podem inibir o processo de adesão, impedindo assim o processo de metástese.

Segundo Galuzzi e colaboradores (2007), a morte celular apresenta vários mecanismos bioquímicos e pode ser classificada baseada nas características morfológicas quanto: apoptose, autofagia, necrose.

Muitas lectinas de plantas com atividade antitumoral tem sido reportadas e apoptose é o mecanismo principal indutor de morte celular (DEEPA *et al.*, 2012). A lectina de ConA, a mais bem estudada lectina de planta, apresenta resultados bastante promissores quanto a sua atividade e aplicação em terapia de câncer (SILVA *et al.*, 2014; PRATT *et al.*, 2014; ROY *et al.*, 2014,). Devido a lectina desse presente estudo pertencer a mesma subtribo da ConA, foi tomado como modelo de estudo para a determinação do mecanismo de ação da DLasiL.

Tomando como base vários trabalhos descritos na literatura onde a ConA apresenta mecanismos de apoptose, se ligando a glicoproteínas das membranas celulares e é internalizada e preferencialmente se localiza na mitocôndria ativando uma série de vias de sinalização, o presente estudo propôs a investigação do mecanismo de ação da lectina de DLasiL contra células A2780, por meio de avaliação de apoptose (Li X *et al.*, 2014, Radojević *et al.*, 2014, (Shi *et al.*, 2014, Jiang N *et al.*, 2012, LIU *et al.*, 2001).

A morte celular programada é um mecanismo de eliminação de células nocivas e de manutenção da homeostase, existindo assim em duas formas: apoptose e autofagia (BURSH 2001, LOCKSHIN & ZAKERI 2004). A apoptose é um mecanismo geneticamente programado de morte celular que em contraste com a necrose, ocorre naturalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento, geralmente, não produz inflamação e lesão do tecido. Ela desempenha um papel importante na fisiologia normal, tal como a homeostase, regulação, e na fisiopatologia de muitas doenças (HATTORI *et al.*, 2010).

A morte celular por apoptose pode ser iniciada por uma variedade de estímulos que geralmente se alimentam de 1 a 3 vias de sinalização conhecida incluindo a via do receptor de morte extrínseca (via receptor de morte) e a via intrínseca (mitocondrial), e a via induzida pelo estresse do retículo endoplasmático (ER) que convergem em uma via comum, causando a ativação de enzimas caspases efetoras (LUAN *et al.*, 2014).

A morte celular por autofagia é um mecanismo conservado evolutivamente para degradação e renovação, com grande influência em limpeza, diferenciação celular, controle do crescimento, defesa celular, remodelação de tecido, e aclimação. Em autofagia, a dupla ou a membrana múltipla delimitada sequestra o autofagossomo do citoplasma em uma maneira não específica, e assim funde-se com o lisossomo. Após a falta de nutrientes ou fome, mecanismos de pró-sobrevivência transferem células danificadas para autodegradação (LI *et al.*, 2011).

A necrose ocorre com um aumento citoplasmático, ruptura da membrana, inchaço das organelas principalmente da mitocôndria e condensação da cromatina nuclear (TAATJES

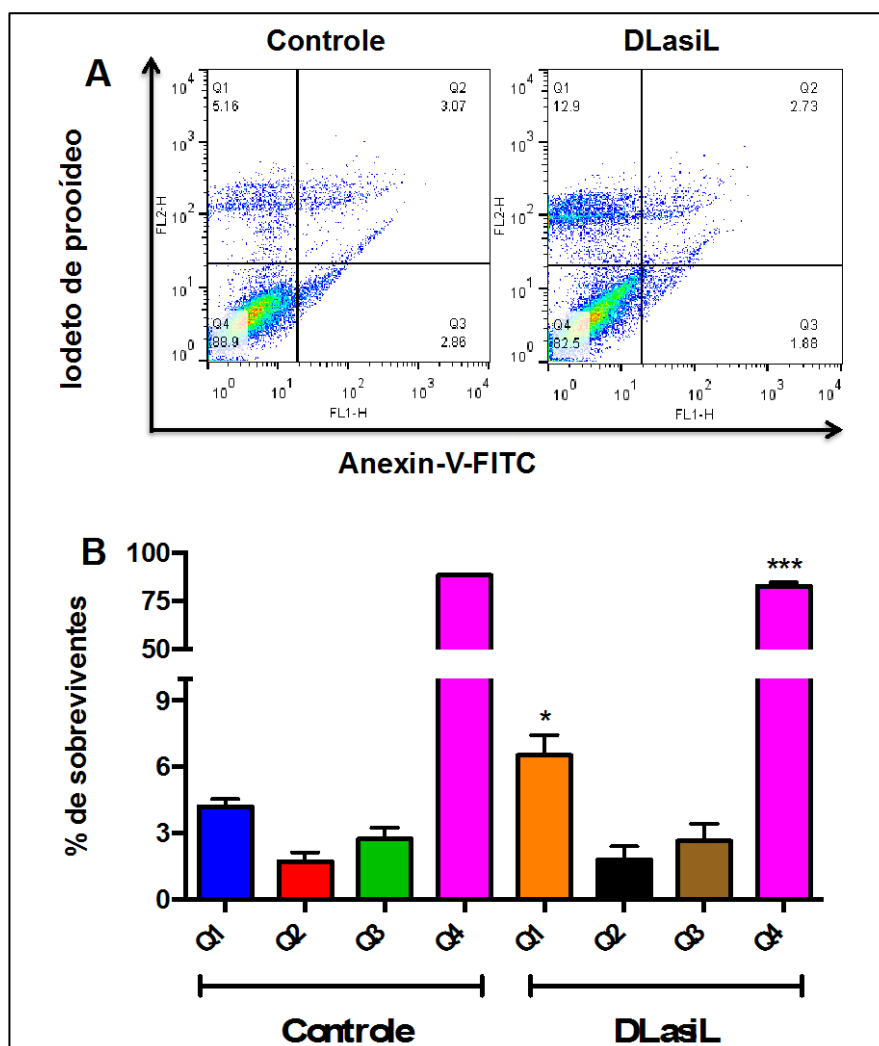
et al., 2008).

Inicialmente, através dos resultados obtidos nos ensaios de IC₅₀, a lectina *Dioclea lasiocarpa* (DLasiL) foi escolhida para investigação do seu mecanismo de ação, pois obteve o melhor índice de citotoxicidade na maior parte das linhagens e especificamente na linhagem celular neoplásica A2780, sendo escolhida como modelo biológico para os estudos subsequentes.

O mecanismo inicial de ação da DLasil foi investigado por meio de ensaios de apoptose como mostra Figura 40.

Figura 40 – Análise de citometria de fluxo da investigação do mecanismo de ação da DLasiL. A linhagem celular de A2780 foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de

propídio. A) Células neoplásicas de A2780 não tratadas (controle por 24 horas). B) Células A2780 tratadas com DLasiL por 24 horas. Quadrante Q1 representa as células não viáveis, Q2 tardias em apoptose, Q3 células iniciais em apoptose e Q4 células viáveis ou sadias.



Fonte: Elaborada pelo autor. A significância estatística foi avaliada usando one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,01$ indicam diferença estatística em comparação com os grupos controle. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

A marcação das células com Anexina V-FITC/PI permitiu a distinção de quatro grupos celulares como mostra a Figura 40 A, divididos em quatro quadrantes que podem ser classificados como: Q1 células inviáveis, localizadas no quadrante superior esquerdo, que não foram marcadas por anexina V-FITC mas foram por PI, Q2 células tardias em apoptose, localizadas no quadrante superior direito, marcadas por anexina V-FITC e PI, Q3 células iniciais em apoptose que se encontram no quadrante inferior direito, que foram marcadas por Anexina V-FITC e não por PI e Q4 células viáveis, que constituem o grupo de células

localizado no quadrante inferior esquerdo e que não foram marcadas por anexina ou iodeto de propídio.

Resultados mostram que para a população não viáveis Q1 no controle negativo se comparado a lectina DLasiL, há um aumento da população para a lectina mostrando que esta provoca a morte das células. A segunda barra Q2 mostra a população de células que estão em apoptose tardia, no qual não apresenta mudanças significativas de aumento entre controle e lectina; o mesmo acontece para terceira barra Q3, que mostra o estágio de apoptose inicial. A última barra mostra a população de células viáveis que apresenta um pequeno decréscimo quanto a população.

