



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ITO LIBERATO BARROSO NETO

ASPECTOS ESTRUTURAIS DO EFEITO VASORELAXANTE DE LECTINAS DE
LEGUMINOSAS

FORTALEZA
2014

ITO LIBERATO BARROSO NETO

ASPECTOS ESTRUTURAIS DO EFEITO VASORELAXANTE DE LECTINAS DE
LEGUMINOSAS.

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do
Curso de Pós Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal do Ceará como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Co-Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias
da Rocha

FORTALEZA
2014

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

-
- B287a Barroso Neto, Ito Liberato.
Aspectos estruturais do efeito vasorelaxante de lectinas de leguminosas / Ito Liberato Barroso Neto. – 2014.
116 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.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.
1. Lectinas. 2. Cristalografia. 3. Proteínas vegetais. I. Título.

ITO LIBERATO BARROSO NETO

ASPECTOS ESTRUTURAIS DO EFEITO VASORELAXANTE DE LECTINAS DE
LEGUMINOSAS.

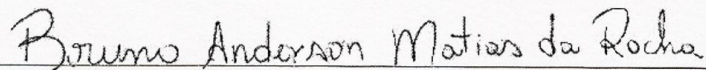
Tese submetida à coordenação do curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 17 / 03 / 2014

BANCA EXAMINADORA



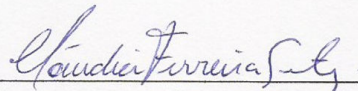
Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador – UFC/DBBM)



Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (UFC/DBBM)



Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (UFC/Eng. Pesca)



Prof. Dra. Cláudia Ferreira Santos (UECE)



Prof. Dr. Plínio Delatorre (UFPB)

A Deus, a minha família, e
àqueles que amo.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida concedida.

Ao meu orientador Benildo Sousa Cavada que me recebeu em seu laboratório e acreditou em meu trabalho mesmo e pelo seu valoroso apoio no meu crescimento profissional.

Ao professor Bruno Anderson pela valiosa contribuição na co-orientação deste trabalho.

Ao professor Celso Shiniti Nagano pelo suporte nos dados de espectrometria de massas e por aceitar participar da banca de defesa desta Tese.

Ao professor Plínio Delatorre pelas importantes discussões científicas em cristalografia e por aceitar participar da banca de defesa desta Tese.

A professora Cláudia, que pude ter o privilégio de conhecer na graduação e agora participa da banca de minha tese.

As professoras Ana Maria Assreuy e Alana Pires do laboratório Laffin (UECE) pela grande ajuda e apoio nas atividades biológica deste trabalho.

A todos os professores do BioMol-Group que estão sempre dispostos a nos auxiliar no nosso crescimento científico.

Aos amigos que ganhei nesse anos de pesquisa Bruno Lopes, Sâmia, Rafael, Helton, Joana, Eduardo, Maria Júlia, Rômulo, Arthur, Guilherme, Raquel Guimarães, Rômulo, Alfa, Pereira Júnior, Jeferson, Mayron, Suzete, Ana Cecília, Claudener, Bruno Anderson, Alysson.

Aos professores e funcionários do DBBM, pelas ajudas diretas ou indiretas e pelos ensinamentos.

A minha mãe Lidia Kaylynne, meu irmão Italo Liberato e meu padrasto Remo Cesar pelo amor que constrói o nosso lar. E a toda minha família que amo tanto, em especial meus avós Dimaria e Ito.

A Lia, pela amizade, pelo carinho, pela compreensão e ajuda em todos os momentos importantes. Sem sua ajuda a caminhada teria sido bem mais difícil, o que me torna eternamente grato.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”.

Fernando Pessoa

RESUMO

As lectinas são proteínas multiativas que apresentam pelo menos um sítio capaz de reconhecer de maneira reversível carboidratos específicos sem modificá-los. A família das lectinas de leguminosas representa o grupo desta classe proteica mais bem estudada, em especial destaque a subtribo *Diocleinae*. As lectinas de *Diocleinae* apresentam um alto grau de similaridade estrutural, porém o mesmo não se observa quanto às atividades biológicas. Esta variabilidade reside em detalhes que podem ser analisados em estudos baseados em estruturas. A sequência primária da lectina de *C. grandiflora* (ConGF) apresenta grande similaridade com lectinas do mesmo gênero, porém concentra o maior número de mutações representativas do gênero *Dioclea*, caracterizando-o como o subgênero de *Canavalia* mais próximo de *Dioclea*, e dentre as canavalias é a mais primitiva. A ConGF apresentou efeito relaxante em músculo liso de aortas de ratos endotelizadas, no entanto, os efeitos mostram-se fracos frente a outras lectinas de *Diocleinae*. A justificativa para este fato não reside em uma baixa similaridade estrutural, mas em pequenas mudanças na orientação de aminoácidos-chave, que se tornam responsáveis pela diversidade na ação biológica apresentada aqui, como deve ocorrer em outros fenômenos elicitados por lectinas. Para a lectina de *Cymbosema roseum* (CRLI), além de avaliado o efeito relaxante, foi observado o papel do cálcio extracelular nesta atividade. Surpreendentemente, o cálcio não foi definitivo para determinar o mecanismo de CRLI como dependente ou independente deste íon. Nossa investigação permitiu a formulação de uma hipótese em que esta lectina apresenta um duplo mecanismo de ativação da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS). A primeira via é baseada em um receptor específico na membrana do endotélio capaz de ativar a eNOS através da calmodulina. A segunda via é baseada na habilidade de ligação de CRLI ao heparano sulfato do glicocálice em um sítio diferente do CRD demonstrada por *docking* molecular, o que justifica a ativação mecânica da eNOS. Este proteoglicano é o principal candidato a mecanoreceptor da tensão de cisalhamento, principal fenômeno da manutenção do tônus vascular pela produção de NO. Dentre as proteínas de *Diocleinae*, foi ainda avaliada uma lectina do gênero *Dioclea*. *D. sclerocarpa* apresentou, como as outras lectinas deste trabalho, a habilidade de relaxar músculos lisos de aortas. Fenômeno que ocorreu com a dependência do endotélio via produção de óxido nítrico e com a participação do CRD de DSL. Tanto seu efeito como sua estrutura apresentam alto grau de semelhança com lectinas do mesmo gênero e um conjunto de características corrobora para seu baixo efeito relaxante. DSL apresenta um desenho de CRD pouco favorável para esta atividade e, além disso, a presença de um glutamato na posição 205 demonstrou ser um fator determinante na regulação desta atividade. Este resíduo modula negativamente a capacidade relaxante frente a lectinas que do mesmo gênero que possuem um resíduo de aspartato nesta mesma posição.

PALAVRAS-CHAVE: Lectina, *Canavalia grandiflora*, *Cymbosema roseum*, *Dioclea sclerocarpa*, Vasorelaxamento, Estrutura-Função.

ABSTRACT

Lectins are multiactive proteins that have at least one domain capable of recognizing specific carbohydrates reversibly without changing them. The legume lectin family is a group of this protein class further studied, in particular highlighted the subtribe *Diocleinae*. These lectins have a high degree of structural similarity, but it does not follow the biological activities. This variability must reside in details, small differences that can be analyzed in studies based in structures. The primary sequence of *C. grandiflora* lectin (ConGF) shows great similarity with lectins of the same genus, but it has the largest number of mutations representative of the genus *Dioclea*, characterizing it as the *Canavalia* subgenus closest to *Dioclea*, and it is the most primitive among the canavalias. ConGF presented relaxing effect on smooth muscles of endothelial aortas of rats; however, the effects are weak against other *Diocleinae* lectins. The justification for this does not lie in a low structural similarity but in small changes in the orientation of key amino acids residues, which become responsible for biological diversity in action presented here, as required in other phenomena elicited by lectins. For *Cymbosema roseum* lectin (CRLI), the relaxing effect was also evaluated and the role of extracellular calcium was observed for this activity. Surprisingly, the calcium was not definitive for determining CRLI mechanism as dependent or independent of calcium ions. Our research has led to the construction of a theory which this lectin has dual mechanism of nitric oxide synthase (eNOS) activation. The first path is based on a specific membrane endothelial receptor able to activate eNOS by calmodulin. The second path relies on the ability of CRLI binding to the glycocalyx heparano sulfate at a domain different from the CRD demonstrated by molecular docking, which explain mechanical activation of eNOS. This proteoglycan is the main mechanoreceptor candidate of shear stress and this phenomenon is the major agent of maintenance of vascular tone by NO production. A lectin from gender *Dioclea* was also evaluated to increase the range of legume proteins tested. As other lectins of this work, *D. sclerocarpa* presented the ability to relax smooth muscle of the aorta dependent on the endothelium nitric oxide production. Both its effect and its structure have a high degree of similarity with lectins of the same genus. A feature set corroborates with its low relaxant effect. DSL has a CRD design less favorable for this activity. In addition, the presence of a glutamate at position 205 proved to be a decisive factor in the activity regulation and it negatively modulates *Dioclea* lectins relaxant effect

KEY WORDS: Lectin, *Canavalia grandiflora*, *Cymbosema roseum*, *Dioclea sclerocarpa*, Vasorelaxation, Structure-Function.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico
AaL – Lectina de *Auracaria angustifolia*
ABA – ácido abscísico
Abu – Ácido α -amino butírico
AII – Angiotensina II
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina
ASAL – Lectina da folha do alho
ATP – Adenosina trifostato
Bk – Bradicinina
BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”
CBol – Lectina de *C. boliviana*
CGL – Lectina de *Canavalia gladiata*
CID – Dissociação induzida por colisão
ConA – Concavalina A
ConBr – Lectina de semente de *C. Brasiliensis*
ConM – Lectina de semente de *C. marítima*
CPL – Lectina de semente de *Camptosema pedicellatum*
CRLI – Lectina de semente de *Cymbosema roseum* ligante a manose.
DBL – Lectina de semente de *D. biflorus*
DRL – Lectina de semente de *D. rostrata*
DSL – Lectina de semente de *D. sclerocarpa*
DVL – Lectina de semente de *D. violacea*
DvirL – Lectina de semente de *D. virgata*
DWL – Lectina de semente de *D. wilsonii*
DDA – Análise direta de dados
CRD – Domínio de reconhecimento a carboidrato
EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF – Fator de relaxamento derivado do endotélio
ET – Endotelinas
GNA – Lectina de *Galanthus nivalis*
GSL – Lectina de *Griffonia simplicifolia*
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina
IAA – Ácido Idol acético
IL-1 – Interleucina 1
IP₃ – Inositol fosfato
L-NAME – L-nitro arginina metil-éster
MS – Espectrometria de Massas
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”
NO – Óxido nítrico
NOS – Enzima óxido nítrico sintase
LTA – Lectina de *Lotus tetragonolobus*
PDB – “Protein Data Bank”
PGI₂ – Prostaciclina
PHA – Lectina de *Phaseolus vulgaris*
Phe - Fenilefrina
p-lec – lectina da ervilha
PMF – “Peptide Mass Fingerprint”
PNA – Lectina do amendoim
RIPs - Proteínas Inativadoras de ribossomos

SBA – Lectina da soja
SR – Retículo sarcoplasmático
TNF- α – Interferon- α
TXA2 – Tromboxano
UPLC – “Ultra Performance Liquid Chromatograph”
WGA – Lectina do gérmen de trigo
X-man – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose
[Ca⁺²]_i – Concentração de Cálcio Intracelular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
1.2 LECTINA	15
1.2.1 Marcos históricos	15
1.2.2 Definição	17
1.2.3 Classificação	18
1.2.4 Ocorrência e Biossíntese	21
1.2.5 Papel das Lectinas nos vegetais	23
1.2.6 Aplicação Biotecnológica.....	29
1.2.7 Lectinas de Leguminosas.....	32
1.2.8 Lectinas de <i>Diocleinae</i>	39
1.3 VASORELAXAMENTO.....	42
1.3.1 O endotélio e os eventos vasculares.....	42
1.3.2 Produção dos fatores derivados do endotélio	43
1.3.3 Óxido nítrico e a ativação da eNOS.....	43
1.3.4 Efeitos vasculares de Lectinas.....	46
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivos Gerais	48
2.2 Objetivos Específicos.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Massa molecular e determinação de sequência de ConGF por espectrometria de massas	50
3.2 Cristalização.....	51
3.3 Coleta de dados, seleção dos modelos e substituição molecular.....	51
3.4 Refinamento e validação da estrutura.....	52
3.5 Teste de contratilidade em aortas isoladas	53
3.5 Interação com receptor muscarínico e participação do cálcio extracelular no efeito relaxante de CRLI.....	54
3.5 Participação do CRD no relaxamento provocado por DSL.....	55

3.6 Análise estatística.....	55
3.7 Análise estrutural	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS DAS LECTINAS EM ESTUDO.	58
4.1.1 Resolução da estrutura de ConGF.....	58
4.1.2 Resolução da estrutura de CRLI.....	70
4.1.3 Resolução da estrutura de DSL.....	80
4.2. VASORELAXAMENTO PROVOCADO POR LECTINAS E ASPECTOS ESTRUTURAIS ENVOLVIDOS NA SUA REGULAÇÃO	86
4.2.1 ConGF	86
4.2.2 CRLI.....	91
4.2.3 DSL.....	97
5. Conclusão	101
Referências.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Carboidratos são biomoléculas capazes de formar ligações glicosídicas a partir de diferentes tipos e números de resíduos de monossacarídeos. Além de suas características estruturais, seu tipo de ligação anomérica, sua posição e a ausência ou presença de ramificação geram uma heterogeneidade complexa para estas macromoléculas nos sistemas vivos. (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001; SHARON; LIS, 1989). Para comparar sua complexidade, podemos considerar o DNA como um conjunto de base 4 e aminoácidos como um conjunto de base 20, com estes conjuntos pode se construir uma linguagem biológica para a transferência de informação de 4.096 e $6,4 \times 10^7$ “palavras”, respectivamente, enquanto os carboidratos possuem mais de $1,05 \times 10^{12}$ variações (LAINE, 1994).

Grandes investimentos científicos são realizados envolvendo tecnologias de análises estruturais de glicanos, como resultado pode se observar um rápido desenvolvimento no emergente campo da glicômica. O efeito direto do desenvolvimento nesta área é o desvendamento de interações glicano-proteína e o estabelecimento do significado funcional destes açúcares (TURNBULL; FIELD, 2007). Na verdade, estes desafios citados fazem parte dos diversos eventos biológicos comuns às células. E nos diversos sistemas vivos, o reconhecimento e tradução da complexidade dos carboidratos é papel inerente de uma classe proteica: as lectinas.

Lectinas são marcadores de reconhecimento único de células que expressam carboidratos em seus glicocálices e de estruturas moleculares glicosiladas. Sua característica primordial fora designada como uma chave em um modelo de chave-fechadura (FISCHER, 1894). Seu papel mais notável reside na capacidade de decifrar o código do carboidrato. Em outras palavras, enquanto os açúcares são capazes de transportar a informação biológica, as lectinas são capazes de decifrar o código (glicocódigo) (KUNO et al., 2005).

Um entendimento detalhado de como ocorre este reconhecimento depende de uma conjunto de técnicas modernas. Entre elas, a resolução de estruturas tridimensionais se mostra crucial para revelar detalhes a níveis atômicos das engrenagens que governam este modelo chave-fechadura. Estruturas de lectinas complexadas com glicanos não só fornecem coordenadas e regiões de sítios de reconhecimento a carboidratos, os detalhes destas interações também são usados para explicar resultados observados em eventos biológicos. Mais precisamente, a técnica de cristalografia permite que seja explicado como proteínas homólogas com o mesmo sítio de reconhecimento e arranjo quaternário idênticos apresentam capacidades biológicas diferentes (BEZERRA et al., 2011, 2013; CAVADA et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2011; NÓBREGA et al., 2012; ROCHA et al., 2011; SANZ-APARICIO et al., 1997).

A aplicabilidade biotecnológica variada das lectinas torna estas moléculas importantes fontes de estudo (GEMEINER et al., 2009; RÜDIGER; GABIUS, 2001). A análise estrutural por cristalografia de raios X é uma técnica crucial para a melhor compreensão do potencial lectínico em diversos modelos de ação, além disso fornece informações essenciais de como pequenas mudanças na estrutura provocam grande diversidade biológica (BEZERRA et al., 2011, 2013; CAVADA et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2011; NÓBREGA et al., 2012; ROCHA et al., 2011; SANZ-APARICIO et al., 1997).

1.2 LECTINA

1.2.1 Marcos históricos

A definição original de lectina foi proposta por Boyd e Shapleigh levando em conta a especificidade do extrato de plantas por grupos sanguíneos. A palavra lectina em si vem do latim *legere*, que significa seleção ou escolha (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

O trabalho de S. Weir Mitchell, em 1860, reporta a aglutinação de células sanguíneas de pombo quando em contato com veneno de *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860).

Em 1888, Stillmark observou o fenômeno da hemaglutinação quando estudava os efeitos tóxicos da planta *Ricinus communis*. Seria a primeira ocorrência desta classe de proteína em plantas (a toxina com capacidade de aglutinar células sanguíneas foi denominada de ricina), mesmo que em anos anteriores (1884) já se tivesse estudado a toxicidade de *Abrus precatorius*, planta que também possui lectina estudada pelo mesmo grupo de Stillmark (STILLMARK, 1888).

Somente em 1891, H. Hellin observou a capacidade de hemaglutinação pela *A. precatorius* (abrina). As duas proteínas (ricina e abrina) foram utilizadas por Paul Ehrlich, e, em 1891, ele pode estabelecer vários dos princípios fundamentais de imunologia (SHARON; LIS, 2001).

Em 1919, James B. Sumner foi o primeiro a isolar uma enzima, a urease. Já em 1926, ele isolou uma proteína de *Canavalia ensiformis* nomeada de Conavalina A (ConA) e desta forma foi o primeiro a obter uma hemaglutinação pura (SUMNER; HOWELL, 1936).

Os primeiros resultados obtidos por Stillmark indicaram alguma seletividade da aglutinação de células vermelhas de alguns animais induzidas por ricina. Esta observação foi corroborada e estendida por Karl Landsteiner pela descoberta dos grupos sanguíneos humanos A, B e O em 1900 (LANDSTEINER; RAUBITSCHKE, 1907).

Em 1940, William C. Boyd e Karl O. Renkonen descobriram, independentemente, a especificidade das hemaglutininas pelos grupos sanguíneos. Eles observaram que extratos de *Phaseolus limenses* e de *Vicia craca* aglutinavam sangue do tipo A, mas não aglutinavam sangue do tipo B ou O, enquanto extratos de *Lotus tetragonolobus* aglutinavam eritrócitos especificamente do tipo O (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Em 1950, o trabalho pioneiro de Watkins e Morgan estava entre as recentes evidências da presença de açúcar na superfície de células, estabelecendo o papel potencial das aglutininas como marcadores de entidades, um tema abordado na glicobiologia moderna (WATKINS; MORGAN, 1952).

A habilidade de aglutininas de plantas em distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou a Boyd e Shapleigh (1954) propor o nome lectina. Este termo foi generalizado no mundo científico para englobar aglutininas açúcar-específicas de origem não imune, independentemente da origem e especificidade sanguínea (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Olavi Mäkela, em 1954-56, examinou extratos de sementes de 743 espécies em 165 gêneros da família *Leguminosae*. Ele detectou atividade hemaglutinante em mais de um terço destes extratos e especificidade sanguínea em quase um décimo das hemaglutininas (MÄKELA, 1957).

Uma grande descoberta no início da década de 1960 foi fundamental para levar as lectinas para a atenção pública: a mitogenicidade da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) por Peter C. Nowell (1960). Esta proteína possui a habilidade de estimular a mitose em linfócitos. Isto teve um impacto revolucionário na imunologia, pois o que se sabia até então era que linfócitos eram o final da diferenciação celular e que eram incapazes de se multiplicar (NOWELL, 1960). Este evento forneceu provas de que a estimulação mitogênica é resultado da ligação de lectinas à açúcares de superfície dos linfócitos e estava entre as primeiras demonstrações do papel biológico dos açúcares de superfície celular.

Lectinas mitogênicas tornaram-se ferramentas para o estudo de transmissão de sinal intracelular e para análise dos eventos bioquímicos que ocorriam durante a estimulação de linfócitos *in vitro*. O resultado mais valioso destes estudos foi a descoberta do fator T de crescimento celular (interleucina-2) no meio de condição para o crescimento normal de linfócitos humanos estimulados por PHA na década de 1970 por Robert C. Gallo e seus colaboradores (MORGAN; RUSCETTI; GALLO, 1976).

Joseph C. Aub, em 1965, descobriu que a aglutinina do gérmen de trigo (WGA) tem a habilidade de preferencialmente aglutinar células malignas. Este evento fez parte das primeiras

evidências que mudanças nos açúcares da superfície celular estão associadas ao desenvolvimento de câncer (AUB; SANFORD; COTE, 1965).

A introdução da técnica de cromatografia de afinidade, por Irwin J. Goldstein e Bipin B. L. Agrawal (1967) aumentou dramaticamente o isolamento de lectinas. Além disso, o interesse nestas proteínas foi amplamente estimulado pela demonstração de que são ferramentas biotecnológicas valiosas (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1967).

A ocorrência de hemaglutininas animais foi constatada desde o início dos estudos com lectinas, na maioria em invertebrados ou vertebrados inferiores. Até metade da década de 1970, apenas três delas haviam sido isoladas e caracterizadas (da enguia, cobra e límulo). Nessa década houve a caracterização de outras lectinas animais, como o receptor de asialoglicoproteína hepática e a de enguia elétrica (TEICHBERG et al., 1975), o primeiro exemplo de uma lectina específica por β -galactose (conhecidas como galectinas) (BARONDES et al., 1994). A partir da década de 1980, o número de lectinas animais purificadas passou a crescer bastante graças ao advento de técnicas recombinantes.

1.2.2 Definição

As lectinas são proteínas capazes de reconhecer específica- e reversivelmente açúcares sem modificá-los através do domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD). Para Peummans e Van Damme (1995), a presença de pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a carboidratos seria o único pré-requisito para que uma proteína fosse denominada lectina. Logo, lectinas de plantas podem ser definidas como proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente de maneira específica a um mono- ou oligossacarídeo. O que inclui uma grande gama de proteínas que se comportam de maneira bem diferentes quanto às suas propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Para qualificar como uma lectina, a (glico)proteína deve possuir três características distintas.

1.2.2.1. A lectina é uma (glico)proteína que se liga a carboidrato.

A partir dessa definição, taninos, certos lipídios, substância catiônicas e carboidratos cognatos em interações carboidrato-carboidrato que aglutinam células estão excluídos. Como o sítio de reconhecimento a carboidrato pode estar ligado a outra cadeia proteica funcional, sendo esse sítio de reconhecimento o responsável para classificar a proteína multifuncional como

lectina, abre-se a possibilidade de classificar a proteína em outra categoria, como RIPs tipo 2 e quitinases classe I (GABIUS, 1997).

1.2.2.2. Lectina estão separadas das imunoglobulinas

Originalmente, lectinas foram denominadas “substâncias tipo anticorpos” (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Este termo se refere à aparente especificidade de ligação e não reflete similaridade estrutural. Inclusive, o termo lectina foi posteriormente diferenciado das imunoglobulinas (Ig) que necessitavam de um estímulo imunológico para serem sintetizadas, apesar da capacidade de se ligar a carboidrato poder ser vista também nas lectinas tipo-I da superfamília-Ig, todas as imunoglobulinas são excluídas. Interessantemente, lectinas são conhecidas por serem induzidas por estímulos externos diferente de desafio do organismo por antígenos. A expressão de lectina de plantas pode aumentar como consequência de estresses como patógenos, seca ou alta salinidade (SCHEGGIA et al., 1988; SINGH; BHAGLAL; BHULLAR, 2000).

1.2.2.3. Lectinas não modificam bioquimicamente os carboidratos aos quais se ligam.

Esta parte da definição exclui glicosiltransferases, glicosidases e enzimas que introduzem substituintes, como grupos sulfatos nos carboidratos. Essa adição é necessária, pois é sabido que certas glicosidases aglutinam células a baixas temperaturas. Como algumas podem, portanto, possuir atividades enzimáticas independentes do sítio lectínico, fica indispensável nos passos iniciais de investigação demonstrar outras atividades atribuídas a cada sítio. (GABIUS, 1997) (BRECHTEL; WÄTZIG; RÜDIGER, 2001; GABIUS, 1997). Lectinas são, portanto, separadas de sensores para mono ou dissacarídeos operando em quimiotaxias ou em sistemas *operon* e de proteínas de transporte (KOCOUREK; HOREJS, 1983).

1.2.3 Classificação

Baseado na sua estrutura geral (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME et al., 1998), as lectinas podem ser classificadas em quatro categorias, denominadas: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas (Figura 1).

1.2.3.1 Merolectinas

São proteínas formadas exclusivamente de um único domínio de reconhecimento a carboidrato (do inglês CRD, *Carbohydrate Binding Domain*), e devido a sua natureza monovalente, é incapaz de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Como exemplos temos a heveína (VAN PARIJS et al., 1992) e as proteínas monoméricas ligantes de manose das orquídeas.[\[ref\]](#)

1.2.3.2 Hololectinas

São exclusivamente formadas por CRDs, mas em contraste com as merolectinas, contêm dois ou mais domínios que são idênticos ou homólogos, esse grupo compreende lectinas que possuem múltiplos sítios de ligação e, portanto, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Obviamente que a maioria das lectinas pertence a esse grupo, já que se comportam como hemaglutininas.

1.2.3.3 Superlectinas

São um grupo especial de quimerolectinas que possuem dois ou mais domínios que diferem do sítio de ligação a carboidratos, tanto em estrutura como em função, ou apresentam domínios lectínicos distintos, tendo a mesma proteína especificidade por carboidratos distintos. Como lectina da tulipa (VAN DAMME et al., 1996), que possui em uma única cadeia polipeptídica um domínio ligante a manose, que é claramente relacionado a subunidade básica das proteínas ligantes a manose de monocotiledôneas, e um segundo domínio ligante a GalNAc, que não possui similaridade com nenhuma proteína conhecida.

1.2.3.4 Quimerolectinas

São proteínas de fusão, possuindo pelo menos um CRD ligado a um domínio não relacionado, que possua uma atividade catalítica bem definida (ou outra atividade biológica) e que atue independentemente do CRD. Dependendo do número de CRDs, quimerolectinas se comportam como mero- ou hololectinas. Por exemplo, RIPs tipo 2 com dois CRDs na sua cadeia B (por exemplo, ricina) aglutinam células, enquanto quitinase de planta tipo I com único domínio de ligação a quitina não aglutinam.

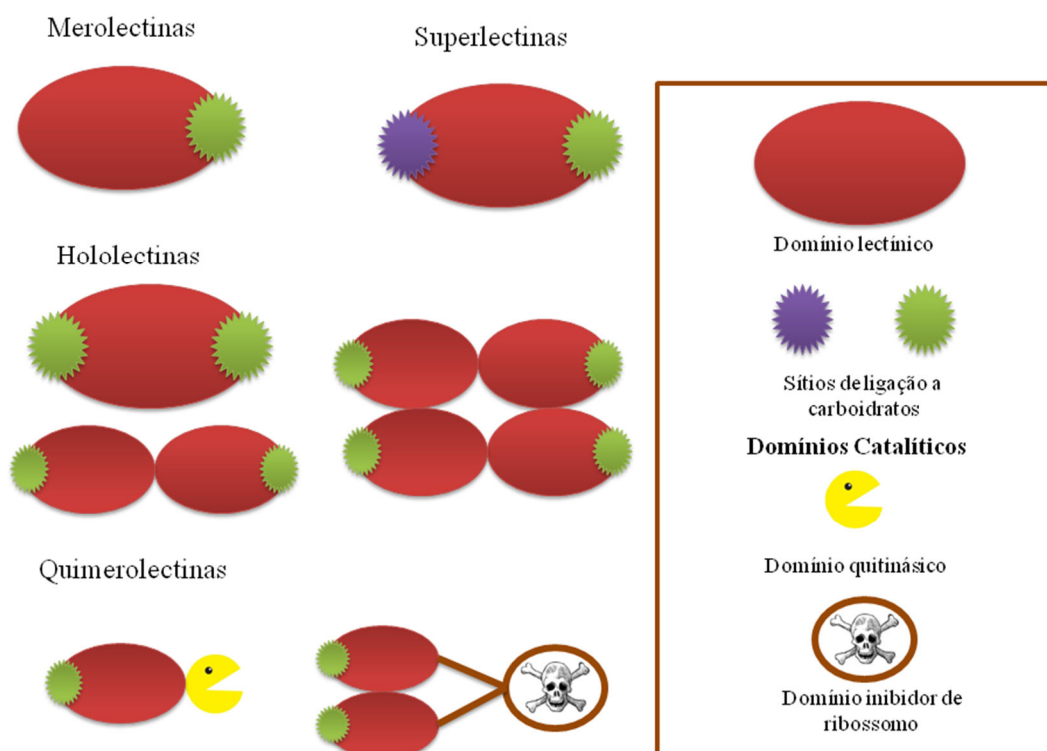


Figura 1 – Representação esquemática das quatro classes estruturais de lectinas de plantas. Baseado em Van Damme, 1998.

Além da classificação estrutural, baseado na análise das sequências das lectinas, pode-se observar diferenças nas relações evolutivas entre estas. Isto permitiu criar quatro grupos de proteínas relacionadas evolutivamente, denominados de lectinas de leguminosa, lectinas ligante a quitina, RIP tipo 2 e as lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose. Além desses quatro grupos, foram reconhecidas três pequenas famílias com sequências e estruturas distintas conhecidas como amarantina, jacalina e lectinas do floema de curcubitáceas (Figura 2) (VAN DAMME et al., 1998).

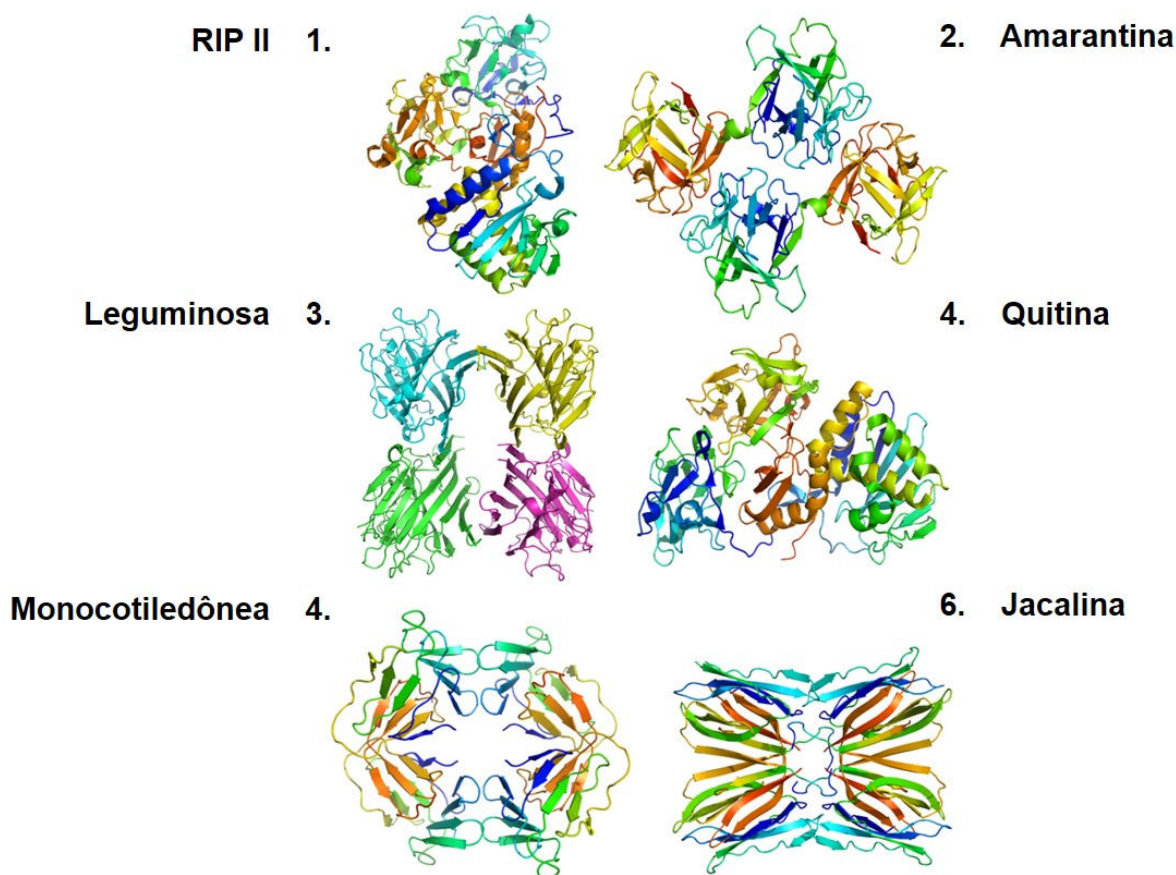


Figura 2 – Estruturas em representação *cartoon* dos grupos e famílias de lectinas vegetais. 1. Abrina – RIP tipo 2; 2. *A. Caudatus* – Família Amarantina; 3. PHA-L – Leguminosa; 4. *Viscum album* – Ligante a quitina 5. *Galanthus nivalis* - Monocotiledônea ligante a manose; 6. Jacalina.

