



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

ITO LIBERATO BARROSO NETO

RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia grandiflora* BENTH. COM EFEITOS SOBRE MECANISMOS INFLAMATÓRIOS

FORTALEZA
2010

ITO LIBERATO BARROSO NETO

RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia grandiflora* BENTH. COM EFEITOS SOBRE MECANISMOS INFLAMATÓRIOS.

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

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

FORTALEZA
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B285r Barroso Neto, Ito Liberato.

Resolução da estrutura tridimensional de uma lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth. com efeitos sobre mecanismos inflamatórios / Ito Liberato Barroso Neto. – 2010.
104 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2010.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.

1. Lectinas de plantas. 2. Sementes. 3. Canavália. I. Título.

CDD 572

ITO LIBERATO BARROSO NETO

RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *CANAVALIA GRANDIFLORA* BENTH. COM EFEITOS SOBRE MECANISMOS INFLAMATÓRIOS.

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador - UFC)

Prof. Dra. Creuza Maria Silveira de Araújo Farias (UNIFOR)

Prof. Dr. Celso Shiniti Nagano (UFC)

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 sem prática científica, pela ajuda fundamental na realização deste trabalho, e pelo apoio para 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 massa e por aceitar participar da banca de defesa dessa dissertação.

A professora Creuza Maria Silveira de Araújo Farias por aceitar participar da banca desta dissertação.

Aos amigos que ganhei nesses anos de graduação e pesquisa Tiago W., Vladimir, Liana, Bruno, Sâmia, Rafael, Helton, Joana, Márcia e Emanuel Marinho pela amizade companheirismo, e apoio no dia-a-dia.

Aos colegas Eduardo, Maria Júlia e Raniere pela grande contribuição na realização deste trabalho.

A aluna de iniciação científica Luciana Gama Mendonça pelo apoio nos meus experimentos.

Aos colegas do BioMol-Lab Tales, Jéssica, Soraya, Rômulo, Arthur, Guilherme, André, Fernando, Batista, Raquel Guimarães, Rômulo, Alfa, Camila, Pereira Júnior e professora Kyria Santiago.

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

A professora Ana Maria Assreuy e Alana Pires do laboratório Laffin (UECE) pela grande ajuda e apoio na aplicação biológica deste trabalho.

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

Aos amigos Maurício, Glauco, Rodrigo, Marcelo, Samantha, Felipe, Renata e Mauro pela amizade e companheirismo de vários anos, sempre importantes em minha vida.

A Raquel Rocha por ser quem ela é, por sempre trazer mais alegria, por ser companheira e amorosa, e pelo apoio que recebo desde quando estamos juntos.

“A alegria está na luta, na tentativa,
no sofrimento envolvido.
Não na vitória propriamente dita”.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Lectinas de plantas podem ser definidas como proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente de maneira específica a um mono- ou oligossacarídeo. A família das lectinas de leguminosas representa o grupo destas proteínas mais bem estudadas, em especial destaque a subtribo Diocleinae, que possui o representante mais bem caracterizado, a ConA. As lectinas de Diocleinae apresentam um alto grau de similaridade estrutural, porém o mesmo não ocorre quanto às atividades biológicas e especificidade a carboidratos variados, o que torna importante a investigação em níveis estruturais e biológicos dos seus diversos membros, dentre eles a *Canavalia grandiflora* Benth. A lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* (ConGr) foi purificada de acordo com Ceccato (2001) e foi cristalizada pelo método de difusão de vapor a 293 K. Cristais foram obtidos em uma condição contendo 0,5 M de sulfato de cádmio hidratado, 0,1 M de HEPES pH 7.5 e 1,0 M de acetato de sódio trihidratado. Os cristais apresentam o grupo espacial ortorrômbico I222, a cela unitária tem como dimensões $a=67,70 \text{ \AA}$, $b=55,90 \text{ \AA}$ e $c=107,46 \text{ \AA}$ e ângulos $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, sendo observado um monômero na unidade assimétrica e um conteúdo de 42,53% de solvente no cristal. A estrutura foi resolvida a $2,19 \text{ \AA}$ e o problema de fase foi solucionado pelo método de substituição molecular utilizando as coordenadas da *Canavalia gladiata* como modelo (PDB: 2D7F). O refinamento satisfatório apresentou “Rfactor” e “Rfree” com 22,6 e 27,4 respectivamente e apenas um resíduo de aminoácido em região não permitida do Ramachandran. Apesar da alta similaridade estrutural, pequenas mudanças na orientação de aminoácidos chaves, podem ser responsáveis pela diversidade nos resultados de aplicações biológicas como os resíduos do sítio de ligação a carboidrato, que apesar de conservados possuem modificações na orientação espacial. A sequência primária da lectina de *C. grandiflora* apresenta grande similaridade com lectinas do mesmo gênero, porém ela 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 ConGr apresentou atividade edematogênica em modelo de edema de pata (s.c.) e efeito relaxante em músculo liso de aortas de ratos endotelizadas, porém os efeitos mostram-se fracos frente a outras lectinas de Diocleinae.

PALAVRAS-CHAVES: Lectina, *Canavalia grandiflora*, Atividade Pró-inflamatória.

ABSTRACT

Lectins can be defined as proteins of nonimmune origin that have at least one non-catalytic domain that binds reversibly to a specific mono-or oligosaccharide. The family of legume lectins is the group of these proteins in plant further studied, in particular those related to the subtribe Diocleinae, which has the best characterized representative, the ConA. The Diocleinae lectins have a high degree of structural similarity, but the same is not true about the biological activities and specificity to various carbohydrates, which makes it important to research in structural and biological several of its members, among them the among them the *Canavalia grandiflora* Benth. The lectin was the seed of *Canavalia grandiflora* (ConGr) was purified according Ceccato (2001) and crystallized in the presence of X-Man by hanging-drop vapor diffusion at 293K. After optimizations crystals suitable for diffraction were obtained under the condition 0.05 M Cadmium sulfate hydrate, 0.1 M HEPES pH 7.5 and 1.0 M Sodium acetate trihydrate. The crystals belongs to the orthorhombic space group I 222, the cell has the dimensions $a = 67.70\text{\AA}$, $b = 55.90\text{\AA}$ and $c = 107.46\text{\AA}$ and its angles by their geometry are the same ($\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). A complete data set was collected at 2.19\AA resolution. Observing a monomer in the asymmetric unit was estimated a concentration of 42.53% of solvent in the crystal the phase problem was solved by molecular replacement method using the coordinates of the *Canavalia grandiflora* as a model. The refinement showed satisfactory Rfactor and Rfree to 22.6 and 27.4 respectively and only one amino acid residue in the not allowed region of Ramachandran. Despite the high structural similarity, small changes in the orientation of key amino acids may be responsible for diversity in the outcome of biological applications such as the binding site of carbohydrate, which, although preserved charged changes in spatial orientation. The primary sequence of the lectin from *C. grandiflora* has great similarity to its lectins genre, but it has the largest number of mutations representative of the Dioclea genus, characterizing it as a subgenus of *Canavalia* nearest *Dioclea* and among *Canavalia* is the most primitive. The ConGr showed edamatogenic activity in rat paws (s.c.) and relaxing effect on smooth muscles of rat aortas with endothelial, but the effects appear to be weak compared to other Diocleinae lectins.