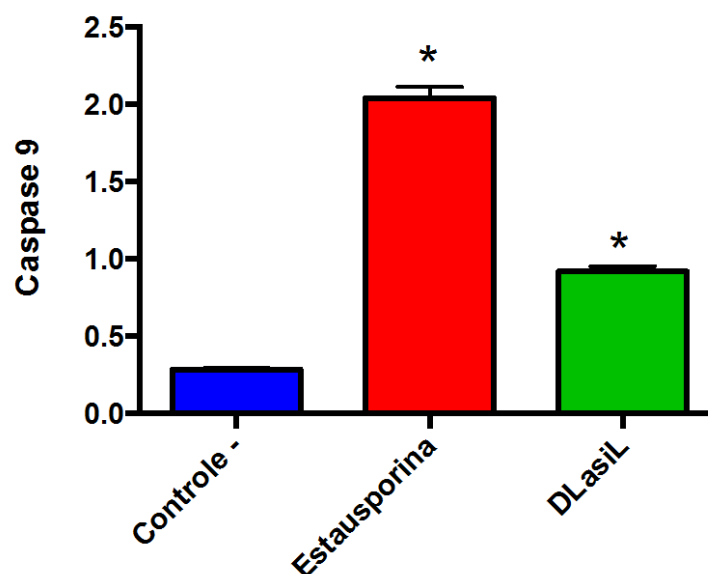
O ensaio de apoptose mostra que a lectina DLasiL está agindo de alguma maneira nas células neoplásicas causando a morte celular, mas o ensaio não mostra um aumento no valor para apoptose cedo e tardia, no qual pode-se inferir que o ensaio determine que a via seria por apoptose. Para provar que o mecanismo de ação da lectina realmente não se dá por apoptose, foi realizado ensaio de Caspase 9, que mostrará que se a via principal de ação seria ou não por apoptose.

4.3.4 Ensaios de Caspase 9

A família de proteases chamada caspases, compõe a via molecular apoptótica, que é um mecanismo predeterminado geneticamente movido por várias vias moleculares (KOLENKO *et al.*, 2000). Encontradas solúveis no citoplasma, as caspases podem ainda se localizar na matriz nuclear e no espaço intermembrana mitocondrial das células, levando a morte celular rápida e funcionam em cascata proteolítica, onde uma caspase ativa outra caspase que amplifica a via de sinalização (ELMORE *et al.*, 2007).

Para confirmar o mecanismo de ação da lectina DLasiL investigou-se o aumento dos níveis de expressão da enzima proteolítica caspase 9, que foi realizado detectando os níveis de caspase 9 Figura 43.

Figura 41 – Gráfico de níveis de expressão de Caspase 9 da linhagem celular A2780.



Fonte: Elaborada pelo autor. Efeito da DLasiL e estausporina na ativação da caspase 9 em células de A2780 (3×10^6). O ensaio da ativação da caspase 9 foi realizado por incubação do substrato Ac-LEHD-AFC com o lisado celular a 37°C por 1,5 hora. A significância estatística foi avaliada usando one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ indica a diferença estatística em comparação com os grupos controle. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

O aumento nos níveis de caspase 9 conforme a Figura 41, mostra que o processo de morte celular via apoptose precisa ser considerado para a DLasiL. Inicialmente foi discutido por ensaio de apoptose que as células A2780 estavam sendo mortas, mas que o mecanismo não seria por apoptose, devido aos níveis de caspases estarem muito similares ao controle. Entretanto, com os ensaios de caspase 9 precisamos considerar apoptose como um mecanismo de ação, (Figura 40), provavelmente como mecanismo secundário e não como mecanismo principal, uma vez que o mecanismo de ação das enzimas caspases se dá em várias etapas em uma rota que modula a subsequente apoptose e eventual ativação de uma outra a caspase 3 (LIU et al., 2009; LI *et al.*, 2010). A lectina de ConA também aumenta os níveis de Caspase 3 e 9 de uma maneira tempo dependente liberando o citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (ZHENG et al 2014).

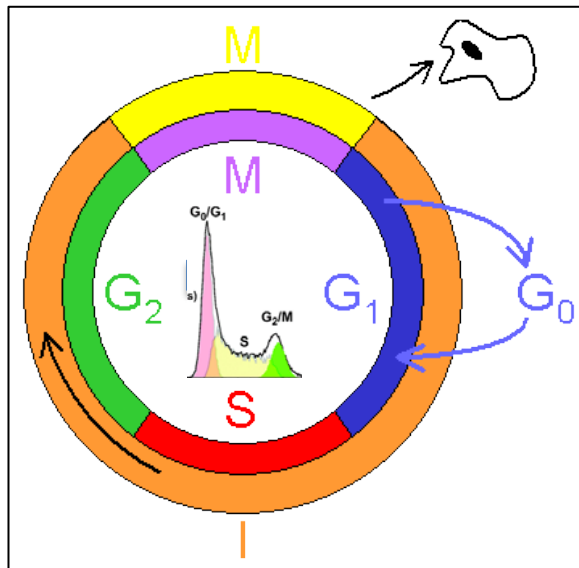
4.3.3 Avaliação do efeito sobre Ciclo Celular

O ensaio para determinação de ciclo celular é importante para descobrir o ponto de parada onde a lectina está agindo. O ciclo consiste em quatro fases: fase S no qual DNA sofre replicação e duplica os cromossomos, fase M no qual os cromossomos duplicados são

separados em dois núcleos chamado de mitose e duas células filhas chamado citocinese, e finalmente, G1 que se apresenta antes da fase S e G2 antes da fase M.

O teste baseia-se na capacidade que o iodeto de propídeo possui em intercalar quantitativamente o DNA e quanto mais DNA presente maior a intensidade de fluorescência (GIVAN 2001). Isso leva a dois picos majoritários no citômetro de fluxo que representa duas cópias de DNA indicando as fases G0/G1 e G2/M respectivamente, segundo figura 42. Ao ser usado um detergente a membrana plasmática das células permite a entrada do iodeto de propídeo que se liga ao núcleo. Células com conteúdo de DNA duplicado, ou seja que encontram-se em fase G2/M, emitirão fluorescência, dependendo da intensidade de fluorescência, assim maior será quantidade de DNA, núcleos com condensação de cromatina e DNA fragmentado (DNA subdiploide) incorporam menor quantidade de iodeto de propídeo consequentemente emitem menor sinal de fluorescência (PERES & CURI, 2005). Além disso menores quantidades de DNA captam menos fluoróforo, emitindo menor fluorescência.

Figura 42: Ciclo celular em células de mamíferos



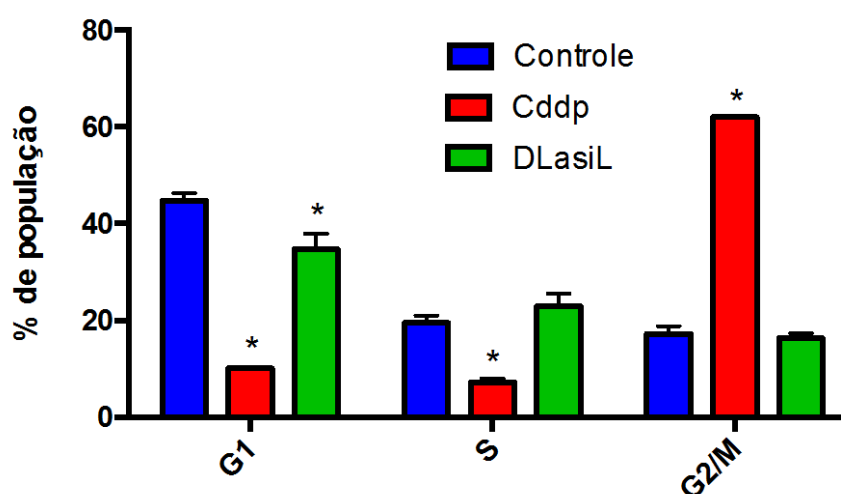
Fonte: <http://wikiciencias.casadasciencias.org>. Ciclos celulares: Fase S, M, G1 e G2/M.

Análises por citometria de fluxo mostram que células A2780 tratadas com DLasiL por 24 horas se comparadas ao controle, levou a um aumento mais pronunciado na população de células na fase S e menos pronunciado para a fase G₂/M, Figura 43. Paradas do ciclo celular são frequentemente observadas em células tratadas com lectinas por causa de danos

causados ao DNA. O processo de ciclo celular, particularmente é a transição de um passo a outro, é regulado pela atividade de diferentes ciclinas dependentes de cinases (CdKs) e suas subunidades reguladoras específicas, que são chamadas de ciclinas (SILVA *et al.*, 2014).

Paradas do ciclo celular na fase S em células de câncer pode ser vantajoso em fornecer uma toxicidade diferencial desde que células cancerígenas possuem um tempo de duplicação celular mais curto que células saudáveis. Várias drogas anticâncer são conhecidas por induzir a parada do ciclo na fase S em diferentes tipos de células de câncer humano incluindo a cisplatina (VAN RIJT *et al.*, 2014).

Figura 43: Análise do ciclo celular de células A2780 através de citometria de fluxo.