1.2.4 Ocorrência e Biossíntese

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo já encontradas em fungos, vírus, bactérias, insetos, animais e plantas (MOREIRA et al., 1991). Nas plantas, são principalmente obtidas de sementes, pela facilidade da obtenção de tecido seco e uma produção considerável neste órgão. Nos outros tecidos das plantas, como em folhas, raízes, caule, súber entre outros, elas também podem ser encontradas, mas geralmente em baixas concentrações (VAN DAMME et al., 1998).

Em relação à biossíntese, um exemplo bem caracterizado da síntese de uma lectina de leguminosa é a síntese da Conavalina A. ConA é sintetizada nos cotilédones de sementes em desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* e acumulada em corpos proteicos em células parenquimatosas de reserva, onde a lectina representa cerca de 20% das proteínas totais na semente madura. Nestas células, ConA é sintetizada como uma pré-pró-proteína, pré-pró-ConA. Depois da remoção co-translacional do peptídeo sinal, a cadeia nascente da proteína é

sequestrada para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER) onde é N-glicosilado. A forma resultante é denominada de pró-ConA, o precursor da ConA madura (CHRISPEELS et al., 1986; FAYE; CHRISPEELS, 1987; HERMAN; SHANNON; CHRISPEELS, 1985). O precursor é transportado para corpos proteicos via complexo de Golgi onde o glicopeptídeo central de 15 aminoácidos é removido, originando dois fragmentos distintos correspondendo aos domínios N- e C-terminal do precursor. A cadeia C-terminal é processada ocorrendo a remoção proteolítica de um peptídeo de nove resíduos na região C-terminal, que é ligada à região N-terminal de maneira inversa (Figura 3) (BOWLES; PAPPIN, 1988; BOYD; SHAPLEIGH, 1954). A nova ligação peptídica ligando os fragmentos N- e C- se localiza entre os resíduos 118 e 119 da proteína madura. Como o processo de religação não possui aproveitamento de 100%, uma fração correspondente aos fragmentos C- e N- da ConA, as duas metades da molécula, estão sempre presentes no preparo dessa lectina. Portanto, quando a lectina é analisada por SDS-PAGE, são observadas três bandas polipeptídicas. O mesmo padrão eletroforético é observado em lectinas isoladas do gênero *Canavalia* (CECCATTO et al., 2002; HAGUE, 1975; MOREIRA; CAVADA, 1986). Para algumas das lectinas de *Canavalia*, foi demonstrado que os dois fragmentos são as duas metades da cadeia alfa intactas (GRANGEIRO, 1996; YAMAUCHI; MINAMIKAWA, 1990; YAMAUCHI et al., 1989), indicando que as espécies de lectina desse gênero são produzidas pelo mesmo mecanismo pós traducional estabelecido para ConA.

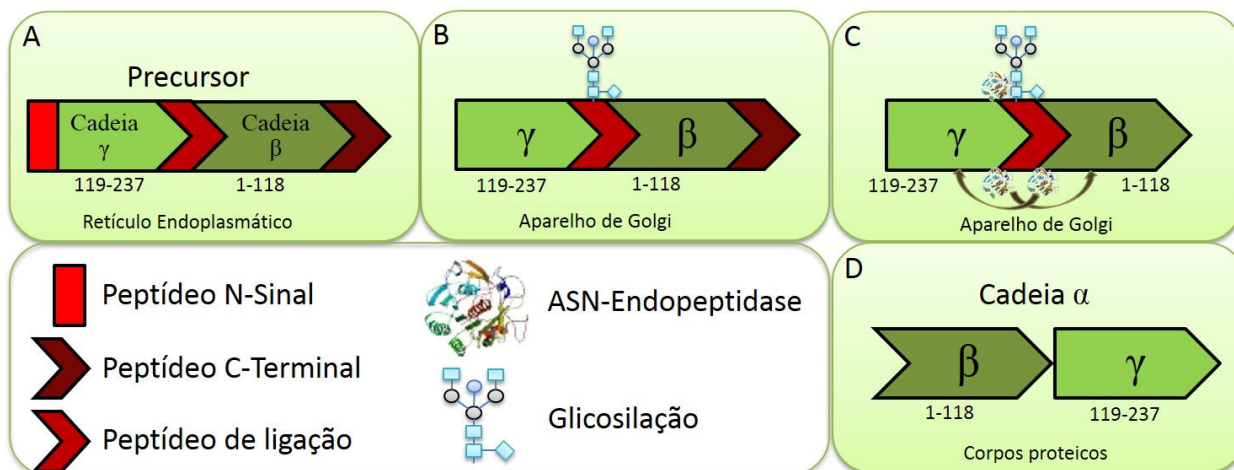


Figura 3 – Representação esquemática da biossíntese das lectinas semelhantes a ConA no processamento chamado de permutação circular. A) a pré-pro-proteína (precursor) é expressa no retículo endoplasmático e ainda não sofreu processamento. B) Após remoção do peptídeo sinal o precursor é direcionado para o aparelho de Golgi, onde é glicosilado no peptídeo de ligação. C) A enzima Asparaginil endopeptidase retira a glicosilação, o peptídeo de ligação e o peptídeo c-terminal. E refaz a ligação das cadeias em ordem invertida (permutação circular). D) A proteína madura é então direcionada aos corpos proteicos nas sementes.

1.2.5 Papel das Lectinas nos vegetais

A busca do papel fisiológico das lectinas de plantas esteve sempre relacionada na busca de seus receptores naturais. No caso de lectinas, receptores poderiam ser as porções glicídicas de glicoconjugados complementares ao sítio de reconhecimento da lectina, onde carboidratos de diferentes fontes (glicoproteínas, glicolipídios e polissacarídeos), mas idênticos (ou estrutura similar) podem atuar como receptores da mesma lectina. A busca por ligantes endógenos da lectina de planta não levaram a descobertas significativas e, com exceção de quitinases, glucanases e glicosidases, lectinas são as únicas proteínas capazes de reconhecer e se ligar a glicoconjugados presentes na superfície de microrganismos (como bactérias e fungos) ou expostos ao longo do trato intestinal de insetos e herbívoros mamíferos. Dado a diversidade dos glicanos microbiais e animal, um largo espectro de lectinas com diferentes especificidade pode ser interpretado como indicação do sucesso das plantas no desenvolvimento de moléculas de reconhecimento/ação contra diferentes receptores glicídicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Argumentos moleculares, bioquímicos, celulares, fisiológicos e evolucionários indicam que lectinas possuem um papel na defesa da planta. O maior argumento desse papel é a observação de que lectinas de plantas se ligam a glicoconjugados de outros organismos. Apesar de lectinas de planta serem capazes de se ligar a carboidratos simples como glicose, manose ou galactose, elas possuem afinidade bem maior por oligossacarídeos, que não são comuns ou

totalmente ausentes nas plantas. Como as lectinas que se ligam a quitina, um carboidrato típico constituinte da parede celular de fungos e exoesqueleto de invertebrados. O mesmo acontece para o lectinas que se ligam ao ácido siálico, açúcar que não existe em plantas, mas é o maior componente glicídico de glicoproteínas animais (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Um argumento substancial a favor do papel de defesas das lectinas é a marcante estabilidade delas sobre condições desfavoráveis. A maioria das lectinas é estável sobre uma grande faixa de pH, são capazes de suportar calor e são resistentes à proteases de animais e insetos. Nestes aspectos, elas lembram fortemente outras proteínas ligadas à defesa como proteínas relacionadas a patogênese, inibidores de protease, quitinases e glicanases, RIPs, inibidores de α -amilase, proteínas antifúngica e tioninas. No entanto, lectinas são degradadas *in vivo* e alguns herbívoros possuem proteases capazes de digerir lectinas de plantas presentes na sua dieta (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

1.2.5.1 Relação entre hormônios vegetais e lectinas

Os mecanismos de defesa de plantas estão associados às cascatas de reações nos quais diversos hormônios vegetais fazem parte, essas cascatas culminam, muitas vezes, com o acúmulo de proteínas de defesa. Podemos observar em diversos casos o acúmulo de lectinas após o tratamento de plantas com determinados hormônios vegetais, como WGA induzido por ABA (CAMMUE et al., 1991), giberilina controla as mudanças diárias na expressão da lectina do xilema de *Cucumis sativus* (ODA et al., 2003). Tratamento com AIA aumentam os níveis do mRNA da lectina de *Cicer arietinum* (ESTEBAN et al., 2002), tratamento com metil jasmonato aumenta o conteúdo de lectina em cultura de calos de *Helianthus tuberosus* (NAKAGAWA et al., 1996). Transcritos de *Brassica napus* acumularam nas folhas após tratamento com o precursor de etileno, bem como ácido jasmônico, ABA e injúria (BABOSHA, 2008).

Um número considerável de lectinas possuem um sítio hidrofóbico capaz de interagir com citocinas e compostos relacionados às mesmas, como a quantidade de lectinas expressa em certos tecidos é alta, principalmente nas sementes, a maior parte do pool de fito-hormônios podem estar ligados à lectinas, que fariam um papel de armazenamento (BABOSHA, 2008).

1.2.5.2 Interação com o ácido α -amino butírico (Abu)

O Abu é um aminoácido não proteico que pode proteger certas plantas contra alguns patógenos. O Abu protege essas plantas pela ativação da defesa natural do organismo pela ativação de mecanismos de defesa das plantas, como calose, resposta hipersensitiva e até

necrose. A resposta induzida pode estar associada ao *priming*, processo que aumenta a capacidade da célula em mobilizar respostas de defesa celular (TON; MAUCH-MANI, 2004).

Delatorre e colaboradores (2007) determinaram que na lectina de CGL existia uma densidade eletrônica correspondente ao Abu (Figura 4), sua presença foi confirmada por espectrometria de massa, e os resíduos envolvidos na interação com o aminoácido não proteico são bastante conservados dentro das Canavalias, mas em outras lectinas de leguminosas ocorrem substituições conservativas. Este trabalho também verificou o aumento da quantidade de Abu na germinação, em contraste com a diminuição da lectina, e esse aumento esteve relacionado com o aumento de hipersensibilidade da planta em germinação. Sua presença já foi detectada em outras lectinas de *Diocleinae*. A associação de lectinas com o Abu fortalece o papel das lectinas na defesa de plantas bem como a característica de interagir com moléculas diferentes de carboidratos, assim como ocorre com os hormônios via domínios hidrofóbicos das lectinas (DELATORRE et al., 2007).

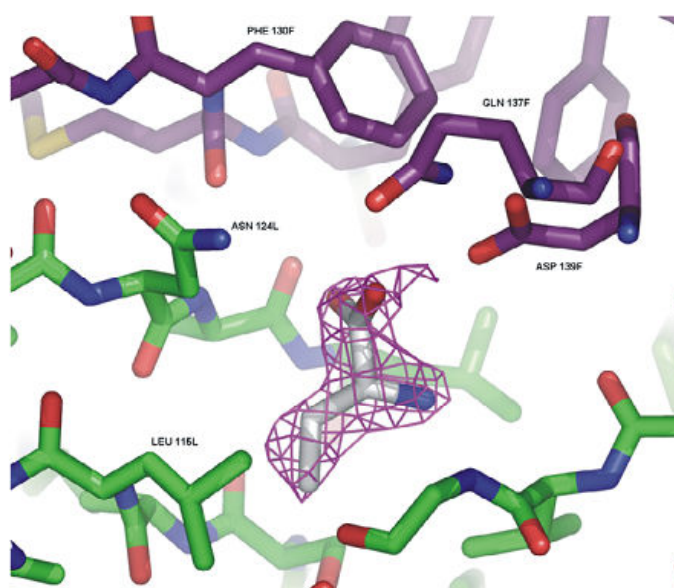


Figura 4 – Sítio de localização do Abu com sua densidade eletrônica. Adaptado de Delatorre et al., 2007

1.2.5.3 Simbiose com Bactérias

Lectinas de plantas não são associadas apenas parte do sistema de defesa. Diversas plantas, em particular leguminosas, são conhecidas por estabelecer simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* e gêneros relacionados que são capazes de fixar nitrogênio atmosférico, oferecendo a planta a independência do fornecimento de fertilizante. Esta simbiose é espécie específica: certas espécies de *Rhizobium* só nodulam uma única espécie de leguminosa ou um número limitado.

Estudos demonstraram que a transferência do gene da lectina da ervilha para a raiz de trevo branco permitiu a nodulação de bactérias específicas de ervilha, e que para interação era necessária o sítio de ligação a carboidrato intacto. Este novo aspecto surgiu com a detecção de fatores de nodulação: lipopolissacarídeos que são produzidos pelas bactérias em respostas a estímulos derivados das plantas (flavonóides). Os fatores de nodulação são formados por um esqueleto de resíduos de β -GlcNAc, que seus receptores são lectinas por definição (GABIUS, 2001).

1.2.5.4. Ação direta de lectinas sobre organismos

1.2.5.4.1 Vírus

Diversos trabalhos mostram a ação direta de lectinas sobre diversos organismos. Ainda assim não se tem evidências de sua atividade direta contra vírus de plantas, mas já se observou aumento da quantidade de lectina em folhas de tabaco quando desafiados por vírus do mosaico (OOI; SUN; OOI, 2004), sendo o mesmo observado em batata desafiada pelo vírus X (SCHEGGIA et al., 1988). Já com relação a outros microrganismos, invertebrados e mamíferos, existe uma gama de trabalhos mostrando a ação tóxica de lectina contra seres vivos.

1.2.5.4.2 Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes e pertencentes ao reino Monera. Sua classificação é feita de acordo com a constituição da parede celular em dois grupos: Gram-positivas (+) e Gram-negativas (-). As bactérias Gram-positivas apresentam em sua parede celular polissacarídeos, ácidos tecóicos e peptidoglicanos, enquanto as Gram-negativas apresentam na sua parede celular peptidoglicano, lipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (TRABULSI, 2000), ambas apresentam sítios de ligação para as lectinas.

A parede celular de bactérias não apenas impede qualquer interação entre glicoconjugados de sua membrana e proteínas que se ligam a carboidratos, mas também previne que estas proteínas penetrem no citoplasma. Portanto, caso lectinas tenham um papel de defesa contra bactérias, esse deve ser por um mecanismo indireto, baseados em interações com a parede celular ou glicanos extracelulares, visto que a existência dessa barreira para interagir diretamente com a membrana plasmática. Porém a lectina de *Araucaria angustifolia* (AaL) mostrou provocar danos em bactérias Gram (+) e Gram (-). Ela provocou grande destruição da parede celular ou a formação de poros da Gram (+) *Clavibacter michiganensis* e formação de bolhas ou destruição

de bactérias de *Xanthomonas axonopodes* pv. *passiflorae*, Gram (-), comparados com o controle (SANTI-GADELHA et al., 2006).

Outro mecanismo de defesa indireto é o bloqueio dos movimentos normais da motilidade de bactérias na interface ar-água da lectina de *Datura stramonium* (BROEKAERT; PEUMANS, 1986). Neste caso, o bloqueio da motilidade da bactéria *in vitro* estava relacionada com uma rápida e específica liberação da lectina pelo tegumento e epiderme da semente (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Contra-atacando o movimento quimioestático de bactérias do solo para sementes em germinação, a lectina pode prevenir a invasão de raízes em germinação por bactérias potencialmente prejudiciais. Diversas lectinas de leguminosas mostraram interagir fortemente com ácido murâmico, ácido N-acetilmurâmico, e muramil dipeptídeos, justificando o potencial dos estudos de lectinas com bactérias (AYOUBA et al., 1994).

1.2.5.4.3 Fungos

Em virtude da especificidade, lectinas ligantes a quitina parecem ter um papel na defesa das plantas contra fungos (e insetos). Prova importante foi obtida quando demonstrado que a lectina de *Urtica dioica*, que não está ligada com sítio quitinásico, inibiu o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Trickoderma kamatum* e *Plykomyces blakesleeanus* (BROEKAERT et al., 1989). Um possível mecanismo, neste caso, é o distúrbio da síntese ou deposição de quitina (VAN PARIJS et al., 1992). Considerando os efeitos da lectina da *U. dioica* sobre a parede celular e a morfologia das hifas do fungo, acredita-se que a lectina está envolvida na colonização dos rizomas pelas endomicorrizas. Tal papel estaria de acordo com a localização da lectina nas sementes e rizoma (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Diversas lectinas apresentam atividade antifúngica e um grupo importante destas proteínas, merolectinas, possui um sítio de ligação à quitina. Heveína é um exemplo deste grupo, extraída do látex de árvore da borracha (*Hevea brasiliensis*), possui um atividade antifúngica comparada a da urtiga (VAN PARIJS; BROEKAERT, WF GOLDSTEIN; PEUMANS, 1991). Outra proteína desse mesmo grupo é a lectina da semente de *Amaranthus caudatus*, que possui uma atividade antifúngica mais potente, mas ainda incapaz de matar o fungo (BROEKAERT et al., 1989).

As únicas lectinas de plantas com marcada atividade fungicida são as quimerolectinas pertencentes à classe I de quitinases (demonstrado *in vivo* e em plantas transgênicas), porém a ação antifúngica reside no domínio catalítico e não no de ligação a carboidrato (COLLINGE et al., 1993).

1.2.5.4.4 Insetos

As células ao longo do epitélio do trato digestório de insetos fitófagos estão expostas diretamente ao conteúdo da dieta e, portanto, são possíveis alvos para proteínas de defesa de plantas. Como glicoproteínas são os maiores componentes dessa membrana, o lúmen do intestino é literalmente coberto por sítios potenciais para lectinas da dieta. Bem como a camada peritrófica, que é alvo de lectinas ligantes à quitina e também as enzimas glicosiladas que são liberadas no lúmen do tubo digestório. A ligação da lectina aos receptores glicoprotéicos pode causar efeitos no inseto como repelência, retardo do crescimento ou morte ao alterar suas funções digestórias, protetoras e secretoras do intestino (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Todavia, é bastante óbvio que para ligar às estruturas do intestino, células, enzimas glicosiladas ou qualquer outro componente do inseto, as lectinas obtidas na dieta devem ser refratárias à ação proteolítica de enzimas e encontrar no ambiente condições satisfatórias de pH e temperatura para exercer seus efeitos (VASCONCELOS, I.M., OLIVEIRA, 2004).

Diversas lectinas mostraram ter efeito sobre insetos, como as lectinas de *Myracrodruon urundeuva* que possuem atividade termicida contra *Nasutitermes corniger* e também atividade larvicida contra L4 de *Aedes aegypti* (SÁ et al., 2008, 2009). Outro exemplo importante mostrou que GNA e ConA, quando incluídas em dieta artificial da larva de *Lacanobia oleracea*, acumulam no intestino, túbulos de Malpighi e hemolinfa, indicando quanto as duas lectinas foram internalizadas e distribuídas sistemicamente depois de se ligarem à glicoproteínas do trato digestório do inseto (FITCHES et al., 2001).

1.2.5.4.5 Animais superiores

Como nos insetos, as células epiteliais ao longo do trato digestório dos mamíferos são totalmente expostas ao conteúdo da dieta. Pode se esperar, então, que as plantas desenvolveram proteínas de defesa contra predadores para este sítio de ação. Como as células do lúmen do trato digestório são totalmente cobertas por glicoproteínas e mucinas glicosiladas, existem incontáveis sítios de ligação para as lectinas da dieta. Levando em consideração a diversidade das lectinas e sua especificidade por glicanos animais, pode-se supor que estas proteínas protegem as plantas de animais predadores.

Um importante exemplo de lectina bem estudada quanto sua toxicidade para mamíferos e seres humanos é a PHA. Esta lectina quando ingerida é altamente resistente a proteases do trato digestório, se liga a células com borda em escova do intestino onde é rapidamente endocitada.

Quando a lectina entra na célula, ela induz a um aumento da atividade metabólica que eventualmente leva a uma hiperplasia e hipertrofia do intestino delgado (PUSZTAI, 1991). Além disso, ingestão de PHA ou feijões mal cozidos causa forte náusea seguido de vômito e diarreia. Os efeitos severos de PHA ilustram o potencial de lectinas na proteção contra predadores. A presença de lectinas tóxicas em sementes e órgãos vegetativos pode ser uma adaptação evolutiva. Apesar da presença de lectinas tóxicas não protegerem completamente a semente ou partes da planta do consumo, o efeito de afastar o animal pode ser benéfico para a sobrevivência de espécies.

1.2.6 Aplicação Biotecnológica

Os carboidratos, que são exclusivamente encontrados na monocamada externa de membranas plasmáticas das células animais, interagem ora com proteínas (glicoproteínas), ora com lipídios (glicolipídios), formando uma estrutura denominada glicocálice. O glicocálice é importante na adesão e reconhecimento celular, na determinação de grupos sanguíneos, entre outras funções.

A composição de carboidratos varia dentre os tipos celulares e a capacidade de lectinas interagirem especificamente com certos glicanos, bem como sua grande diversidade, coloca essas proteínas como importantes ferramentas de interação celular e o desencadeamento de reações biológicas. Hoje, a aplicação de lectinas em diversos modelos é uma realidade.

1.2.6.1 Identificação Celular

Nos últimos anos, novas tecnologias têm estabelecido *DNA arrays* para distinguir diferentes tipos de células, através do perfil da expressão de genes. No entanto, o fenótipo das células não é apenas determinado pela expressão de genes. Acredita-se que mudanças pós-traducionais por glicosilação e regulação da localização da proteína são essenciais para determinar a identidade de um tipo particular de célula em um dado estágio de diferenciação. Portanto, células diferentes poderiam ser distinguidas através do perfil de glicanos em sua superfície. O uso de um painel de lectinas com diferentes especificidades seria o meio mais conveniente e efetivo para alcançar o perfil de glicanos. O desenvolvimento de uma nova biblioteca de lectinas irá expandir grandemente a utilização de lectinas e irá permitir que a identificação celular se torne mais acurada e confiável (YIM; ONO; IRIMURA, 2001).

1.2.6.2 Adesão celular e liberação de mediadores químicos

Na biologia celular, lectinas tóxicas são ferramentas potentes para selecionar variações de células resistentes e poder identificar defeitos genéticos da maquinaria de glicosilação. Como substâncias modelos para induzir agregação celular e adesão, sua capacidade de se ligar a células permite a realização de ensaios com inibidores sintéticos como glicodendrimeros para dissecar as cascatas de sinalização relevantes para estes processos de glicosilação, o mesmo foco pode ser atribuído para as lectinas mitogênicas no estudo dos mecanismos moleculares do controle proliferativo e na liberação dos mediadores químicos. Nessa ocasião, a capacidade de ligação cruzada das lectinas, que formam redes ordenadas com ligantes (células, glicoconjugados), é vital para realizar a inicialização da cascata de reação. Em ativando células imunológicas, induzindo apoptose ou modulando a liberação de citocinas destas células, as lectinas de plantas funcionam efetivamente como modificadores da resposta biológica. O uso de lectinas imunomodulatórias não deve se traduzir automaticamente para o benefício clínico. Existe risco da aplicação de lectinas desde sua utilização em plantas de consumo e seus efeitos em longo prazo para humanos, e a nível ecológico. De fato, células que respondem ao efeito mitogênico de lectinas, podem incluir células cancerígenas, bem como a ativação de células imunológicas pode levar a liberação de fatores de crescimento e alterar o padrão de crescimento de tumores (RÜDIGER; GABIUS, 2001).

1.2.6.3 Transporte nuclear

Uma aplicação intrigante de lectinas na biologia celular e análise de glicanos vem da detecção da O-GlcNAcilação de proteínas citoplasmáticas do núcleo por WGA (SHANE; pHART, 1999). As proteínas de gramíneas detectam esse tipo especial de O-glicosilação. Suas aplicações permitem, além do monitoramento das mudanças dinâmicas na extensão dessa modificação, o estudo de bloqueio para inferir o papel desse açúcar no transporte intranuclear. (RÜDIGER; GABIUS, 2001).

1.2.6.4 *Drug Delivery*

A maioria das proteínas membranares e muitos lipídios da membrana plasmática são glicosilados, e esses glicanos são sítios para a ligação de lectinas. A combinação de um pequeno número de açúcares pode produzir uma grande variedade de diferentes estruturas químicas. Diferentes células expressam uma gama diferente de glicanos e em particular “células doentes”, como células transformadas ou cancerígenas, geralmente expressam diferentes glicanos

comparados com suas correspondentes células normais. Portanto, lectinas podem ser utilizadas como moléculas carreadoras para endereçar drogas especificamente para diferentes células e tecidos. (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004).

Existe uma alta especificidade na interação lectina-glicoconjugado. Em virtude disso, as lectinas podem ser usadas como moléculas de endereçamento para glicoconjugados específicos de tumor. Estas proteínas podem ser conjugadas com uma série de agentes que devem ser levados para células de tumor. Estes podem incluir (1) drogas tumorílicas (2) radioisótopos como ¹²⁵I e ⁶⁷G para rádio imagem (*scintiscan*) e (3) antioxidantes fotoativados para terapia fotodinâmica (MODY; JOSHI; CHANEY, 1995).

1.2.6.5 Isolamento de células e transplante de medula óssea

PNA (aglutinina do amendoim) é uma lectina com especificidade para Gal β 3GalNAc, conhecido como antígeno T, presentes em O-glicoproteínas. Essa proteína mostrou a capacidade de selecionar subpopulações de timócitos, ela aglutina timócitos corticais imaturos, mas não os timócitos medulares maduros. As células maduras apresentam, na superfície de carboidratos, ácido siálico, o que impede a interação com lectina, sua remoção enzimática restitui a aglutinação como nas células imaturas que não possuem esse açúcar. Essa propriedade também foi vista com a SBA (aglutinina da soja), que é capaz de remover, em meios a células da medula óssea, as células responsáveis pela doença do enxerto contra hospedeiro transfusional, possibilitando assim a transfusão de medula óssea segura para crianças com imunodeficiência combinada severa (SHARON, 2007).

1.2.6.6 Eventos de Vasculares

Selectinas são componentes essenciais para o recrutamento de leucócitos nos processos inflamatórios. Devido ao domínio lectínico presente nas selectinas, Assreuy e colaboradores (1997) investigaram o potencial anti-inflamatório de lectinas. Foi demonstrado que algumas lectinas glicose-manose ligantes de sementes de *Diocleinae* inibiram a migração de linfócitos e o edema em patas de rato induzidos por carragenana (ASSREUY et al., 1997). As lectinas podem possuir também atividade pró-inflamatória, inclusive a mesma lectina pode possuir as duas atividades caso se mude a via pela qual é aplicada no animal (MOTA; CRIDDLE, 2006). Em decorrência destes estudos outros foram realizados e já se pode observar que as lectinas também apresentam efeitos vasodilatador (ASSREUY et al., 2009) e anticonceptivo (HOLANDA et al., 2009).

1.2.6.7 Agricultura – transgênicos

Lectinas possuem um papel defensivo nas plantas em resposta ao ataque de herbívoros e patógenos e ocorrem naturalmente em centenas de espécies (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). A atuação das lectinas contra espécies predadoras de plantas é alvo de pesquisa por todo mundo. Genes que codificam lectinas são, portanto, candidatos de particular interesse para expressão em culturas vegetais transgênicas. Por engenharia genética, genes de lectinas foram inseridos nessas culturas para proteção contra insetos (HOGERVORST, 2006) incluindo GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*), lectina da folha do alho (ASAL), lectina da ervilha (p-lec), WGA, jacalina e lectina do arroz (LEGASPI; LEGASPI; SÉTAMOU, 2004; SAHA, P., MAJUMDER, P., DUTTA, I., RAY, T., ROY, S.C., DAS, 2006; SCHULER et al., 1998). Provavelmente, a lectina mais largamente estudada é a GNA. Seu gene foi introduzido com sucesso em diversas culturas (GATEHOUSE; SL; QUISENBERRY, 1999; LEGASPI; LEGASPI; SÉTAMOU, 2004). Estas plantas mostraram ser parcialmente resistentes aos insetos sugadores de floema, indicando que GNA é transportado para o floema. Exemplos incluem tabaco (YUAN et al., 2001), batata (DOWN et al., 1996; GATEHOUSE et al., 1996), trigo (STOGER et al., 1999), e arroz (FOISSAC et al., 2000; RAO et al., 1998; SUN; WU; TANG, 2002; WU et al., 2002). Além de insetos, ela já mostrou aumentar resistência contra nematoides em *Arabidopsis thaliana* transgênica (RIPOLL et al., 2003).

Estes são apenas alguns exemplos de estudos envolvendo lectinas. Uma família desta classe proteica se destaca nestas variadas pesquisas. As lectinas de *Leguminosae*, em especial exemplares da subtribo *Diocleinae*, foram aplicados em inúmeros outros modelos experimentais como, produção *in vitro* de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999) prevenção de cistite hemorrágica (ASSREUY et al., 1999), induzir apoptose (CAVADA et al., 2001) efeito antidepressivo em camundongos (BARAUNA et al., 2006), atividade tipo insulina (CAVADA et al., 2003) proteção de camundongos infectados por *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETTO et al., 1996). Estes exemplos e inúmeros outros demonstram o grande valor científico destas proteínas, o que impulsiona estudos funcionais e estruturais desse grupo.

1.2.7 Lectinas de Leguminosas

Diversas lectinas de leguminosas de diferentes subordens e tribos foram isoladas, a maioria de sementes. Apesar de diferirem na especificidade por açúcar, essas lectinas se assemelham nas suas propriedades físico-químicas. Elas usualmente consistem de duas subunidades (25-30 kDa), cada uma com um sítio de ligação a carboidrato. Interação com carboidratos requer uma ligação firme com Ca^{2+} e Mn^{2+} (ou outro metal de transição). As

sequências das lectinas exibiram uma marcante homologia, com um número significativo de invariantes resíduos de aminoácidos, entre eles, os envolvidos na ligação ao metal (SHARON; LIS, 1990).

1.2.7.1 Estrutura

1.2.8.1.1 Monômero e suas interações

Não surpreendentemente, a estrutura do monômero da lectina de leguminosa é altamente conservada e uma característica adicional importante, que parece ser comum a todas lectinas de leguminosas, é que o monômero *per si* carrega em sua estrutura todas as características necessárias para o reconhecimento do ligante. Isto significa que a oligomerização transmite para estas lectinas a especificidade fina necessária para sua atividade biológica, e ainda fornece a estabilidade estrutural geral para a macromolécula (REDDY et al., 1999).

O monômero consiste de duas folhas betas pregueadas na qual a região que se liga a carboidrato se insere. A mesma arquitetura e topologia é encontrada em uma variedade de proteínas que reconhecem carboidratos. A topologia do *fold* da lectina de leguminosa é complexa e estruturalmente relacionada à topologia conhecida como *jelly-roll*, comumente encontrado em proteínas virais de capsídeos (LORIS et al., 1998). O *jelly-roll* foi primeiramente descrito na ConA. Cada unidade do monômero consiste de uma folha β plana com seis fitas na parte de trás da molécula, uma folha β curvada com sete fitas, e, no topo, possui uma pequena folha β com cinco fitas. Dois núcleos hidrofóbicos estabilizam essa estrutura (Figura 5). O primeiro deles está entre as três folhas β , e o segundo se localiza entre a folha β da frente com as alças que conectam as fitas desta folha (BANERJEE et al., 1996).

O fato de essas proteínas serem oligoméricas e capazes de formar dímeros e tetrâmeros está relacionado ao seu potencial em aglutinar celular e precipitar carboidratos multivalentes. Uma unidade monomérica extremamente conservada pode se oligomerizar em uma variedade de formas, tornado essas proteínas alvo no estudo de interação proteína-proteína. Além disso, a estrutura quaternária está relacionada com a atividade, como foi mostrado para uma variedade de lectinas: um arranjo homogêneo altamente ordenado de uma mistura de carboidratos e lectinas, resultando numa forma superior que não se pode atingir no nível de monômeros (LORIS et al., 1998).

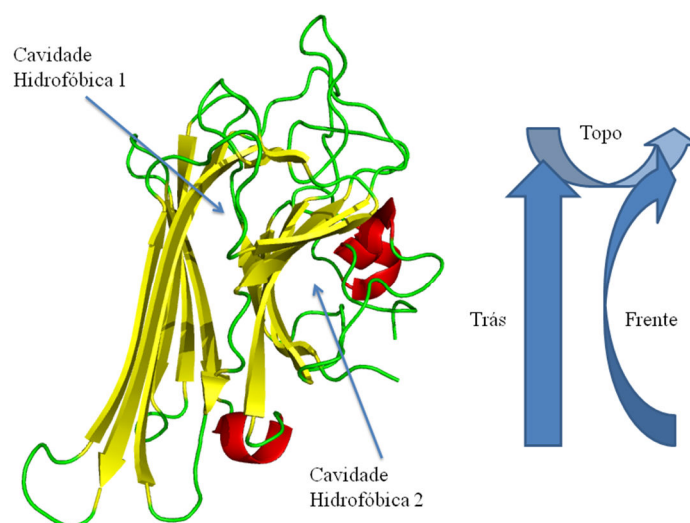


Figura 5 – Partes do monômero de lectinas de leguminosas. Estrutura que indica a localização das cavidades hidrofóbicas e modelo esquemático demonstrando o posicionamento de folhas betas na estrutura monomérica. Baseada em Sinha e colaboradores (2007).

A capacidade de lectinas de leguminosas se ligarem a carboidratos depende simultaneamente da presença do cálcio e do metal de transição. Estes sítios de ligação a carboidrato foi primeiramente descritos e detalhados na concavalina A (HARDMAN; AGARWAL; FREISER, 1985) e é altamente conservado na estrutura de outras lectinas de leguminosas. O cálcio e o metal de transição estão distanciados aproximadamente por 4,5 Å (no caso da ConA) e dois resíduos de aspartato fazem uma ponte (Figura 6) entre eles (LORIS et al., 1998). Os resíduos envolvidos nesse sítio são Glu₈, Asp₁₀, Tyr₁₂, Asn₁₄, Asp₁₉, His₂₄, Val₃₂, Ser₃₄, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈.