KEY WORDS: Lectin, *Canavalia grandiflora*, Inflammatory activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação dos quatro tipos de lectinas de plantas.	Página 23
Figura 2 – Estrutura de grupos e famílias de lectinas vegetais.	Página 24
Figura 3 – Representação esquemática da biossíntese das lectinas semelhantes à ConA.	Página 26
Figura 4 – Sítio de localização do Abu.	Página 28
Figura 5 – Modelo de ação de lectinas em plantas.	Página 31
Figura 6 – Partes do monômero de lectinas de leguminosas.	Página 40
Figura 7 – Ponte de aspartato ligando o Ca^{2+} e o metal de transição presente nas lectinas de leguminosas.	Página 41
Figura 8 – Isomerização da ligação Ala207-Asp208	Página 41
Figura 9 – Representação esquemática da associação dimérica das lectinas GSL e LTA.	Página 44
Figura 10 – Vasodilatação durante a inflamação aguda.	Página 49
Figura 11 - Liberação dos fatores derivados do endotélio.	Página 50
Figura 12 – Perfil eletroforético da lectina.	Página 65
Figura 13 – espectro das massas das cadeias de <i>C. grandiflora</i> .	Página 66
Figura 14 – Espectro de MS da lectina intacta de <i>C. grandiflora</i> .	Página 66
Figura 15 – Mapa de peptídeos da lectina de <i>C. grandiflora</i> .	Página 67
Figura 16– Imagem do seqüenciamento de um íon.	Página 68
Figura 17A – Peptídeo com uma massa de 487,27 Da não identificada automaticamente.	Página 69
Figura 17B – o mesmo peptídeo possui uma massa de 113,89 Da não identificada automaticamente.	Página 70
Figura 18 – Alinhamento das seqüências de lectinas Diocleinae.	Página 73
Figura 19 – Árvore filogenética com seqüências de lectinas de Diocleinae.	Página 74
Figura 20 – Foto da gota contendo o cristal de <i>C. grandiflora</i> e foto ampliada.	Página 75
Figura 21 – Gráfico de Ramachandran.	Página 77
Figura 22 – Monômero de <i>C. grandiflora</i> .	Página 78
Figura 23 – Estrutura geral da lectina de <i>C. grandiflora</i> .	Página 78
Figura 24 – Sítio de ligação a metal da lectina de <i>C. grandiflora</i> .	Página 79
Figura 25 – Sítios de interação de Cd^{2+} .	Página 80

Figura 26 – A – Sítio do Abu na lectina de <i>C. grandiflora</i> ; B – Localização das moléculas de Abu na interface do dímero; C – Representação em visão estéreo referente ao Abu, na estrutura da lectina de <i>C. grandiflora</i> . D – densidade eletrônica no OmitMap.	Página 81
Figura 27 – Sobreposição de sítios do Abu de duas Canavalias. Os resíduos envolvidos neste sítio de interação com o Abu são conservados nas Canavalias.	Página 81
Figura 28 – A Densidade eletrônica no OmitMap B. Representação em visão estéreo do ligante Xman.	Página 82
Figura 29 – Posicionamento do Xman no domínio de reconhecimento a carboidrato e esquema da estrutura do Xman.	Página 82
Figura 30 – Desenho do sítio da <i>C. grandiflora</i> .	Página 83
Figura 31 – Resíduos envolvidos no reconhecimento a carboidrato nas lectinas de <i>C. grandiflora</i> (azul) e <i>C. gladiata</i> (cinza).	Página 84
Figura 32 – Lectina de <i>Canavalia grandiflora</i> induz edema de pata em ratos.	Página 85
Figura 33 – Registros típicos <i>C. grandiflora</i> .	Página 86
Figura 34 – Efeito relaxante da lectina de <i>Canavalia grandiflora</i> em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina	Página 86
Figura 35 – A. Registro típico de ConGr na presença de L-NAME. B. Efeito relaxante da lectina de <i>Canavalia grandiflora</i> na presença ou não do L-NAME.	Página 87
Tabela 1 – Tipos de Interfaces formadas durante a oligomerização de lectinas de Leguminosas.	Página 42
Tabela 2 – Identificação dos peptídeos anotados no seqüenciamento da cadeia alfa de <i>C. grandiflora</i> .	Página 67
Tabela 3 – Identidade entre as seqüências fornecidas.	Página 72
Tabela 4 – Estatísticas dos dados de coleta e refinamento.	Página 75
Tabela 5 – Distância entre resíduos que forma o sítio de reconhecimento a carboidrato em Canavalias.	Página 83
Gráficos da estabilidade da lectina de <i>C. grandiflora</i> em diferentes pH e temperaturas.	Página 64
Gráficos da A.H.E.	Página 64

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- AA – Ácido aracdônico
- AaL – Lectina de *Auracaria angustifolia*
- ABA – ácido abscísico
- Abu – Ácido α -amino butírico
- A.H.E. – Atividade Hemaglutinante Específica
- AII – Angiotensina II
- AMPC – Monofosfato cíclico de adenosina
- ASAL – Lectina da folha do alho
- ATP – Adenosina trifosfato
- 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 *C. Brasiliensis*
- ConM – Lectina de *C. marítima*
- CRLI – Lectina de *Cymbosema roseum*
- DBL – Lectina de semente de *D. biflorus*
- DDA – Análise direta de dados
- DRC – Domínio de reconhecimento á carboidrato
- EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
- EDHF fatores hiperpolarizantes derivados 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
- GTP – Trifosfato de guanosina
- IAA – Ácido Indol acético
- Ig – Imunoglobulinas
- IL-1 – Interleucina 1
- IP₃ – Inositol fosfato
- LecRK – Receptor quinase lectínico