Fonte: Elaborada pelo autor. Porcentagem da população de células de A2780 (1×10^6) em cada fase do ciclo celular avaliado através de citometria de fluxo utilizando coloração com iodeto de propídeo (PI) após o tratamento das células com cisplatina e DLasiL por 24 horas. A significância estatística foi avaliada usando one-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. * $p < 0,05$ indica a diferença estatística em comparação com os grupos controle. Os valores são expressos pelas médias e desvio padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

4.3.5 Ensaio antiviral

Estudos mostram que agentes que possuem ligação a carboidratos tem comprovada eficácia em inibir entrada de vírus nas células. Esses agentes bloqueiam entrada do vírus inibindo a fusão dos viriões, também são capazes de prevenir formação de células gigantes

entre linfócitos T CD4⁺ HIV- infectado e não infectado (MAHALIGHAN *et al.*, 2011).

Lectinas de plantas constituem uma classe de inibidores dessa entrada que buscam resíduos de oligomanose gp120 no envelope viral. Exposições prolongadas de agentes como as lectinas a células infectadas com certos tipos de vírus, causam deglicosilações no envelope viral, criando viriões que são altamente suscetíveis a neutralização (KOUOKAN *et al.*, 2011), MORI *et al.*, 2005).

Um exemplo de agente antiviral, a lectina da alga marinha vermelha griffthsin (GRFT) possui uma atividade em concentrações que vai de nanomolar a picomolar (HOORELBEKE *et al.*, 2013). Sítios de ligação a manose intactos da GRFT são críticos para a preservação da atividade completa. Recentemente, foi demonstrada que a ligação a glicoproteína gp120 presente na superfície viral são mais pronunciadas nas partes virais nativas (ALEXANDRE *et al.*, 2011).

Com a finalidade de testar as lectinas das espécies de *Canavalia brasiliensis*, *C. maritima*, *Dioclea lasiocarpa* e *D. Esclerocarpa*, com respeito a suas atividades biológicas antivirais, foram realizados ensaios em forma de *screening*. Os ensaios foram feitos em colaboração no Instituto Rega para Pesquisa Médica, Katholieke Universiteit Leuven, Bélgica.

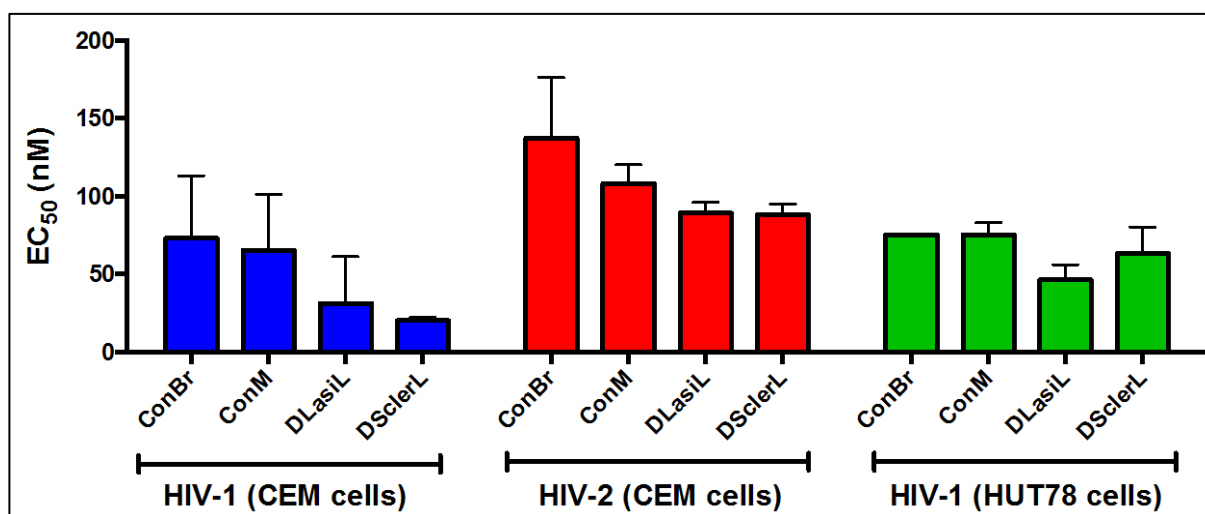
As lectinas foram usadas para teste em três tipos de linhagem de vírus diferentes, HIV-1(CEM células), HIV-2 (CEM células) e HIV-1 com células HUT78. Os vírus HIV-1 e HIV-2 infectam as células CEM (infectadas e não infectadas), que são células derivadas de células T(defesa) de humanos , linha celular de linfoblastos. O vírus HIV-1 ainda foi utilizado para infectar células HUT78, que são um tipo de célula CD4⁺T, que é derivada de uma célula

T de defesa (WEN *et al.*, 2005).

Os resultados da Figura 43 mostram que as lectinas estudadas testadas quanto a capacidade antiviral em vírus HIV-1 (células CEM), inibiram a proliferação do vírus em valores de EC_{50} na faixa de 100 nM, apresentando valores ainda menores para a DLasiL e DSclerL. Com vírus da linhagem HIV-2, as lectinas mostraram valores de EC_{50} maiores que para linhagem do HIV-1, ainda assim novamente ilustrando uma inibição maior para a DLasiL e DSclerL.

O vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é um vírus altamente divergente possuindo dois tipos diferentes HIV-1 e HIV-2. HIV-1 inclui quatro grupos, alguns subgrupos, e ainda subtipos e um grande número de formas recombinantes. Neste contexto, a grande diversidade de tipos de vírus pode influenciar nos ensaios de *screenings*, indicando assim uma afinidade de grupos de lectinas por glicoconjugados específicos no capsídeo de cada tipo de vírus (PINA-ARAÚJO *et al.*, 2014).

Figura 44: Ensaios antivirais nas lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL contra o vírus HIV-1 e HIV-2 testados em células CEM e HIV-1 testado em células HUT78.

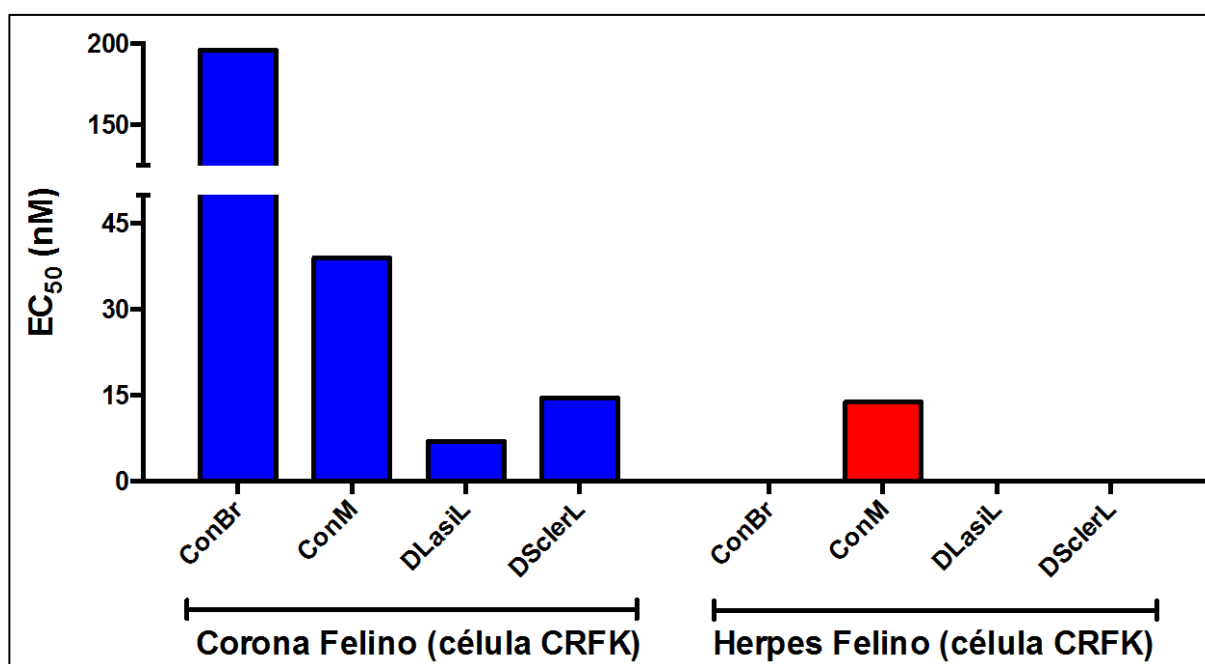


Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o vírus HIV-1 cultivado com células HUT178, outro tipo de células de defesa, os resultados mostram que as lectinas provocaram um efeito intermediário entre HIV-1(células CEM) e HIV-2(células CEM) , com um efeito mais pronunciado para DLasiL e DSclerL. O que se vê a partir dos resultados, é que houve um padrão de inibição de crescimento do vírus sempre maior nas lectinas de *Dioclea*, sugerindo que as duas espécies possuem mais afinidade de ligação as glicoproteínas do envelope viral ex (Gp120).

O vírus da peritonite infecciosa é um dos mais importantes em doenças infecciosas fatal em gatos, onde a patogênese associada a doença ainda não foi elucidada (KIPAR & MELI 2014).