A ligação ao íon metálico induz uma lenta transição da conformação da proteína para um estado dito fechado porque aumenta a afinidade dos dois metais pela proteína (KOENIG; BREWER; BROWN, 1978). A alta energia de ativação desse processo é provavelmente devido à isomerização da ligação peptídica entre os resíduos Ala₂₀₇ e Asp₂₀₈. Esta ligação possui a conformação trans- em ConA desmetalizadas (BOUCKAERT et al., 1999), mas adota conformação não usual cis- na proteína nativa. Esta isomerização ocorre com a concomitante formação do sítio de ligação a carboidrato e a presença destes íons é essencial para o correto empacotamento e arranjo interno do sítio do carboidrato para reduzir os custos entrópicos restringindo a mobilidade do contato do ligante (RÜDIGER; GABIUS, 2001). Os íons, mesmo não participando diretamente na interação com o ligante, têm o papel de estabilizar as regiões de ligação ao metal e de ligação ao carboidrato (BOUCKAERT et al., 2000). Os dois domínios estão

interligados, uma molécula de água que faz ponte de hidrogênio com o cálcio realiza outra com a Asp₂₀₈ (LORIS; HAMELRYCK; BOUCKAERT, 1998).

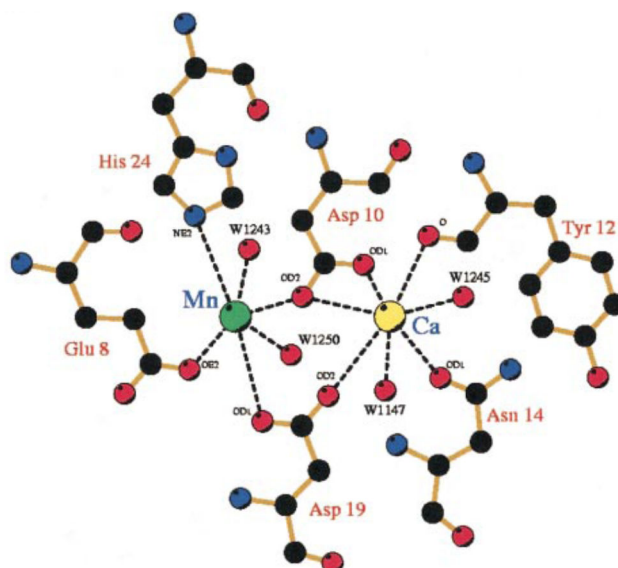


Figura 6 – Ponte de aspartato ligando o Ca^{2+} e o metal de transição (Mn^{2+}) presente nas lectinas de leguminosas. Reproduzido de: (WAH et al., 2001). Átomos são representados por esferas ligados por linhas. Linhas tracejadas mostram os contatos polares.

O sítio de ligação a carboidratos também é altamente conservado em lectinas do tipo ConA. Os resíduos de aminoácidos que interagem com os açúcares nas lectinas de *Diocleinae* são conservados e, normalmente, realizam a formação de cinco a oito pontes de hidrogênio com os carboidratos (HAMODRAKAS et al., 1982). No entanto, a lectina da semente de *Camptosema pedicellatum* (CPL) é a primeira (e até então única) a apresentar uma mutação pontual no subsítio hidrofóbico do CRD das lectinas desta subtribo. A modificação se encontra na posição 99, temos então que os resíduos de aminoácidos envolvidos neste domínio são: Asn₁₄, Leu₉₉ (Val₉₉ para CPL), Tyr₁₀₀, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ (TEIXEIRA et al., 2006).

O CRD é o sítio representativo das lectinas, mas este não é o único sítio de ligação existente. Lectinas de leguminosas tem a habilidade de reconhecer ligantes distintos dos seus carboidratos específicos. Estas proteínas exibem uma variedade de sítios de ligação com características e habilidades distintas, incluindo o reconhecimento de moléculas como hormônios, ácidos nucleicos e aminoácidos não-naturais (BABOSHA, 2008; DELATORRE et al., 2007; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983a). Estes sítios podem estar localizados na superfície proteica, como no caso do CRD, mas também podem estar em cavidades. Estas, por vezes, são formadas pela associação dimérica e tetramérica (DELATORRE et al., 2007).

Toda lectina de leguminosa é encontrada na forma de um dímero ou de um tetrâmero formado por dímeros. A oligomerização entre as lectinas diméricas ou tetraméricas é mediada principalmente por suas interações da folha β plana da parte de trás, que interagem entre diferentes subunidades pra produzir diferentes tipos de interfaces.

A primeira lectina que a estrutura foi resolvida foi a ConA (EDELMAN et al., 1972). Esta lectina forma dímeros de dímeros, e sua dimerização ocorre pela associação lado-a-lado da folha β plana de seis fitas, formando uma folha β contígua de 12 fitas. Subsequentemente, outras lectinas de leguminosas apresentaram uma associação dimérica similar e, por isso, esta associação passou a ser conhecida como canônica ou Tipo II em modelos de dimerização em lectinas de leguminosas. Posteriormente, diferentes tipos de associação dimérica foram descobertas, todas elas envolvem associações de empacotamento costa com costa (tipo X) pela sobreposição das folhas β planas de seis fitas. As variações dessas interfaces (X1-X5) representa, as diferenças angulares, φ , entre as duas folhas β que estão em contato (SINHA et al., 2007).

1.2.7.1.2 Estrutura quaternária

A maioria das lectinas de leguminosas possui uma estrutura denominada de dímero canônico. É caracterizado por uma larga folha beta com 12 fitas, resultado da associação do verso de duas folhas betas com 6 fitas cada. No entanto, existem lectinas diméricas de estrutura conhecida que não formam o dímero canônico, como as lectinas de *Erythrina corallodendron* (SHAANAN; LIS; SHARON, 1991) e de *Griffonia simplicifolia* (DELBAERE et al., 1993). Em diversas espécies, os dímeros se associam formando uma estrutura quaternária tetramérica. A formação deste arranjo pode ser dependente do pH da solução, como ocorre para a estrutura da ConA, esta proteína apresenta um dímero em pH abaixo de 5,0 e um tetrâmero em pH neutro ou básico formado pela associação de dois dímeros (BOUCKAERT et al., 1995).

Os tetrâmeros, como dímeros de dímeros, são originados e estabilizados por combinações das interfaces diméricas. Os diferentes tipos de estruturas de lectinas de leguminosas são formados pelos sete tipos de interfaces diméricas compreendendo as estruturas tipo canônica (dímero de tipo II), tipo ECor1 (dímero de X3), tipo GS4 (dímero de X4), tipo DB58 (dímero de X1), tipo DBL (lectina de semente de *D. biflorus* – tetrâmero de tipo II+X1), estrutura quaternária aberta de PNA (interface incomum de tipo II+X4), tipo GS1 (interface incomum de X4) tipo arcelina-5 (monômero) (BRINDA; SUROLIA; VISHVESHWARA, 2005).

Além dessas associações quaternárias, a estrutura da lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA) apresenta um arranjo diferente formado pelos seus dímeros tipo GS4. PNA e GSL apresentam a mesma configuração espacial, com arranjos angulares bem semelhantes nos

monômeros, porém ocorre uma grande discrepância na associação dos dímeros. O alinhamento da sequência envolvida na interface costa-com-costa de GS4 mostra uma grande identidade da LTA com PNA e em uma extensão bem menor de identidade delas com a GS4. Esta pode ser uma razão para a discrepância angular. Outro aspecto importante que pode ter provocado essa discrepância é a glicosilação que ocorre na Asn₄, localizada próxima a interface de contato dos monômeros, podendo influenciar nas diferenças no arranjo molecular de dímeros tipo GS4 de LTA e de dímeros tipos GS4 de GSA, enquanto nos monômeros de GSA a glicosilação ocorre no resíduo Asn₁₈. O dímero de LTA tipo GS4 é uma associação de fitas β de monômeros adjacentes e sua interface dimérica é estabilizada por pontes de hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre as alças dos monômeros A/C e B/D (Figura 7). As duas interfaces de contato foram descritas como uma nova interface dimérica na LTA (MORENO et al., 2008).

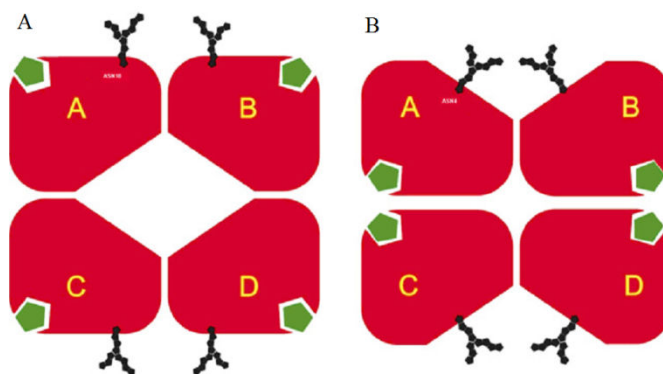


Figura 7 – Representação esquemática da associação dimérica das lectinas GSL e LTA. As caixas vermelhas representam o monômero lectínico, pontos pretos representam os padrões de glicosilação e caixas pretas representam domínios de ligação a carboidratos. A – Representação da interface de dímeros costa-com-costa de GSL. B - representação do tetrâmero de LTA. Adaptado de Moreno e colaboradores (2008).

Operações de simetria permitem colocar os dímeros de LTA no mesmo arranjo da GSL, mas para isso a orientação do glicano da LTA deveria ser para o centro do tetrâmero, o que é incomum em lectinas de leguminosas. Além disso, há restrições estéricas para acomodar todos esses glicanos no centro e o fato do ambiente favorável para glicanos exposto ao solvente contribui para o seu posicionamento proposto. Portanto, a diferença observada entre esse novo arranjo quaternário e outras lectinas de leguminosas é provocada por características intrínsecas da estrutura primária da LTA (MORENO et al., 2008).

1.2.7.1.3 Relação estrutura-função

Lectinas da subtribo *Diocleinae* de leguminosas estão intimamente relacionadas filogeneticamente, apresentando pequenas diferenças em posições cruciais da estrutura primária, e o impacto dessas mudanças estruturais tem sido demonstrado através de vários ensaios biológicos (BEZERRA et al., 2011, 2013; CAVADA et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2011; NÓBREGA et al., 2012; ROCHA et al., 2011; SANZ-APARICIO et al., 1997). A diversidade da estrutura primária em posições estratégicas ao longo da interface dímero-dímero de lectinas de leguminosas de relações filogenéticas próximas pode influenciar nas diferenças na tendência de oligomerização pH-dependente das lectinas de *Diocleinae*. Esta característica, por sua vez, pode modular a capacidade de lectinas de se ligar e agregar específicas glicoproteínas e glicolipídios receptores da superfície celular e isto pode suportar a distinta capacidade de acionar respostas celulares. Além disso, diferenças espaciais entre sítios de reconhecimento a carboidrato de lectinas tetraméricas homólogas de *Diocleinae* combinado com diferentes distâncias entre epítomos cognatos de ligantes multivalentes pode conferir distintas especificidades/afinidades para estruturas primárias idênticas de carboidratos nos mesmos ou diferentes tipos celulares (CALVETE et al., 1999).

Distâncias entre os resíduos principais que compõem o CRD definem a sua forma e, por conseguinte, o volume de cada domínio. Estes fatores afetam diretamente o reconhecimento da lectina ao carboidrato e a sua capacidade para induzir efeitos biológicos (BEZERRA et al., 2011, 2013; CAVALCANTE et al., 2011). Não somente os resíduos que fazem parte integralmente do CRD influenciam na capacidade do reconhecimento deste domínio. A posição 205 na sequência das lectinas de *Diocleinae* foi apontada como determinante para definir a orientação e intensidade na afinidade por carboidratos em *Canavalia* (GADELHA et al., 2005) e como um modulador do vasorelaxamento em *Dioclea violacea* e *D. rostrata* (BEZERRA et al., 2013).

Além do formato e volume do CRD, a proporção entre as formas diméricas e tetraméricas de lectinas em solução influenciadas pelo pH (oligomerização dependente do pH) refletem diferenças na associação de monômeros que podem afetar diretamente a atividade biológica das lectinas. Mais especificamente, a orientação relativa do CRD na estrutura tetramérica afeta o arranjo espacial dos sítios de ligação a carboidratos e determina a capacidade da lectinas em distinguir sacarídeos e ligar-se a glicoconjugados de superfície celular.

1.2.8 Lectinas de *Diocleinae*

As lectinas de leguminosas da subtribo *Diocleinae* são proteínas altamente similares, mas que apresentam significativas diferenças na potência e eficácia das suas atividades biológicas (DELATORRE et al., 2006). Como exemplo, mesmo diferindo em apenas três resíduos de aminoácidos, *Canavalia gladiata* (CGL) e *C. maritima* (ConM) apresentam padrões diferentes em diversas atividades, como no relaxamento da aorta (ASSREUY et al., 2009). Apesar das atividades serem bem documentadas, pouco se sabe sobre os receptores que eles interagem e como ocorre. A estrutura cristalina de muitas lectinas de plantas revelou como elas especificamente reconhecem ligantes carboidratos e nos dá uma direção para elucidar os mecanismos de ação (LIS; SHARON, 1998).

Essas lectinas apresentam sítios de ligação conservados para trimanosídeos de N-oligossacarídeos, mas possuem diferentes especificidades para complexos de carboidratos biantenados (DAM et al., 1998). Essas diferenças refletem inúmeras evidências que mostram como lectinas homólogas apresentam inúmeras mudanças quanto a intensidade de fenômenos biológicos como a proliferação de linfócitos e produção de interferon γ (BARRAL-NETTO et al., 1996), estimulação de macrófagos peritoneais e reação inflamatória (RODRIGUEZ et al., 1992), indução do edema de pata e migração de células no peritônio de ratos (BENTO et al., 1993), liberação de histamina de mastócitos do peritônio (GOMES et al., 1994), e relaxamento da aorta (ASSREUY; FONTENELE, 2009). A liberação de histamina pode estar relacionada à afinidade relativa aos complexos de carboidratos biantenados (DAM et al., 1998). As lectinas de *Diocleinae* caracteristicamente apresentam equilíbrio dímero-tetrâmero dependente do pH. Se especula que apenas a forma tetramérica é habilitada para realizar a ligação cruzada entre receptores de membranas de células e acionar a transdução de sinal de um evento biológico.

1.2.8.1 Lectina da semente de *Canavalia grandiflora* Benth

Canavalia grandiflora Benth pertence à família das leguminosas, mais precisamente a subtribo *Diocleinae*. O gênero é composto de vinhas que normalmente possui flores luminosas que são polinizadas por insetos como abelhas. São plantas de origem tropical com espécies usadas na agricultura como plantas forrageiras, como o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) enquanto outras estão ameaçadas de extinção.

Ceccato, em 2002, fez a caracterização bioquímica parcial da lectina de *Canavalia grandiflora* Benth (ConGF). A lectina foi isolada em Sephadex G-50, eluída com glicose 0,1 M, e apresentou perfil eletroforético de lectinas do mesmo gênero, como a ConBr, apresentando cadeia α e fragmentos β e γ . A ConGF mostrou atividade hemaglutinante por eritrócitos de

coelhos nativos e sangue humano tipo A tratado com tripsina. A atividade hemaglutinante em eritrócitos de coelho foi inibida por manose, α -D-metil-manopiranosídeo, 1-o-metil- α -D-glicopiranosídeo e glicoproteínas: mucina suína e bovina e lactotransferina bovina. A composição de aminoácidos revelou alto teor de ácido aspártico, serina e leucina, e não se detectou metionina e cisteína. E a sequência parcial de aminoácidos e nucleotídeos mostrou alta homologia estrutural com as outras sequências de aminoácidos de *Diocleinae* (CECCATTO et al., 2002).

Algumas aplicações biológicas foram atribuídas à lectina desta espécie, como seu efeito modulador de eventos essenciais da inflamação. A lectina de *Canavalia grandiflora* (ConGF), possui efeitos anti-inflamatório e analgésicos, mediados por IL-1, TNF- α , provoca redução do rolamento e adesão de leucócitos, e, conseqüentemente, redução do tráfico de neutrófilos. Os resultados tornam a ConGF importante alvo para novas terapias anti-inflamatórias e analgésicas (NUNES et al., 2009).

CLASSIFICAÇÃO

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Fabaceae*

Subfamília: *Faboideae*

Gênero: *Canavalia*



1.2.8.2 Lectina da semente de *Cymbosema roseum* Benth (CRLI)

Cymbosema roseum (membro da família *Leguminosae* pertencente a subtribo *Diocleinae*) possui duas lectinas caracterizadas com afinidades distintas extraídas de suas sementes, CRLI e CRLII, uma proteína ligante à manose e lactose, respectivamente (CAVADA et al., 2006; ROCHA et al., 2009). Especificamente em relação à CRLI, experimentos de calorimetria de titulação isotérmica determinam que esta se ligue aos oligossacarídeos de manose, sendo capaz de reconhecer a estrutura do núcleo de trimanosídeo de oligossacarídeos N- ligados, estruturas de *high*-manose (como a oligomanose Man5) e um complexo biantenado (ROCHA et al., 2011).

A sequência da lectina CRLI é composta de 237 resíduos de aminoácidos com um pI calculado em 5.1 e uma massa molecular de 25,326 Da, confirmada por espectrometria de massa (MALDI-ToF). A sequência é altamente similar às outras purificadas a partir do gênero

Canavalia e *Dioclea* (mais de 90%) (ROCHA et al., 2011). Em determinadas atividades, CRLI exibe efeitos distintos dependendo da rota de administração usada, mostrando efeitos pró-inflamatórios pela injeção local (modelo do edema de pata) e efeitos anti-inflamatórios quando usada injeção sistêmica. O envolvimento de domínio da lectina é sugerido no efeito da CRLI, pois ambas as atividades pró- ou anti-edematogênicas foram revertidas pela associação da lectina com seu açúcar ligante (ROCHA et al., 2011).

CLASSIFICAÇÃO

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Fabaceae*

Subfamília: *Faboideae*

Gênero: *Cymbosema*



1.2.8.3 Lectina da semente de *Dioclea sclerocarpa* Ducke

Extratos proteicos de sementes *Dioclea sclerocarpa* apresentam baixo valor de digestibilidade além de alta toxicidade em ratos, estas propriedades devem-se a fatores anti-nutricionais proteicos diferentes da lectina. (GRANT; MCKENZIE; MOREIRA, 1986; GRANT et al., 1995).

A lectina de *Dioclea sclerocarpa* (DSL) é uma proteína ligante a glicose/manose purificada a partir do extrato proteico de sementes de *Dioclea sclerocarpa*. Assim como outras lectinas *Diocleinae*, DSL é um monômero com massa molecular de 25.606 Da, que se associa na forma tetramérica. Sua cadeia α madura é produzida por meio de permutação circular pós-traducional, modificação típica de *Diocleinae*. O polipeptídeo de cadeia α tem 237 aminoácidos e é classificado como uma lectina tipo Con-A com base na sua sequência de aminoácidos primária. A sequência primária de DSL foi determinada por espectrometria de massas *in tandem*, difere apenas por um resíduo da lectina de *D. megacarpa* na cadeia madura. (CORREIA et al., 2011).

CLASSIFICAÇÃO

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

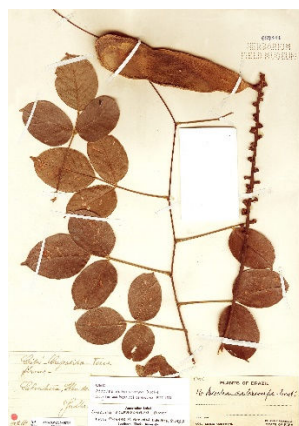
Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Fabaceae*

Subfamília: *Faboideae*

Gênero: *Dioclea*



1.3 VASORELAXAMENTO

1.3.1 O endotélio e os eventos vasculares

Até o início dos anos 80, o endotélio era descrito apenas como uma camada simples de células justapostas que constituíam uma barreira física entre o sangue (compartimento intravascular) e o meio extra vascular, fazendo, portanto, parte da parede dos vasos sanguíneos e da camada mais interna do coração (endocárdio). Do ponto de vista funcional, essa barreira semipermeável tinha por objetivo único possibilitar as trocas de água e íons entre o sangue e tecidos adjacentes através de poros no território capilar.

Em 1980, Furchgot e Zawadiski, estudando a reatividade vascular em pequenos seguimentos em aortas de coelhos, observaram que a aplicação de acetilcolina provocava vasodilatação de seguimentos de aorta somente se o endotélio estivesse intacto. Se o endotélio fosse removido ou danificado (por meio de uma suave raspagem da parede interna do vaso), ocorria constrição do vaso. De maneira brilhante, lançaram a hipótese da existência de uma substância produzida pelas células endoteliais, quando intactas, denominada de Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio (EDRF), que seria a responsável pela vasodilatação associada à estimulação do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Somente em 1987, o EDRF foi quimicamente caracterizado como sendo o óxido nítrico (NO), um gás instável continuamente produzido pelo endotélio. Ainda nas décadas de 80 e 90, foram descobertos outros fatores de relaxamento (como a prostaciclina) ou constrição (como endotelina, angiotensina II), que também eram produzidos pelo endotélio, firmando-se, então, o conceito deste como órgão regulador do tônus vasomotor (LUSHER; BARTON, 1997; VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990).

1.3.2 Produção dos fatores derivados do endotélio

O endotélio controla o tônus da musculatura lisa adjacente em resposta a estímulos fisiológicos e farmacológicos. Esse processo envolve a ativação de um número de receptores da membrana da célula endotelial por diferentes estímulos, a ativação de complexas vias de sinalização intracelular culmina com a síntese e a liberação de substâncias vasoativas (BEHRENDT; GANZ, 2002; LUSHER; BARTON, 1997; VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990; VAPAATALO; MERVAALA, 2001). Dessa forma, o endotélio é considerado um órgão sensor, pois o fluxo do sangue e as substâncias que nele são transportadas (hormônio, ácidos graxos, proteínas, catecolaminas) estimulam receptores específicos da membrana celular das células endoteliais, interferindo sobre sua função.

As várias substâncias (fatores) que são produzidas pelas células endoteliais difundem-se ou são liberadas tanto para o sangue como para as outras camadas do vaso. Dessa forma, elas podem controlar funções das células musculares lisas e das células circulantes que participam das funções regulatórias descritas acima. Dentre os fatores produzidos, destacam-se o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂), o tromboxano (TXA₂), as endotelinas (ET), a angiotensina II (AII), o fator hiperpolarizante do endotélio (EDHF), a bradicinina (Bk), a serotonina, a histamina e os radicais livres de oxigênio, dentre outros (LUSHER; BARTON, 1997; VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990; VAPAATALO; MERVAALA, 2001).

Do ponto de vista da ação do estado de contração (vasomotricidade), o endotélio sintetiza substâncias que promovem a dilatação (fatores vasodilatadores, como o NO) e outras que são vasoconstritores (como endotelina e angiotensina II). De forma geral, os fatores endoteliais que promovem dilatação têm também um efeito de diminuir a agregação plaquetária e a adesão de glóbulos brancos, além de apresentarem um efeito mais prolongado por meio da estimulação de fatores de transcrição que regulam a atividade gênica, promovendo menor crescimento celular. Por outro lado, os fatores endoteliais que promovem constrição dos vasos facilitam ou induzem a adesão plaquetária e adesão de glóbulos brancos, além de exercerem importante estímulo ao processo de crescimento e proliferação celulares através da ativação de outros fatores de transcrição e de modulação gênica (LUSHER; BARTON, 1997; VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990; VAPAATALO; MERVAALA, 2001).

1.3.3 Óxido nítrico e a ativação da eNOS

O óxido nítrico (NO), uma pequena molécula reativa, é um extraordinário bio-regulador. Sua importância biológica foi conhecida apenas a partir da década de 1980. Hoje, NO é

reconhecido como um biomensageiro ubíquo, existente em uma ampla variedade de organismos. Nos mamíferos, NO é utilizado para uma série de funções de sinalização intercelular e intra-celulares, incluindo a dilatação dos vasos sanguíneos, a transmissão do sinal neuronal, a citotoxicidade contra patógenos e tumores, a coordenação do ritmo cardíaco e a regulação da atividade de respiração celular (GROVES; WANG, 2000).

O endotélio está localizado entre o sangue que flui e a parede vascular. As células que revestem a circulação arterial são expostas a forças de fluidos de magnitude muito maior do que aqueles experimentados por outros tecidos de mamíferos. Por conseguinte, as respostas mecanicamente relacionadas controladas pelo endotélio ter evoluído como parte da fisiologia vascular normal, mais notavelmente no controle do tônus vascular, onde os mecanismos responsáveis pela transmissão e transdução de informação hemodinâmica do sangue para a parede do vaso subjacente residem no endotélio (DAVIES, 1995). O ciclo cardíaco provoca a tensão de cisalhamento gerado pelo fluxo sanguíneo e pelo estiramento pulsátil da parede vascular como consequência temos a produção basal de NO endotelial ou "tônus vasodilatador" através estimulado continuado (FLEMING; BUSSE, 2003). Forças mecânicas induzidas pelo fluxo sanguíneo, especialmente a tensão de cisalhamento, determinam a morfologia da célula endotelial e função. As ações da tensão de cisalhamento incluem, além do controle do tônus vascular, a remodelação da parede do vaso, ligação de células sanguíneas ao endotélio e hemostasia (DAVIES, 1995).

Nas células endoteliais vasculares, o NO é produzido pela óxido nítrico sintetase (eNOS). Este gás, quando produzido, atravessa a membrana celular por difusão em uma forma inalterada e rapidamente interagem com geradores cruciais de resposta celular (PARADISE et al., 2010). eNOS pode ser ativada por agonistas da acetilcolina (ACh), bradicinina e substância P (FLEMING; BUSSE, 2003). Eles elicitam o relaxamento (Figura 8) através de um mecanismo dependente de Ca^{2+} extracelular que culminam na ativação pela calmodulina (BUSSE; FLEMING, 1995; LUCKHOFF et al., 1988; SINGER; PEACH, 1982). Neste caso, os receptores ativam a subunidade α da proteína G, seguido da ativação da enzima membrana fosfolipase C. Esta enzima é responsável pela formação do inositol trifosfato, um mensageiro secundário que se difunde rapidamente no citosol e provoca liberação do cálcio no citoplasma ao ligar-se a canais de cálcio presentes no retículo endoplasmático, este Ca^{2+} é o responsável pela ativação da calmodulina (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Logo, um aumento de Ca^{2+} intracelular conduz a um aumento da ligação da calmodulina (CaM) à eNOS, que por sua vez desloca uma alça auto-inibidora e facilita o fluxo dos elétrons a partir de NADPH no domínio redutase para a heme no domínio oxigenase (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012)

No entanto, eNOS também pode ser ativada por estímulos que não produzem aumentos sustentados do Ca^{2+} intracelular, mas ainda induzem a liberação de NO de longa duração (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Dentre estes estímulos, destaca-se o mecanismo independente de Ca^{2+} , como o estresse por cisalhamento. A aplicação desse estresse sobre células endoteliais resulta em uma cascata de reações que promovem a ativação da fosfatidilinositol 3-quinase e a subsequente ativação das serinequinas Akt e proteína quinase A (PKA), que fosforilam a eNOS na posição 1177 (resíduo de serina) e aumentam a atividade da enzima (FLEMING; BUSSE, 2003). A(s) molécula(s) responsável(is) pela mecanotransdução ainda não foi identificada. Até agora, o glicocálice é o melhor candidato. Estudos que envolvem o tratamento de células endoteliais com heparinase e hialuronidase, enzimas que degradam as glicosaminoglicanas heparano sulfato e hialuronan, respectivamente, demonstram uma importante redução na produção de NO induzida pelo estresse de cisalhamento (FLORIAN et al., 2003; MOCHIZUKI et al., 2003). Portanto, indica que tanto o heparano sulfato e hialuronan devem exercer um papel na detecção da força de cisalhamento (REITSMA et al., 2007).

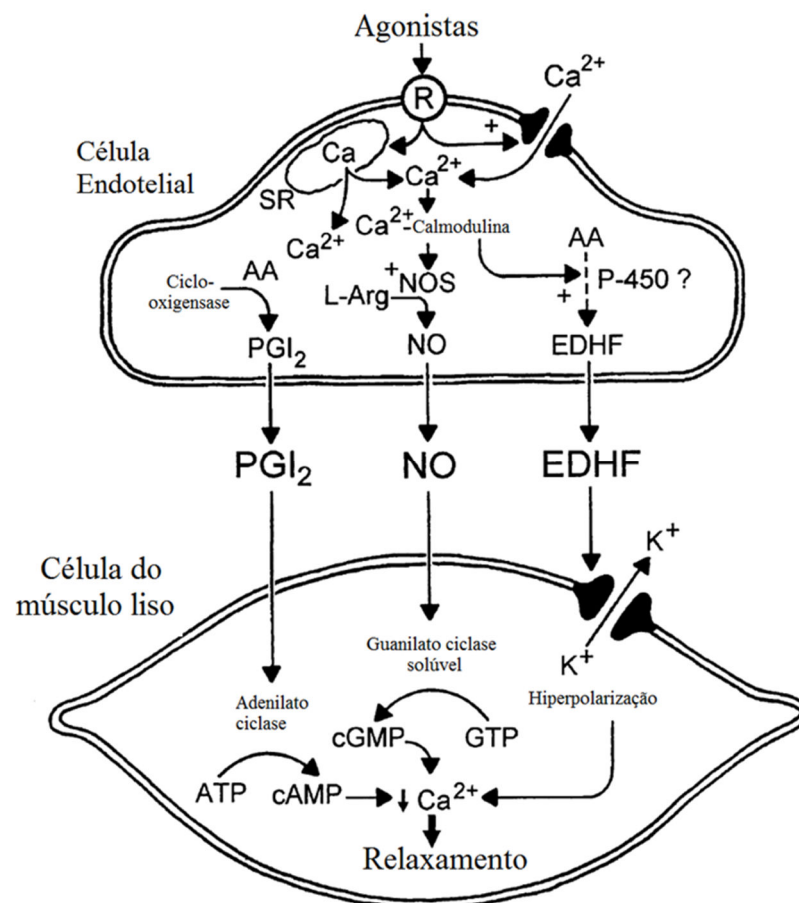


Figura 8 - Liberação dos fatores derivados do endotélio. Ativação do receptor endotelial (R) induz o fluxo de Ca^{2+} para o citoplasma da célula endotelial. Quando agonistas ativam as células do endotélio, um aumento do inositol fosfato (IP_3) pode contribuir para o aumento do Ca^{2+}

citoplasmático pela sua liberação do retículo sarcoplasmático (SR). Seguido de interações com a calmodulina, o Ca^{2+} ativa a óxido nítrico sintetase (NOS) e provoca liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). O aumento do Ca^{2+} também acelera a produção de prostaciclina (PGI₂) a partir do ácido araquidônico (AA) pela ciclo-oxigenase. NO causa relaxamento pela ativação da formação de AMP cíclico através do ATP. EDHF causa hiperpolarização e relaxamento ao abrir canais de K^+ . Qualquer aumento de Ca^{2+} citosólico causa a liberação de fatores de relaxamento (VANHOUTTE, 2004).

1.3.4 Efeitos vasculares de Lectinas

Na superfície das células endoteliais, as glicoproteínas podem funcionar como receptores das lectinas e este fato se torna relevante na ação demonstrada de lectinas no relaxamento de músculo liso da parede de aortas endotelizadas. As lectinas da subtribo *Diocleinae* são proteínas filogeneticamente relacionadas que provocam vasorelaxamento em segmentos de aorta pré-contraídas (ASSREUY *et al.*, 2009; BEZERRA *et al.*, 2011, 2013; GADELHA *et al.*, 2005; NÓBREGA *et al.*, 2012). Esse fato é bem documentado para os gêneros *Canavalia* e *Dioclea*. Muitas lectinas do gênero *Canavalia* exibem efeitos relaxantes em aorta de ratos pré-contraídas e endotelizadas, por exemplo, ConA, ConBr (de sementes de *C. brasiliensis*), CGL (de sementes de *C. gladiata*) e ConM (de sementes de *C. maritima*). Entre essas, a ConBr apresentou a menor habilidade de induzir a produção de óxido nítrico, e este evento foi atribuído ao menor volume de CRD nessa proteína (BEZERRA *et al.*, 2011). As sementes de lectinas do gênero *D. violacea* (DLV) e *D. rostrata* (DRL) exibem atividades de relaxamento de musculatura lisa, mas com importante diferença (43% de relaxamento para a DVL e 96% para a DRL). Apesar da sua grande semelhança estrutural, a DRL apresenta um CRD maior e mais raso que favorece o vasorelaxamento; as diferenças no CRD resultam de variações nas distâncias entre os resíduos-chave presentes no CRD (BEZERRA *et al.*, 2013). Além disso, a lectina de *D. virgata* (DvirL) mostra uma eficácia melhor na indução de NO em comparação a DVL, mas ainda inferior ao da DRL, um fenômeno que também pode ser explicado pela localização distinta dos resíduos de CRD (NÓBREGA *et al.*, 2012). Em relação a esses fatos, o CRD foi sugerido como o fator determinante mais importante para a indução do NO nas lectinas de *Diocleinae*.