L-NAME – L-nitro arginina metil-éster)
MAP(K) – “Mitogen-activated protein (kinase)”
MLCK – “Myosin light chain kinase”
MS – Spectrometria de Massa
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”
NO – Óxido nítrico
NOS – Enzima óxido nítrico sintase
LTA – Lectina de *Lotus tetragonolobus*
PAMP – Padrões moleculares associados aos patógenos
PDB – “Protein Data Bank”
PGI2 – Prostaciclina
PHA – Lectina de *Phaseolus vulgaris*
Phe - Fenilefrina
p-lec – lectina da ervilha
PMI – Imunidade baseada em PAMP
PMF – “Peptide Mass Fingerprint”
PNA – Lectina do amendoim
RIPs - Proteínas Inativadoras de ribossomos
RK – Receptor quinase
PRR – Receptores de reconhecimento padrão
SBA – Lectina da soja
SR – Retículo sarcoplasmático
TNF- α – Interferon- α
TXA2 – Tromboxano
UPLC – “Ultra Performance Liquid Chromatograph”
WGA – Lectina do germe de trigo
Xman – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose
[Ca⁺²]_i – Concentração de Cálcio Intracelular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	16
1.2 LECTINA.....	17
1.2.2 Histórico.....	17
1.2.3 Definição.....	20
1.2.4 Classificação.....	22
1.2.5 Ocorrência e Biossíntese	24
1.2.6 Papel das Lectinas nos vegetais.....	26
1.2.7 Aplicação Biotecnológica	35
1.2.8 Lectinas de Leguminosas	38
1.2.9 Lectinas de Diocleinae	45
1.3 CONTRATILIDADE.....	47
1.3.1 O endotélio e os eventos vasculares.....	47
1.3.2 Produção dos fatores derivados do endotélio	49
1.3.3 Efeito do Óxido Nítrico nos vasos sanguíneos.....	51
1.3.4 Efeitos vasculares de Lectinas.....	52
2. OBJETIVOS	53
2.1 Objetivos Gerais.....	54
2.2 Objetivos Específicos.....	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 Obtenção da lectina de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth.....	56
3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS	56
3.3 Determinação da especificidade da lectina de <i>Canavalia grandiflora</i> Benth por eritrócitos de coelhos nativos e tratados enzimaticamente.....	56
3.4 Dosagem de proteínas solúveis	57
3.5 Ensaio de termoestabilidade.....	57
3.6 Ensaio de pH estabilidade	58
3.10 Massa Molecular da lectina de <i>C. grandiflora</i> por espectrometria de massa (massa intacta).....	58
3.7 Seqüenciamento da lectina de <i>C. grandiflora</i> por espectrometria de massa.....	58

3.8	Processamento dos espectros	59
3.9	Análise da seqüência de <i>C. grandiflora</i>	59
3.11	Avaliação da atividade edematogênica da lectina de <i>C. Grandiflora</i>	59
3.12	Teste de contratilidade em aortas isoladas	60
3.13	Avaliação da participação do fator relaxante derivados do endotélio NO no efeito da lectina.....	60
3.14	Análise estatística.....	60
3.15	Cristalização.....	61
3.16	Coleta de Dados, Seleção dos Modelos e Substituição Molecular.....	61
3.17	Refinamento e Validação da Estrutura.....	62
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E ESPECIFICIDADE POR ERITRÓCITOS DE COELHO.....	64
4.1.1	Estabilidade da Lectina de <i>C. grandiflora</i>	64
4.1.2	Ensaio hemaglutinante com eritrócitos de coelhos nativos e tratados.....	64
4.1.3	Integridade estrutural da lectina de <i>C. grandiflora</i>	65
4.2	ESPECTROMETRIA DE MASSAS	65
4.2.1	Determinação da massa molecular por espectrometria de massas.	65
4.2.3	Análise da seqüência de completa <i>C. grandiflora</i>	71
4.3	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL	74
4.3.1	Cristalização.....	74
4.3.3	Estrutura da lectina <i>C. grandiflora</i>	77
4.3.4	Sítios de interação aos metais.....	79
4.3.5	Sítio do ácido α -aminobutírico.....	80
4.3.6	Sítio de reconhecimento a carboidrato	82
4.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS CARACTERIZADAS PARA A LECTINA DE <i>C. GRANDIFLORA</i>	84
4.4.1	Efeito edematogênico da lectina de <i>C. grandiflora</i>	84
4.4.2	A lectina de <i>C. grandiflora</i> relaxa aortas endotelizadas	85
4.4.3	O L-NAME reverte o efeito relaxante da lectina de <i>Canavalia grandiflora</i>	87
5.	Conclusão.....	88

Referências.....	90
------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil é o país mais rico em diversidade macro e microbiológica. Acredita-se que possua cerca de 20% de toda a biodiversidade existente no planeta. Até a década de 90, metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo tem origem em princípios ativos de plantas, incluindo-se os fungos (Pletsch, 1998, p.12). De acordo com Rifkin (1999). É nessa diversidade biológica que se apoiará a grande indústria do século XXI, a biotecnologia, a qual está voltada para o crescente mercado mundial de produtos biotecnológicos, que movimenta entre 470 bilhões e 780 bilhões de dólares por ano. No Brasil, a participação desse mercado ainda é pequena, atingindo 500 milhões de dólares por ano (Arnt, 2001).

Os métodos de conservação dos recursos da diversidade biológica não são capazes de evitar o crescente perigo de extinção de espécies e, sobretudo, a perda da variabilidade genética. Assim sendo, faz-se mister que novas formas de conservação desses recursos sejam incorporadas àquelas já em uso, com a finalidade de diminuir, ao máximo, essas perdas irreversíveis (Barbosa, 2001).

A perda da variabilidade genética e, sobretudo, de espécies de fauna e flora se traduzem em uma potencial perda de macromoléculas de uso biotecnológico, seja nas áreas farmacêuticas, agropecuárias, industriais e científicas. A exploração sustentável dos recursos naturais é de grande importância e necessária devida sua grande aplicabilidade nas diversas áreas.