Figura 44: Ensaio antiviral com as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, em células CRFK, para o vírus Corona Felino(FIPV) e Herpes Felino.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A concentração efetiva que inibe 50% da proliferação celular foi determinada pela medida da viabilidade celular através do método colorimétrico MTS, discutido na seção experimental. As células utilizadas nesta parte do ensaio foram as células de fígado felino de *Crandell-Rees*.

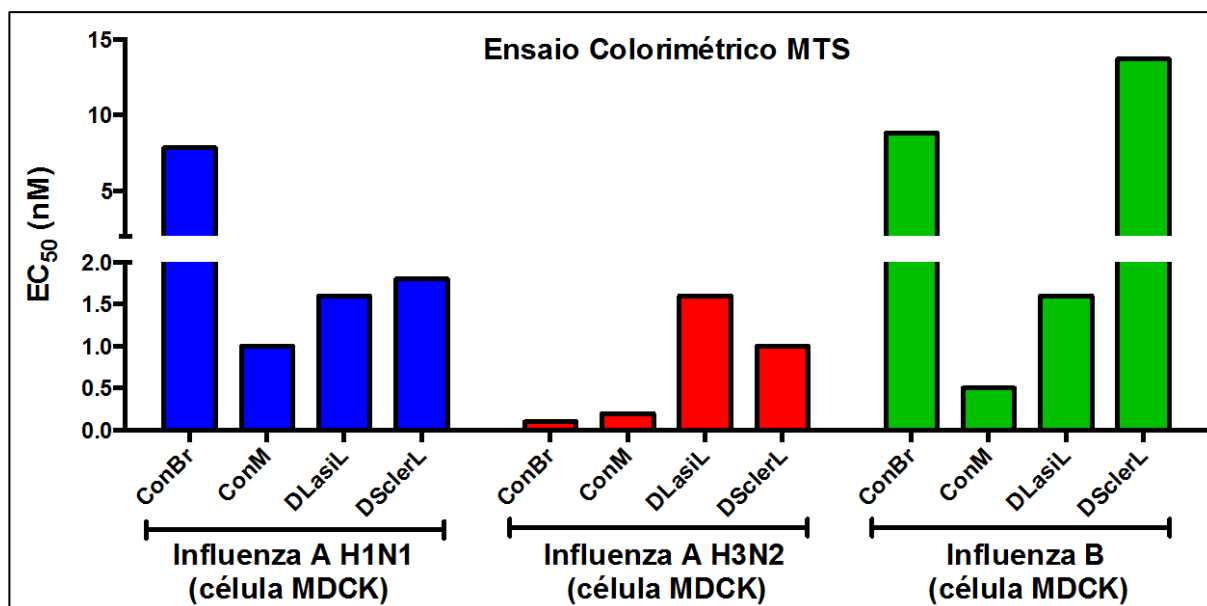
Os resultados dos ensaios mostram que a ConBr possui valores ao redor de 200 nM, valor mais alto entre as lectinas, seguido da ConM na faixa de 35 nM. Mais uma vez, para o conjunto de vírus Corona Felino a DLasiL e DSclerL apresentaram valores menores dentre as quatro lectinas. Para o vírus da Herpes Felina, a ConM obteve resultados satisfatórios em valores de 15 nM, as outras amostras não apresentaram atividade antiviral significativa.

Nesse ensaio foram utilizadas células de fígado canino Madin Darby (MDCK), para o vírus da Influenza subtipo A H1N1, Influenza AH3N2 e Influenza B.

Influenza é uma doença respiratória conhecida desde muito tempo, ocorrendo em

particular durante o inverno e possuindo relevante efeito na saúde pública mundial (GARCIA & RAMOS 2006). Influenza em humanos é causada por dois subtipos do vírus influenza o vírus A e o B.

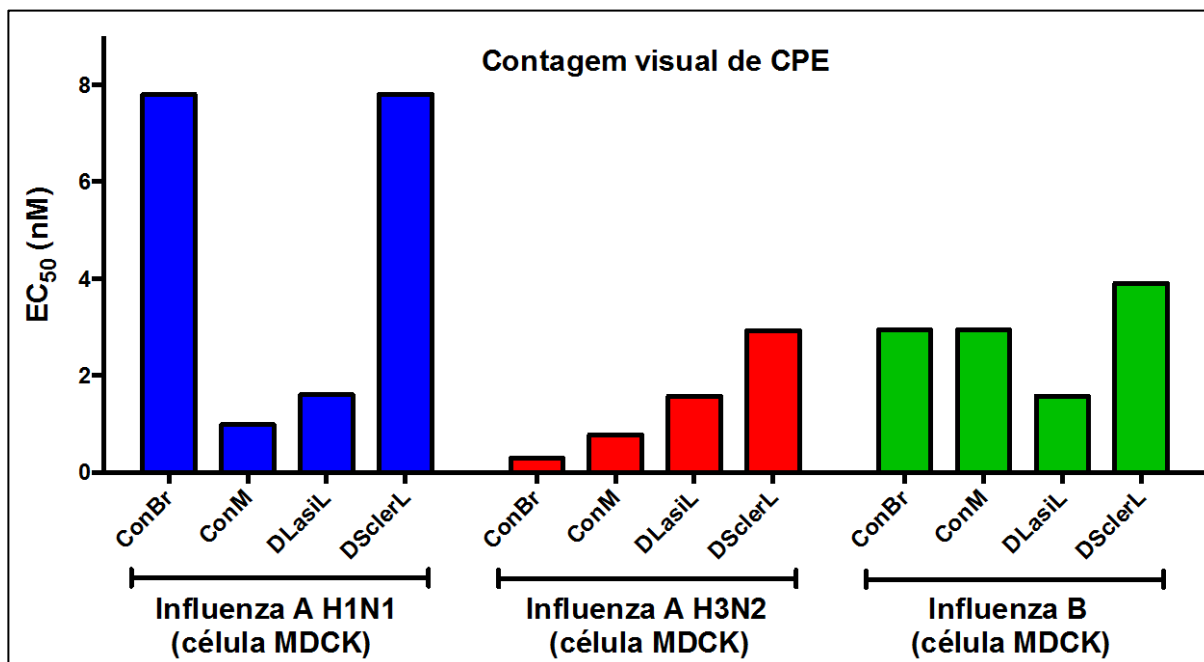
Figura 45: Ensaio antiviral com as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, em células MDCK, para o vírus da Influenza A H1N1, Influenza a H3N2 e influenza B. Teste realizado por ensaio colorimétrico MTS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o vírus da Influenza, os ensaios mostram valores de EC_{50} sem nenhum padrão aparente. Os valores são bastante promissores em termos de especificidade com relação aos vírus da Influenza, pois os valores de EC_{50} não ultrapassam 15 nM para a lectina menos ativa. ConBr possuiu o valor bem baixo 0,2 nM de EC_{50} , para Influenza A H3N2, o menor para esse conjunto de vírus, seguido da ConM com aproximadamente o dobro da ConBr. Outra lectina que se destacou pelo seu valor baixo de EC_{50} foi a ConM que se sobressaiu entre as lectinas para o vírus Influenza B. Resultados de ensaio colorimétrico para formazan pela medição da viabilidade celular também foi realizado.

Figura 46: Ensaio antiviral com as lectinas ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL, em células MDCK, para o vírus da Influenza A H1N1, Influenza a H3N2 e influenza B. Teste realizado por pelo método de contagem visual.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Outro ensaio para o vírus Influenza foi feito por um método diferente, o método de CPE (Método de contagem visual), pois algumas células não podem ser acessadas pelo método do MTS. Além disso, esse método foi usado para evitar erros técnicos ao comparar os dois métodos. Discutido na parte experimental, o ensaio de MTS necessita de um produto oriundo de uma reação para a obtenção de uma coloração que é detectada pelo ensaio colorimétrico. Um exemplo são as células *McCoy* infectadas que não podem ser assessadas pelo método do MTS.

Contagem visual de inibição por CPE é um método desenvolvido para vírus que causa mudanças citopáticas em cultura de células. O método é usado porque é rápido e permite um número maior de compostos serem avaliados usando microplacas. Entretanto, inibição de CPE pode tomar tempo quando um grande número de amostras precisam ser analisadas (CHAVEZ *et al.*, 2013).

O método da contagem de CPE mostrou uma sensibilidade maior que o método do MTS, podendo ser observado pelo valor dos eixos Y das figuras 45 e 46. O método de contagem visual foi mais eficaz em torno de 2 vezes, corroborando com a literatura consultada que relata que o método de contagem visual é mais sensível que o do MTS.

As lectinas estudadas mostraram maior afinidade pelo subtipo H3N2 do vírus Influenza, mostrando valores de EC₅₀ menores para o grupo da Influenza A, destacando-se assim ConBr > ConM > DLasiL > DSclerL, respectivamente. Para os outros subtipos não foi

observado nenhum padrão entre as amostras, mas apesar disso os valores de EC₅₀ se mostraram bastante promissores. Outra observação a ser feita foi a DLasiL que se apresentou com os mesmos valores de EC₅₀ para os três subtipos.