Outras lectinas também mostraram o efeito relaxante de aortas intactas, como as algas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *B. seafortii* (LIMA *et al.*, 2004). O relaxamento ocorre via aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintetase, responsável pela síntese de óxido nítrico. Também foi demonstrado que a lectina do gérmen do trigo (WGA) produz relaxamento dependente de endotélio em aorta de coelhos (KLEHA; DEVESLY; JOHN, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo elucidar estruturalmente três lectinas de leguminosas (ConGF, CRLI e DSL) e avaliar a capacidade destas proteínas em elicitar vasorelaxamento em segmentos de aorta de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a sequência primária de ConGF por espectrometria de massas ;
- Analisar e comparar a sequência da lectina dentro da subtribo ao qual faz parte (*Diocleinae*);
- Obter dados de difração de raios X para as lectinas de ConGF, CRLI e DSL;
- Determinar a estrutura tridimensional de ConGF, CRLI e DSL por cristalografia de raios X;
- Avaliar o efeito vasorelaxante de ConGF em segmentos de aortas de ratos.
- Avaliar o efeito vasorelaxante de CRLI em segmentos de aortas de ratos e analisar o papel do cálcio extracelular na deflagração deste evento.
- Avaliar o efeito vasorelaxante de DSL em segmentos de aortas de ratos e o papel do CRD neste evento.
- Identificar características únicas nas estruturas de ConGF, CRLI e DSL que fundamentem a resposta do evento biológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Massa molecular e determinação de sequência de ConGF por espectrometria de massas

A massa molecular isotópica média de ConGF foi determinada por ionização por *electrospray* utilizando um espectrômetro de massas híbrido (Synapt HDMS, Waters Corp, Milford, MA, EUA). Uma solução de proteína (10 $\mu\text{mol/mL}$) foi infundida no sistema a uma taxa de fluxo de 10 $\mu\text{L/min}$. A voltagem do capilar e a voltagem do cone foi fixada em 3 kV e 40 V, respectivamente. A temperatura da fonte foi mantida a 90 °C, e o nitrogênio foi utilizado como gás de secagem (taxa de fluxo: 150 L/h). Os dados foram adquiridos com o software Mass Lynx 4.1. Os espectros foram deconvoluídos usando técnicas de máxima entropia (FERRIGE et al., 1992).

Para a determinação da estrutura primária, a ConGF foi submetida à SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), e as bandas foram excisadas e descoradas com 50 mM de bicarbonato de amônio em 50% de acetonitrila. Em seguida, as bandas foram desidratadas em 100% de acetonitrila e secas em um *Speedvac* (Labconco). Para a clivagem proteolítica, realizada a 37 ° C por dezesseis horas, as bandas foram reidratadas com as seguintes soluções enzimáticas: bicarbonato de amônio 50 mM, contendo tripsina (Promega), quimotripsina (Sigma-Aldrich) e endoproteinase Asp-N (Roche). Os peptídeos obtidos foram extraídos em uma solução de 50% de acetonitrila com ácido fórmico a 5 %, em seguida concentrados em *Speedvac* (LabConco) (SHEVCHENKO et al., 2006). ConGF também foi submetida a digestão química com ácido fórmico utilizando condições descritas por Hua e colaboradores (HUA; LOW; SZE, 2006). Os peptídeos foram injetados num sistema nanoACQUITY ligado à fonte de *electrospray* de um espectrômetro de massas (Synapt HDMS, Waters Corp, Milford, MA, EUA). A amostra foi aplicada em uma coluna de fase reversa (75 μM x 100 mm) e eluída com um gradiente de acetonitrila de 10% a 85% contendo ácido fórmico a 0,1%. O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo, utilizando uma fonte de temperatura a 90 °C e voltagem capilar de 3,0 kV. O instrumento foi calibrado com os fragmentos do íon de [Glu1] -Fibrinopeptídeo B (m/z 785,84).

O experimento de LC-MS/MS foi realizado de acordo com a função de Aquisição Dependentes de Dados (DDA), selecionando os íons precursores dupla ou triplamente carregados, que foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) ,utilizando argônio como gás de colisão, e com uma rampa de energia de colisão que varia de acordo com o estado de carga e a relação massa/carga do íon precursor selecionado. Os dados foram processados e analisados utilizando o programa *Proteinlynx* (Waters) e o parâmetro de pesquisa foi o padrão de fragmentação dos peptídeos. Os espectros de CID também foram interpretados manualmente usando a ferramenta *Pept Seq* do *Mass Lynx software* 4.0 (Waters). O Alinhamento

de sequências primárias foi realizado com o software ESPript 2.2 (GOUET; ROBERT; COURCELLE, 2003).

3.2 Cristalização

As proteínas liofilizadas, previamente purificadas em cromatografia de afinidade (CECCATTO et al., 2002; CORREIA et al., 2011; ROCHA et al., 2011), foram suspensas em água Milli-Q na concentração final de 10 mg/mL. A suspensão da proteína foi então centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para os passos futuros. Para experimentos com o ligante, a proteína em solução foi encubada com X-man (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose) na concentração final de 3 mM por uma hora antes dos experimentos de cristalização. A proteína foi então submetida ao *screen* de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991). Os kits utilizados foram os *crystal screen I e II* (Hampton) onde as variáveis iniciais foram pH, sal e precipitantes. O método utilizado foi o de difusão de vapor e gota suspensa com uso de placas de cristalização de 24 poços para a ConGF e microtitulação de 96 poços (fundo reto) para CRLI e DSL; estes foram manuseados no robô TTP Labtech's mosquito® Crystal. Foram colocados em cada poço da placa de cristalização 300 μ L da solução do kit (condição de cristalização) e a gota foi composta por 2 μ L da solução de proteína e 2 μ L da condição de cristalização. O poço foi então vedado com silicone e deixado em repouso à temperatura de 18 °C. Na placa de 96 poços foi adicionado 100 μ L da condição de cristalização e a gota foi composta por 100 nL da solução de proteína e 100 nL da condição de cristalização. Os poços foram vedados com ViewDrop™ II para placa de 96 poços para até 3 gotas suspensas. Após a obtenção de cristais foi feita a otimização dessas condições de cristalização, variando a concentração de precipitante e o pH da solução, repetindo o método da difusão de vapor. Essa otimização visou melhorar a condição de formação do cristal, produzindo assim, um cristal com características necessárias para que ele pudesse ser difratado quando submetido aos raios X.

3.3 Coleta de dados, seleção dos modelos e substituição molecular

Os dados de difração de raios X foram coletados a temperatura de 100 K. Para evitar formação de gelo, os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora composta de 70 % da solução de cristalização e 30 % de glicerol. Os cristais laçados com uso de *loops* foram alinhados utilizando-se o goniômetro e então submetido à coleta de dados. Os dados de difração de raios X de ConGF foram coletados em um comprimento de onda de 1,47 Å usando uma fonte de luz de radiação síncrotron (estação MX1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)),

Campinas, Brasil), utilizando um detector CCD-MAR de 165 mm (MAR Research) em 180 quadros com uma oscilação de 1°.

A estação experimental MX2 do também Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (Campinas-SP) foi utilizada para a coleta das lectinas CRLI e DSL. A linha pode realizar coletas em diferentes comprimentos de onda (0,8 – 2,5 Å), contudo o comprimento de onda usado foi de 1,47 Å. O detector utilizado foi MarMosaic 225 (CCD com área de 225 x 225 mm²). O número de imagens coletadas foi determinada de acordo o grupo espacial encontrado e sua mosaicidade determinados no MOSFLM (LESLIE; POWELL, 2007) e as intensidades reduzidas utilizando o programa SCALA (EVANS, 1993). Ambos fazem parte do pacote CCP4 (WINN et al., 2011). No processamento são observadas as intensidades de cada ponto de difração e os índices de Miller, que são números inteiros utilizados para identificar os pontos de difração no espaço recíproco. Além deste pacote de programas do CCP4 foi usado para indexar, integrar e reduzir intensidades o pacote o XDS (KABSCH, 2010) e HKL2000 (OTWINOWSKI; MINOR, 1997) para as lectinas DSL, ConGF e CRLI, respectivamente.

O problema da fase foi solucionado utilizando o método de substituição molecular. As coordenadas moleculares de alguns monômeros de lectinas similares foram selecionadas a partir dos alinhamentos, acima descritos, e testadas como modelos usando o programa PHASER (MCCOY et al., 2007). Os modelos passam por movimentos de rotação e translação para serem posicionados juntos às moléculas reais na rede cristalina. Rotação e translação são operações usadas em cristalografia, onde a rotação gira a molécula para a orientação correta e a translação move para a posição correta.

3.4 Refinamento e validação da estrutura

O modelo inicial foi submetido a ciclos de refinamento cristalográfico baseados em ciclos de refinamento de máxima verossimilhança. Primeiramente, foi realizado o refinamento de corpo rígido para verificar a posição relativa de grupos rígidos seguido de refinamento de restrição (e posicional) através do programa REFMAC 5 (CCP4) e monitorados usando os valores do R_{factor} e R_{free} (BRÜNGER, 1992). O fator de estrutura é referente à onda espalhada em uma determinada direção no espaço recíproco, tal como definido pelos índices de Miller, relacionado com a intensidade. Ele é definido por sua magnitude, amplitude e fase, que definem as propriedades das ondas espalhadas. O R_{factor} é uma medida de quão bem um modelo atômico descreve um conjunto de medições de difração de raios X observadas, utilizando uma escala de

soma em módulo da diferença entre as magnitudes observadas no fator de estrutura e os valores calculados a partir do modelo, de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{\sum ||F_{OBS}| - |F_{CALC}||}{\sum |F_{OBS}|}$$

Onde R; F_{OBS} e F_{CALC} , correspondem, respectivamente, ao R_{factor} ; Fatores da estrutura observados e Fatores da estrutura calculados.

Uma limitação do R_{factor} é que, se o modelo foi refinado com os dados experimentais, então ela não pode ser um bom indicador da qualidade do modelo. A relação R_{free} - R_{factor} é usada por este motivo. O R_{free} de equação usa exatamente o mesmo que o R_{factor} , mas só é calculado ao longo de um subconjunto de reflexões, referido como conjunto de teste. Estas reflexões não são usadas no refinamento do modelo e assim fornecem uma indicação independente da qualidade do mesmo.

Após os passos iniciais de refinamento, as moléculas de água foram adicionadas pelo REFMAC 5 em um passo único. As densidades eletrônicas foram visualizadas no programa COOT (EMSLEY et al., 2010), onde foram feitos ajustes manuais no modelo, posicionadas corretamente as moléculas de X-man, e verificadas as moléculas de água. Todos os passos manuais foram seguidos de ciclos de refinamentos posicionais e os valores do R_{factor} e R_{free} foram monitorados.

As análises estereoquímicas, dos ângulos de ligação, distâncias interatômicas e interações foram checadas manualmente com ajuda do gráfico de Ramachandran e a análise final realizada através do programa Prochek (LASKOWSKI et al., 1993). As análises estruturais e figuras foram feitas utilizando o programa PyMol (DELANO, 2002).

3.5 Teste de contratilidade em aortas isoladas

Ratos Wistar machos (250-300 g) foram criados e mantidos (n = 6 por gaiola) em salas com um ciclo controlado luz/escuro 12/12 h a 25 °C com comida e água *ad libitum*. Protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética institucional da Universidade Estadual do Ceará para uso de animais (CEUA n ° 10130208-8/40).

A aorta torácica foi rapidamente removida e limpa e os segmentos em anel (3-5 mm) foram preparados para a gravação da tensão (2 g) em banhos para órgãos de 10 ml preenchidos com solução de Tyrode modificada (NaCl 136 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 0,98 mM, 2 CaCl₂ mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, NaHCO₃ 11,9 mM) e 5,5 mM de glucose, pH 7,4 (a 37 °C, 95 % de O₂ e 5 % de CO₂). Em todos experimentos a aorta foi testada com KCl (60 mM) após 45 minutos de

equilíbrio para assegurar a viabilidade do tecido. A resposta contrátil foi medida usando um transdutor de força ligado a um pré-amplificador e um sistema de aquisição de dados computadorizado (DATAQ).

Para avaliar o efeito relaxante das lectinas de ConGF, CRLI e DSL, foram realizadas curvas de concentração cumulativa (1-100 µg/ml) em um platô de concentração induzido pela fenilefrina (Phe, 0,1 µM) em segmentos de aorta com endotélio intacto ou desnudo. Aorta de controle recebeu o mesmo volume de Tyrode. A remoção do endotélio foi realizada por meio de fricção mecânica da superfície da íntima da aorta. O endotélio intacto foi considerado para respostas relaxantes a acetilcolina (ACh, 1 µM) 75 % maior que induzido por Phe (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

A participação de EDRF no efeito relaxante lectínico foi avaliada pela incubação da aorta endotelizada com as substâncias metil éster de N-nitro-L-arginina (L-NAME, 100 µM), indometacina (10 µM) ou tetraetilamônio (TEA; 5 mM), 30 min antes da adição da lectina no platô de contração induzida por fenilefrina. As moléculas adicionadas são, respectivamente, inibidores da óxido nítrico sintetase, ciclooxigenase e canais de potássio. Para as lectinas de ConGF e DSL foram testadas apenas a participação do óxido nítrico.

Ao final de cada experimento, os tecidos foram banhadas em solução de Tyrode seguido pela adição de fenilefrina para verificar a recuperação da capacidade de resposta do tecido.

3.5 Interação com receptor muscarínico e participação do cálcio extracelular no efeito relaxante de CRLI

A interação de CRLI com o receptor muscarínico da acetilcolina na superfície da membrana foi avaliada pela incubação dos tecidos com atropina (1 µM) durante 10 min antes das contrações com fenilefrina. CRLI (30 µg/ml) ou acetilcolina (10 µM) foram adicionadas ao platô de resposta contrátil induzida por fenilefrina.

Para avaliar a participação do cálcio extracelular no efeito relaxante de CRLI, os tecidos foram banhados em uma solução livre de cálcio (0Ca) de Tyrode (substituído por 10 mM de etileno glicol tetra-acético - EGTA) 10 minutos antes de realizar o platô da contração induzida por fenilefrina. Em seguida, CRLI (30 µg/ml) ou a ACh (10 µM) foi adicionada.

Ao final de cada experimento, os tecidos foram banhadas em solução de Tyrode contendo cálcio seguido pela adição de fenilefrina para verificar a recuperação da capacidade de resposta do tecido.

3.5 Participação do CRD no relaxamento provocado por DSL

Para avaliar a participação do CRD de DSL na atividade vasorelaxante deflagrada por esta lectina, foi realizada a reversão por açúcar. DSL na sua concentração mais ativa foi incubada com 0,1 M de α -metil manosídeo por 1 h a 310 K para permitir a interação lectina-açúcar antes do experimento de relaxamento. Controles de lectina e de açúcar foram preparados e incubados individualmente sob condições semelhantes.

Ao final de cada experimento, os tecidos foram banhados em solução de Tyrode seguido pela adição de fenilefrina para verificar a recuperação da capacidade de resposta do tecido.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e as diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), seguida de teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.7 Análise estrutural

As estruturas tridimensionais das proteínas estudadas e comparadas neste trabalho foram analisados utilizando tanto Coot quanto PyMOL (DELANO, 2002; EMSLEY et al., 2010). O volume do CRD foi calculado pela programa Q-Sitefinder (LAURIE, A.T., JACKSON, 2005). Contatos de van der Waals, contatos polares e interações hidrofóbicas foram analisados com o software CONTACT implementado em CCP4 (WINN et al., 2011), adotando as distâncias 3,5, 3,5 e 5,0 Å, respectivamente, como corte. A análise das distâncias significativas dos átomos foi realizada utilizando um erro de posicionamento atômico calculada pelo Luzatti Plot (LUZZATI, 1952).

Para avaliar a capacidade da lectina em reconhecer carboidratos heparano sulfato, foi realizada a técnica de alta precisão de docking molecular (MolDock) implementada em *Molegro Virtual Docker*, uma plataforma integrada para a previsão de interações proteína-ligante (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006). O Moldock Score [GRID] foi calculado usando a função de pontuação. A resolução da grade foi de 0,30 Å com raio de 15 Å. O algoritmo de busca utilizado foi *Moldock Optimizer* com configurações padrão. O número de execuções foi de 10, e o máximo de interações foram 5000. O tamanho da população e o número máximo de poses

foram 500 e 10, respectivamente. A energia de interação proteína-ligante foi expresso sob a forma de uma pontuação MolDock (MDS), em unidades arbitrárias. Um valor mais negativo reflete uma interação mais forte.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS DAS LECTINAS EM ESTUDO.

4.1.1 Resolução da estrutura de ConGF

4.1.1.1 Determinação da estrutura primária de ConGF por espectrometria de massas.

A sequência completa da lectina ConGF pode ser vista na Figura 9. Nesta sequência, a região que corresponde às posições 31 a 39 foi identificada pelo peptídeo A2MS que compreendem os resíduos 28-43 e apresentam uma massa teórica de 1.945,09 Da. Apesar dos dados de MS/MS não estarem disponíveis, os dados cristalográficos de densidade eletrônica de ConGF (com resolução de 2,3 Å) mostram claramente a presença do resíduo de aminoácido isoleucina na posição 37. A ionização de A2MS foi realizada também pelo método de MALDI, no entanto, a intensidade relativa foi muito baixa para realizar um experimento de MS/MS. Os dados de espectrometria de massas juntamente com os dados de cristalografia nos permitiu realizar o sequenciamento completo de ConGF. A Tabela I contém todos os peptídeos sequenciados utilizados para completar a estrutura primária de ConGF. Os dados da sequência da proteína estão depositados na base de dados UniProt sob o número de acesso C0HJC6.

```

1  ADTIVAVELD TYPNTDIGDP NYPHIGIDIK SIRSKKIAKW NMQDGKVATA HIIYNSVGKR
   |-----T1-----|                               |--T2--||-----T3----|
                                     |-----C1-----|
                                     |---A1---||-----A2MS-----|
61  LSAVVSYPNA DSATVSYDVD LDNVLPEWVR VGLSATGLY KETNTILSWS FTSKLKSNST
   |-----T4-----| |-----T5---| |-----T6-----| |---
   |-----C2-----| |-----C3-----| |---C4--| |---C5
                                     |-----F1-----|
121 AETNALHFTF NQFTKDQKDL ILQGDATTDS DGNLQLTRVS SDGTPQGNSV GRALFYAPVH
   -----T7-----| |-----T8-----| |-----T9-----|
   -----| |-----C6-----| |-----C7
                                     |-----F2-----| |-----F3-----|
   |-----A3-----| |-----A4-----|
181 IWESSAVVAS FDATEFTFLIK SPDSDPADGI TFFISNMDST IPGSGGRLG GLFPDAN
                                     |-----T10-----| |---T11---|
   -----C7-----| |-----C8-----| |-----C9-----| |---C10---|
                                     |-----F4-----| |-----F5-----|
                                     |-----A5-----|

```

Figura 9 – Sequência completa de ConGF. Os peptídeos que iniciam com a letra T são originados a partir de uma digestão de tripsina; os originados com a letra C, a partir de uma digestão com quimiotripsina; com a letra A, a partir de uma digestão com endoproteínase ASPN; e com a letra F a partir de uma digestão química do ácido fórmico.

Tabela I – Detalhes dos peptídeos de ConGF obtidos por espectrometria de massas sequencial.

Peptídeo	Massa Experimental	Massas Teórica	Diferença	Sequencia
T1	3268,6265	3268,6138	-0,01	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPN YPHIGIDIK
T2	893,4940	893,3701	-0,12	WNMQDGK
T3	1371,7266	1371,7510	0,02	VATAHIIYNSVGK
T4	3293,5566	3293,6091	0,05	LSAVVSYPNADSATVSYDVL DNVLPWVR
T5	1108,5844	1108,6128	0,03	VGLSATTGLYK
T6	1512,6273	1512,7460	0,12	ETNTILSWSFTSK
T7	2157,0786	2157,0786	0,07	SNSTAETNALHFTFNQFTK
T8	2145,0518	2145,0549	0,00	DLILQGDATTDSDGNLQLTR
T9	1359,7244	1359,6378	-0,09	VSSDGTPOGNSVGR
T10	2827,2444	2827,2607	0,02	SPSDPADGITFFLSNMDSTLP SGSGGR
T11	958,4844	958,5123	0,03	LLGLFPDAN
C1	1314,6626	1314,6931	0,03	QDGKVATAHIIY
C2	1629,7576	1629,7522	-0,01	SAVVSYPNADSATVSY
C3	1837,9664	1837,9574	-0,01	DVDLDNVLPWVRVGL
C4	1090,4891	1090,5659	0,08	KETNTILSW
C5	1418,6790	1418,6445	0,03	KSNSTAETNALHF
C6	4806,3687	4806,3809	0,01	NQFTKDQKDLILQGDATTDSD GNLQLTRVSSNGTPQGNSVGRALF
C7	1598,7843	1598,8092	0,02	APVHIWESSAVVASF
C8	1461,6379	1461,6987	0,06	IKSPSDPADGITF
C9	1850,7644	1850,9197	0,16	FISNMDSTLPSGSGGRLL
C10	732,2814	732,3442	0,06	GLFPDAN
A1	1024,4844	1024,4978	0,01	DPNYPHIGI
A2	1945,0771	1945,0931	0,02	DIKSIRSKKIAKWNMQ
A3	1696,7354	1696,8209	0,07	DSTIPSGSGRLLGLFPDAN
A4	1390,6488	1390,6688	0,02	DSDGNLQLTRVSS
A5	1972,9590	1972,9854	0,03	DSTIPSGSGRLLGLFPDAN
F1	1367,7072	1367,7561	0,05	NVLPWVRVGLS
F2	1189,6044	1189,6099	0,00	GNLQLTRVSSD
F3	1155,7644	1155,5996	0,16	GTPQGNSVGRAL
F4	1238,6244	1238,6547	0,03	ATFTFLIKSPD
F5	1143,5040	1143,6248	0,12	STIPSGSGRLL

A massa molecular média determinada para a cadeia α da ConGF foi de 25.606 ± 2 Da, e para β e γ foram de 12.961 ± 2 e 12.663 ± 2 Da, respectivamente. A massa teórica determinada a partir da sequência foi de 25.606, 1.961 e 12.664 Da, respectivamente, para as cadeias α , β e γ . Os resultados obtidos revelam a consistência entre a massa determinada experimentalmente e a sequência inferida a partir desta.

A cadeia polipeptídica de ConGF é composta de 237 resíduos de aminoácidos e revela quatro modificações únicas (Ile₃₇, Ala₄₈, Thr₁₆₄ e Thr₂₂₀) quando comparada às lectinas do tipo ConA (Figura 10). Todas as lectinas do gênero *Canavalia* possuem uma Val na posição 32, com exceção para ConGF que, semelhante às lectinas do gênero *Dioclea*, possui um Ile na posição 32. Isto também ocorre nas posições 96, 121, 150 e 226, que são Ser, His, Thr e Thr, nesta

ordem, no gênero *Canavalia* e Thr, Ala, Ser e Gly no gênero *Dioclea* e ConGF. Deve notar-se que ConGF apresenta alguns resíduos de aminoácidos normalmente encontrados apenas em lectinas do gênero *Dioclea*.

O *score* da identidade da sequência de ConGF varia entre 81,62 e 90,72 em comparação com outras proteínas semelhantes a ConA, como mostrado na Figura 10. A lectina mais semelhante a ConGF é a CGL (91,56), seguida por ConM e ConA (ambas 90,72), e ConBr (90,3). Todos os pontos de identidade estão disponíveis na legenda da Figura 10. Simões e colaboradores (2012) mostraram que ConGF está posicionada entre os grupos *Canavalia* e *Dioclea/Cratylia*, como um intermediário baseado na análise filogenética, usando o alinhamento da sequência de aminoácidos parcial de ConGF com as lectinas *Canavalia*, *Dioclea* e *Cratylia* como sinapomorfias (SIMÕES et al., 2012).

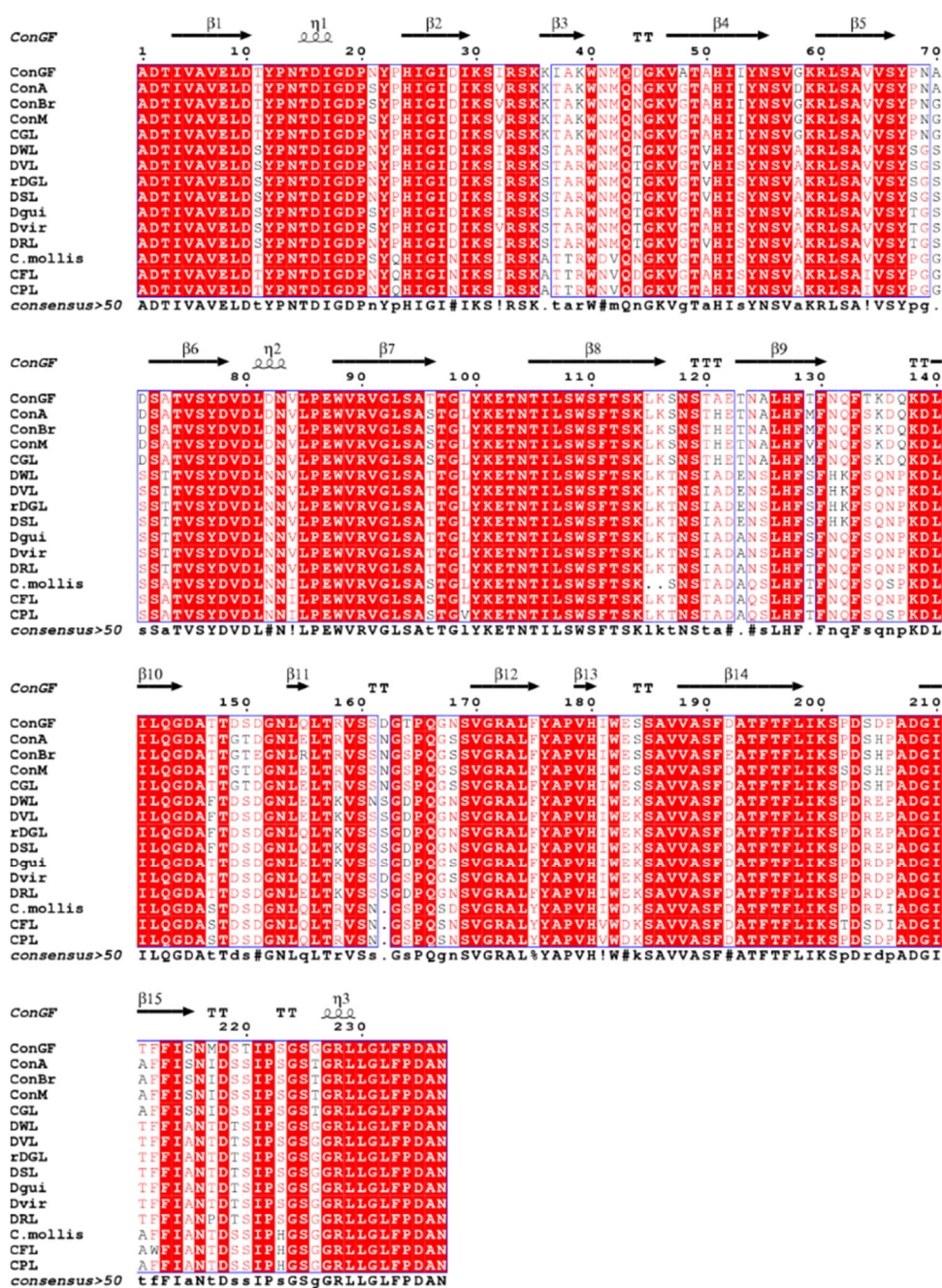


Figura 10 – O alinhamento múltiplo de ConGF com outras sementes de lectinas tipo ConA. ConA (*C. ensiformis*; acesso UniProt: P02866; Identidade: 90,72), ConBr (*C. brasiliensis*; acesso UniProt: P55915; Identidade: 90,3), ConM (*C. maritima*; acesso UniProt: P81364; Identidade: 90,72), CGL (*C. gladiata*; acesso UniProt: P14894; Identidade: 91,52), DWL (*Dioclea wilsonii*; acesso UniProt: P86624; Identidade: 83,12), DVL (*Dioclea violacea*; acesso PDB: 2GDF ; Identidade : 83,54), rDGL (lectina recombinante de *Dioclea grandiflora*; acesso PDB: 2JE9; Identidade: 83,97), DSL (*Dioclea sclerocarpa*; acesso UniProt : B3EWJ2 ; Identidade: 83,97), Dgui (acesso *Dioclea guianensis*, PDB: 1H9W; Identidade: 84,81), Dvir (*Dioclea virgata*; acesso UniProt: P58907; Identidade: 85,65), DRL (*Dioclea rostrata*; PDB acesso: 2ZBJ; Identidade: 85,65), Cmollis (*Cratylia mollis*; acesso UniProt: P83721; Identidade: 81,62); CFL (*Cratylia floribunda*; UniProt acesso: P81517; Identidade: 82,2), CPL (*Camptosema pedicellatum*; acesso UniProt: J9PBR3; Identidade: 83,05).

4.1.1.2 Coleta de dados, estatísticas de dados e refinamento de ConGF

Utilizando a condição 34 do *Crystal Screen II*TM da Hampton research, em temperatura de 298 K, se obteve melhores cristais para a difração de raios X. A condição 34 possui: Sulfato de cádmio hidratado 0,5 M (sal), HEPES 0,1 M pH 7.5 (tampão) e Acetato de sódio triidratado 1,0 M (precipitante).

Os cristais foram difratados a uma distância de 100 mm da placa de imagem. O conjunto de dados obtido foi gerado numa resolução de 2,19 Å, enquanto o escalonamento foi realizado numa resolução entre 10,29-2,3 Å. O cristal difratado pertence ao grupo espacial ortorrômbico *I*222 e a cela apresenta como dimensões $a = 63,42$ Å, $b = 65,15$ Å e $c = 106,71$ Å e seus ângulos pela sua geometria são os mesmos ($\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). Os dados estatísticos de coleta e refinamento estão representados na tabela II. A substituição molecular foi realizada utilizando estrutura cristalina de *C. gladiata* (CGL), coordenadas PDB 2OVU, como o modelo de busca. O coeficiente de Matthews foi calculado como $2,05 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$ com base em um peso molecular de 25,5 kDa, indicando a presença de um monômero na unidade assimétrica e um teor de solvente de 39,54% (MATTHEWS, 1968). As coordenadas atômicas de ConGF complexada com X-man foram depositadas no *Protein Data Bank*, código de excesso 4L8Q.

Tabela II. Estatísticas dos dados de coleta e refinamento de ConGF.

Parâmetro	Valor
<i>Coleta de Dados</i>	
Grupo Espacial	<i>I</i> 222
Parâmetros da Célula Unitária (Å)	
<i>a</i>	63,42
<i>b</i>	65,15
<i>c</i>	106,71
Reflexões totais	71,496
Número de reflexões únicas	10,110
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limites de resolução (Å)	10,29-2,3
R_{merge}^a (%)	10,3 (29,8) ^d
Completeza	99,4 (100) ^d
Multiplicidade	7,07
$(I)/\sigma$	5,16 (10,00) ^d
<i>Substituição Molecular</i>	
LLG	1.378,09
RFZ	18,2
TFZ	32,1
<i>Refinamento</i>	
Resolução (Å)	19,17-2,30
R_{factor}^b (%)	22,41
R_{free}^c (%)	26,40
Número de resíduos na unidade assimétrica	237
Número de moléculas de água	88
<i>RMSD de valores ideais</i>	
Comprimentos de ligações (Å)	0,021
Ângulos de ligações (graus)	2,110
<i>Luzatti</i>	0,301
<i>Fator de Temperatura</i>	
Média do valor B para toda cadeia proteica (Å ²)	32,43
<i>Ramachandran</i>	
Resíduos em regiões mais favorecidas (%)	96,07
Resíduos em regiões permitidas (%)	3,93
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0

^a $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle \bar{I}(hkl) \rangle_i|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle \bar{I}(hkl) \rangle_i}$ onde $I(hkl)_i$ é a intensidade da medida da reflexão *h* e $\langle \bar{I}(hkl) \rangle_i$ é o valor médio $\langle \bar{I}(hkl) \rangle_i$ para toda *I* medida

$$^b R_{factor} = \frac{\sum_h ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

^c Calculado com 5 % das reflexões omitidas do refinamento

^d Valores em parênteses representam as camadas de alta resolução.

4.1.1.3 Estrutura geral de ConGF

A estrutura geral da ConGF complexada com X-Man (Figura 11) foi refinada a uma resolução de 2,3 Å. Esta estrutura refinada de ConGF apresenta 88 moléculas de água, um íon de cálcio e um íon de manganês por monômero.

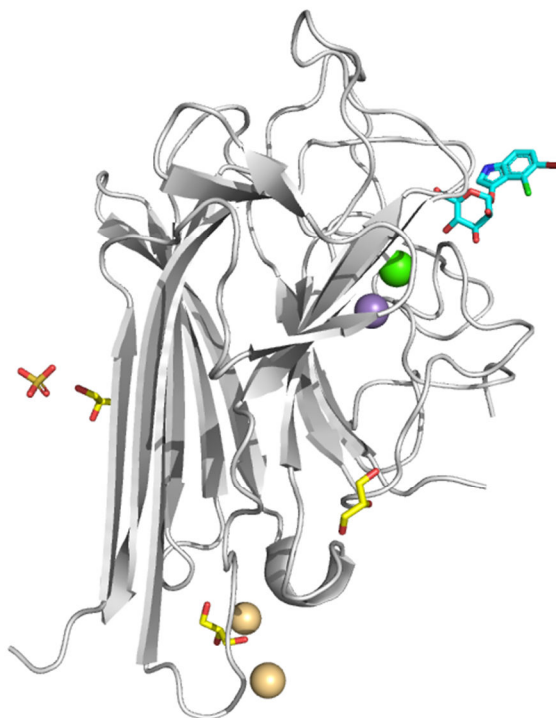


Figura 11 – Monômero de ConGF representado em *cartoon* cinza, seus ligantes estão representados em *sticks* e esferas. O sulfato possui átomos de enxofre em laranja e átomos de oxigênio em vermelho. Carbonos das três moléculas de glicerol são coloridos em amarelo, e carbonos de X-man são coloridos em azul.