Dentro das macromoléculas, um grupo de grande interesse nas pesquisas estão as proteínas, seus estudos deram um grande salto como consequência da genômica, pois nelas se encontram traduzidas a função do gene (análise funcional) seu produto real. Surgiu a proteômica. Nas suas diversas linhas se encontra a proteômica estrutural, que aliado a bioinformática, é capaz de resolver a estrutura tridimensional de proteínas. Isto foi permitido devido aos avanços em técnicas relacionadas à cristalografia de proteínas, difração de raios X e processamento dos dados coletados na difração. Os estudos estruturais são de grande importância na análise detalhada do sítio de ação das proteínas, dentro dessa perspectiva, a indústria farmacêutica investiga a estrutura de diversas enzimas, envolvidas em patologias, para produzir fármacos baseados no sítio ativo e inibir a ação enzimática (desenho racional de fármacos).

Dentro das proteínas vegetais de interesse biotecnológico se encontram as lectinas (proteínas capazes de se ligar reversivelmente a carboidratos), pois elas mostram grande aplicabilidade desde a medicina à agricultura. Alguns fatos contribuem pra sua importância nas pesquisas, como sua ocorrência em inúmeras espécies de plantas em diferentes tecidos, sua

capacidade de reconhecer diferentes carboidratos (peça importante para decodificar a informação contida nos carboidratos), sua diversidade estrutural, potencial uso como agentes de defesa em plantas, capacidade de reconhecer e diferenciar diversos tipos celulares em modelos animais elicitando diferentes reações, como apoptose, proliferação, induz produção de metabólitos, atuam como “drug delivery” (Rüdiger e Gabius, 2001).

Lectinas com alto grau de homologia, com domínios conservados possuem diferenças notáveis nas suas aplicações, como as lectinas da subtribo de Diocleinae. Já que essas lectinas possuem especificidades semelhantes para carboidratos, essas diferenças podem ser mais bem compreendidas quando se analisam suas estruturas tridimensionais, em seus arranjos quaternários e arquitetura do domínio de reconhecimento a carboidratos.

Logo o estudo de novas lectinas é de grande importância devida sua aplicabilidade tecnológica, e seu estudo estrutural pode ser crucial para compreender seu potencial em diversos modelos de ação.

1.2 LECTINA

1.2.2 Histórico

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 e Shapleigh ainda fizeram um discurso profético “Elas (as lectinas) prometem ter importância teórica e prática”. Alguns pesquisadores apenas denominaram os extratos que possuíam especificidade por grupos sanguíneos como aglutininas, hemaglutininas ou fitohemaglutininas. O termo “aglutinina” não foi bem aceito por alguns imunologistas devido a origem do material ser de tecidos de plantas. O uso da palavra lectina tornou-se comum, sem dúvida por que substâncias que aglutinam eritrócitos são encontrados em quase todos os tecidos examinados. (Doyle e Slifkin, 1994)

O trabalho de S. Weir Mitchell, em 1860, reporta a aglutinação de células sanguíneas de pombo quando em contato com veneno de *Crotalus durissus* (Gabius 2002 [9]), apenas em 1888, Stillmark observou o fenômeno da hemaglutinação quando estudava os efeitos tóxicos da planta *Ricinus communis*, seria a primeira ocorrência destas proteínas 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 toxicidades de *Abrus precatorius*, planta que também possui lectina estudada pelo mesmo grupo de Stillmark (Moreira *et al*, 1991); 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. Ehrlich demonstrou em seus estudos a especificidade da resposta do anticorpo, o fenômeno da memória imunológica, e a transferência da imunidade humoral da mãe para sua progênie. O público em geral tomou conhecimento da ricina em 1978, quando foi usada como arma em um crime de motivação política conhecido como assassinato do guarda-chuva (“umbrella murder”) em que o opositor do governo búlgaro Georgi Markov, em Londres, enquanto cruzava ponte Westminster, sofreu um encontro de um homem com um guarda-chuva com um dispositivo para inocular a toxina, três dias depois o opositor estava morto (Sharon e Lis, 2004).

1.2.2.1 Ligação a açúcar e especificidade sanguínea

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 Concavalina A e desta forma foi o primeiro a obter uma hemaglutinação pura. No entanto, apenas em 1936, Sumner e Howell, demonstraram que concavalina A aglutina células como eritrócitos e leveduras e inclusive precipita glicogênio em solução. Eles mostraram que a hemaglutinação era inibida por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade da lectina por açúcar. Eles também sugeriram que a hemaglutinação induzida por concavalina A poderia ser conseqüência da reação da proteína vegetal com a superfície dos eritrócitos.

Já 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. Quase uma década depois ele reportou que a atividade hemaglutinante de diversas sementes eram bem diferentes quando testadas com eritrócitos de animais diferentes (Landsteiner e Raubitshek, 1907). Por causa desta especificidade, Landsteiner concluiu que a reação das hemaglutininas vegetais “se assemelham as reações de anticorpos em todas suas essências”. Em 1940, William C. Boyd e Karl O. Renkonen descobriram, independentemente, a especificidade das hemaglutininas pelos grupos sanguíneos. Eles descobriram 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. Olavi Mäkela, em 1954-56, examinou extratos de sementes de 743 espécies em 165 gêneros da família Leguminosae, e detectou atividade hemaglutinante em mais de um terço, quase um décimo das hemaglutininas apresentaram especificidade sanguínea.

Apesar de vários dos extratos testados fossem específicos para sangue O ou A, ou ambos os tipos A e B, um extrato de *Dolichos biflorus*, aglutina bem mais eritrócitos do tipo A1 do que A2, somente extrato de *Griffonia simplicifolia* exibiu especificidade exclusiva por sangue B. Desde então, outras hemaglutininas específicas para sangue A ou O (mas não B) foram descobertas, bem como diversas para outros tipos sanguíneos, como N (lectina de *Vicia graminea*), T (aglutinina do amendoim PNA) e Tn (as lectinas de *Vicia villosa* e *Moluccella leavis*). As hemaglutininas específicas para cada tipo sanguíneo tiveram um papel crucial na investigação da base estrutural da especificidade dos antígenos associados ao sistema sanguíneo A B O por Walter J. T. Morgan Winifred M. Watkins em 1950. O trabalho pioneiro de Watkins e Morgan estava entre as recentes evidências da presença de açúcar na superfície de células e o papel potencial das aglutininas como marcadores de entidades, um tema abordado na glicobiologia moderna. No entanto, levou certo tempo para que os contra-receptores de açúcares de superfície, isto é, as lectinas endógenas que reconhecem estes açúcares, fossem identificados, os primeiros foram os receptores hepáticos de asialoglicoproteínas de mamíferos. A habilidade de aglutininas de plantas em distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos levou a Boyd 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.