Outro conjunto de vírus estudado foram os vírus de estomatite vesicular (que afeta bovinos, suínos e equinos), vírus coxsackie (ecovirose, poliomielite, e vírus da hepatite A) e o vírus sincicial respiratório que causa infecções respiratórias. Os vírus foram usados em culturas de células Hela (cancer cervical). Os resultados indicam que ConM, DLasiL e DSclerL apresentaram baixa citotoxicidade 196 nM e a ConBr apresentou citotoxicidade de 3523 nM. A DLasiL e DSclerL dentre as lectinas foram as que obtiveram um melhor índice de EC₅₀ para o vírus sincicial respiratório no valor de 29 nM.

Tabela 6 - Atividade antiviral para as lectinas contra os Vírus da Estomatite Vesicular, Vírus Coxsackie e Vírus Sincicial Respiratório.

Lectina	Concentração Citotóxica Mínima (nM)	EC50 (nM)		
		Estomatite Vesicular	Vírus Coxsackie	Vírus Sincicial Respiratório
ConBr	979	196	196	196
ConM	196	-	-	29
DLasiL	197	-	-	29
DSclerL	195	-	-	8

Fonte : Elaborada pelo autor

Os vírus restantes vírus Parainfluenza-3, Reovírus-1, Vírus Sindibis, Vírus B4 Coxsackie, Vírus Punta Toro, testados em culturas de células Vero (células de fígado de macaco verde) não mostraram resultados positivos satisfatórios e apresentaram uma concentração citotóxica mínima bastante elevada, mostrando que as lectinas não foram eficientes para esse grupo de vírus.

Último grupo testado foi para os Vírus-1 (KOS) Simplex Herpes, Vírus-2 (G) Simplex Herpes, Vírus da vacínia, Vírus Estomatite Vesicular, Vírus-1 TK⁻ KOS ACV^T Simplex Herpes usados em cultura de células HEL (leucemia). Para todas as quatro lectinas testadas,

os resultados foram os mesmos de EC_{50} , não mostrando nenhuma especificidade especial por nenhum tipo de vírus, entretanto a concentração citotóxica mínima foi de 196 nM, apresentando baixa citotoxicidade.

Os resultados de *screening* antiviral em geral mostraram que as lectinas possuíam seletividade por alguns tipos de vírus, apresentando valores bem pequenos de EC_{50} e outros com valores mais altos. A citotoxicidade possuiu o mesmo padrão, o que significa dizer que dependendo do tipo de capsídeo viral dependerá assim a afinidade das lectinas por esses glicoreceptores no envelope viral, indicando interessante e promissora seletividade.

Os estudos de *screening* de diversos tipos de vírus, mostra resultados bem promissores indicativos da atividade das lectinas testadas, se tornando assim necessários estudos mais aprofundados com relação ao seu mecanismo de ação e também o aprofundamento de prospectar mais lectinas quanto ao seu uso em medicina.

4.3.6 Terapia de combinação entre drogas FY 26 + DLasiL

Apesar de estar em uso clínico por mais de 30 anos, cisplatina ainda é considerada uma das drogas mais usadas em quimioterapia no tratamento de diversos tipos de câncer. Entretanto, a toxicidade da cisplatina gera muitos efeitos colaterais e derivados alternativos vem surgindo (PEREZ *et al.*, 2001).

Combinação de drogas é um tipo de tratamento que vem ganhando espaço nas pesquisas contra as mais mortais doenças, como o câncer e AIDS. Segundo CHOU (2010), o efeito terapêutico, a redução da toxicidade, a minimização ou atraso à resistência de drogas, torna o método de combinação de drogas, uma alternativa aos tratamentos, ou seja, uma opção ao estudo contra o câncer. Além disso, para melhorar o reconhecimento seletivo de um fármaco, seria incorporar uma molécula que reconhecesse especificamente o tecido tumoral (CHOU, 2010).

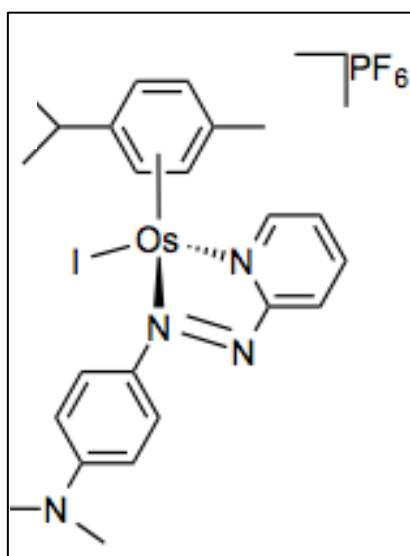
Chou e Talalay em 1984 propuseram um método para análise de duas drogas que poderiam interagir por 3 maneiras diferentes: aditivamente, sinergisticamente ou antagonicamente. Sinergismo se refere ao fenômeno pelo qual dois compostos diferentes são combinados com o objetivo de aumentar suas atividades individuais. Assim, se o resultado da combinação obtiver pior efeito de atividade se comparado à ação individual de cada substância, então é denominado de antagonismo; efeitos menores que sinergismo, mas não

considerados antagonismos são chamados efeitos aditivos ou indiferentes (CHOU *et al.*, 2005).

Com o intuito inicial de testar o efeito terapêutico entre drogas, foram feitos experimentos de dose e toxicidade em combinação com o composto organometálico de ósmio (FY 26) e a lectina DLasiL.

O composto organometálico de ósmio ($[\text{Os}(\eta^6\text{-bip})(\text{azpy-NMe}_2)\text{I}](\text{PF}_6)$) (FY 26) representado na figura 47, é um composto que apresenta uma baixa citotoxicidade, a concentrações na faixa de nanomolar, para a linhagem cancerígena A2780. FY 26 apresenta $\text{IC}_{50}=140$ nM contra células de câncer ovariano. O composto apresenta baixa toxicidade e efeitos deletérios negligenciáveis em um modelo de cancer de cólon, dando origem à possibilidade de uma ampla janela terapêutica. A sua atividade citotóxica parece envolver mecanismos redox (SADLER *et al.*, 2010).

Figura 47: Estrutura do complexo de ósmio FY26.



Fonte: Romero-Canelón *et al.*, 2013, Fu *et al.*, 2012.

Com o objetivo de testar o efeito terapêutico entre fármacos, e se o uso combinado desses potenciais fármacos aumentaria a eficácia de morte celular, foram feitos experimentos de dose e toxicidade em combinação com o composto organometálico de ósmio (FY 26) e a lectina DLasiL contra células neoplásicas da linhagem A2780, seguindo o mesma linha de raciocínio apresentado por BUCCHAROV *et al.*, (2012). Inicialmente as amostras foram combinadas em uma matriz, em concentrações variadas, iniciando de 0 a 2x o valor de IC_{50}

para as drogas testadas, seguidas de teste de viabilidade celular por colorimetria SRB. Resultados das microplacas mostram que a DLasiL em conjunto com o complexo de Ósmio possui valores que matam mais de 50% da população se comparado ao controle, onde o erro experimental é insignificante e aceitável. A população sobrevivente varia muito pouco de experimento 1 de 36,85 para experimento 2 de 34,15; apontando um ótima reprodutibilidade dos resultados. Esses resultados iniciais se mostram ainda preliminares, mas abrem uma janela de opção para a utilização de lectinas de leguminosas em conjunto com potenciais fármacos sintéticos para diminuir a ação tóxica que possuem esses compostos fazendo com que diminuam os efeitos colaterais do uso de drogas químicas. Estudos mais detalhados necessitam ser feitos para a identificação do efeito entre as duas drogas, cálculos matemáticos assim provariam se o efeito causado da união entre o FY26 e a DLasiL proporcionaria efeito antagônico ou sinérgico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi isolada e caracterizada a lectina DLasiL de sementes de *Dioclea lasiocarpa* da subtribo Diocleinae, cuja pureza foi evidenciada através de perfil eletroforético. Estudos por sequenciamento de cDNA indicaram a composição desta lectina e sua massa molar consistente com 237 aminoácidos. Além desta lectina, outras três ConBr, ConM e DsclerL foram preparadas e usadas nesta tese, principalmente para fins de investigação de atividades biológicas.

Medidas de ressonância paramagnética de elétron comprovaram a presença do íon manganês (II) em todas as amostras, além de sugerir menor conteúdo deste íon na DLasiL em comparação as outras lectinas estudadas. Estudos por ICP-MS confirmaram essas observações, além de apresentar quantificação e detecção de íon cálcio nas amostras. Apesar do conteúdo de íons divalentes estarem inferiores ao esperado isso não afetou as medidas biológicas devido a presença de tais íons nos meios de cultura. Estudos por fluorescência indicaram a natureza e acessibilidade dos triptofanos na DLasiL, sugerindo um ambiente majoritariamente neutro. Além disso, foi possível investigar a interação da lectina e o açúcar usando bis-ANS como sonda fluorescente, medindo-se valores para constantes de dissociação, estratégia que poderá ser usada futuramente para medições de outros ligantes de interesse. A técnica de dicroísmo circular foi também empregada nesta tese para avaliar a estabilidade térmica desta lectina, cujo valor de 72 graus para desnaturação de 50% da proteína ilustra a expressiva termoestabilidade desta proteína. Estes estudos produziram

resultados importantes para a compreensão dos mecanismos que governam seus processos biológicos, e sustentam o uso dessas macromoléculas para fins biotecnológicos.