Uma molécula de X-Man foi modelada no domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD). Foram encontrados também um íon sulfato, dois íons cádmio e três moléculas de glicerol incorporadas na estrutura de ConGF, todos de acordo com o mapa de densidade eletrônica $F_o - F_c$. Após o último refinamento da estrutura, R_{factor} foi de 0,22 e o R_{free} foi de 0,26. O modelo apresenta estequiometria aceitável com base na gráfico de Ramachandran e uma estrutura geométrica bem definida. O desvio quadrático médio calculado (RMSD) mostra desvios comprimento de ligação de 0,021 e desvios de ângulo de ligação de 2,110. Os principais desvios se encontram nas regiões das alças, incluindo as envolvidas no CRD. O arranjo tetramérico de ConGF foi confirmado pela análise PISA e sua estrutura com ligantes pode ser vista na Figura 12.

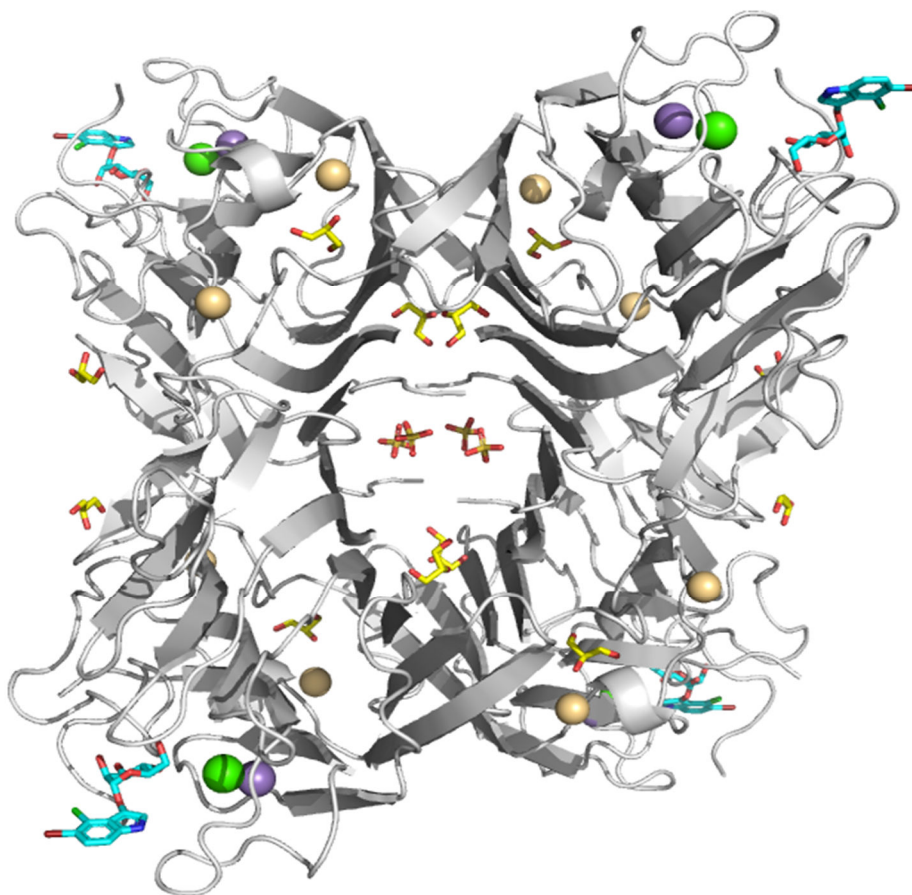


Figura 12 – Estrutura geral de ConGF. (A) As cadeias do arranjo tetramérico de ConGF estão em representação *cartoon* (cor cinza); esferas representam os íons de cálcio (em verde), os íons de manganês (em roxo), e íons cádmio (em ouro). Outros ligantes moleculares estão em representação *stick*. O sulfato no centro possui átomos de enxofre em laranja e átomos de oxigênio em vermelho. Carbonos das três moléculas de glicerol são coloridos em amarelo, e carbonos de X-man são coloridos em azul.

Algumas lectinas de *Canavalia* e *Dioclea* não apresentam densidade eletrônica em regiões instáveis da estrutura, geralmente englobando alças 117-123 e 149-151. Na estrutura de ConGF, apenas a alça 117-123 é instável e as coordenadas dos resíduos (S₁₁₇N₁₁₈S₁₁₉T₁₂₀) não foram modeladas. Portanto, esta região foi cortada na estrutura final e todas as outras regiões estão bem definidas e consistentes com a sequência de aminoácidos.

4.1.1.4 Sítios de ligação da ConGF

A estrutura de ConGF possui um sítio de ligação a metal contendo resíduos conservados (DELATORRE et al., 2007). Este sítio é semelhante aos presentes nas outras lectinas de leguminosas que fazem a coordenação dos íons Ca²⁺ e Mn²⁺ (Figura 13). O sítio de ligação a

metal presente na estrutura monomérica situa-se na proximidade do CRD e a ligação aos íons favorecem interações que auxiliam na estabilização do sítio de ligação a carboidratos. Quatro aminoácidos, principalmente através de suas cadeias laterais, e duas moléculas de água coordenam cada íon metálico. Neste caso o Mn^{2+} é coordenado pelos resíduos Glu₈, Asp₁₀, Asp₁₉ e His₂₄; e o Ca^{2+} é coordenado pelos resíduos Asp₁₀, Tyr₁₂, Asn₁₄ e Asp₁₉. Além disso, moléculas de água ligam indiretamente Ile₃₂ e Ser₃₄ ao manganês; e os resíduos Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ ao cálcio. A ligação peptídica entre Ala₂₀₇ e Asp₂₀₈ na configuração cis é isomerizada pela presença de metais bivalentes que provocam a mudança da orientação da cadeia lateral e estabilizam a ligação não usual cis-peptídica Ala₂₀₇-Asp₂₀₈ por uma ponte formada entre um íon cálcio, uma molécula de água e o grupo carbonil da cadeia principal de Asp₂₀₈.

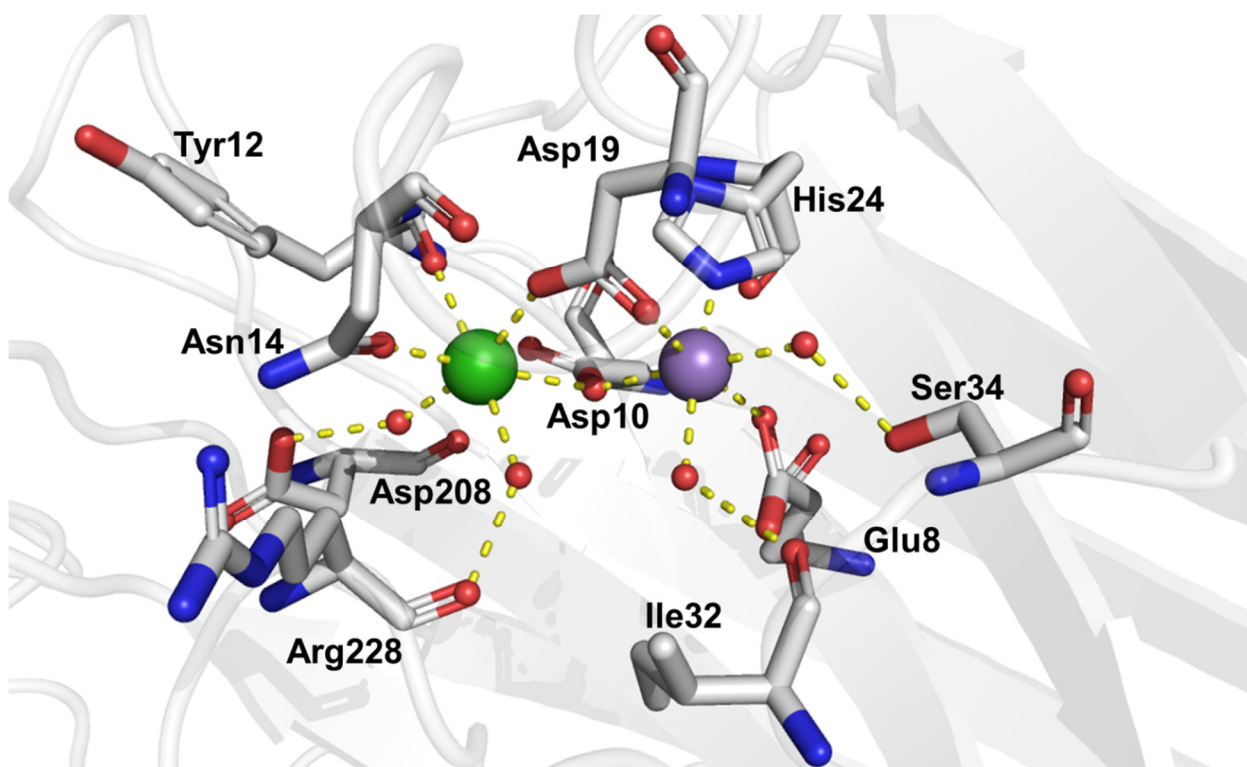


Figura 13 – Coordenação dos metais na estrutura de ConGF. A esfera verde representa o íon de cálcio e a roxa o de magnésio; traços amarelos indicam as interações polares. Resíduos relevantes estão destacados em *sticks* cinzas.

Lectinas de leguminosas podem estabelecer interações com ligantes diferentes dos carboidratos. A literatura mostra a presença de sítios de ligação com características hidrofóbicas, e a associação de moléculas, como hormônios, ácidos nucleicos e aminoácidos não-naturais (BABOSHA, 2008; DELATORRE et al., 2007; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983b). Sítios de ligação podem ser localizados na superfície de lectinas, por exemplo, o CRD, bem como em cavidades, que são por vezes formados pelas associações diméricas e tetraméricas

(DELATORRE et al., 2007). O mapa de diferença de densidade de eletrônica exibiu algumas características através da estrutura ConGF. Estas podem ser explicadas pela presença de íons cristalizados e moléculas de glicerol que foi utilizado como crioprotetor para a aquisição de dados de raios X. Dois íons de cádmio, um íon sulfato e três moléculas de glicerol foram resolvidos na estrutura ConGF (Figura 11). No arranjo tetramérico de ConGF, a cavidade central apresenta íons de sulfato de frente para o outro em monômeros opostos. Esses íons são coordenados pelos resíduos His₁₂₇ e Thr₁₂₉, duas moléculas de água e um contato polar adicional entre cada sulfato (Figura 14).

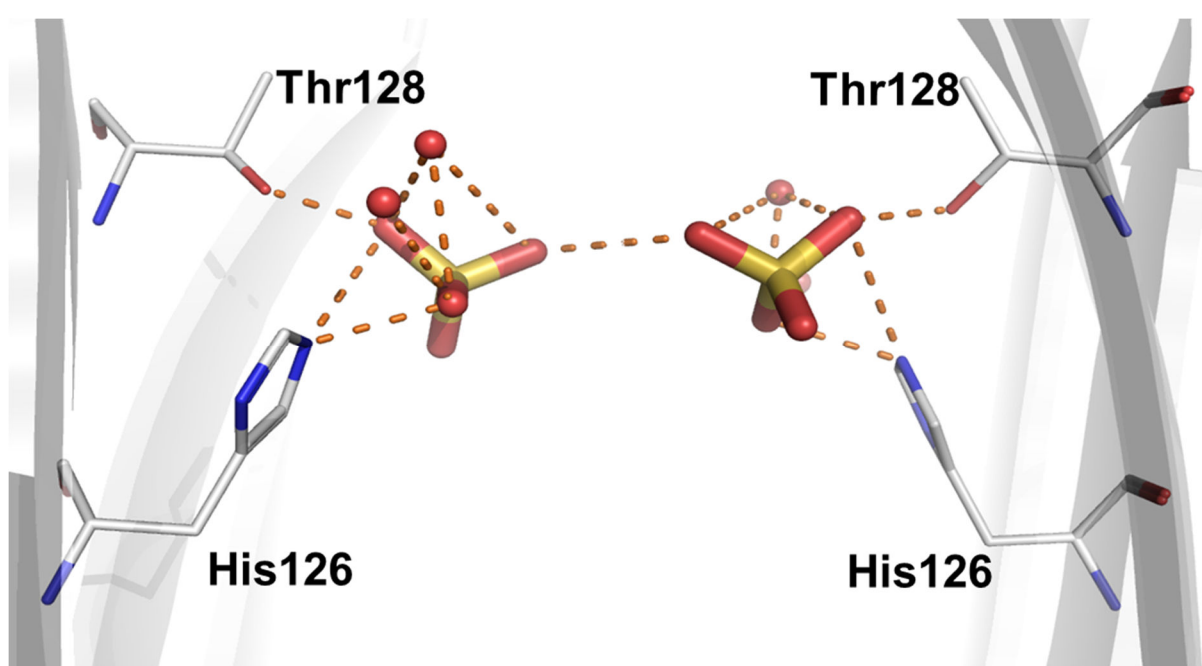


Figura 14 – Detalhes da interação do sulfato (representado em *sticks*) na cavidade central. Resíduos em contato são destacados, e as linhas tracejadas em laranja representam as ligações polares.

Além disso, os resíduos presentes na cavidade central também coordenam uma molécula de glicerol (Figura 15). Lys₁₁₄, Lys₁₁₆ e Ser₁₉₀ de um monômero interagem com o glicerol, que por sua vez interage com os resíduos Asp₁₉₂, Ala₁₉₃ e Thr₁₉₄ de um monômero oposto. Ligantes que formam pontes entre os monômeros opostos em lectinas tetraméricas são capazes de auxiliar na estabilização do oligômero.

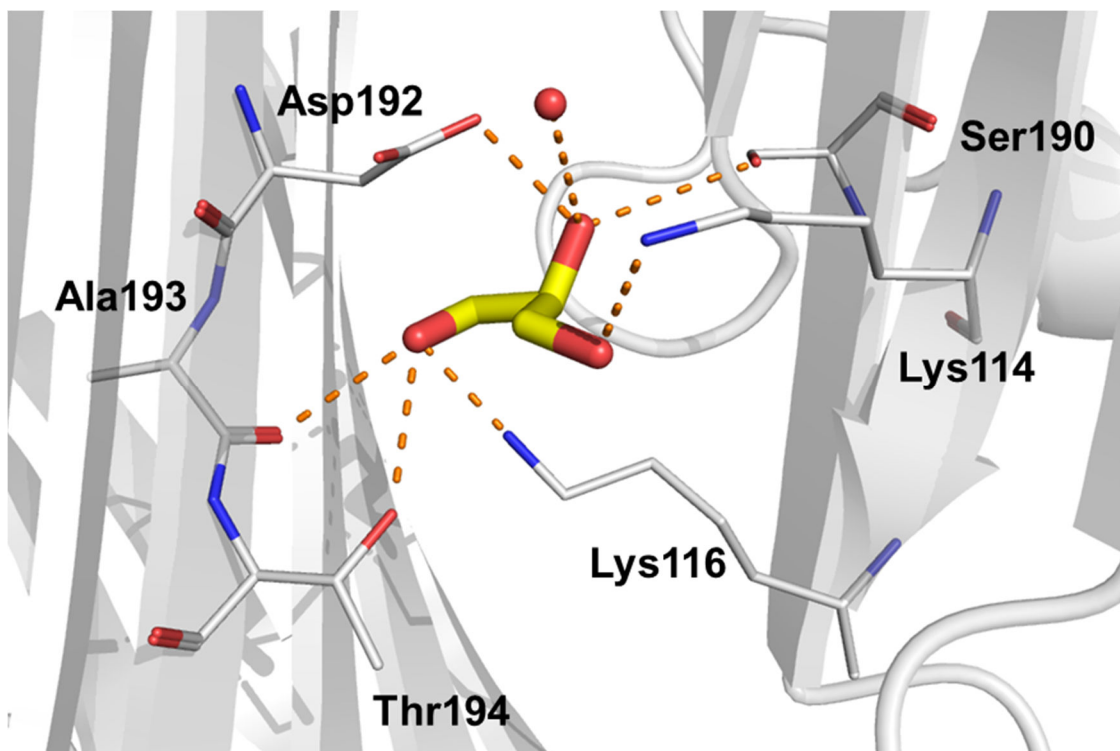


Figura 15 – Detalhes da interação do um glicerol (representado em *sticks*) na cavidade central de ConGF. Resíduos em contato são destacados, e as linhas tracejadas em laranja representam as ligações polares.

Os átomos de cádmio presentes no monômero não fazem parte da estrutura nativa da proteína. Eles são encontrados na condição de cristalização e não são necessários para a proteína realizar sua função, no entanto, acabam interagindo com certos resíduos. Um dos íons é coordenado pelo resíduo Val₁₈₈, enquanto o outro é coordenado pelos resíduos Asp₈₀ e Asp₈₂ (Figura 16).

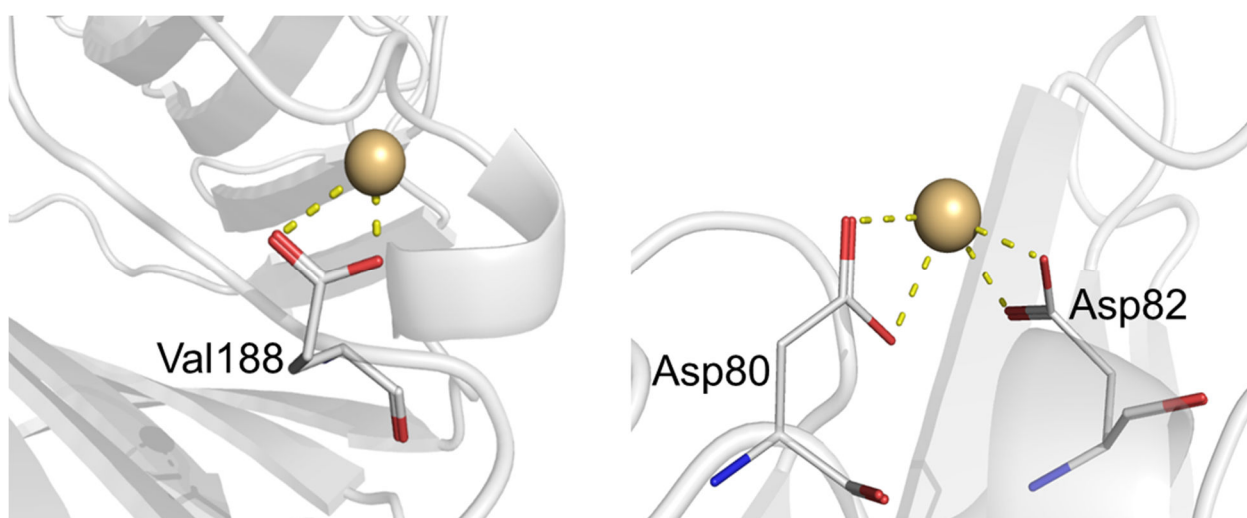


Figura 16 – Sítios de interação de Cd²⁺ (representados em esferas). Resíduos em contato são destacados, e as linhas tracejadas em amarelo representam as ligações polares.

Na estrutura de ConGF, o CRD está ocupada por X-man, que foi modelado na lectina utilizando o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc (Figura 17A). O resíduo de manose da molécula de X-man foi conduzido ao CRD e estabilizado por uma rede de doze ligações de H conectando os resíduos Asn₁₄, Gly₉₈, Leu₉₉, Tyr₁₀₀, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ aos átomos de oxigênio O-3, O-4, O-5 e S-6 manosídeo (Tabela III). O grupo indol de X-man é estabilizado por uma interação com o grupo hidroxil de Tyr₁₂ e várias interações de van der Waals com o subsítio hidrofóbico, envolvendo resíduos Tyr₁₂, Leu₉₉ e Tyr₁₀₀ (Figura 17B).

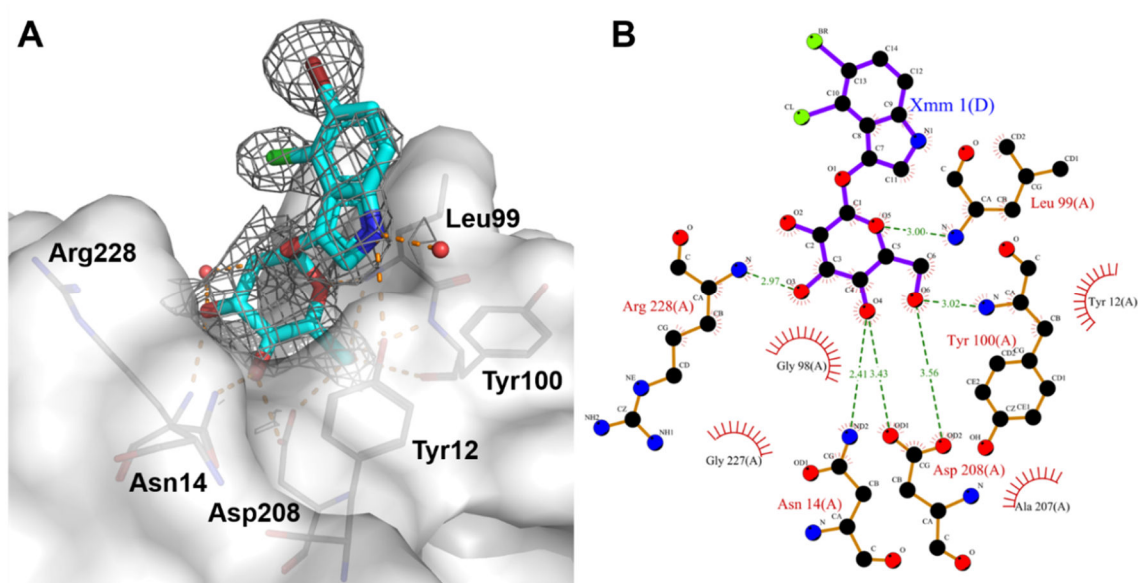


Figura 17 – Sítio de ligação de carboidratos de ConGF interagindo com X-Man. (A) Mapa de omissão representando a densidade eletrônica contornada em 1σ do X-Man. Traços laranja representam contatos polares. Os aminoácidos que compõem o CRD estão nomeados. (B) Representação LIGPLOT das ligações de hidrogênio e de van der Waals em todo o X-man.

Tabela III – Interação entre os resíduos do CRD e molécula de X-Man.

Amino ácido	X-Man	Distâncias (Å)
<i>Interações de van der Waals</i>		
Tyr12 OH	C11	2,9
Asn14 CG	O4	3,5
Gly98 CA	O6	3,1
Gly98 C	O6	3,4
Leu99 CB	O5	3,2
Ala207 CB	O6	3,0
Ala207 CB	C6	3,4
Asp208 CG	O6	3,2
Asp208 OD2	C4	3,4
Asp208 OD2	C6	3,4
Arg228 CA	O4	3,4
Arg228 CB	O4	3,2
Arg228 CG	O4	3,3
<i>Ligações de H</i>		
Tyr12 OH	N1	3,3
Asn14 ND2	O4	2,4
Gly98 N	O6	3,3
Leu99 N	O5	3,0
Leu99 N	O6	3,0
Tyr100 N	O6	3,0
Tyr100 O	O6	3,4
Asp208 OD1	O6	2,9
Asp208 OD1	O4	3,4
Asp208 OD2	O4	2,5
Arg228 N	O3	2,9
Arg228 N	O4	3,2

4.1.2 Resolução da estrutura de CRLI

4.1.2.1 Coleta de dados e estatísticas de dados e refinamento de CRLI

Os cristais para difração foram obtidos à temperatura de 298 K, utilizando a condição 27 do *Crystal Screen ITM* da Hampton research se obteve melhores resultados na difração de raios X. A condição 27 possui: 0,2 M de citrato de sódio tribásico triidratado, 0,1 M de HEPES-Na pH 7,5 e 20 % v/v de 2-Propanol.

Os dados de difração mostraram que os cristais de CRLI pertencem ao grupo espacial ortorrômbico *I222* com parâmetros de cela $a = 65,36 \text{ \AA}$, $b = 88,75 \text{ \AA}$, e $c = 90,63 \text{ \AA}$. As estatísticas do processamento, escalonamento e refinamento dos dados são mostradas na Tabela IV. A substituição molecular foi feita utilizando as coordenadas (PDB 2JE7) da estrutura cristalina de *D. guianensis* (Dgui) como modelo de busca. O coeficiente de Matthews foi

calculado em $2,46 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ baseado numa massa de 25,5 kDa, indicando a presença de um monômero na unidade assimétrica e um teor de solvente de 50,13 % (MATTHEWS, 1968). As coordenadas atômicas de CRLI complexada com X-man foram depositadas no *Protein Data Bank*, código de excesso 4MYE.

Tabela IV - Coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura de CRLI

Parâmetro	Valor
<i>Coleta de Dados</i>	
Grupo Espacial	<i>I</i> 222
Parâmetros da Célula Unitária (Å)	
<i>a</i>	65,36
<i>b</i>	88,75
<i>c</i>	90,63
Reflexões totais	143.239
Número de reflexões únicas	31.694
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limites de resolução (Å)	27,10-1,65
R_{merge}^a (%)	4,0 (18,0) ^d
Completeza	98,8 (99,9) ^d
Multiplicidade	4,5 (4,5)
(<i>I</i>)/ σ	33,45 (10,84) ^d
<i>Substituição Molecular</i>	
LLG	3,898
RFZ	33,8
TFZ	31,3
<i>Refinamento</i>	
Resolução (Å)	26,33-1,65
R_{factor}^b (%)	18,78
R_{free}^c (%)	20,85
Número de resíduos na unidade assimétrica	237
Número de moléculas de água	262
<i>RMSD de valores ideais</i>	
Comprimentos de ligações (Å)	0,0248
Ângulos de ligações (graus)	2,272
<i>Fator de Temperatura</i>	
Média do valor B para toda cadeia proteica (Å ²)	21,454
<i>Luzzati plot</i>	
Resíduos em regiões mais favorecidas (%)	97,86
Resíduos em regiões permitidas (%)	2,14
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0

^a $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle \bar{I}(hkl) \rangle_i|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle \bar{I}(hkl) \rangle_i}$ onde $I(hkl)_i$ é a intensidade da medida da reflexão *h* e $I(hkl)$ é o valor médio $I(hkl)_i$ para toda *I* medida

$$^b R_{factor} = \frac{\sum_h ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

^c Calculado com 5 % das reflexões omitidas do refinamento

^d Valores em parênteses representam as camadas de alta resolução.

4.1.2.1 Estrutura geral de CRLI

A estrutura geral da CRLI complexada com X-man (Figura 12) foi refinada à resolução de 1,65 Å. A estrutura refinada apresenta 262 moléculas de água, um íon cálcio e um íon magnésio por monômero. Uma molécula X-Man foi modelada no domínio de reconhecimento a carboidrato. Também foi encontrado um íon sódio incorporado na estrutura da CRLI (Figura 18), tudo de acordo com o mapa Fo-Fc de densidade eletrônica. Após o refinamento da última estrutura os valores de R_{factor} e R_{free} foram respectivamente de 0,187 e 0,208. O modelo apresenta estequiometria baseada no gráfico de Ramachandran e uma estrutura geométrica bem definida. O *rmsd* apresenta desvios de comprimento ligação de 0,0025 e desvios de ângulo de ligação de 2,272. Os principais desvios estão nas regiões não ordenadas de alças, incluindo as pertencentes do domínio de ligação a carboidratos.

Todos os 237 resíduos foram bem definidos e consistentes com a sequência de aminoácidos; a densidade elétrica mostrada na estrutura da CRLI também inclui regiões usualmente instáveis na estrutura da lectina de leguminosa, comumente abrangendo alças de 117-123 e 149-151.

4.1.2.2 CRLI: monômero e arranjo biológico

A estrutura cristalina de CRLI complexada com X-Man resolvida a 1,65 Å pode ser descrita como uma estrutura rígida e comum em β -sanduíche, consistindo de uma folha β de seis fitas (anterior), uma outra folha β curvada (posterior) com sete fitas, e uma terceira pequena folha β , consistindo apenas de duas fitas conectando as outras folhas.

Os monômeros se associam por ligações não-covalentes, como dímeros canônicos estabilizados na forma tetramérica (Figura 18). Apesar da estrutura de CRLI encontrada na unidade assimétrica consistir em um monômero, a estrutura quaternária (o arranjo biológico de lectinas de leguminosas em solução) é um tetrâmero (LORIS et al., 1998). A estrutura tetramérica foi confirmada pela análise PISA (KRISINEL; HENRICK, 2007). Além disso, a estrutura de CRLI nativa exibiu um tetrâmero na unidade assimétrica (ROCHA et al., 2011).

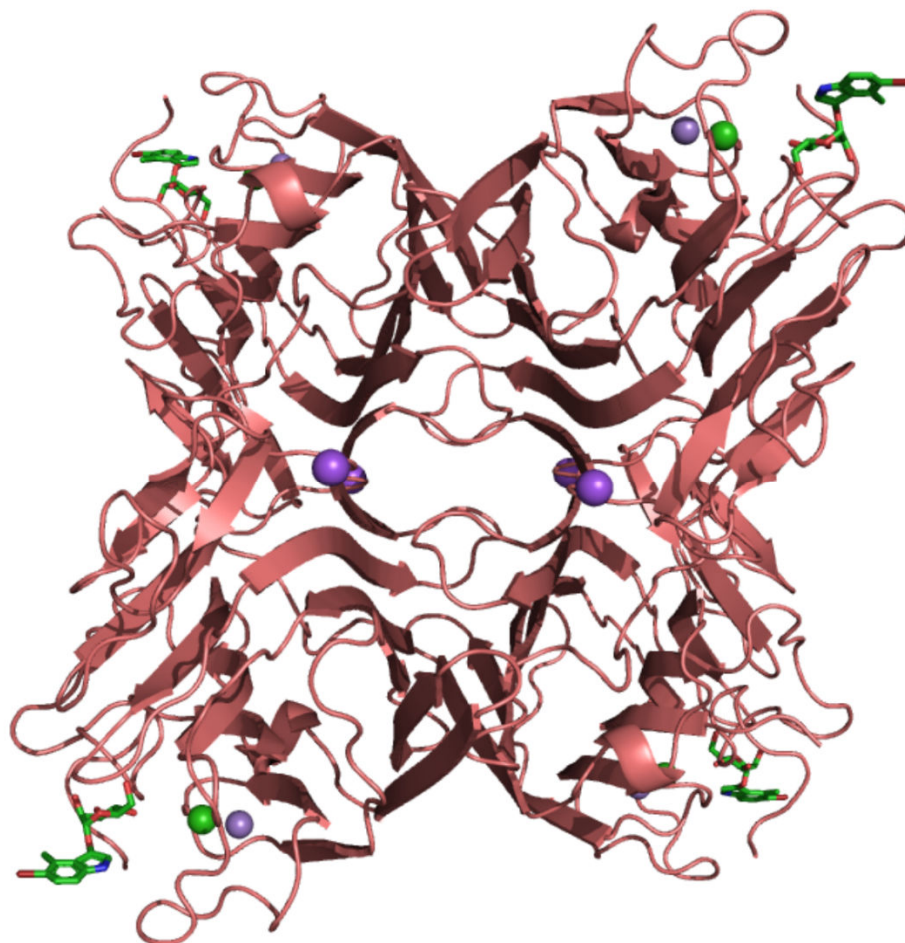


Figura 18 – Estrutura geral de CRLI. (A) O arranjo tetramérico das cadeias de CRLI está representado em cartoon (cor magenta clara); esferas representam os íons de cálcio (em verde), os íons de manganês (em roxo), e os íons de sódio (em roxo na cavidade central). Ligantes estão em representação em *sticks*, carbonos de X-man são coloridos em verde.

4.1.2.3 Sítios de ligação na estrutura de CRLI

A coordenação dos metais Mn^{2+} e Ca^{2+} no sítio de ligação ao metal de CRLI já foi descrita (ROCHA et al., 2011) e este apresenta resíduos conservados com grandes semelhanças a outras estruturas de lectinas de leguminosas (DELATORRE et al., 2007). Nestas semelhanças são incluídos os aminoácidos envolvidos, resíduos de água e a localização na estrutura monomérica na vizinhança do sítio de ligação a carboidrato. O Ca^{2+} é coordenado pelos resíduos Asp₁₀, Tyr₁₂, Asn₁₄ e Asp₁₉. Enquanto o Mn^{2+} é coordenado pelo Glu₈, Asp₁₀, Asp₁₉ e His₂₄. Além disso, moléculas de água ligam indiretamente Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ ao cálcio e os resíduos Ile₃₂ e Ser₃₄ ao manganês (Figura 19). A presença de metais divalentes provoca mudanças na orientação da cadeia lateral e estabiliza a ligação peptídica não-usual cis de Ala₂₀₇-Asp₂₀₈. A isomerização é provocada por uma ponte formada entre o íon cálcio, uma molécula de água e o grupo carbonila da cadeia peptídica de Asp₂₀₈.