1.2.2.2 Estímulo mitogênico de linfócitos e aglutinação de células cancerígenas

Duas das maiores descobertas feitas no início da década de 1960 foram fundamentais para levar as lectinas para a atenção pública. A primeira delas foi a descoberta, por Peter C. Nowell (1960), da mitogenicidade da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), ou seja, ela possui a habilidade de estimular a mitose em linfócitos. Esta descoberta teve um impacto revolucionário na imunologia, pois o que se sabia até então era que linfócitos eram o final da diferenciação celular e eram incapazes de se dividirem. Em pouco tempo, várias outras lectinas provaram ser mitogênicas. Em especial, a descoberta que concavalina A era mitogênica, pois, em contraste com a PHA, sua atividade podia ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos como manose. Esta descoberta 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. Logo, 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, na década de 1970 por Robert C. Gallo e seus associados, do fator T de crescimento celular (interleucina-2) no meio de condição para o crescimento normal de linfócitos humanos estimulados por PHA (Morgan *et al* 1976). A segunda descoberta foi feita por Joseph C. Aub (Aub *et al* 1963 1965), ele descobriu que a aglutinina do gérmen de trigo (WGA) tem a habilidade de preferencialmente aglutinar células malignas. Em seguida outras lectinas mostraram ter essa habilidade como a concavalina A, aglutinina da soja (SBA). Essa investigação forneceu as primeiras evidências de que mudanças nos açúcares da superfície celular estão associados como desenvolvimento de câncer.

1.2.2.3 Isolamento de lectinas em larga escala

Antes do início do anos 1970, a presença de hemaglutininas foi relatada em inúmeros organismos, mas poucos haviam sido purificados. A introdução da cromatografia de afinidade, por Irwin J. Goldstein e Bipin B. L. em 1967, aumentou dramaticamente o isolamento de lectinas. Numerosas lectinas se tornaram disponíveis, a maioria de plantas. O interesse nas lectinas foi amplamente estimulado pela demonstração de que elas são ferramentas valiosas para detecção, isolamento, e caracterização de glicoconjugados, primariamente de glicoproteínas, para histoquímica de células e tecidos e para o exame das mudanças que ocorrem na superfície da célula durante processos fisiológicos e patológicos, da diferenciação celular até o câncer (Agrawal e 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 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.

1.2.3 Definição

Na opinião de 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.

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

1.2.3.1. 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 protéica funcional, sendo esse sítio de reconhecimento o responsável para classificar a proteína multifuncional como lectina, abre a possibilidade de classificar a proteína em outra categoria como RIPv tipo 2 e quitinases classe I (Gabiús, 1997).

1.2.3.2. Lectinas estão separadas das imunoglobulinas

Originalmente, lectinas foram denominadas “substâncias tipo anticorpos” (Boyd e 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 sintetizados, apesar da capacidade de se ligar a carboidrato pode 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 anticorpos. A expressão de lectina de plantas pode aumentar como consequência de estresses, como patógenos, seca ou alta salinidade (Scheggia *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2000).

1.2.3.3. 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. (Gabijs, 1997; Brechtel *et al.*, 2001; Trainotti *et al.*, 2001). Lectinas são, portanto, separadas de sensores para mono ou dissacarídeos operando em quimiotaxias ou em sistemas “operon” e de proteínas de transporte (Kocourek *et al.*, 1983).

1.2.4 Classificação

Baseado na sua estrutura geral (Peummans e Van Damme 1995; Peummans e Van Damme 1998), as lectinas podem ser classificadas em quatro categorias, denominadas: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas (Figura 1).

1.2.4.1 Merolectinas

São proteínas formadas exclusivamente de um único domínio de reconhecimento á carboidrato (DRC), e devido a sua natureza monovalente, é incapaz de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Como exemplos temos a heveína (Van Parijs *et al.*, 1991) e as proteínas monomérica ligantes de manose das orquídeas.

1.2.4.2 Hololectinas

São exclusivamente formadas por DRCs, 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.

1.2.4.3 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.

1.2.4.4 Quimerolectinas

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

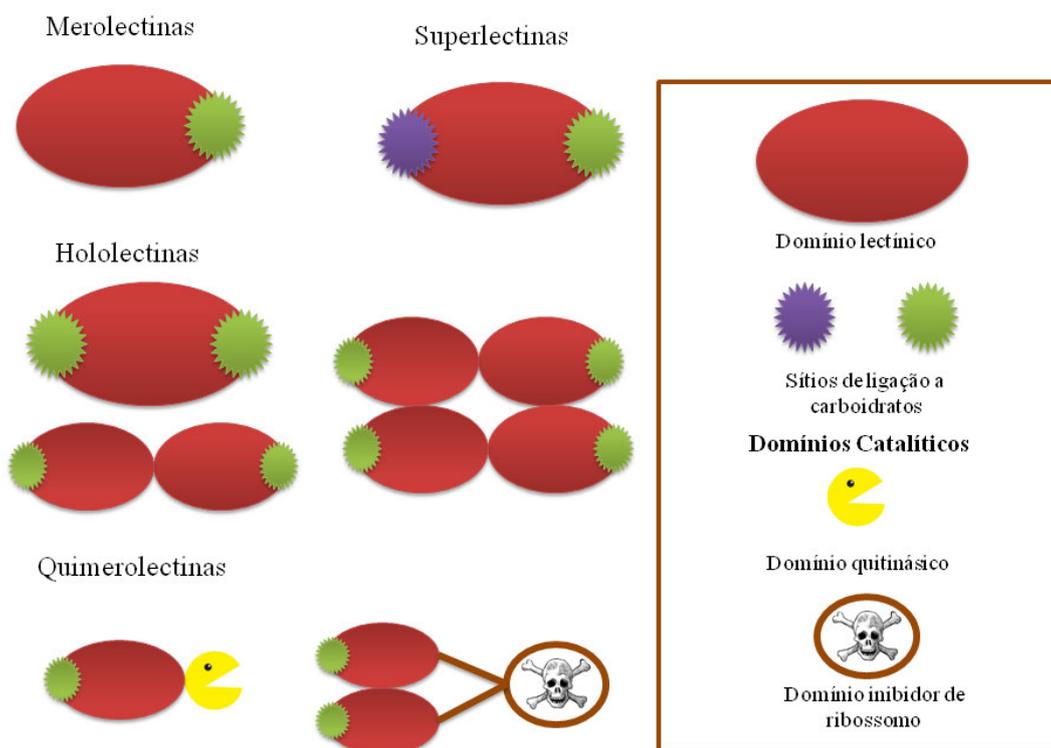


Figura 1 – Representação dos quatro tipos de lectinas de plantas. Baseado em Van Damme, 1998.