Com respeito aos efeitos biológicos, este trabalho apresentou características bastante notáveis para ConBr, ConM, DLasiL e DsclerL em relação ao uso em terapia de câncer e contra alguns tipos de vírus, o que merece estudos posteriores ainda mais aprofundados e mecanísticos. Mais especificamente, nessa tese os ensaios de viabilidade celular mostraram o potencial anticancerígeno das lectinas contra as células neoplásicas A2780, A549, MCF7 e PC3, cujas atividades se encontram na faixa nanomolar, indicando a abertura de uma janela de estudos para avaliação dessas moléculas como possíveis fármacos, sendo ainda a lectina DLasiL a mais promissoras entre as quatro lectinas investigadas.

Adicionalmente, os estudos antivirais demonstram também afinidade e especificidade possivelmente pelas glicoproteínas existentes no capsídeo dos vírus em estudo, destacando essas lectinas como um potencial biológico contra vírus de espectro bastante amplo.

Por fim, estas lectinas demonstram ser um material de fácil obtenção e purificação, além de estáveis, mostrando que é válida a sua prospecção na área médica, de acordo com resultados apresentados nessa tese, e corroborando com dados de literatura para homólogos como a ConA. Desta forma se torna necessário a inclusão desses modelos em estudos mais avançados até mesmo em estudos pré-clínicos para câncer e vírus.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO-FILHO, J.H. *et al.* A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. **J Agric Food Chem.** v. 58, p. 4090-4096, 2010.

ARENAS, M.I.: *et al.* A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma, 1999.

ASSREUY, A. M. *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 380, p. 509-21, 2009.

AUGUSTIN, M. *et al.* Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. **Arzneimittelforschung.** v. 55, p. 38-49, 2005.

BABA, M. *et al.* Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. **Journal of Virological Methods.** v. 20, p. 309–321, 1988.

BALZARINI *et al.* *Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose- specific plant lectins are markedly inhibitoru to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro.* **Antimicrob Agents Chemother.** v. 3, p. 410-6. **1991.**

BALZARINI *et al.* Synthesis and antiviral activity of some new S-adenosyl-L-homocysteine derivates. **J Med Chem.** v. 24, p. 4576-83. 1992.

BALZARINI J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. **Antiviral Res.** . v. 2-3, p. 237-47, 2006.

BANERJEE, R.; 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. **J Mol Biol.** v. 259, p. 281–296, 1996.

BANNER, L. R. *et al.* Direct targeting of cancer cells: A multiparameter approach. **Acta Histochemica.** v. 107, p. 335-344, 2005.

BARBOSA *et al.* Revising proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci.** v. 2, p.123-35. 2001.

BARRAL-NETO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol Invest.** v. 21, p. 297-303, 1992.

BARROSO-NETO, I. L. et al. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 543, p. 31–39, 2014.

BEZERRA, E. H. et al. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: new insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins **Journal of Structural Biology**. v. 160, p. 168–176, 2007.

BEZERRA, E. H. et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 408, p. 566-570, 2011.

BEZERRA, G. A. et al. Structural Studies of an Anti-Inflammatory Lectin from *Canavalia boliviana* Seeds in Complex with Dimannosides, **PLoS One**. v. 5, e97015. 2014

BOTOS & WLODAWER. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. **Prog Biophys Mol Biol**. v. 2, p. 233-82. 2005.

BOUCKAERT ET, J. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **J. Biol. Chem**. v. 275, p. 19778-19787, 2000.

BOULYGA S. F, BECKER J. S. ICP-MS with hexapole collision cell for isotope ratio measurements of Ca, Fe e Se. **Fresenius J. Anal. Chem**. v. 370, p. 618-623. (2001)

BREWER, C. F. et al. Demonstration of a Conserved Histidine and Two Water Ligands at the Mn²⁺ Site in Diocleinae Lectins by Pulsed EPR Spectroscopy. **Biochemistry**. v. 39, p. 2340-2346, 2000.

BURSCH, W. et al. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. **Cell Death and Differentiation**. v. 8, p. 569-581, 2001.

BRUSTOLON & GIANMELO, **Electron Paramagnetic Ressonance**, 3-553. 2009.

BUSHVAROV, I. C. et al. Characterization of metalloanticancer capacity of an agglutinin from wheat. **Molecular Biosystems**. v. 8, p. 2633-2636, 2012.

BUTS, L. et al. Weak protein-protein interactions in lectins: the crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. **J. Mol. Biol**. v. 309, p. 193-201, 2001.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**. v. 40, p. 1515–1539, 2002.

CARRINGTON A. POLYPEPTIDE LIGATION OCCURS DURING POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS OF CONCAVALIN. **Nature**, v.313, p. 64-67, 1985.

CAVADA, B. S. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination, **Biol Plantarum**. v. 26, p. 113-120, 1984.

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

CHARAN *et al.* Isolation and characterization of Myrianthus holstii lectin, a potente HIV-1 inhibitory protein from the plant Myrianthus holstii(1). **J Nat Prod**, v. 8, p. 1170-4, 2000.

CHARUNGCHITRAK, S *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of Archidendron jiringa Nielsen. **Food Chemistry**. v. 126, p. 1025–1032, 2011.

CHATTERJEE A., MANDAL K. D. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1648, p.174–183, 2003.

CHAVÉZ J. H. *et al.* No association between viral cytopathic effect in mccooy cells and mtt colorimetric assay for the in vitro anti-rabies evaluation. **Virus Reviews and Research**. 2013.

CHEN *et al.*, Crystal structure of the RNA demethylase ALKBH5 from zebrafish. **FEBS Lett**. V. 6, p 892-8, 2014.

CHEUNG, R. C. *et al.* Antifungal and antiviral products of marine organisms. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 98, p. 3475-94, 2014.

CHOU, T. C, Potent reversal of multidrug resistance by ningalins and its use in drug combinations against human colon carcinoma xenograft in nude mice. **Cancer Chemother Pharmacol**; v.56, p. 379–90, 2005.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. **Cancer Research**. v. 70, p. 440-446, 2010.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**. v. 58, p. 621-681, 2007.

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Adv. Enzyme Regul.** v. 22, p. 27-55, 1984.

CINGI, M. R. *et al.* Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: A multicentre approach. **Toxicology In Vitro**, v. 5, p. 119-125, 1991.

CORREIA, J. L. A. *et al.* Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke, **Molecules**. v. 16, p. 9077-9089, 2011.

CRUZ, M. S. D. *et al.* Factors affecting germination of *Canavalia brasiliensis*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria ternatea* and *Calopogonium mucunoides* seeds. **Seed Science and Technology**, v. 23, p. 447-454, 1995.

D'ARCY, W.C. *Canavalia*. Flora of Panamá. (Leguminosae). In: WOODSON, R.; SCHERY, R.W. Eds **Ann Miss Bot Gar**, v. 67, p. 562-571, 1980.

DAM, T. K. *et al.* Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J Biol Chem**. v. 273, p. 12082- 12088, 1998.

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

Davis, Ed., *Basic cell culture : a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2002.

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

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**. v.19, p.11-15, 1987

EISENBEIS, S.; Höcker, B. Evolutionary mechanism as a template for protein engineering. **J Pept Sci.** v. 16, p. 538-544, 2010.

EL-AASSAR, M.R. *et al.* Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. **International Journal of Biological Macromolecules.** v. 69, p. 88–94, 2014.

EWING B. *et al.* Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Research.** v. 8, p. 175-185, 1998.

FÉRIR, J. *et al.* Combinations of Griffithsin with Other Carbohydrate-Binding Agents Demonstrate Superior Activity Against HIV Type 1, HIV Type 2, and Selected Carbohydrate-Binding Agent-Resistant HIV Type 1 Strains. **Aids Research And Human Retroviruses.** v. 28, p. 1513-1523, 2012.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; BESERRA, I. G. *et al.* Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** v. 380, p. 407–414, 2009.

FORMAN, D. *et al.* Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians.** v. 61, p. 69-90 2011.

GADELHA *et al.* Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J. Struct. Biol.** v. 152, p. 185–194, 2005.

GALEAS *et al.* Seasonal fluctuations of selenium in sulfur accumulation in selenium hiperaccumulators and related non-accumulators. **New phytologist.** v. 173, p 517-525. 2007.

GALLEGO DEL SOL F *et al.* The first Crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain. **J Mol Biol.** v. 3, p.574-83. 2005.