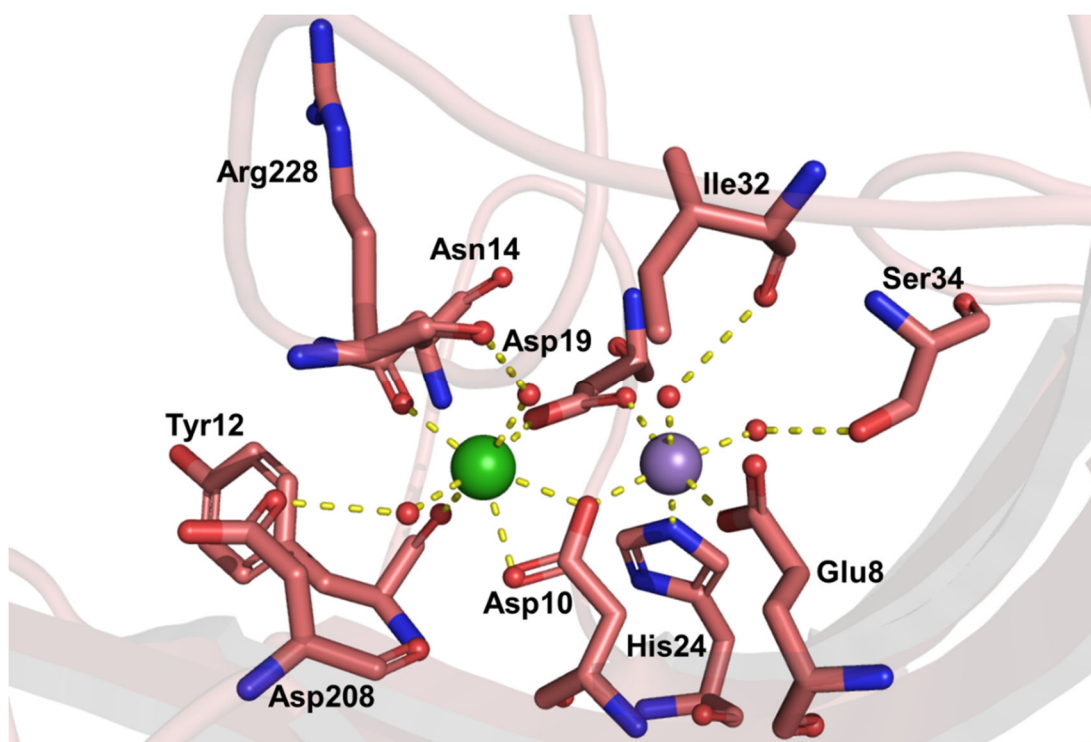


Figura 19 – Coordenação dos metais na estrutura de CRLI. A esfera verde representa o íon de cálcio e a roxa o magnésio, traços amarelos indicam as interações polares. Resíduos relevantes estão destacados em *sticks* magenta claro.

O mapa de diferença exibiu algumas características relevantes na estrutura de CRLI que foram explicadas pela presença de íons na condição da cristalização (Figura 20). Além disso, o CRD de CRLI é ocupado por uma molécula de X-man que foi resolvida na lectina utilizando o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc, como pode ser visto na Figura 21A.

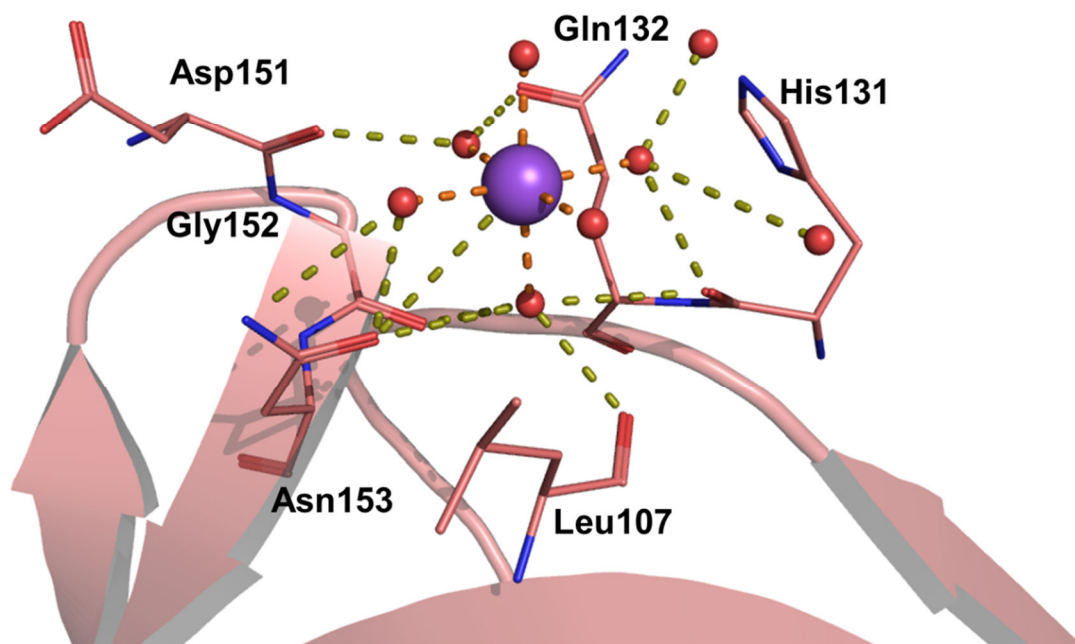


Figura 20 – Coordenação do sódio (representado em esfera) na estrutura de CRLI. Resíduos que participam da interação estão destacados como linhas. Moléculas de água são representadas como esferas vermelhas. Contatos polares são destacados como traços amarelos.

O resíduo de manose de X-Man foi conduzido para o sítio de ligação e estabilizado por uma rede de doze ligações de H conectando os resíduos Asn₁₄, Gly₉₈, Leu₉₉, Tyr₁₀₀, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ aos átomos de oxigênio O-3, O-4, O-5 e O-6 (Tabela V) presentes no manósídeo. O grupo indol do X-man é estabilizado por interações polar entre o grupo hidroxil de Tyr₁₂ e diversas interações de van der Waals com o subsítio hidrofóbico, envolvendo os resíduos Tyr₁₂, Leu₉₉ e Tyr₁₀₀ (ver Figura 21B).

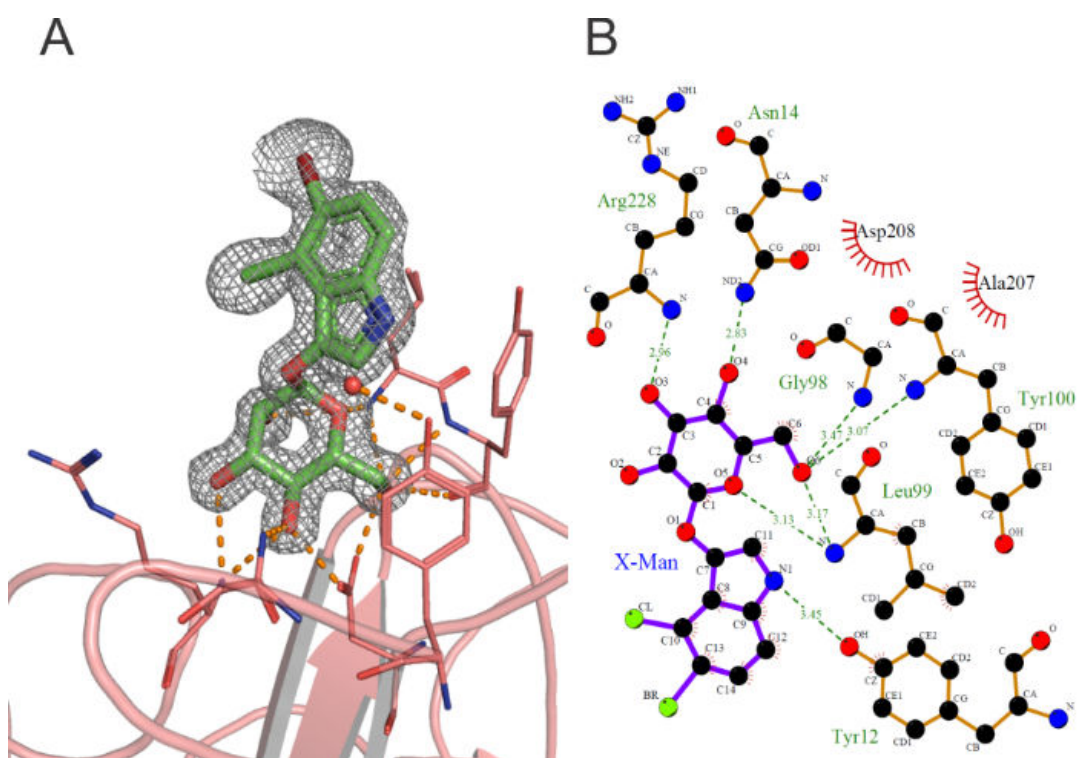


Figura 21 – Sítio de ligação a carboidratos de CRLI interagindo com X-Man A) Representação do mapa de omissão da densidade eletrônica contornada a 1σ no X-Man. Traços em laranja representam contatos polares. B) representação LIGPLOT das ligações de hidrogênio e de van der Waals em torno de X-man, os resíduos CRD estão nomeados.

Tabela V – Interações entre CRLI e X-Man

Amino Ácido	X-Man	Distâncias (Å)
<i>Interações de van der Waals</i>		
Tyr12 OH	C11	3,3
Gly98 CA	O6	3,3
Leu99 CD2	C9	3,4
Leu99 CB	O5	3,2
Ala207 CB	O6	3,2
Asp208 OD1	C6	3,2
Asp208 OD2	C6	3,1
Asp208 CG	O6	3,2
Asp208 OD1	C4	3,2
Asp208 OD2	C4	3,4
Asp208 CB	O4	3,3
Asp208 CG	O4	3,2
<i>Ligações de hidrogênio</i>		
Tyr12 OH	N1	3,4
Asn14 ND2	O4	2,8
Gly98 N	O6	3,4
Leu99 N	O5	3,1
Leu99 N	O6	3,1
Tyr100 N	O6	3,0
Tyr100 O	O6	3,4
Asp208 OD1	O6	3,4
Asp208 OD2	O6	2,3
Asp208 OD1	O4	2,4
Asp208 N	O3	2,9
Arg228 N	O4	3,2

4.1.2.4 Análise Estrutural

Como esperado, a estrutura geral do CRLI complexada com X-man mantém o mesmo aspecto da sua estrutura nativa já publicada (ROCHA et al., 2011). No entanto, ao sobrepor as duas estruturas, são reveladas diferenças importantes. É sabido que a entrada do ligante provoca rearranjos na proteína para que ocorra a estabilização da estrutura complexada, alcançando um novo estado de menor energia (TOOZE; BRANDEN, 1999).

Existem poucas distâncias-chave entre os resíduos de aminoácidos pertencentes ao CRD que sofrem variações provocadas pela entrada do carboidrato. Na Tabela VI, estas distâncias são resumidas. Algumas destas distâncias mostraram ser significativamente menores na CRLI nativa (CRLI_N) em relação a complexada (CRLI_C) fato que ocorre principalmente pelo movimento da cadeia lateral de Leu₉₉ em direção ao centro do CRD em CRLI_N.

Tabela VI – Distâncias (Å) entre resíduos envolvidos no reconhecimento a carboidrato.

Pares de resíduos	CRLI _C	CRLI _N
Tyr12 CZ-Gly227 CA	9,4	9,8
Leu99 CG-Tyr12 CZ	7,8	6,8
Leu99 CG-Asn14 ND2	9,9	8,6
Leu99 CG-Arg228 CZ	12,4	11,5
Tyr100 CZ-Tyr12 CZ	5,3	4,8
Tyr100 CZ-Asn14 ND2	9,4	8,8
Tyr100 CZ-Arg228 CZ	13,5	12,9

Em CRLI_C Leu99-Tyr12, Leu99-Asn14 e Leu99-Arg228 apresentam respectivamente 7,8 Å, 9,9 Å e 12,4 Å, enquanto na CRLI_N temos 6,8 Å, 8,6 Å, 11,5 Å. Como pode ser visto na Figura 22, a estrutura de CRLI complexada ao X-Man exibe alça maiores na região do CRD; estas características indicam que CRLI “abre espaço” para permitir a entrada do carboidrato e atingir a estabilidade. Os movimentos destas alças revelam um CRD mais volumoso. De fato, a lectina complexada apresenta o volume de 141 Å³ contra 113 Å³ da proteína nativa.

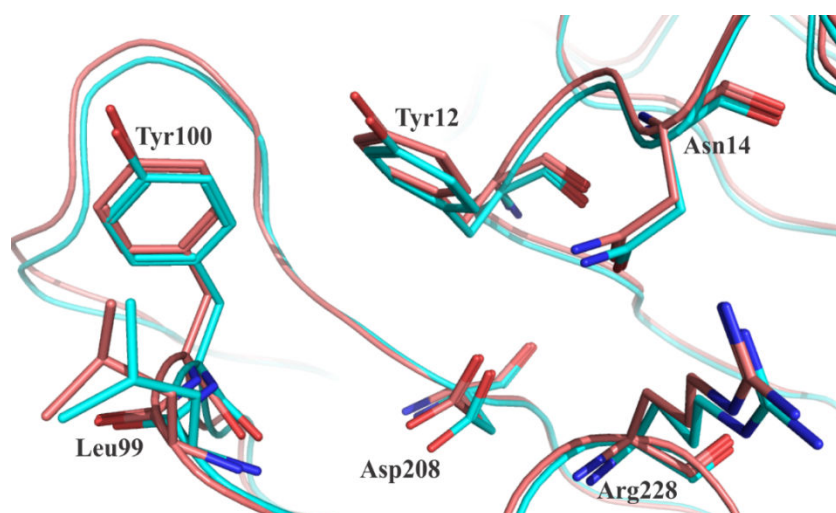


Figura 22 – Comparação entre a orientação de resíduos de CRD de CRLI nativa e CRLI complexada com X-Man. CRLI nativa é exibida na cor azul, resíduos do CRD estão nomeados. As diferenças nas posições indicam os ajustes da proteína causados pela entrada do X-man. O carboidrato foi omitido para uma imagem mais clara.

4.1.3 Resolução da estrutura de DSL

4.1.3.1 Coleta de dados, estatísticas da coleta e refinamento de DSL

Os cristais ideais para difração foram obtidos à temperatura de 298 K, utilizando condição de cristalização contendo 0,5 M de sulfato de amônia, 0,1 M de citrato de sódio tribásico diidratado pH 5,6 e 1,3 M de sulfato de lítio monoidratado.

Os dados de difração mostraram que os cristais de DSL pertencem ao grupo espacial ortorrômbico $I222$ com parâmetros de cela $a = 64,94 \text{ \AA}$, $b = 66,61 \text{ \AA}$, e $c = 108,65 \text{ \AA}$. As estatísticas do processamento, escalonamento, e refinamento dos dados são mostradas na Tabela VII. A substituição molecular foi feita utilizando as coordenadas (PDB 3SH3) da estrutura cristalina de *D. wilsonii* (DWL) como modelo de busca. O coeficiente de *Matthew* foi calculado em $2,30 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ baseado numa massa de 25,5 kDa, indicando a presença de um monômero na unidade assimétrica e um teor de solvente de 46,64 % (MATTHEWS, 1968).

Tabela VII - Coleta de dados, refinamento e qualidade da estrutura de DSL

Parâmetro	Valor
<i>Coleta de Dados</i>	
Grupo Espacial	<i>I</i> 222
Parâmetros da Célula Unitária (Å)	
<i>a</i>	64,94
<i>b</i>	66,61
<i>c</i>	108,65
Reflexões totais	134.440
Número de reflexões únicas	10.164
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limites de resolução (Å)	7,43-2,35
R_{merge}^a (%)	8,5 (20,5) ^d
Completeza	100 (100) ^d
Multiplicidade	4,6 (4,6)
$(I)/\sigma$	3,4 (5,4) ^d
<i>Substituição Molecular</i>	
LLG	2.380
RFZ	21,5
TFZ	24,9
<i>Refinamento</i>	
Resolução (Å)	28,41–3,50
R_{factor}^b (%)	23,57
R_{free}^c (%)	28,95
Número de resíduos na unidade assimétrica	237
Número de moléculas de água	72
<i>RMSD de valores ideais</i>	
Comprimentos de ligações (Å)	0,2357
Ângulos de ligações (graus)	1,958
<i>Luzzati</i>	0,343
<i>Fator de Temperatura</i>	
Média do valor B para toda cadeia proteica (Å ²)	34,0
Resíduos em regiões mais favorecidas (%)	97,4
Resíduos em regiões permitidas (%)	2,6
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0

^a $R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle \bar{I}(hkl) \rangle_i|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle \bar{I}(hkl) \rangle_i}$ onde $I(hkl)_i$ é a intensidade da medida da reflexão *h* e $\langle \bar{I}(hkl) \rangle_i$ é o valor médio $\langle \bar{I}(hkl) \rangle_i$ para toda *I* medida

$$^b R_{factor} = \frac{\sum_h ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum_h |F_{obs}|}$$

^c Calculado com 5 % das reflexões omitidas do refinamento

^d Valores em parênteses representam as camadas de alta resolução.

4.1.3.2 Estrutura geral de DSL

A estrutura geral de DSL complexada com X-man (Figura 23) foi refinada a uma resolução de 2,35 Å. Esta apresenta 72 moléculas de água, um íon cálcio e um íon manganês por monômero. Além disso, uma molécula X-Man foi modelada no domínio de reconhecimento do carboidrato (CRD). Após o último refinamento, a estrutura apresenta os valores de R_{factor} e R_{free} de 0,2357 e 0,2895 respectivamente. O modelo apresenta estequiometria baseada na gráfico de Ramachandran e uma estrutura geométrica bem definida. O *rmsd* apresenta desvios de comprimento ligação de 0,236 e desvios de ângulo de ligação de 1,958. As regiões não ordenadas de alças são responsáveis pelos principais desvios.

Em algumas lectinas de *Canavalia e Dioclea*, as alças 117-123 e 149-151 são consideradas como as regiões mais instáveis e por vezes não apresentam densidade eletrônica. Em DSL, as coordenadas dos resíduos Ser₁₁₉, Ile₁₂₀ e Ala₁₂₁ não foram modeladas, pois a alça 117-123 é instável. Por esta razão, estes resíduos foram omitidos na estrutura final. Todas as outras regiões foram bem definidas e consistentes com as sequências de aminoácidos.

4.1.3.3 Monômero de DSL e o arranjo biológico

A estrutura cristalina de DSL complexada com X-Man resolvida à 2,35 Å apresenta o domínio *jelly-roll*. Este consiste em folhas beta de seis fitas (posterior), uma outra folha curvada de sete fitas e uma terceira folha beta pequena, consistindo de duas fitas ligando as outras duas. Os monômeros se associam por ligações não-covalentes como dímero canônicos estabilizados na forma tetramérica (Figura 23). A estrutura de DSL encontrada na unidade assimétrica é representada por um monômero, porém seu arranjo biológico consiste de um tetrâmero (comum a lectinas de leguminosas em solução) (LORIS et al., 1998). A estrutura tetramérica foi confirmada pela análise PISA (KRISINEL; HENRICK, 2007)



Figura 23 – Estrutura geral de DSL. (A) O arranjo tetramérico das cadeias de DSL está representado em *cartoon* (cor verde); esferas representam os íons de cálcio (em verde), os íons de manganês (em roxo). Ligantes estão em representação em *sticks*, carbonos de X-man são coloridos em amarelo.

4.1.3.4 Sítios de ligação de DSL

A coordenação dos metais Mn^{2+} e Ca^{2+} no sítio de ligação ao metal de DSL apresenta configuração comum às lectinas de *Diocleinae* (DELATORRE et al., 2007). A coordenação dos íons se mantem praticamente constante, o que inclui os aminoácidos envolvidos, resíduos de água e a sua localização ao lado do sítio de ligação a carboidrato. Ca^{2+} é coordenado pelos resíduos Asp₁₀, Tyr₁₂, Asn₁₄ e Asp₁₉, e o Mn^{2+} é coordenado pelo Glu₈, Asp₁₀, Asp₁₉ e His₂₄. Além disso, moléculas de água ligam indiretamente Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ ao cálcio e o resíduo Ser₃₄ ao manganês. A presença de íons metálicos é responsável por estabilizar a ligação peptídica não-usual cis de Ala₂₀₇-Asp₂₀₈. A isomerização é provocada por uma ponte formada entre o íon cálcio, uma molécula de água e o grupo carbonila da cadeia peptídica de Asp₂₀₈ (Figura 24). Esta mudança estrutural é crucial para a manutenção do arranjo do CRD (LORIS et al., 1998).

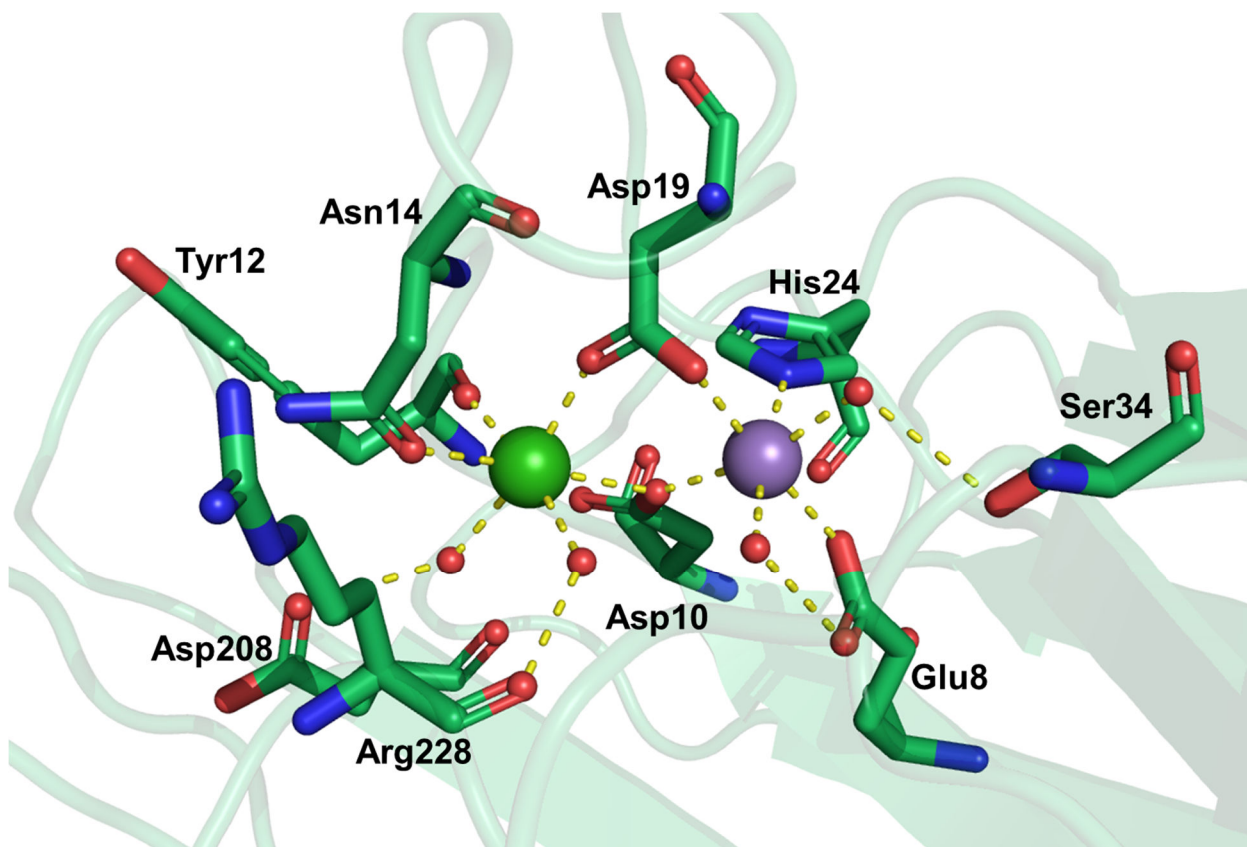


Figura 24 – Coordenação dos metais na estrutura de DSL. A esfera verde representa o íon de cálcio e a roxa o magnésio, traços amarelos indicam as interações polares. Resíduos relevantes estão destacados em *sticks* verdes.

O resíduo de manose de X-Man foi conduzido para o CRD e estabilizado por uma rede de dez ligações de H conectando os resíduos Asn₁₄, Gly₉₈, Leu₉₉, Tyr₁₀₀, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈ aos átomos de oxigênio O-3, O-4, O-5 e O-6 (Tabela VIII) presentes no manósídeo (Figura 25A). O grupo indol do X-man é estabilizado por diversas interações de van der Waals com subsítio hidrofóbico, envolvendo os resíduos Tyr₁₂, Leu₉₉ e Tyr₁₀₀ (Figura 25B).

Tabela VIII – Interações entre DSL e X-Man.

Amino Ácido	X-Man	Distâncias (Å)
<i>Interações de van der Waals</i>		
98 CA	O6	3,0
98 C	O6	3,2
99 CA	O5	3,4
99 CB	O5	2,9
99 CD	C9	3,1
99 CD	C12	3,2
99 CD	N1	3,4
207 CB	O6	3,4
208 OD	C4	3,4
208 CG	O4	3,4
228 CB	O3	3,4
228 CB	O4	3,2
228 CG	O3	3,2
<i>Ligações de hidrogênio</i>		
Asn14 ND2	O4	2,9
Gly98 N	O6	3,3
Gly99 N	O5	2,9
Leu99 N	O6	2,8
Tyr100 O	O6	3,4
Tyr100 N	O6	2,7
Asp208 OD1	O4	2,5
Asp208 OD2	O6	3,0
Arg228 N	O3	2,9
Arg228 N	O4	3,4

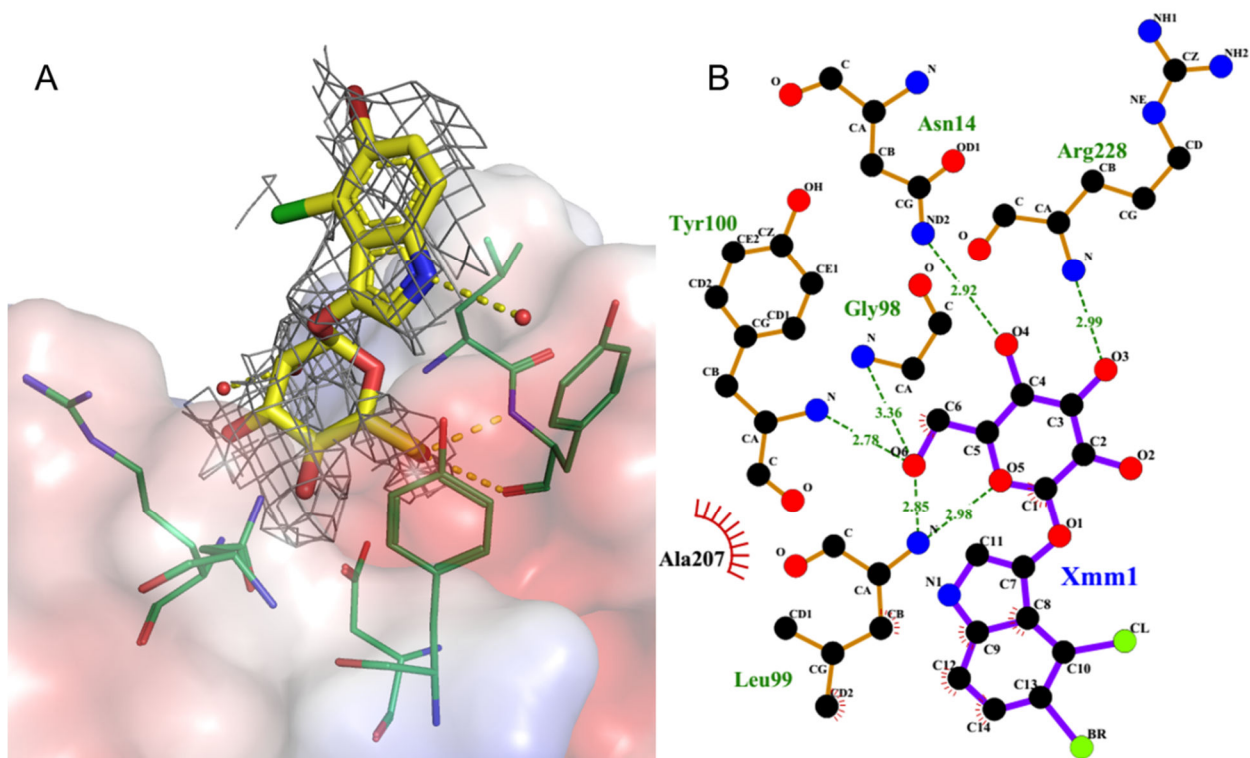


Figura 25 – Sítio de ligação a carboidratos de CRLI interagindo com X-Man A) Representação do mapa de omissão da densidade eletrônica contornada a 1σ no X-Man. Traços em amarelo representam contatos polares. B) representação LIGPLOT das ligações de hidrogênio e de van der Waals em torno de X-man, os resíduos CRD estão nomeados.

4.2. VASORELAXAMENTO PROVOCADO POR LECTINAS E ASPECTOS ESTRUTURAIS ENVOLVIDOS NA SUA REGULAÇÃO

4.2.1 ConGF

4.2.1.1 O efeito vasorelaxante de ConGF

Fenilefrina induziu contrações tônicas em aortas de rato com amplitude de $0,48 \pm 0,03$ g na ausência de endotélio ($n = 10$; Figura 26A) e $0,37 \pm 0,04$ g na presença de endotélio ($n = 12$; Figura 26B). ConGF relaxou os segmentos de aorta endotelizadas pré-contraídas nas doses de 30 e $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($\text{IC}_{50} = 34,48 \pm 5,07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em cerca de 25% (Figura 26B e 26C). O efeito relaxante da lectina não foi observado no endotélio desnudo (Figura 26A e 26C). A lectina não alterou a capacidade de resposta do tecido uma vez que, ao final de cada experimento, a resposta contrátil a KCl foi semelhante a inicial (Figura 26A e 26B).

O envolvimento de NO na resposta vasorelaxante foi demonstrado por várias lectinas da subtribo *Diocleinae*, como ConBr, ConM, ConA, DVL e DvirL (ASSREUY et al., 2009;

BEZERRA et al., 2013; GADELHA et al., 2005; NÓBREGA et al., 2012). A dependência do endotélio para o efeito relaxante da ConGF sugere o envolvimento deste gás. Em aortas previamente incubadas com L-NAME, a Phe induziu contrações com amplitude de $0,73 \pm 0,07$ (n = 5). L-NAME bloqueou o efeito relaxante do ConGF em todas as concentrações (Figura 26D), o que indica um papel potencial do NO como um mediador do relaxamento de vasos provocado pela lectina.

Comparado entre as lectinas de *Canavalia*, ConGF exibe menor efeito vasorelaxante na sua dose mais elevada (25 % de relaxamento em contrações proteicas de 100 $\mu\text{g/mL}$), enquanto ConBr, CGL, ConM e ConA provocam, respectivamente, 74 % (100 $\mu\text{g/mL}$), 108 % (100 $\mu\text{g/mL}$), 110 % (30 $\mu\text{g/mL}$) e 85% (100 mg/mL) de efeito relaxante em segmentos de aorta de ratos. Já está bem estabelecido que lectinas de leguminosas exibem grandes variações em diferentes atividades biológicas, mesmo estas sendo altamente homólogas (BEZERRA et al., 2011, 2013; CAVADA et al., 2001; CAVALCANTE et al., 2011; NÓBREGA et al., 2012; ROCHA et al., 2011; SANZ-APARICIO et al., 1997). Surpreendentemente, ConGF apresenta um efeito consideravelmente inferior quando comparado aos produzidos por proteínas similares que também atuam no relaxamento vascular. Nossa hipótese é que a configuração do CRD de ConGF é responsável por esta diferença uma vez que este domínio é o responsável pela adesão proteína-célula e elícita a produção de NO.