Além da classificação estrutural, baseado na análise das seqüências das lectinas, pode-se observar as diferenças e relações evolutivas entre elas e permitiu criar quatro grupos de proteínas

relacionadas evolutivamente, denominados 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 (Figura 2) (Van Damme *et al.*, 1998).

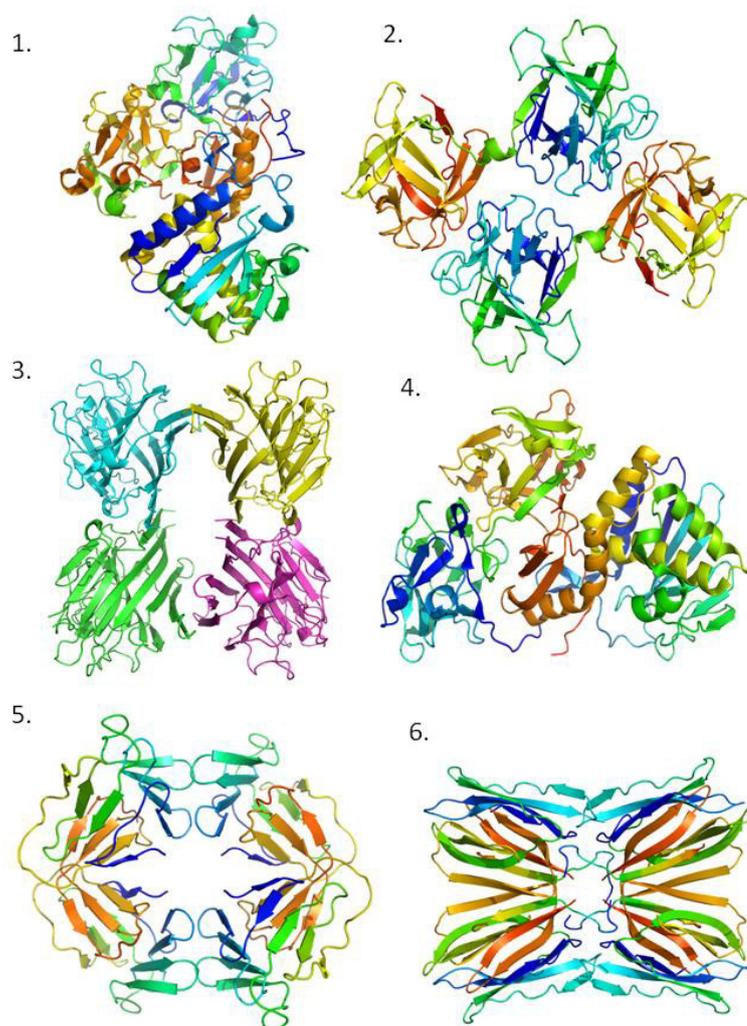


Figura 2 – Estrutura de grupos e famílias de lectinas vegetais. 1. Abrina - RIP tipo 2; 2. *A. Caudatus* - Família Amarantina; 3. PHA-L – Leguminosa; 4. *V. Album* – Ligante a quitina 5. GNA - Monocotiledônea ligante a manose; 6. Jacalina.

1.2.5 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 Concavalina A. ConA é sintetizada nos cotilédones de sementes em desenvolvimento de *Canavalia ensiformis* e acumulada em corpos protéicos 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 com uma cadeia lateral de manose. O glicano é atracado na cadeia lateral de um resíduo de asparagina localizado no meio da molécula e essa forma resultante é denominada de pró-ConA, o precursor da ConA madura (Herman *et al.*, 1985; Chrispeels *et al.*, 1986; Faye e Chrispeels, 1987). O precursor é transportado para corpos protéicos via complexo de Golgi onde o glicopeptídeo central (o glicano atracado a um peptídeo de 15 resíduos) é removido, originando dois fragmentos distintos correspondendo aos domínios N- e C- do precursor. A cadeia C-terminal é processada ocorrendo a remoção proteolítica de um peptídeo de nove resíduos na extensão C-terminal, que é ligada à região N-terminal de maneira inversa (Figura 3). Uma clivagem subsequente libera 4 resíduos de aminoácidos originando a lectina madura com 237 resíduos. (Bowles *et al.*, 1986; Bowles e Pappin, 1988). 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* (Hague, 1975; Moreira e Cavada, 1984; Cavada *et al.* 1996; Ceccato, 2001). Para algumas das lectinas de *Canavalia*, foi demonstrado que os dois fragmentos são as duas metades da cadeia alfa intacta (Yamauchi *et al.*, 1989; Yamauchi e Minamikawa, 1990, Grangeiro, 1996), indicando que as espécies de lectina desse gênero são produzidas pelo mesmo mecanismo postranslacional estabelecido para ConA.