GARCIA-GARCIA J RAMOS C. **Influenza, an existing public health problem.** *Salud Publica Mex,* v. 48, p.244-267, 2006.

GEETHANANDAN *et al.* **X-ray structure of a galactose-specific lectin from *Spatholobous parviflorous*.** *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 49, p 992-998. 2011.

GILMAN, Environmental Horticulture Department, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL 32611. <http://edis.ifas.ufl.edu>. 2011.

GOLDFARB, D. *et al.* Dynamics in the Mn^{2+} Binding Site in Single Crystals of Concanavalin A Revealed by High-Field EPR Spectroscopy. **Biochemistry**. v. 42, p. 7863-7870, 2003.

GOMES, J. C. *et al.* Histamine release induced by glicose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**. v. 41, p. 132-5, 1994.

GRANGEIRO, T. B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur. J. Biochem**. v. 248, p. 43-48, 1997.

GRANGEIRO J. M. Purification and characterization of a low-molecular weight bovine kidney acid phosphatase. **An Acad Bras Cienc.**; v.4, p.451-60. 1997.

GROSSARTH-MATICEK, R. Prospective controlled cohort studies on long-term therapy of breast cancer patients with a mistletoe preparation (Iscador). **Forsch Komplementmed**. v. 13, p. 285-292, 2006.

HABOUR, O. F. *et al.* Tempol protects human lymphocytes from genotoxicity induced by cisplatin. **Int J Clin Exp Med**. v. 7, p. 982-8, 2014.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.

HANCOCK, R. E.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, p. 243-254, 2012.

HAROLD A; TAYLOR JR. Manganese minerals. In: Industrial Minerals and Rocks, 6th Edition, D. D. Carr (Senior Editor), Society of Mining, Metallurgy, and Exploration, Inc. Littleton, Colorado, 1196p., p.655-660. 1994.

- HAWE. A; SUTTER. M; JISKOOT W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. **Pharmaceutical Research**, v. 25, No. 7, 2008.
- HIRST, J. D. *et al.* Circular and linear dichroism of proteins. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 9, p. 2020-2035, 2007.
- HOLANDA, F. R. *et al.* Antinociceptive Activity of Lectins from Diocleinae Seeds on Acetic Acid-Induced Writhing Test in Mice. **Protein & Peptide Letters**. v. 16, p. 1088-1092, 2009.
- HOUGHTON, P. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**. v. 42, p. 377-387, 2007.
- IHM STOKKUM V.*et al.* Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. **Analytical Biochemistry**, v.191, p.110–118, 1990.
- IWAKURA, M.; NAKAMURA, T.; YAMANE, C.; MAKI, K. Systematic circular permutation of an entire protein reveals essential folding elements. **Nat Struct Biol**. v. 7, p. 580-585, 2000.
- JAQUES, A. V. *et al.* 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.
- JI *et al.* Apoptosis induced in HIV-exposed, resting CD4⁺T cell subsequent to signaling through homing receptors is Fas/Fas ligand mediated. **J Leukoc Biol**. v. 1, p. 297-305. 2007.
- JIMENEZ, P. *et al.* Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). **Plant Foods Hum Nutr**. v. 69, p. 168-74, 2014.
- KABAMBA B. A. *et al.* Binding of the Mannose-Specific Lectin, Griffithsin, to HIV-1 gp120 Exposes the CD4-Binding Site. **Journal of Virology**, v.85, p. 9039-9050, 2011.
- KANG, Y. K. *et al.* A phase IIa dose-finding and safety study of first-line pertuzumab in combination with trastuzumab, capecitabine and cisplatin in patients with HER2-positive advanced gastric cancer. **British Journal of Cancer**. 2014 Jun 24. doi: 10.1038/bjc.2014.356. [Epub ahead of print]

KARLSSON, K. Meaning and therapeutic potential of microbial recognition of host glycoconjugates. **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 1-11, 1998.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**. v. 1, p. 349-384, 2000.

KEYAERTS et al. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. **Antiviral Res.** v. 3, p.179-87. **2007**

KIARIS M, *Understanding Carcinogenesis*, Wiley, Weinheim, First Edit.2006.

KIPAR A., MELI ML. Feline Infectious Peritonitis: Still an Enigma. **Veterinary Pathology**, v. 51, p.505-526, 2014.

KIRTIKARA, K. *et al.* Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening **Nature Protocols**. v. 1, p. 1112-1116, 2006.

KOENING, S. H. *et al.* Metal ion binding and conformational transitions in concanavalin A: a structure-function study. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**. v. 1, p. 961-997, 1983.

KORTSARIS, A. H. *et al.* Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**. v. 208, p. 151-158, Boyd *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82(1990), 1107-1112. 1997.

KOUOKAM J. C. *et al.* Investigation of Griffithsin's Interactions with Human Cells Confirms Its Outstanding Safety and Efficacy Profile as a Microbicide Candidate. **Plos One**, v. 6, 2011.

KUMAZAWA-INOUE K, *et al.* ZG16p, an animal homolog of β -prism fold plant lectins, interacts with heparan sulfate proteoglycans in pancreatic zymogen granules. 2012. **Glycobiology**. v. 22, p. 258-266, 2012.

LAKOWICZ *et al.*, Principles of fluorescence spectroscopy, (2009).

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectin production and practical application. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 89, p. 45-55, 2011.

LI, W. W. *et al.* Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 414, p. 282-286, 2011.

LI, CHUN-YANG *et al.*, Concanavalin A, from old Protein to Novel Candidate Anti-Neoplastic Drug. **Current Molecular Pharmacology**, v. 3, p. 123-128. 2010.

LIN, P.; NG, T. B. Preparation and Biological Properties of a Melibiose Binding Lectin from *Bauhinia variegata* Seeds. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry.** v. 56, p. 10481-10486, 2008.

LIU, B. *et al.* Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy.** v.5, p. 432-3, 2009.

LIU, F. *et al.* Complement and HIV-I infection/HIV-associated neurocognitive disorders. **J Neurovirol.** v. 20, p. 184-98, 2014.

LOBLEY A. ET AL. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Bioinformatics**, v.18, p. 211–212, 2002.

LOBLEY A. *et al.* A website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Biophysical Journal**, v. 80, p.373a, 2001.

LORD, J. M. The use of cytotoxic Plant Lectins in cancer therapy. **Plant Physiology.** v. 85, p. 1-3, 1987.

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

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1572, p. 198–208, 2002.

MAHALIGAM, A. *et al.* Activity and safety of synthetic lectins based on benzoboroxole-functionalized polymers for inhibition of HIV entry. **Mol. Pharmaceutics**, v. 8, p. 2465–2475, 2011.

MALIK, A. *et al.* Community-based network study of protein-carbohydrate interactions in plant lectins using glycan array data. **PLoS One.** v. 9(4), e95480. 2014 .

MARAMOSH & HIRUMI, *Practical tissue culture applications*, New York Academic Press, 1979.

MATOS, A. B. *et al.* Revisión Taxonômica del Género *Canavalia* DC (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba. **Rev Acad Colomb Cienc.** v. 28, p. 157-75, 2004.

MEJIA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 45, p. 425-445, 2005.

MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake. *Smithson Contrib Knowl.* XII, 89-90, 1860.

MIZUOCHI T *et al.* Carbohydrate structures of the human-immunodeficiency-virus(HIV)recombinant envelope glycoprotein gp 120 produced in Chinese-hamster ovary cells. **Biochem. J.** v. 2, p. 599-603, 1988.

MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.).**Planta.** v. 158, p. 63-9, 1983.

MOREIRA, R. A. *et al.* Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal.** v. 5, p. 127-132, 1993.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterisation and behaviour during germination. **Biol. Plant.** v. 26, p. 113-120, 1984.

MOREIRA, R. *et al.* Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry.** v. 30, p. 2619-2621, 1991.

MORI *et al.* **J BiolChem.** v. 10, p. 9345-9353. 2005.

MURKHERJEE, B *et al.* Toxicological Concerns of engineered Nanosize Drug Delivery Systems. **Am. J. Ther.**. Epub ahead of print. 2013.

NAGANO, C. S.; CALVETE, J. J.; BARETTINO, D.; *et al.* Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **The Biochemical journal**, v. 409, n. 2, p. 417–28, 2008.

NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine Drugs**. v. 10, p. 1936-1954, 2012.

NASCIMENTO, K. S. *et al.* Purification and partial characterization of a new mannose/glycose-specific lectin from *Dialium guineense* Wild seeds that exhibits toxic effect, **Journal of Molecular Recognition**. v. 26, p. 351-356, 2013.

NG, W. *et al.* Soluble Host Defense Lectins in Innate Immunity to Influenza Virus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. vol. 2012, Article ID 732191, 2012.

NOVÁKOVÁ *et al.* Studies on lectins. The role of Mn^{+2} in the activity of the soybean lectin. **Biochim Biophys Acta**. v. 3, p. 401-407. 2001.