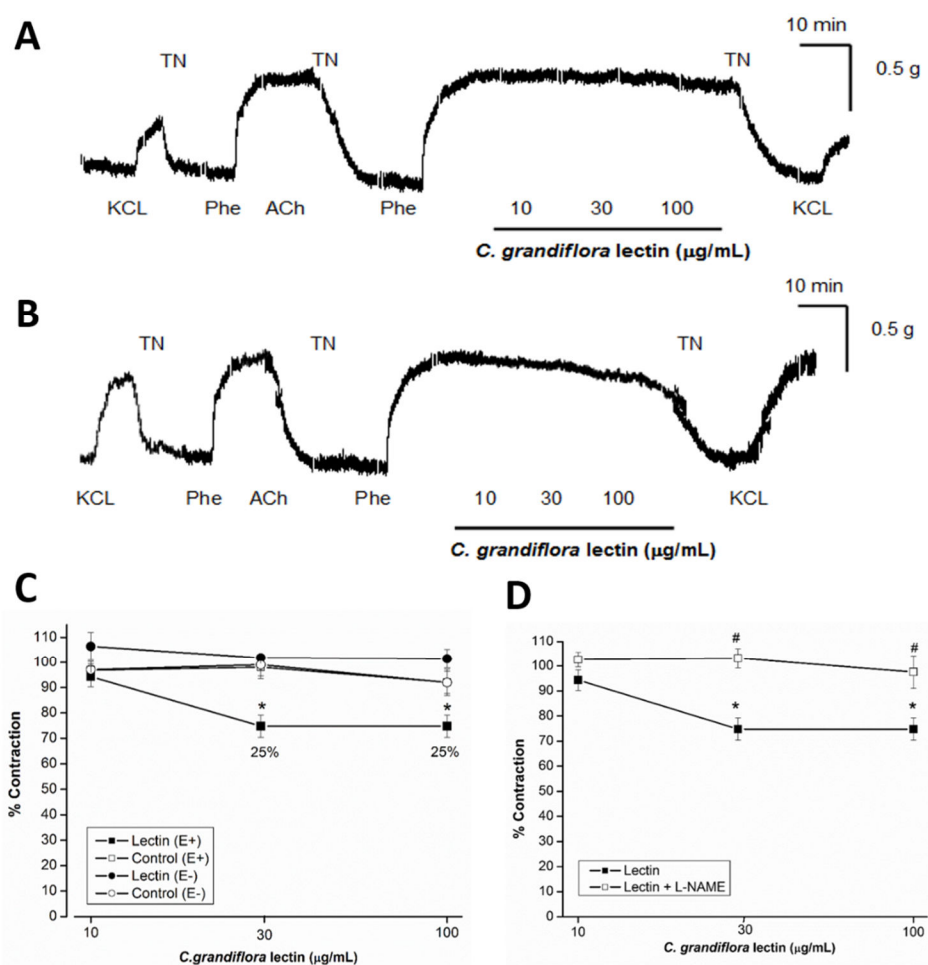


Figura 26 – Papel do endotélio no efeito relaxante da ConGF em aortas pré-contraídas com fenilefrina. Traços típicos mostrando o efeito de ConGF (1, 30 e 100 µg/mL) em (B) anéis de aortas desnudas (A) ou endotelizadas (B). Efeito da lectina na contração induzida por Phe, comparando seu efeito entre aorta desnuda e endotelizada (C) e o seu efeito na ausência ou na presença de L-NAME (100 µM) (D). Média ± S.E.M; * $p < 0,05$ versus controle (100% da contração Phe); # $p < 0,05$ vs lectina sozinho. Fenilefrina (Phe; 0,1 µM); acetilcolina (ACh; 1 µM), cloreto de potássio (KCl; 60 mM); 'TN' indica a lavagem da preparação com solução de Tyrode; aorta desnudada (E-); aorta endotelizadas (E+).

4.2.1.2 A estrutura de CRD de ConGF em relação a elicitação de atividade biológica

Domínios de ligação a carboidratos em lectinas de leguminosas são compostos de alças adjacentes. Estes são estabilizados por interações fracas, que são formadas entre eles mesmos e com o sítio de ligação a metal (BOUCKAERT et al., 1995; LORIS; HAMELRYCK; BOUCKAERT, 1998). Os principais resíduos da cadeia polipeptídica encontrados nestas regiões de alça, geralmente, são muito semelhantes entre as lectinas de *Canavalia* e apresentam alta flexibilidade nas suas cadeias laterais. A maioria das lectinas de *Diocleinae* exibem propriedades biológicas semelhantes, mas com grandes diferenças nas suas intensidades (CAVADA et al.,

2001). As diferenças das distâncias entre os átomos dos resíduos que compõem o CRD são, em sua maioria, pequenas. Ainda assim, são poderosas o suficiente para promover diferenças de intensidades de atividades biológicas (BEZERRA et al., 2011).

Nas lectinas, o CRD sofre ajuste induzido provocado pela ligação do carboidrato, e neste trabalho a estrutura resolvida de ConGF exhibe um CRD ocupada por X-man. Algumas distâncias-chave entre os resíduos de aminoácidos do CRD sofrem alterações (em sua maioria pequenas) provocadas pela entrada do carboidrato (Figura 27). Contudo, baseado no alinhamento de estrutura de formas não complexadas e complexadas de lectinas com elevada similaridade, verificou-se que as distâncias entre os pares de resíduos Tyr₁₂-Gly₂₂₇, Leu₉₉-Asn₁₄ e Tyr₁₀₀-Arg₂₂₈ são praticamente constantes (BEZERRA et al., 2011; GADELHA et al., 2005). As alterações em distâncias específicas entre átomos dos resíduos de aminoácidos do CRD das lectinas de leguminosas podem justificar as divergências na afinidade e reconhecimento a carboidratos. Neste estudo as distâncias vão servir como base para justificar as diferenças observadas na intensidade da estimulação da eNOS.

Como referência, a Tabela IX lista as distâncias-chave entre átomos dos resíduos do CRD de lectinas de *Canavalia*. Entre estas, ConM parece ser a melhor indutora da produção de NO (ASSREUY et al., 2009; GADELHA et al., 2005), pois seu CRD apresenta algumas características estruturais, como as distâncias entre aminoácidos e o volume do sítio, que favorecem esta indução. Mais detalhadamente e de acordo com as análise realizada, as distâncias que separam Tyr₁₂CZ-Gly₂₂₇CA, Leu₉₉CG-Asn₁₄ND2 e Tyr₁₀₀CZ-Arg₂₂₈CZ devem ser respectivamente inferiores a 9,0 Å, menores que 9,5 Å e maiores que 12,0 Å para promover essa atividade (ASSREUY et al., 2009; GADELHA et al., 2005).

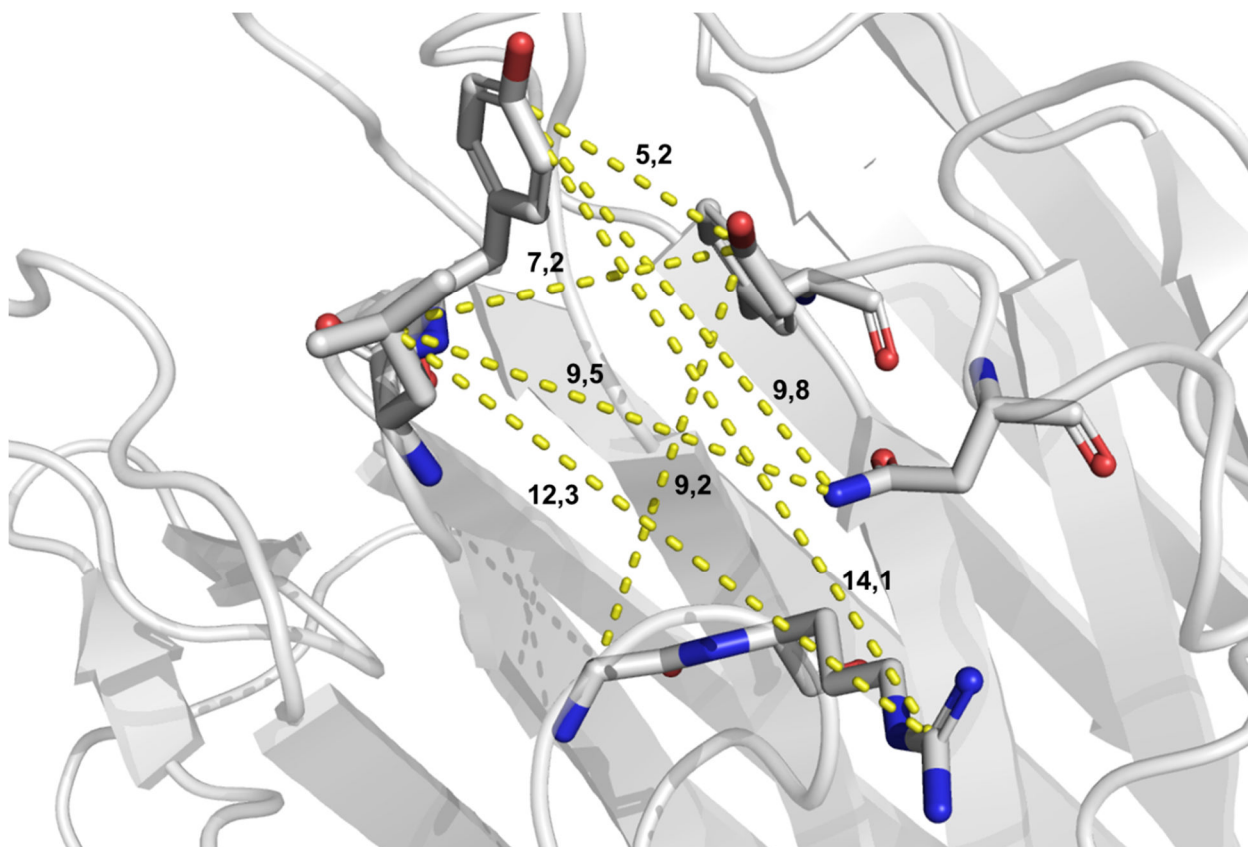


Figura 27 – Posição relativa entre os resíduos do CRD e suas respectivas distâncias-chave no sítio da *C. grandiflora*.

Tabela IX – Distâncias entre resíduos que formam o sítio de reconhecimento a carboidrato em *Canavalia*.

Pares de resíduos	ConGF	ConBr	ConM	ConA	CGL
Tyr12 CZ-Gly227 CA	9,2	8,6	8,9	9,5	9,3
Leu99 CG-Tyr12 CZ	7,2	6,8	7,6	7,4	8,1
Leu99 CG-Asn14 ND2	9,5	9,1	9,0	9,3	8,6
Leu99 CG-Arg228 CZ	12,3	11,8	11,1	11,5	9,9
Tyr100 CZ-Tyr12 CZ	5,2	5,4	5,2	5,4	5,4
Tyr100 CZ-Asn14 ND2	9,8	9,9	9,4	9,3	9,5
Tyr100 CZ-Arg228 CZ	14,1	14,2	13,7	13,0	13,0

De modo semelhante, as distâncias exibidas pelo CRD de ConBr levariam a classificação desta lectina como uma indutora altamente eficiente no vasorelaxamento dependente de NO baseado nas distâncias relatadas para a ConM e outras lectinas de *Canavalia* previamente caracterizadas (GADELHA et al., 2005). Diferente das outras lectinas, as distâncias Tyr₁₀₀CZ-Arg₂₂₈CZ (14,2 Å) e Leu₉₉CG-Tyr₁₂CZ (6,8 Å) para a ConBr são consideradas suficientemente

grandes e curtas, respectivamente. Estas características dão origem a um CRD mais estreito, e como consequência destas mudanças ocorre a formação de um sítio de ligação com um menor volume (BEZERRA et al., 2011). Essas modificações tem efeitos direto sobre a atividade biológica e coloca ConBr na classe de um indutor de vasorelaxamento de eficácia apenas moderada. Estes resultados mostram que as distâncias entre resíduos de aminoácidos no CRD de lectinas de leguminosas são determinantes para a produção de NO, e conseqüentemente, a uma maior ou menor indução do relaxamento dos vasos. Com base nessas características estruturais, ConGF não cumpre os requisitos de um indutor eficiente de vasorelaxamento. Para justificar, ConGF tem duas distâncias fundamentais relacionados à atividade vasorelaxante (Tyr₁₂CZ-Gly₂₂₇CA e Leu₉₉CG-Asn₁₄ND2) localizada a alguns angstroms distante dos limites marcados para um bom indutor. Estes limites são Tyr₁₂CZ-Gly₂₂₇CA, Leu₉₉CG-Asn₁₄ND2 e Tyr₁₀₀CZ-Arg₂₂₈CZ e devem ser menores do que 9,0 Å e 9,5 Å e maior que 12,0 Å respectivamente. Com base nestes limites, a distância de Tyr₁₀₀CZ-Arg₂₂₈CZ em ConGF deve ser inserida dentro dos limites de um indutor potente, uma vez que é maior do que 12 Å (14,3 Å). Contudo, esta distância se encaixa no mesmo intervalo de ConBr, e juntamente com a distância Leu₉₉CG-Tyr₁₂CZ (7,23 Å), dão origem a um CRD mais estreito e mais profundo. A consequência para o sítio de ligação é um volume inferior ao do melhor indutor (121 Å³ no CRD de ConGF e 135 Å³ no de ConM). Estes resultados revelam a importância das distâncias-chave e o volume do CRD na produção de NO induzida por lectinas, estes foram considerados determinantes da baixa capacidade de ConGF para provocar relaxamento vascular.

4.2.2 CRLI

4.2.2.1 Atividade vasorelaxante e a relação estrutural de CRLI

A fenilefrina induziu contrações tônicas estáveis de $0,45 \pm 0,06$ g em preparações de anéis de aorta possuindo endotélio intacto (n=8) e de $0,63 \pm 0,04$ g naquelas em que o endotélio havia sido removido mecanicamente (n=8). Nas preparações com o endotélio preservado, CRLI (IC₅₀= $12,4 \pm 4,92$ µg/ml) elicitou relaxamento nas doses de 10, 30 e 100 µg/ml com $56,17 \pm 13,58$ %; $86,23 \pm 7,92$ % e $95,98 \pm 15,1$ % de relaxamento, respectivamente. Em contraste, nas preparações de endotélio desnudo, uma adição cumulativa de CRLI não foi capaz de induzir o efeito relaxante (Figura 28A e 28B).

O efeito relaxante do CRLI também não foi inibido pela indometacina ou TEA. Porém, L-NAME bloqueou completamente o efeito da lectina (Figura 28C). O efeito relaxante de CRLI ($94,91 \pm 11,71$ %) não foi alterado pela incubação prévia com atropina ($75,77 \pm 13,18$ %). No

entanto, numa condição com meio livre de cálcio (0Ca), o efeito relaxante de CRLI foi inibido parcialmente ($50,32 \pm 10,02 \%$), demonstrando a necessidade de Ca^{2+} em um certo nível (Figura 28D). O efeito relaxante de Ach ($10 \mu\text{M}$) usada como controle foi totalmente bloqueado pela atropina e pela solução livre de cálcio (Ca0).

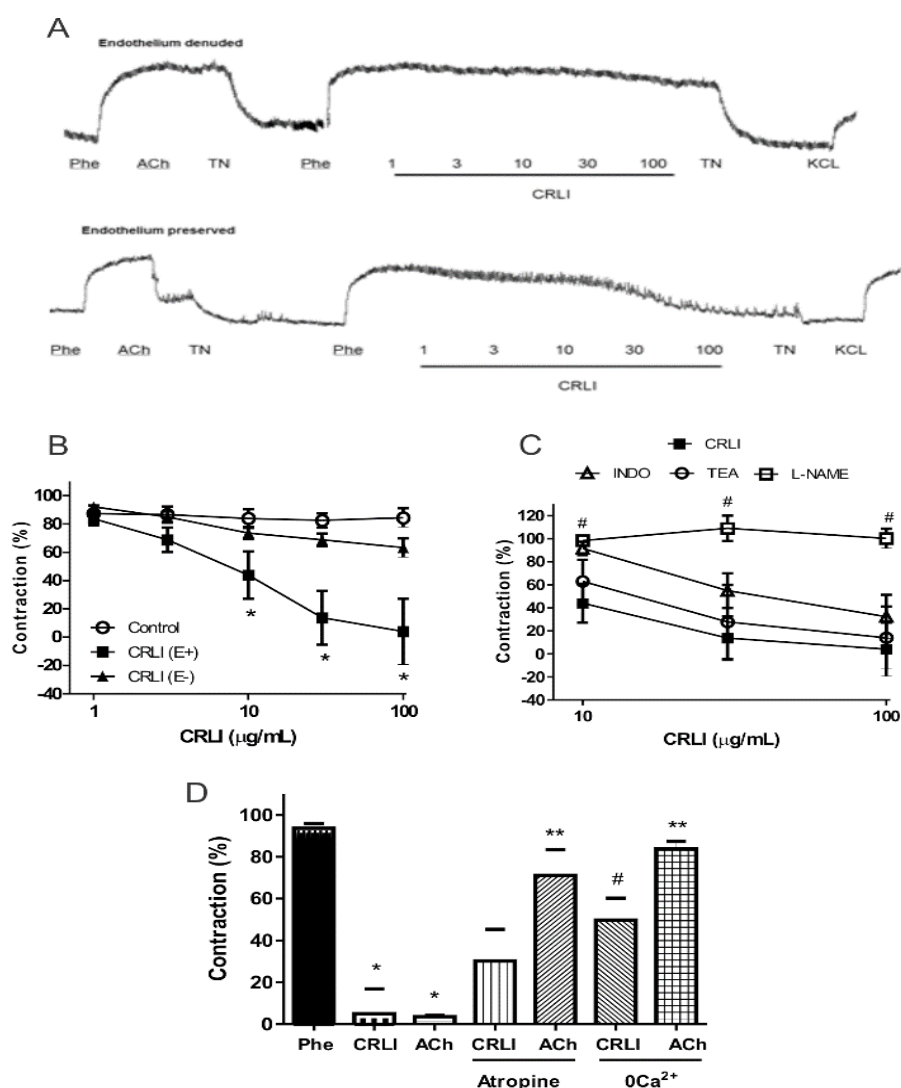


Figura 28 – Efeito vasorelaxante de CRLI. A – Registro típico. B – Curva dose dependente em segmentos na presença e ausência d endotélio. C – Efeito de inibidores de EDRF sobre o relaxamento. D – Efeito da remoção do cálcio na atividade.

L-NAME bloqueou o efeito vasorelaxante de CRLI, diferentemente da indometacina e TEA. O NO é o principal mediador do relaxamento dependente do endotélio na musculatura lisa dos vasos (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), o que sugere este fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) como o responsável pelo efeito desta lectina. A literatura tem mostrado que outras lectinas da subtribo *Diocleinae* apresentam efeitos relaxantes em aortas pré-contraídas de

ratos com a fenilefrina via NO. Porém, estes estudos estão restritos aos gêneros *Dioclea* e *Canavalia* (ASSREUY et al., 2009; BEZERRA et al., 2013; GADELHA et al., 2005; KLEHA; DEVESLY; JOHN, 1991; NASCIMENTO et al., 2012; NÓBREGA et al., 2012).

NO é o principal EDRF produzido no endotélio que recobre a musculatura lisa dos vasos sob a ativação da eNOS (CHEN et al., 1997; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; NÓBREGA et al., 2012). Esta enzima foi descrita como dependente da formação do complexo Ca^{2+}/CaM para a sua ativação. Esse mecanismo é também utilizado por agonistas como Ach via receptores muscarínicos M3, que estão presentes no endotélio vascular (BUSSE; MÜLSCH, 1990). No entanto, eNOS pode também ser ativada por mecanismos independentes do cálcio como a força de cisalhamento, que realiza contato na superfície da célula endotelial pela passagem sanguínea e provoca o relaxamento (KUCHAN; FRANGOS, 1994). O efeito relaxante do CRLI parece ocorrer por um mecanismo diferente do utilizado pela Ach, pois a incubação do tecido aórtico com atropina, uma antagonista competitivo dos receptores muscarínicos, não preveniu o relaxamento induzido pela lectina. Além disso, CRLI exibe ainda um relaxamento parcial da aorta numa solução livre de cálcio, sugerindo que o cálcio extracelular e a formação de complexo Ca^{2+}/CaM não são a única rota utilizada na cadeia de sinalização bioquímica envolvida nos efeitos relaxantes desta lectina.

Fatores proteicos como a substância P e o peptídeo C são também capazes de elicitar a produção de NO quando interagem com receptores endoteliais acoplados a proteínas-G. A substância P interage com o receptor Taquinina 1, induzindo o influxo de Ca^{2+} e consequentemente a ativação de eNOS (QUARTARA; MAGGI, 1997). Assim como para o peptídeo C, até então não existe um receptor endotelial acoplado a proteína-G identificado para as lectinas (FORST; KUNT, 2004). Diferentemente dessas moléculas, a atividade de CRLI não foi totalmente cessada pela remoção do cálcio, indicando uma ativação secundária de eNOS por um mecanismo independente deste íon.

4.2.2.2 CRLI se liga ao heparano sulfato

Várias rotas bioquímicas de transdução de força foram caracterizadas para mecanismo independentes de cálcio na ativação da eNOS, porém o(s) mecanoreceptor(s) primário(s) permanece(m) desconhecido(s) (WHITE; FRANGOS, 2007). Florian e colaboradores (2003) formularam uma hipótese sólida de mecanotransdução que sugere que frações de heparano sulfato do glicocálice atuam como sensores da tensão de cisalhamento na produção de NO pelas células endoteliais. Os proteoglicanos de heparano sulfato, os sindecanos, se associam a

elementos do citoesqueleto como a actina. A condição local deste componente está envolvida na regulação da transdução de sinais para a produção de NO nas células endoteliais, proporcionando assim a estruturação de um mecanismo que liga o heparano sulfato do glicocálice para a produção de NO (FLORIAN et al., 2003).

As lectinas são conhecidas, principalmente, como proteínas de ligação a carboidratos. Apesar de este conceito pertencer a sua definição, ele não indica a real capacidade dessas proteínas, que também possuem a habilidade de se ligar a diferentes ligantes em múltiplos sítios (BABOSHA, 2008; DELATORRE et al., 2007; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983a). Aqui, indicamos um novo sítio em lectinas, tendo este a capacidade de reconhecer heparano sulfato. Cardin e Weintraub (1989) identificaram em fosfolipídios duas sequências consensuais capazes de se ligar a heparina: XBBBXXBX ou XBBXBX, onde B é o aminoácido básico e X representa os aminoácidos não-básicos (CARDIN; WEINTRAUB, 1989). Heparano sulfato e heparina são glicosaminoglicanas e consistem em uma repetição variável de unidades de dissacarídeo sulfatado. Foi identificado na CRLI um fragmento em sua sequência semelhante ao motivo de ligação a heparina, uma curta sequência de resíduos ricos em aminoácidos básicos entre posições 29 a 36 (IKSIRSKS); esta característica na estrutura CRLI pode ter facilitado a interação desta lectina com membrana de sulfato de heparano.

Para reforçar esta hipótese, foi realizada uma simulação de *docking* molecular com uma sequência linear de cinco subunidades de heparano sulfato para uma região rica em resíduos básicos. Os resultados demonstraram que todas as poses encontradas na simulação foram atraentes para esta região. A pose com energia de interação mais atraente foi demonstrada na Figura 29A.

Lys₃₀ e Lys₃₅ estabeleceram contatos polares com o sulfato de penta-heparano. A cadeia lateral da Arg₃₃ está posicionada um pouco mais distante do heparano, no entanto sua carga ainda contribui para favorecer o ambiente de ligação. Além dos resíduos carregados positivamente, Thr₁₅ e Gly₁₈ favorecem a ligação através de contatos polares; já Thr₁₇, Tyr₇₇ e Val₇₉ contribuem através de contatos de Van der Waals. A orientação relativa (e o tipo de contribuição) dos resíduos que compõem este sítio de ligação está detalhada na Figura 29B. Também foi avaliada a capacidade do CRD de CRLI ligar-se a molécula de heparano-sulfato. O *docking* indica que o CRD também pode se ligar ao heparano, porém a energia de interação apresentada (-147,435) é inferior ao encontrado no domínio de ligação tipo heparina (-185,963). O *docking* realizado, utilizando esta sequência particular como centro de busca e um penta-heparano sulfato como ligante, mostrou que CRLI é capaz de reconhecer HS e que estes

glicosaminoglicanos podem ser considerados como mecanorreceptores envolvidos na produção de óxido nítrico.

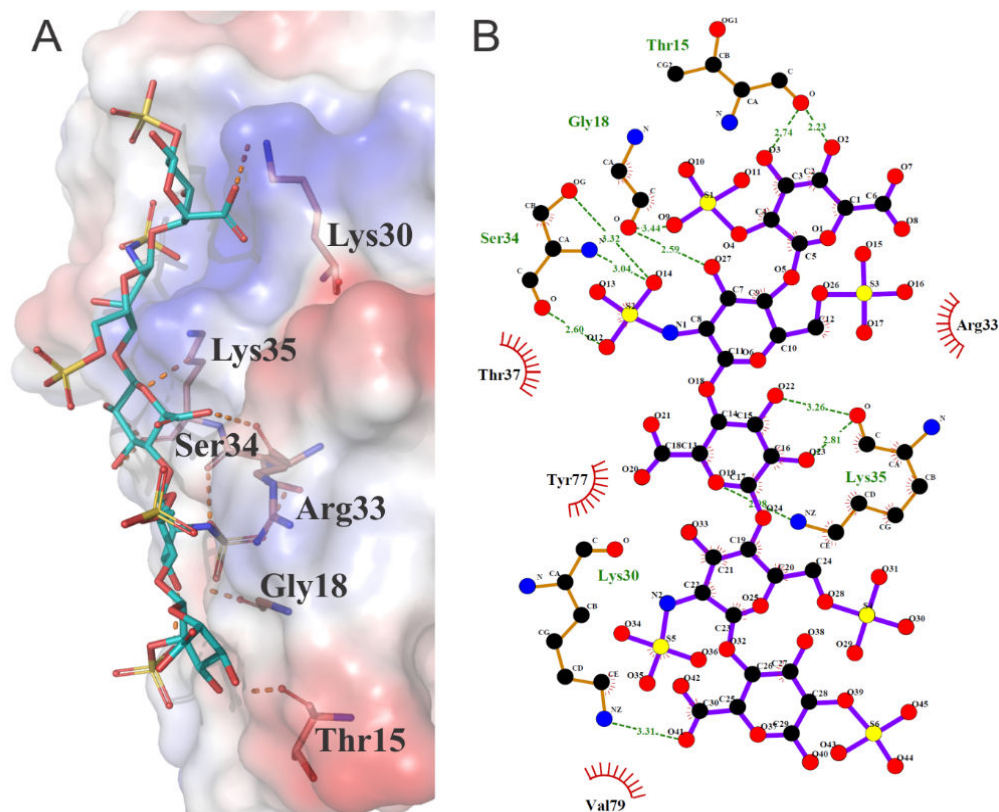


Figura 29 – A) *Docking* do penta-heparano sulfato na estrutura de CRLI. Estruturas em destaque são representados em forma de *sticks*. Resíduos envolvidos na coordenação do heparano estão na cor magenta clara e o heparano sulfato em azul. (Em volta do monômero de CRLI, uma superfície indica a distribuição de cargas eletrostáticas B) Indicação da orientação relativa e tipo de contribuição dos resíduos que compõem sítio de ligação do heparano.

A capacidade de reconhecer heparano sulfato pode ser estendida para as lectinas de *Diocleinae*, já que estas apresentam este mesmo domínio conservado em suas estruturas (Figura 30)

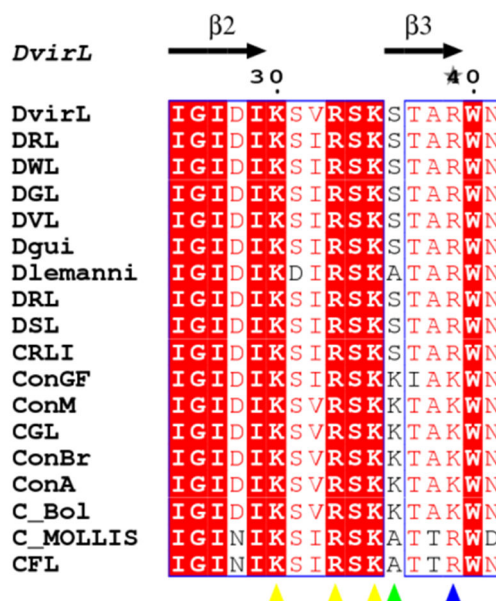


Figura 30 – Alinhamento de fragmento de *Diocleinae* rico em aminoácidos básicos. Triângulos amarelos indicam os resíduos básicos conservados (posições 30, 33 e 35); o verde indica a posição 36 e azul a 39.

Triângulos amarelos indicam que os resíduos básicos encontrados no fragmento de CRLI são conservados na subtribo *Diocleinae*. O triângulo verde indica a posição em que lectinas do gênero *Canavalia* apresentam um resíduo básico extra, o que destaca este gênero entre as outras lectinas de *Diocleinae* como o de maior concentração de cargas positivas em um mesma região. Ainda próximo a esta última posição temos outro resíduo básico, variando entre lisina ou arginina, ocupando a posição 39, o que pode favorecer a ligação a heparano sulfato.

As mesmas condições do *docking* molecular de CRLI foram aplicadas em outras lectinas da mesma subtribo, o que permitiu avaliar como mais a hipótese da presença de um novo domínio. ConGF e DSL foram convenientemente escolhidas para estas simulações. Praticamente ambas apresentaram a mesma energia de interação com o ligante e com intensidades maiores à CRLI (-217,977 para ConGF e -217,787 para DSL). Os resultados sugerem se tratar de um novo domínio de interação presentes nestas lectinas; além disso, a presença de um resíduo básico a mais neste domínio nas canavalias não parece ser fator determinante para garantir ou não a interação com o ligante.

4.2.3 DSL

4.2.3.1 Efeito vasorelaxante de DSL

A fenilefrina induziu contrações tônicas em aortas com amplitude de $0,811 \pm 0,35$ g (n = 11) na ausência e $0,714 \pm 0,149$ g (n = 10) na presença de endotélio. A lectina de DSL induziu relaxamento em aortas endotelizadas pré-contraídas com Phe (CI50 = $12,77 \pm 4,03$ mg/ml), iniciando a $10 \mu\text{g/ml}$ com $18,68 \pm 3,38\%$ e atingindo o efeito máximo de $100 \mu\text{g/ml}$ com $36,07 \pm 9,25\%$. No entanto, nenhum efeito relaxante foi observado em tecidos desnudos do endotélio (Figura 31C). A lectina não alterou a capacidade de resposta do tecido ao final de cada experimento em todos os protocolos, uma vez que a resposta contráctil induzida por KCl provocou um tônus semelhante ao inicial (dados não apresentados) (Figura 31A e B).

L-NAME bloqueou o efeito relaxante da lectina na dose de $100 \mu\text{g}$ (Figura 31D), o que mostra a influência do óxido nítrico derivado do endotélio. A associação de lectina com o seu açúcar ligante -CH3 inverteu totalmente o efeito relaxante da lectina *D. sclerocarpa*, mostrando a participação do domínio de lectina neste efeito (Figura 31D).

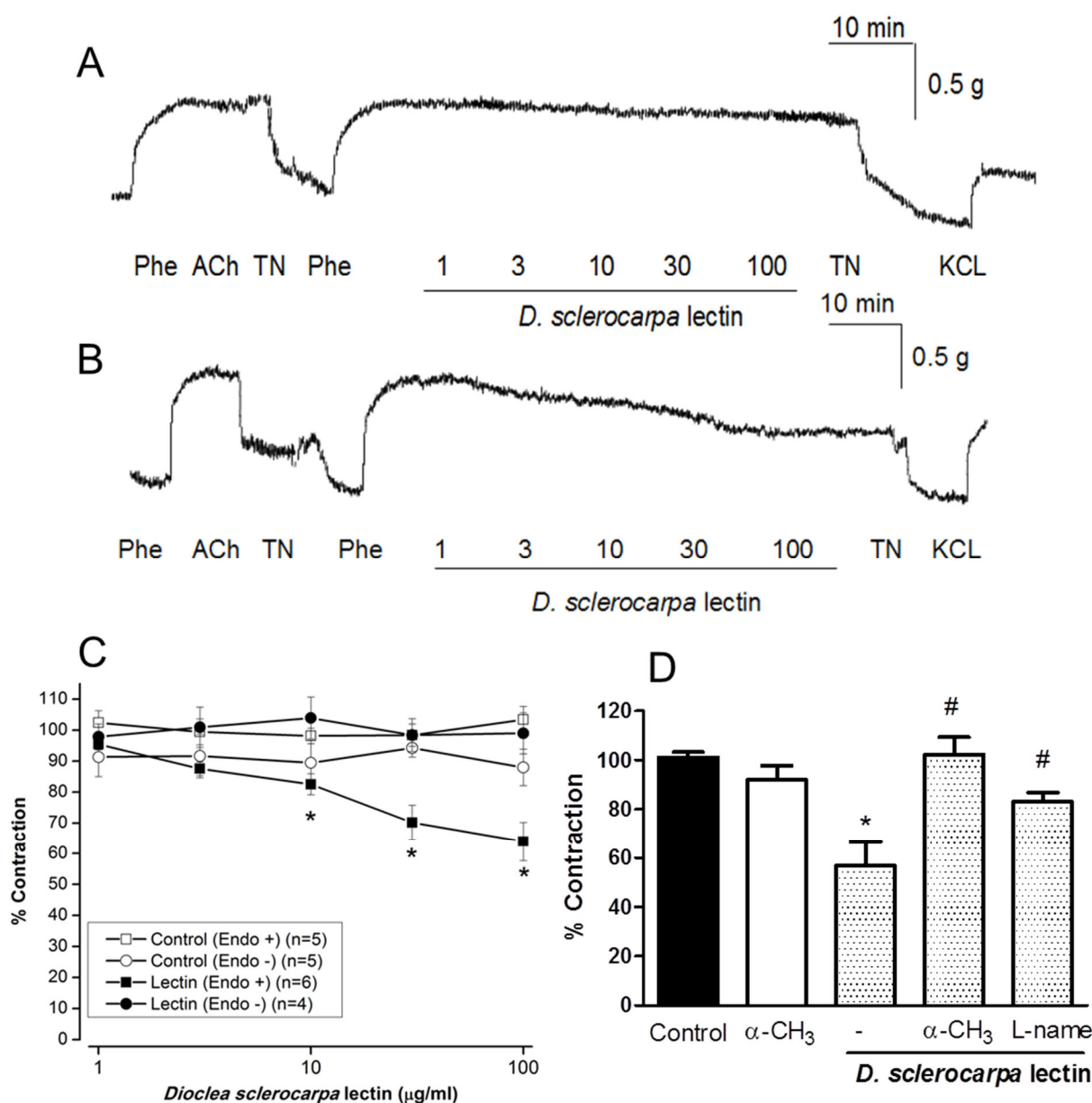


Figura 31 – A lectina de DSL induz o relaxamento de aortas endotelizadas pré-contraídas com fenilefrina via produção de óxido nítrico e domínio lectínico. Traços típicos das reações de DSL (1-100 $\mu\text{g/ml}$) em (A) anéis de aorta endotelizados e (B) pré-contraídos com Phe; C) os dados que comparam as respostas de DSL (1-100 $\mu\text{g/ml}$) ao controle em anéis de aorta desnudados e endotelizados pré-contraídos com Phe D) Reversão de respostas relaxantes de lectina DSL (100 $\mu\text{g/ml}$) por L-NAME (100 μM) e incubação com alfa-metil-manosídio ($\alpha\text{-CH}_3$; 0,1 M) em anéis de aorta endotelizados pré-contraídos com Phe. A lectina foi incubada com $\alpha\text{-CH}_3$ antes da adição. Média \pm S.E.M.; * $p < 0,05$ versus controle; controle indica o grupo que recebeu o mesmo volume de solução de Tyrode em vez de lectina. Phe = fenilefrina (0,1 μM); Ach = acetilcolina (1 μM); KCl = cloreto de potássio (60 mM); TN = lavagem do tecido.