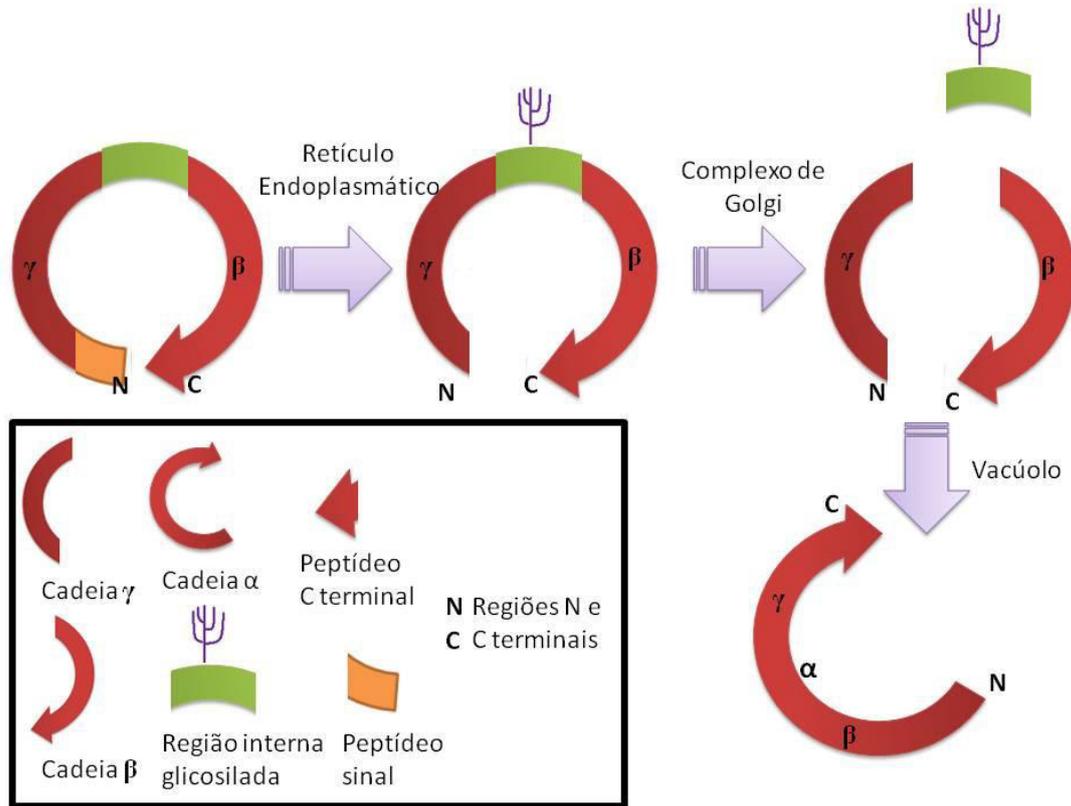


Figura 3 – Representação esquemática da biossíntese das lectinas semelhantes a ConA no processamento chamado de permutação circular, modificado a partir de Peumans e Van Damme (1998).

1.2.6 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 microorganismos (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 e 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 e 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 e Van Damme, 1995).

1.2.6.1 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.*, 1989), giberilina controla as mudanças diárias na expressão da lectina do xilema de *Cucumis sativus* (Oda *et al.*, 2003). Tratamento com IAA 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.*, 2000). 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 possui 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 fitohormônios podem estar ligados à lectinas, que fariam um papel de armazenamento (Babosha, 2008).

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

O Abu é um aminoácido não protéico 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 está associado ao “priming”, processo que aumenta a capacidade da célula em mobilizar respostas de defesa celular (Ton e 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 protéico 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.

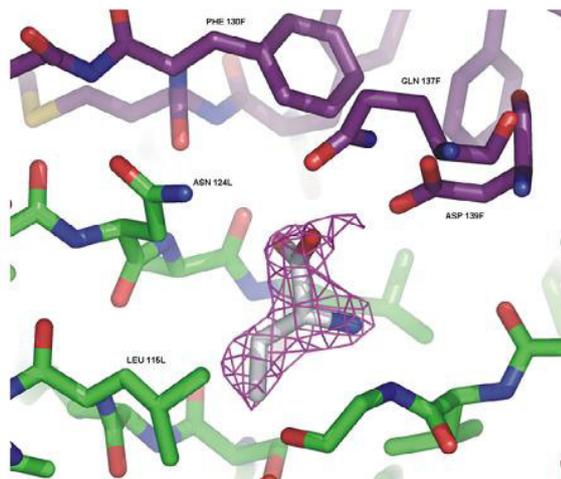


Figura 4 – Sítio de localização do Abu com sua densidade eletrônica. Adaptado de Delatorre *et al.*, 2007

1.2.6.3 Simbiose com Bactérias

Lectinas de plantas não são consideradas por serem 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 recentes se focam nas lectinas de raiz, alguma delas similares as lectinas de fato, foi possível mostrar 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.

E um 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 por definição, seus receptores são lectinas (Gabiús, 2001).

1.2.6.4 Modelo de ação de lectinas em plantas

Alguns dos papéis exercidos pelas lectinas nas plantas estão claros à luz da ciência, porém as dificuldades maiores são explicar os mecanismos pelos quais as lectinas atuam nas plantas (De Hoff *et al* 2009).

A imunidade inata das plantas é mediada via interação receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e PAMPs (padrões moleculares associados aos patógenos). Quando esse reconhecimento ocorre, e são acionados a cascata de transdução de sinais baseados em proteínas quinase (MAPK), a resistência basal ou imunidade baseada em PAMP (PMI) é elicitada em planta. De Hoff e colaboradores (2009), sugerem um modelo baseados nas descobertas feitas sobre as lectinas e o mecanismo de defesa de plantas, para explicar sua ação tanto na defesa quanto na simbiose.

O meio extracelular é um ambiente complexo nos quais organismos patógenos, simbióticos e comensais se agregam na rizosfera onde não só proteína, mas também açúcares liberados por esse organismo e pela planta se acumulam. Os micróbios na região da raiz são atraídos por quimiotaxia pelos nutrientes liberados pela raiz e se movem em sua direção. No

entanto, os micróbios podem ser imobilizados por uma primeira linha de defesa (estima-se que uma distância de 5-50µm da superfície da raiz), onde lectinas multiméricas e provavelmente outras moléculas aglutinam eles. No entanto, esta barreira não é impenetrável e uma fração de microorganismos pode migrar para a superfície da raiz permitindo o controle de amostragem do ambiente local pela raiz. Na superfície da raiz, os organismos que escaparam das lectinas secretadas irão, provavelmente, encontrá-las novamente, via interação com sua superfície de carboidratos, e aglutinarão por receptores de reconhecimento de patógenos e/ou simbióticos. Estas lectinas e receptores estão potencialmente associados juntos em “lipid rafts” (microdomínios especializados da membrana plasmática onde alguns lipídios, normalmente esfingolipídios e colesterol, e proteínas estão concentrados), permitindo a amplificação do sinal resultante da percepção pela raiz. O domínio da lectina nos LecRK provavelmente aglutina estas moléculas via carboidratos ou superfície glicosilada de proteínas. A degradação da parede celular pode ser detectada por domínios auxiliares na estrutura da lectina e transmitida para a planta para uma resposta. Na interação patogênica e mutualística, a parede celular é degradada (Robledo *et al.*, 2008), e nos dois cenários resulta na “up regulation” de genes envolvidos na defesa da planta. Na patogênese, a resposta defensiva é mantida, mas na simbiose mutualística a resposta é atenuada (Gibson *et al.*, 2008). Na simbiose de *Rhizobium*, fatores de nodulação podem possuir um papel de “down-regulation” na resposta de defesa ou de inibir sua transdução, por uma interação direta ou indireta com um RK (receptor quinase) ou LecRK. O modelo criado também ilustra a possibilidade de reconciliação entre o aparente papel duplo das lectinas de plantas na simbiose e na defesa. Na figura 5A, quando simbióticos (como *Rhizobium*) se ligam à raiz, micróbios (bactérias em verde) colonizam a superfície da raiz. Aumentando a concentração de células de *Rhizobium* facilita o reconhecimento local de fatores de nodulação por receptores desse fatores de um *Rhizobium* compatível (Oldroyd e Downie, 2008), possivelmente em um “lipid raft”. Quando patógenos (bactérias em marrom) são detectadas por FLS2 ou por lectinas, uma resposta local e imediata (explosão oxidativa) e resposta sistêmica (via cascata de MAPK) são acionadas, e o progresso do patógeno é reduzido. As proteínas efetoras das bactérias também podem ser internalizadas e detectadas internamente por um RK. No caso de bactérias comensais (bactérias amarelas ou cores claras), nem a resposta patogênica ou simbiótica é ativada. A interação proposta entre organismos mutualísticos e patogênicos está representada na figura 5B e C, respectivamente. A planta sofre os custos da secreção de nutrientes em larga escala para potencialmente se associar com bactérias simbióticas, mas ao mesmo tempo pode sofrer o risco de ser atacada por patógenos. Lectinas de plantas podem participar no balanço da interface entre as interações mutualísticas e patogênicas. A compreensão da dualidade de funções é limitada não