O'KEEFE *et al.* Isolation and characterization of niphatevirin, a human-immunodeficiency-virus-inhibitory glycoprotein from the marine sponge *Niphates erecta*. **Eur. J. Biochem**. V.1, p. 47-53. 1997.

OLIVEIRA JTA. *et al.* . Purification and physicochemical characterization of a cotyledonarylectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301–310, 2002.

OLIVEIRA, J. T. A. Lectins And The Chemotaxonomy Of The Sub-Tribedioecleinae (Leguminosae-Phaseoleae). **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**. v. 7, p. 7-14, 1995.

OSTERNE, V. J. *et al.* Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 172, p. 3342-53, 2014.

PERES & CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PEREZ, G. *et al.* Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. **Phytochemistry**. v. 29, p. 1745-9, 1990.

PEREZ, J. M. *et al.* Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. **Molecular Pharmacology**. v. 59, p. 657-663, 2001.

PEUMANS, W. J *et al.* Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate J**. v. 14, p. 259-265, 1997.

PINA-ARAUJO I. I. M . *et al* . Profile of the HIV Epidemic in Cape Verde: Molecular Epidemiology and Drug Resistance Mutations among HIV-1 and HIV-2 Infected Patients from Distinct Islands of the Archipelago. **Plos One**, v.9, 2014.

PINTO *et al* , Effects of Canavalia lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. *Inflammation*, v. 36, p. 713-22. 2013.

PIRES, A. F. *et al*. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis* Fundam. **Clin. Pharmacological**. v. 27, p. 201-209, 2013.

PROVENCHER S.W, GLOCKNERI J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism.1981. **Biochemistry**, v.20, p.33–37, 1981.

RAMOS, M. V. *et al*. The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Mem. Oswald Cruz**. v. 6, p. 91-96, 1996.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL. M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**. v. 160, p. 739–744, 2001.

RIEGER, D. K. *et al*. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 122, p. 53-60, 2014.

ROY, A. *et al*. Binding of insecticidal lectin *Colocasia esculenta* tuber agglutinin (CEA) to midgut receptors of *Bemisia tabaci* and *Lipaphis erysimi* provides clues to its insecticidal potential. **Proteomics**. v. 14, p. 1646-1659, 2014.

ROY, S *et al* . Equilibrium unfolding of cyclophilin from *Leishmania donovani*:Characterization intermediate states. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 69, p. 353–360. 2014

ROY, B. *et al*. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**. v. 210, p. 96-102, 2014.

RUBSTEIN *et al.*, Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a

- tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of The National Cancer Institute**. V. 13, p 1113-8. 2007.
- SAMES, K. *et al.* Lectin and proteoglycan histochemistry of Merkel cell carcinomas. **Experimental Dermatology**. v. 10, p. 100-109, 2001.
- SANZ-APARICIO *et al.* The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalina A. **FEBS Lett.** v. 1, p. 114-8. **1997**.
- SANTOS, A. F. *et al.*, Toxicity of some glicose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 794-798, 2010.
- SHI, Z. *et al.* In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Proliferation**. v. 46, p. 86-96, 2013.
- SILVA, F. O. *et al.* Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Res Vet Sci**. v. 96, p. 276-82, 2014.
- SILVA, M. C. C. *et al.* *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1840, p. 2262-71, 2014.
- SILVA, W. L. S. *et al.* Inventário e distribuição geográfica de Leguminosae no arquipélago de Marajó, PA, Brasil. **Hoehnea**. v. 40, p. 627-647, 2013.
- SINGH T. *et al.*, Effect of molluscicidal components of *Abrus precatorius*, *Argemone Mexicana* and *Nerium indicum* on certain biochemical parameters of *Lymnaea acuminata*. **Phytother Res.** v. 3, p. 210-3. **1999**.
- SKEHAM, P. *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of The National Cancer Institute**. v. 82, p. 1107-1112, 1990.
- SOARES, A. M. *et al.* Activation of J77A.1 Macrophages by Three Phospholipases A2 Isolated from *Bothrops atrox* Snake Venom. **BioMed Research International**. v. 2014, p. 1-13, 2014.

SREEMA N., WOODY RW. A. Self-Consistent Method for the Analysis of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism. **Analytical Biochemistry**, v. 209, p. 32–44, 1993.

SREEMA N. et al. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science**, v. 8, p.370–380, 1999.

SRINIVAS VR. et al. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.1527, p.102-111, 2001.

SULTAN, N. A. M. *et al.* Tryptophan environment, secondary structure and thermal unfolding of the galactose-specific seed lectin from *Dolichos lablab*: Fluorescence and circular dichroism spectroscopic studies. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1760, p. 1001-1008, 2006.

SURESHKUMAR, T.; PRIYA, S. Purification of a lectin from *M. rubra* leaves using immobilized metal ion affinity chromatography and its characterization. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 168, p. 2257-2267, 2012.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 407, p. 241-247, 2002.

SWAMY, M. J. *et al.* Tryptophan environment, secondary structure and thermal unfolding of the galactose-specific seed lectin from *Dolichos lablab*: Fluorescence and circular dichroism spectroscopic studies. **Biochimica et Biophysica**. v. 1790, p. 1001-1008, 2006.

TANH-SANG & KIM. Potential anti-HIV agents from marine resources: an overview. **Marine Drugs**. v. 8, p. 2871-2892, 2010.

TEIXEIRA, E.H. *et al.* In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 111-116, 2006.

TRAN, M. *et al.* Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 110, p. 2826-35, 2013.

UETA E *et al.* Enhancement of apoptotic damage of squamous cell carcinoma cells by inhibition of the mitochondrial DNA repairing system. **Cancer Sci.** v. 11, p 2230-7. 2008.

ULIEL & UNGER. Naturally occurring circular permutation in proteins. **Protein Eng.** v. 8, p 533-42, **2001**.

VALENTINER, U. *et al.* The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. **Anticancer Res.** v. 23, p.1197-1206, 2003.

VAN RITJ, S *et al.* Potent organometallic osmium compounds induce mitochondria-mediated apoptosis and S-phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells, ; **Metallomics.** v 6(5). p. 1014-22. 2014.

VAREJAO N. *et al.* Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of Cratylia mollis seed lectin (CRAMOLL 1): effects of natural fragmentation on protein stability. **Biochemistry**, v. 50, p. 7330–7340, 2011.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of leguminous lectins on the growth of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Molecules.** v. 18, p.5792-803, 2013.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) is a valuable biotechnological tool to stimulate the growth of *Rhizobium tropici* in vitro. **Molecules.** v. 17, p. 5244-54, 2012.

VEER, L. J.; BERNARDES, R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. **Nature.** v. 452, p. 564-570, 2008.

VOGEL *et al.*, Análise Química Quantitativa, 6ª edição, Editora LTC, 2002, 462p.

WEIL & BOLTON, Electron Paramagnetic Resonance, Second Edition, by John A.

WEN *et al.* HIV-1 infection initiates changes in the expression of a wide array of genes in U937 promonocytes and HUT78 T cells. **Virus Research.** v. 113, p. 26–35, 2005.

WU *et al.* Recognition profile of *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA). **Life Sci**, 74, 1763-1774. 2004.

XU, Y. *et al.* Receptor interactive protein kinase 3 promotes Cisplatin-triggered necrosis in apoptosis-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. **PLoS One**. 2014 Jun 24;9(6):e100127, 2014.

ZAKERI, Z. *et al.* Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 36, p. 2405-2419, 2004.

ZHENG S. *et al.* **Acta Pharmacologica Sinica**. Antitumor effects of concanavalin A and Sophora flavescens lectin in vitro and in vivo. v. 35, p. 248-256, 2014.

7. TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Alves-Filho, J. G.; do Nascimento, A. S.; **Gondim, A. C.**; Pereira, R. H.; da Cunha, R. M.; Nagano, C. S.; Teixeira, E. H.; Nascimento K. S.; Cavada, B. S. *Isoform characterisation, heterologous expression and functional analysis of two lectins from Vatairea macrocarpa*. Protein and Peptide Letters, v. 20(11), p.1204-10, 2013.

Nascimento, A. S. F.; **Gondim, A. C. S.**; Cajazeiras, J. B.; Correia, J. L. A.; Pires, A. F.; Nascimento, K. S.; Nagano, C. S.; Assreuy, A. M. S.; Cavada, B. S. *Purification and partial characterization of a novel lectin from Dioclea lasiocarpa Mart seeds with vasodilator effects*. Journal of Molecular Recognition, v. 25, p. 657-664, 2012.

Correia, J. L. A.; Nascimento, A. S. F.; Cajazeiras, J. B.; **Gondim, A. C. S.**; Pereira, R. I.; Sousa, B. L.; Silva, A. L. C.; Garcia, W.; Teixeira, E. H.; Nascimento, K. S.; Rocha, Bruno A. M.; Nagano, C. S.; Sampaio, A. H.; Cavada, B. S.. *Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of Dioclea sclerocarpa Ducke*. Molecules (Basel. Online), v. 16, p. 9077-9089, 2011.