Frente a outras lectinas deste gênero, DSL apresentou o vasorelaxamento de menor intensidade. Enquanto DVL, DvirL e DRL apresentaram respectivamente 43, 70 e 96 % de

relaxamento a 100 $\mu\text{g/ml}$ (BEZERRA et al., 2013; NÓBREGA et al., 2012), DSL relaxou apenas 36 %.

4.2.3.2 Relação do desenho do CRD de DSL com o efeito vasorelaxante.

Diferenças nas distâncias entre Arg228 e Asn14, e entre Arg228 e Tyr100, desempenham um papel importante na profundidade do sítio de ligação a carboidratos em lectinas do gênero *Dioclea*. (NÓBREGA et al., 2012). Da mesma forma, a largura do sítio depende da distância entre Tyr100 e Tyr12, estas determinam a geometria do sítio de ligação a carboidratos. A geometria (e conseqüentemente as propriedades biológicas) é resultado das distâncias entre os resíduos que compõem o CRD. De maneira geral, um CRD largo e raso favorece a interação da lectina com carboidratos, enquanto um CRD mais estreito e profundo tende a diminuir esta interação (BEZERRA et al., 2013) (Figura 32).

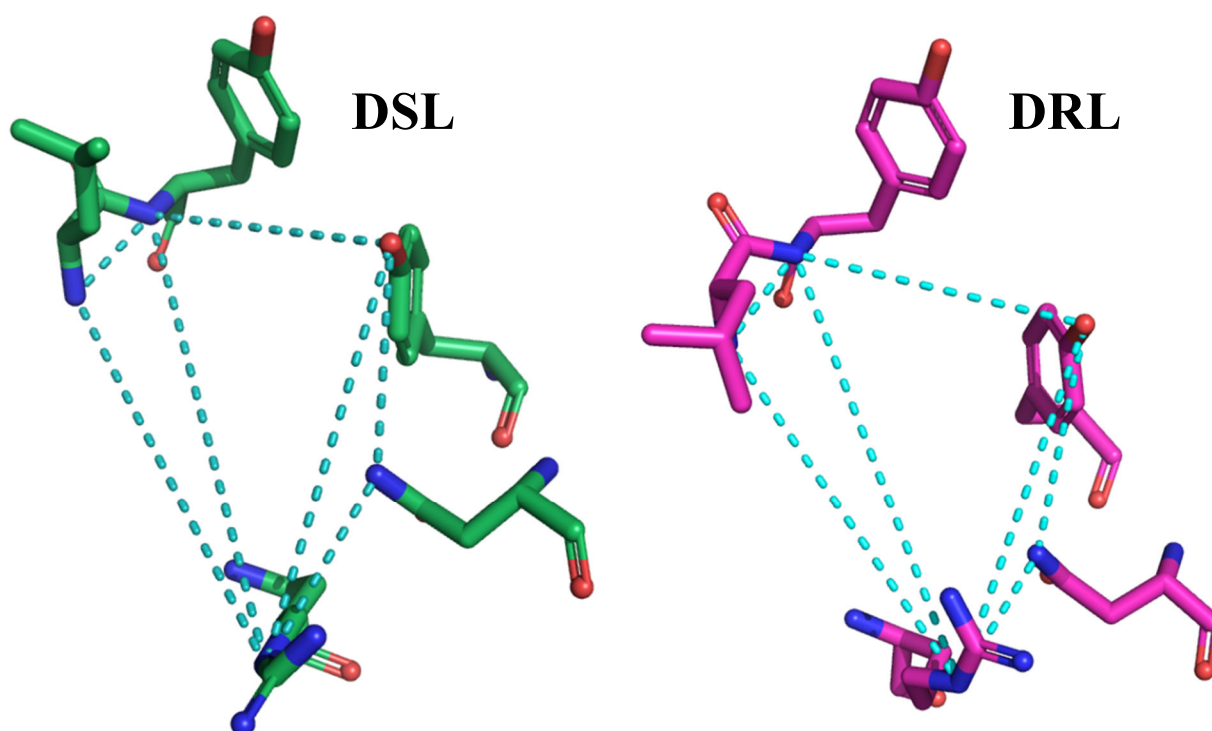


Figura 32 – Os resíduos em *sticks* de cor verde demonstram a forma do CRD de DSL, enquanto os de cor magenta representam o CRD de DRL.

O CRD de DSL se assemelha bastante ao de DVL (Tabela X), o que claramente justifica a baixa atividade vasorelaxante desta lectina e fortalece o desenho de sítio proposto por Nóbrega e colaboradores (2012). De acordo com este desenho, o resíduo Arg228 em posição proximal

favorece a interação com glicanos, o que faz com que DRL se destaque neste fenômeno biológico (BEZERRA et al., 2013; NÓBREGA et al., 2012).

No entanto, DvirL mantém níveis de relaxamento intermediários mesmo apresentando um desenho de CRD que se aproxima dos fracos indutores do vasorelaxamento. Porém, esta lectina apresenta uma característica importante compartilhada pela forte indutora DRL: a posição 205 em sua sequência primária é ocupada pelo resíduo de aminoácido aspartato (o mesmo ocorre para DRL) enquanto os fracos indutores nesta posição apresentam resíduos de glutamato.

Tabela X – Distâncias entre resíduos que compõem o CRD de lectinas de *Dioclea* que apresentam atividade vasorelaxante.

Pares de átomos	Distâncias (Å)			
	DSL*	DVL*	DRL	DvirL*
ARG228 N – TYR12 OH	9,4	9,5	9,0	10,1
ARG228 N – ASN14 ND2	4,9	4,8	3,7	5,2
TYR100 N – TYR12 OH	7,1	6,9	7,3	7,0
TYR100 N – LEU99 N	2,8	2,6	2,7	2,7
TYR12 OH – ASN14 ND2	5,1	5,3	5,7	5,4
ARG228 N – LEU99 N	10,1	10,2	9,8	10,0
ARG228 N – TYR100 N	11,6	11,8	11,0	11,7

* Lectinas com o CRD ocupado por X-man

A posição 205 já foi identificada como crucial para determinar a orientação e afinidade do CRD em lectinas de *Diocleinae* (Gadelha et al., 2005). No caso das lectinas do gênero *Dioclea*, a afinidade de seus domínios de ligação parecem ser alterados pela substituição ou não deste resíduo localizado ao lado do CRD. A troca de um aminoácido por outro de cadeia mais longa provoca a aproximação de uma carga negativa ao encontro do subsítio hidrofóbico. Este arranjo pode influenciar de maneira negativa as interações formadas no CRD, o que deve estar associado à baixa atividade relaxante apresentada pelas lectinas DSL e DVL.

5. Conclusão

A espectrometria de massas e a cristalografia de raios X dão origem às estruturas primária e tridimensional de ConGF. Esta lectina foi capaz de induzir o relaxamento de intensidade relativamente baixa em segmentos de aorta endotelizadas de ratos através da produção de NO. Este efeito mostrou ser dependente de distâncias fundamentais entre os resíduos que compõem o CRD de ConGF e o seu volume reduzido. ConGF pode ser classificada como uma fraca indutora no vasorelaxamento de acordo com as limitações apresentadas em distâncias-chave entre aminoácidos essenciais determinadas no presente trabalho. Da mesma forma, estas distâncias provocam também a redução do volume do CRD e assim justifica a atividade biológica observada em ConGF em comparação com outras lectinas do gênero *Canavalia*. Estas características permitem a categorização destas proteínas como indutores fortes ou fracos no vasorelaxamento dependentes de NO.

A cristalografia por difração de raios X forneceu a estrutura tridimensional da lectina de ligante a manose derivada da *Cymbosema roseum* complexada com X-man. Esta estrutura possui resíduos conservados envolvidos no reconhecimento a carboidratos e permitiu que fossem notadas nuances no CRD e as mudanças provocadas pela entrada do açúcar. A investigação deste trabalho caracterizou a habilidade do vasorelaxamento de CRLI em aorta de ratos endotelizada via liberação de NO sem a interação com receptores muscarínicos. Determinar experimentalmente a dependência do cálcio extracelular deveria ser um ponto decisivo para classificar o mecanismo de CRLI como dependente ou independente de cálcio. Ao invés disso, notamos que a habilidade de relaxamento do CRLI decresce apenas a metade num meio livre de cálcio. A atividade sustentada, apesar de mais fraca, teve que ser ativada por uma via diferente, mas ainda mantendo a produção de NO. A partir da estrutura primária e tridimensional de CRLI, foi possível identificar uma sequência específica com uma grande semelhança com sítios de ligação da heparina comuns às fosfolipases. O *docking* realizado utilizando essa sequência específica como centro de busca e penta-heparano sulfato como ligante mostrou que CRLI é capaz de reconhecer HS. Essas glicosaminoglicanas podem ser consideradas como mecanoreceptores envolvidos na produção de óxido nítrico, nos permitindo construir nossa hipótese. Em resumo, este trabalho reporta a primeira estrutura de CRLI complexada com um carboidrato, indica a presença de um novo sítio de ligação na sua estrutura, e, baseado nos dados experimentais e achados da simulação, sugere um mecanismo duplo da ativação da eNOS por esta lectina específica.

D. sclerocarpa apresentou, como as outras lectinas avaliadas neste trabalho, a habilidade de relaxar músculos lisos de aortas. Fenômeno que ocorreu com a dependência do endotélio via produção de óxido nítrico e com a participação do CRD de DSL. Tanto seu efeito como sua

estrutura apresentam alto grau de semelhança com lectinas do mesmo gênero e um conjunto de características corrobora para seu baixo efeito relaxante. A baixa capacidade de induzir vasorelaxamento pela DSL reside no arranjo do domínio de reconhecimento a carboidrato. A partir de sua estrutura foi possível demonstrar que esta proteína apresenta um desenho de CRD desfavorável para eliciar esta atividade. Além disso, a presença de um glutamato na posição 205 demonstrou ser um fator determinante na regulação desta atividade, este resíduo modula negativamente a capacidade relaxante frente a lectinas do mesmo gênero que possuem um resíduo de aspartato nesta mesma posição.

Referências

- AGRAWAL, B.; GOLDSTEIN, I. Specific binding of concanvalin A to cross-linked dextran gels. **Biochem. J**, v. 96, p. 23C–15, 1967.
- ANDRADE, J. et al. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98–102, 1999.
- ASSREUY, A. et al. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation.**, v. 6, p. 201–210, 1997.
- ASSREUY, A. et al. PREVENTION OF CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED HEMORRHAGIC CYSTITIS BY GLUCOSE-MANNOSE BINDING PLANT LECTINS. **The Journal of Urology**, v. 161, p. 1988–1993, 1999.
- ASSREUY, A.; FONTENELE, S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. 2009.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 380, n. 6, p. 509–521, dez. 2009.
- AUB, J.; SANFORD, B.; COTE, M. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proc.NatlAcad.Sci.USA**, v. 54, p. 396–399, 1965.
- AYOUBA, A. et al. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochem Syst Eco1.**, v. 22, p. 153–159, 1994.
- BABOSHA, A. V. Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 73, n. 7, p. 812–825, jul. 2008.
- BANERJEE, R. et al. Conformation Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. **J. Mol. Biol.**, v. 259, p. p.281–296, 1996.
- BARAUNA, S. C. et al. Antidepressant \square like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 160–169, 2006.
- BARONDES, S. et al. Galectins: a family of beta-galactoside-bindinglectins. **Cell.**, v. 54, p. 597–598, 1994.
- BARRAL-NETTO, M. et al. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on Balb/C mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, p. 237–250, 1996.
- BEHRENDT, D.; GANZ, P. Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. **Am J Cardiol**, v. 90, p. 8L–40L, 2002.
- BENTO, C. et al. Rat paw edema and leukocyte emigration induced by plant lectins. **Ag. Actions**, v. 38, p. 48–54, 1993.
- BEZERRA, E. H. S. et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 408, n. 4, p. 566–70, 20 maio 2011.

BEZERRA, M. J. B. et al. Crystal structure of Dioclea violacea lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with Dioclea rostrata lectin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 4, p. 807–815, abr. 2013.

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

BOUCKAERT, J. et al. Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. **Proteins: Struct.Funct. Genet.**, v. 23, p. 510–524, 1995.

BOUCKAERT, J. et al. The crystal structures of Man (α 1–3)Man(α 1–0)Me and Man(α 1–6)Man(α 1–0)Me in complex with concanavalin A. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 29188–29195, 1999.

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

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

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

BRECHTEL, R.; WÄTZIG, H.; RÜDIGER, H. .. The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: A phosphatase-activating protein that is closely associated with an α -galactosidase activity. **PlantSci.**, v. 160, p. 1025–1033, 2001.

BRINDA, K. V; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs : a case study of lectins. **Biochem. J.**, v. 15, p. 1–15, 2005.

BROEKAERT, W. . et al. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. **Science**, v. 245, p. 1100–1102, 1989.

BROEKAERT, W. .; PEUMANS, W. . Lectin release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.**, v. 5, p. V57–65, 1986.

BRÜNGER, A. The Free R value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. **Nature**, v. 355, p. 472–474, 1992.

BUSSE, R.; FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. **Ann Med.**, v. 27, p. 331–340, 1995.

BUSSE, R.; MÜLSCH, A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS letters**, v. 265, n. 1–2, p. 133–136, 4 jun. 1990.

CALVETE, J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1430, n. 2, p. 367–375, 1999.

CAMMUE, B. et al. Stress-Induced Accumulation of Wheat Germ Agglutinin and Abscisic Acid in Roots of Wheat Seedlings. **Plant Physiol**, v. 89, p. 1432–1435, 1991.

- CARDIN, A. D.; WEINTRAUB, H. J. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 9, n. 1, p. 21–32, 1 jan. 1989.
- CAVADA, B. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, v. 2, n. 2, p. 123–35, jun. 2001.
- CAVADA, B. et al. Glucose-mannose binding Lectins Isolated from Brazilian Beans stimulate the Autophosphorylation of the Insulin Receptor in vitro. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, p. 125–127, 2003.
- CAVADA, B. S. et al. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, v. 62, n. Pt 3, p. 235–237, 1 mar. 2006.
- CAVALCANTE, T. et al. Effect of Lectins from Diocleinae Subtribe against Oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, p. 3530–3543, 2011.
- CECCATTO, V. M. et al. PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A LECTIN FROM *Canavalia grandiflora* Benth. SEEDS. **Protein Pept. Lett.**, v. 9, n. 1, p. 67–73, 2002.
- CHEN, P. F. et al. Mutation of Glu-361 in human endothelial nitric-oxide synthase selectively abolishes L-arginine binding without perturbing the behavior of heme and other redox centers. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6114–6118, 7 mar. 1997.
- CHRISPEELS, M. . et al. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 261, n. 22, p. 10021–10024, 1986.
- COLLINGE, D. et al. Plant chitinases. **Plant J.**, v. 3, p. : 31–40, 1993.
- CORREIA, J. L. A. et al. Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 16, n. 11, p. 9077–89, jan. 2011.
- 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 *. **JBC**, v. 273, n. 20, p. 12082–12088, 1998.
- DAVIES, P. Flow-Mediated Mechanotransduction. **PHYSIOLOGICAL REVIEWS**, v. 75, n. 3, p. 519–560, 1995.
- DELANO, W. L. **PyMOL User's Guide** San Carlos, CA DeLano Scientific, , 2002.
- DELATORRE, P. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Acta Cryst.**, v. F62, p. 166–168, 2006.
- DELATORRE, P. et al. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC structural biology**, v. 7, p. 52, jan. 2007.

DELBAERE, L. et al. Structures of the lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis b human blood group determinant at 2.0Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 230, p. 950–965, 1993.

DOWN, R. et al. Snowdrop lectin inhibits in development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. **Journal of Insect Physiology**, v. 42, p. 1035–1045, 1996.

EDELMAN, G. et al. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Natl Acad Sci USA**, v. 69, p. 2580–2584, 1972.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr. D.**, v. 66, p. 486–501, 2010.

ESTEBAN, R. et al. A seedling specific vegetative lectin gene is related to development in *Cicer arietinum*. **Physiol. Plant**, v. 114, p. 619–626, 2002.

EVANS, P. “Data reduction”, Proceedings of CCP4 Study Weekend. **Data Collection & Processing**, p. 114–122, 1993.

FAYE, L.; CHRISPPEELS, M. Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in jack-bean. **Planta**, v. 170, p. 217–224, 1987.

FERRIGE, A. et al. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid. Commun. Mass. Spectrom**, v. 6, p. 707–711, 1992.

FISCHER, E. Einfluss der Konfiguration auf die Wirkung der Enzyme. **Ber Dtsch**, v. 27, p. 2985–2993, 1894.

FITCHES, E. et al. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jack bean (*Canavalia ensiformis*; ConA) lectins with in tomato moth (*Lacania bialeracea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **J.InsectPhysiol**, v. 47, p. 777–787, 2001.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284, p. R1–R12, 2003.

FLORIAN, J. A et al. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. **Circulation research**, v. 93, n. 10, p. e136–42, 14 nov. 2003.

FOISSAC, X. et al. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). **Journal of Insect Physiology**, v. 46, p. 573–583, 2000.

FORST, T.; KUNT, T. Effects of C-peptide on microvascular blood flow and blood hemorheology. **Experimental diabetes research**, v. 5, n. 1, p. 51–64, 2004.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829–37, 837a–837d, abr. 2012.

FURCHGOTT, R.; ZAWADZKI, Z. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, p. 373–376, 1980.

GABIUS, H. Animal lectins. **Eur J Biochem**, v. 243, p. 543–576, 1997.

GABIUS, H. Biological Information Transfer beyond the Genetic Code: The Sugar Code. **Naturwissenschaften**, v. 87, n. 3, p. 108–121, 2001.

GADELHA, C. A. D. A. et al. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of structural biology**, v. 152, n. 3, p. 185–194, dez. 2005.

GATEHOUSE, A. et al. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach- potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, p. 295–307, 1996.

GATEHOUSE, A.; SL, C.; QUISENBERRY, S. Biotechnological applications of plant genes in the production of insect-resistant crops. In: **Global Plant Genetic Resources for Insect-Resistant Crops**. C. [s.l: s.n.]. p. 263–280.

GEMEINER, P. et al. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances Journal**, v. 27, n. 1, p. 1–15, 2009.

GOMES, J. et al. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132–135, 1994.

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

GOUET, P.; ROBERT, X.; COURCELLE, E. ESPript/ENDscript: Extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structure of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 3320–3323, 2003.

GRANGEIRO, T. **Clonagem, seqüenciamento e expressão do gene da lectina (ConBr) de sementes de *Canavalia brasiliensis***. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 1996.

GRANT, G. et al. Nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. **The Journal of Agricultural Science**, v. 124, n. 03, p. 437–445, 27 mar. 1995.

GRANT, G.; MCKENZIE, N. H.; MOREIRA, R. A. *Dioclea grandiflora* and *Dioelea seleroearpa* seeds . A nutritional study. **Qual Plant Plant Foods Hum Nutr**, v. 36, p. 47–61, 1986.

GROVES, J. T.; WANG, C. C. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. **Current opinion in chemical biology**, v. 4, n. 6, p. 687–95, dez. 2000.

HAGUE, D. Studies of storage proteins of higher plants. I. Concanavalin A from three species of the genus *Canavalia*. **Plant Physiology**, v. 55, p. 636–642, 1975.

HAMODRAKAS, S. et al. The Crystal Structure of the Complex of Concanavalin A with 48-Methylumbelliferyl-D-glucopyranoside. **J. Struc. Biol**, v. 157, p. 23–30, 1982.

HARDMAN, K.; AGARWAL, R.; FREISER, M. Manganese and calcium binding sites of concanavalin A. **J. Mol. Biol.**, v. 165, p. 23–29, 1985.

HERMAN, E.; SHANNON, L.; CHRISPEELS, M. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, v. 165, p. 23–29, 1985.

HOGERVORST, P. **Transgene products in honeydew: estimating risks for non-target insects.** [s.l: s.n.].

HOLANDA, F. et al. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein Pept Lett.**, v. 16, n. 9, p. 1088–92, 2009.

HUA, L.; LOW, T.; SZE, S. Microwave-assisted specific chemical digestion for rapid protein identification. **Proteomics**, v. 6, n. 2, p. 586–591., 2006.

JANCARIK, J.; KIM, S. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 409–411, 1991.

KABSCH, W. XDS. **Acta Cryst. D**, v. 66, p. 125–132, 2010.

KLEHA, J.; DEVESLY, P.; JOHN, S. The effects of lectins on the Release of EDRF from rabbit aorta. **Br J Pharmacol**, v. 104, p. 287–288, 1991.

KLEHA, J.; DEVESLY, P.; JOHN, S. A. The effects of lectins on the Release of EDRF from rabbit aorta. **BrJPharmacol**, v. 104, p. 287–288, 1997.

KOCOUREK, J.; HOREJS, V. A note on the recent discussion on the definition of the term “lectin.” In: BOG-HANSEN, T.; SPENGLER, G. (Eds.). **In Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.** 3. ed. Berlin, Germany: Walter de Gruyter, 1983. v. 3p. 3–6.

KOENIG, S.; BREWER, C.; BROWN, R. Conformation as the determinant of saccharide binding in concanavalin A: Ca²⁺ concanavalin A complexes. **Biochemistry**, v. 20, p. 4251–4260, 1978.

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

KUCHAN, M.; FRANGOS, J. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. 628–636, 1994.

KUNO, A. et al. Evanescentfieldfluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. **Nat Methods**, v. 2, p. 851–856, 2005.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAINE, R. Invited Commentary A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields hexasaccharide : the Isomer Barrier to development of single-method saccharide sequencing or synthesis systems. **Glycobiology**, v. 4, p. 759–767, 1994.

- LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Aamolyse und Aamagglutination. **Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.**, v. 45, p. 600–607, 1907.
- LASKOWSKI, R. et al. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283–291, 1993.
- LAURIE, A.T., JACKSON, R. M. Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein–ligand binding sites. **Bioinformatics**, v. 21, p. 1908–1916, 2005.
- LEGASPI, J.; LEGASPI, B.; SÉTAMOU, M. Insect-resistant transgenic crops expressing plant lectins. In: OPENDER, KOUL, AND G. S. D. (Ed.). **In Transgenic Crop Protection: Concepts and Strategies**. [s.l.] Science Publishers, Inc., 2004. p. 85–116.
- LESLIE, A.; POWELL, H. Processing Diffraction Data with Mosflm. **Evolving Methods for Macromolecular Crystallography**, v. 245, p. 41–51, 2007.
- LIMA, R. et al. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **JPharmPharmacol.**, v. 56, p. 1415–1421, 2004.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chem.Rev.**, v. 98, p. 637–674, 1998.
- LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1383, n. 1, p. 9–36, 3 mar. 1998.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J. Legume lectin structure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1383, p. 9–36, 1998.
- LUCKHOFF, A. et al. Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. **Br J Pharmacol**, v. 95, p. 189–196, 1988.
- LUSHER, T.; BARTON, M. Biology of the endothelium. **Clin Cardiol**, v. 20, n. II, p. 310, 1997.
- LUZZATI, P. V. Traitement Statistique des Erreurs dans la Détermination des Structures Cristallines. **Acta Cryst**, v. 5, p. 802–810, 1952.
- MÄKELÄ, O. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. **Ann. Med. Exp. Fenn. Suppl.**, v. 35, n. Suppl 11, p. 1–133, 1957.
- MATTHEWS, B. The solvent content of protein crystals. **J. Mol. Biol.**, v. 33, p. 491–587, 1968.
- MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of applied crystallography**, v. 40, n. Pt 4, p. 658–674, 1 ago. 2007.
- MITCHELL, S. Researches about the venom of the rattle snake. **Smithsonian Contributions to Knowledge**, v. 12, p. 89–90, 1860.
- MOCHIZUKI, S. et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 285, p. H722–H726, 2003.

- MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **JPM**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 1995.
- MOREIRA, R. et al. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. II, p. 211–218, 1991.
- MOREIRA, R.; CAVADA, B. Lectin from CANAVALIA BRASILIENSIS (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, p. 113–120, 1986.
- MORENO, F. et al. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of structural biology**, v. 161, p. 133–143, 2008.
- MORGAN, D.; RUSCETTI, F.; GALLO, F. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**, v. 193, p. 1007–1008, 1976.
- MOTA, M. R. L.; CRIDDLE, D. N. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from Araucaria angustifolia seeds via mast cells. p. 1–10, 2006.
- NAKAGAWA, R. et al. Purification and characterization of two lectins from callus of Helianthus tuberosus. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 60, n. 2, p. 259–262, 1996.
- NASCIMENTO, A. et al. Purification and partial characterization of a novel lectin from Dioclea lasiocarpa Mart seeds with vasodilator effects. **J. Mol. Recognit.**, v. 25, n. 12, p. 657–664, 2012.
- NÓBREGA, R. et al. Structure of Dioclea virgata lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 900–906, mar. 2012.
- NOWELL, P. Phytohemagglutinin: a initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **CancerRes**, v. 20, p. 462–446, 1960.
- NUNES, B. et al. Lectin extracted from Canavalia grandiflora seeds potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609–616, 2009.
- ODA, A. et al. Possible involvement of leaf gibberellins in the clock-controlled expression of XSP30, a gene encoding a xylem sap lectin, in cucumber roots. **Plant Physiol.**, v. 133, p. 1779–1790, 2003.
- OOI, L. S. M.; SUN, S. S. M.; OOI, E. C. V. . Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of Pandanus amaryllifolius (Panadanaceae). **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.**, v. 36, p. 1440–1446, 2004.
- OTWINOWSKI, Z.; MINOR, W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. **Methods in Enzymology**, v. 276, n. Macromolecular Crystallography, Part A, Publisher: Academic Press, p. 307–326, 1997.
- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–5526, 1987.
- PARADISE, W. et al. Nitric Oxide: Perspectives and Emerging Studies of a Well Known Cytotoxin. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, p. 2715–2745, 2010.

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

PUSZTAI, A. **Plant lectins**. Cambridge: [s.n.].

QUARTARA, L.; MAGGI, C. . The tachykinin NK1 receptor. Part I: Ligands and mechanisms of cellular activation. **Neuropeptides**, v. 31, n. 6, p. 537–563, 1997.

RAO, K. et al. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. **Plant J.**, v. 15, p. 1988, 1998.

REDDY, G. et al. Molten globule like state of peanut lectin monomer retains its carbohydrate specificity: Implications in protein folding and legume lectin oligomerization. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 4500–4503, 1999.

REITSMA, S. et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 454, n. 3, p. 345–59, jun. 2007.

RIPOLL, C. et al. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, p. 517–523, 2003.

ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13820–4, 25 nov. 1983a.

ROBERTS, D.; GOLDSTEIN, I. Adenine Binding Sites of the Lectin from Lima Beans (*Phaseolus lunatus*). **The Journal of Biologicacalh Chemistry**, v. 258, n. 22, p. 13820–13824, 1983b.

ROCHA, B. et al. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 806–816, maio 2011.

ROCHA, B. A M. et al. Purification, characterization, and preliminary X-ray diffraction analysis of a lactose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 152, n. 3, p. 383–393, mar. 2009.

RODRIGUEZ, D. et al. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 823–826, 1992.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, v. 18, p. 589–613, 2001.

SÁ, R. et al. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* hear twood lectin. **Biodeterioration & Biodegradation**, v. 1-5, 2008.

SÁ, R. et al. Comparative Biochemistry and Physiology , Part C Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 149, n. 3, p. 300–306, 2009.

- SAHA, P., MAJUMDER, P., DUTTA, I., RAY, T., ROY, S.C., DAS, S. . Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. **Planta**, v. 223, p. 1329–1343, 2006.
- SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 1050–1055, 2006.
- SANZ-APARICIO, J. et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. v. 405, p. 114–118, 1997.
- SCHEGGIA, C. et al. Alteration of lectin pattern in potato tuber by virus X. **Plant Science**, v. 58, n. 1, p. 9–14, 1988.
- SCHULER, T. et al. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 168–175, 1998.
- SHAANAN, B.; LIS, H.; SHARON, N. Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. **Science**, v. 254, p. 862–866, 1991.
- SHANE, A.; HART, G. Dynamic cytoskeletal glycosylation and neuro degenerative disease. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**, v. 11, p. 355–70, 1999.
- SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition molecules. **The journal of biological chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 246, n. 4927, p. 227–34, 13 out. 1989.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, p. 3198–3208, 1990.
- SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Adv Exp Med Biol**, v. 491, p. 1–16, 2001.
- SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nat. protoc.**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860., 2006.
- SIMÕES, R. C. et al. Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 26, n. 7, p. 811–818, 15 abr. 2012.
- SINGER, H.; PEACH, M. Calcium- and endothelia-mediated vascular smooth muscle relaxation in rabbit aorta. **Hypertension**, v. 4, p. 19–25, 1982.
- SINGH, P.; BHAGLAL, P.; BHULLAR, S. Wheat germ agglutinin (WGA) gene expression and ABA accumulation in the developing embryos of wheat (*Triticum aestivum*) in response to drought. **PlantGrowthRegulation**, v. 30, p. 145–50, 2000.

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

STILLMARK, H. **Ueber Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen Von Ricinus communis L. und ein igenan der em Euphorbiaceen**. Dorpat: Schnakenburg's Buchdruckerei, 1888.

STOGER, E. et al. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. **Molecular Breeding**, v. 5, p. 65–73, 1999.

SUMNER, J.; HOWELL, S. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriol.**, v. 32, p. 227–237, 1936.

SUN, X.; WU, A.; TANG, K. Transgenic rice lines with enhanced resistance to the small brown planthopper. **Crop Protection**, v. 21, p. 511–514, 2002.

TEICHBERG, V. et al. A β -D-Galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **PNAS**, v. 72, p. 1383–1387, 1975.

TEIXEIRA, C. R. et al. Potential of KM + lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, p. 3001–3008, 2006.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 3315–3321, 2006.

TON, J.; MAUCH-MANI, B. γ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. **Plant J**, v. 38, p. 119–130, 2004.

TOOZE, J.; BRANDEN, C.-I. Folding and Flexibility. In: TOOZE, J.; BRANDEN, C.-I. (Eds.). **Introduction to Protein Structure**. 2nd ed. ed. New York: Garland Publisher, Inc., 1999.

TRABULSI, R. **Microbiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

TURNBULL, J. E.; FIELD, R. A. Emerging glycomics technologies. **Nat Chem Biol**, v. 3, n. 2, p. 74–77, fev. 2007.

VAN DAMME, E. et al. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem.**, v. 236, p. 419–427, 1996.

VAN DAMME, E. et al. **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications**. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 1998. p. 466

VAN PARIJS, J. et al. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin) on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakeslezzus* Burgeff. **Arch Microbiol**, v. 158, p. 19–25, 1992.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F. GOLDSTEIN, I.; PEUMANS, W. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258–262, 1991.

VANE, J.; ANGGARD, E.; BOTTING, R. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 27–36, 1990.

- VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarizations : the history. **Pharmacological research**, v. 49, n. November 2003, p. 503–508, 2004.
- VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. **Med Sci Monit**, v. 7, p. 1075–1085, 2001.
- VASCONCELOS, I.M., OLIVEIRA, J. T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385–403, 2004.
- WAH, D. A. et al. Crystal Structure of Native and Cd / Cd-substituted Dioclea guianensis Seed Lectin . A Novel Manganese- binding Site and Structural Basis of Dimer- tetramer Association. 2001.
- WATKINS, W.; MORGAN, W. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, p. 825–826, 1952.
- WHITE, C. R.; FRANGOS, J. A. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 362, n. 1484, p. 1459–67, 29 ago. 2007.
- WINN, M. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallogr. D**, v. 67, p. 235–242, 2011.
- WU, A. et al. Homozygous transgenic rice lines expressing GNA with enhanced resistance to the rice sap-sucking pest Laodelphax striatellus. **Plant Breeding**, v. 122, p. 93–95, 2002.
- YAMAUCHI, D. et al. Nucleotide sequence of cDNA for concanavalin A from Canavalia gladiata seeds. **Plant Cell Physiology**, v. 30, n. 1, p. 147–150, 1989.
- YAMAUCHI, D.; MINAMIKAWA, T. Structure of the gene encoding concanavalin A from Canavalia gladiata and its expression in Escherichia coli cells. **FEBS Letters**, v. 260, n. 1, p. 127–130, 1990.
- YIM, M.; ONO, T.; IRIMURA, T. Mutated plant lectin library useful to identify different cells. **PNAS**, v. 98, n. 5, p. 2222–2225, 2001.
- YUAN, Z. et al. Aphid-resistant transgenic tobacco plants expressing modified GNA gene. **Acta Botanica Sinica**, v. 43, p. 592–597, 2001.