só pela falta de informação sobre todos os fatores que participam do funcionamento, mas também devido às peças desse quebra-cabeça ainda não terem sido identificadas (De Hoff *et al* 2009).

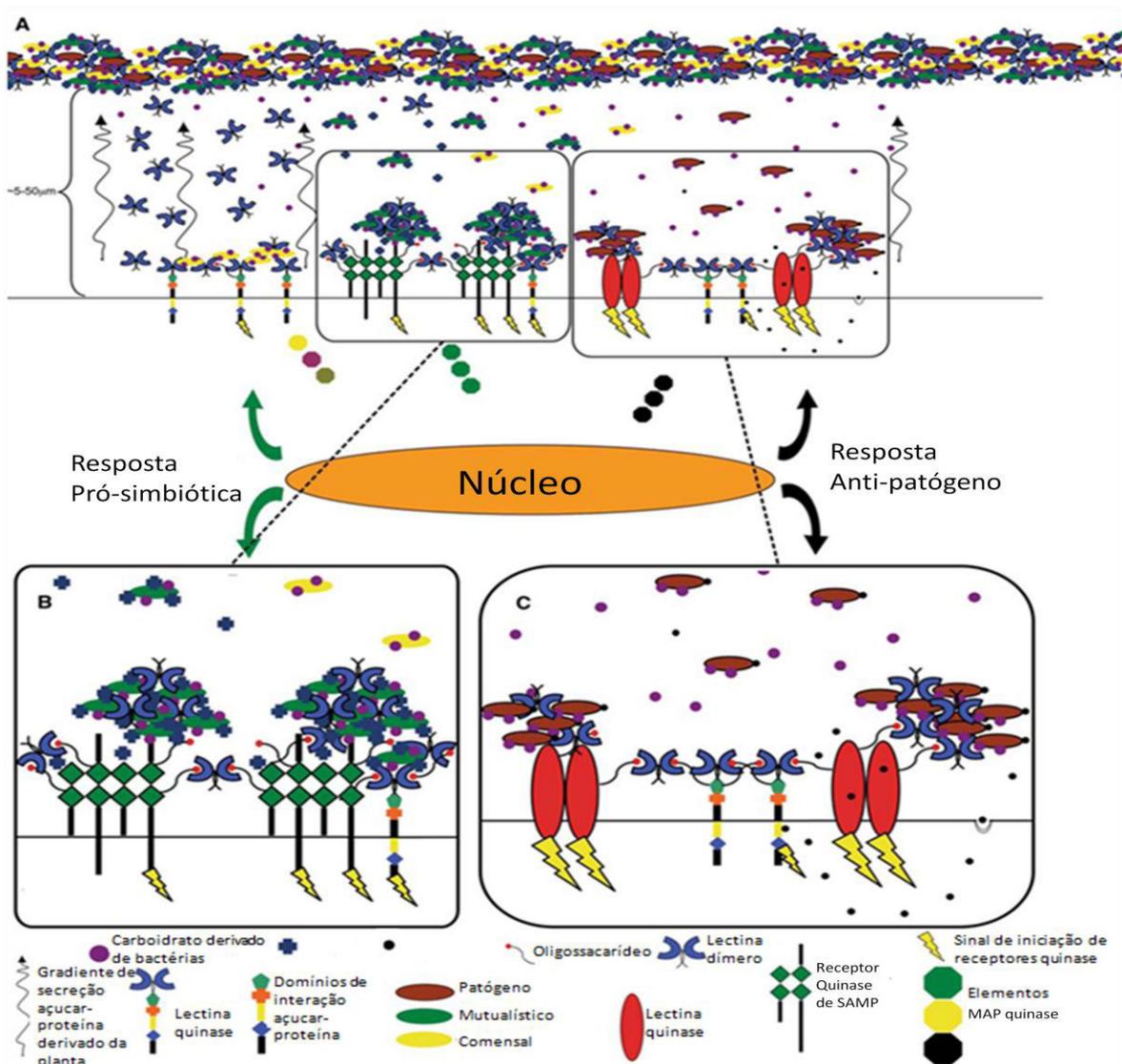


Figura 5 – Modelo de ação de lectinas em plantas, adaptado de De Hoff e colaboradores (2009)

1.2.6.5. Ação direta de lectinas sobre organismos

1.2.6.5.1 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 *et al.*, 2004), o mesmo foi observado em batata desafiada pelo vírus X (Scheggia *et al.*,

1988). Já com relação a outros microorganismos, invertebrados e mamíferos, existe uma gama de trabalhos mostrando a ação tóxica de lectina contra seres vivos.

1.2.6.5.2 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 peptideoglicanos, enquanto as Gram-negativas apresentam na sua parede celular peptideoglicano, 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 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 e 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 e 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 (Ayoub *et al.*, 1994)

1.2.6.5.3 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 kamtum* e *Pkykomyces 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 (Peummans e Van Damme, 1995).

Diversas outras lectinas apresentam atividade antifúngica, e um grupo importante é o das merolectinas, neste caso, elas possuem só um sítio de ligação à quitina. Heveína é um exemplo, extraída do látex de árvore da borracha (*Hevea brasiliensis*), possui um atividade antifúngica comparada a da urtiga (Van Parijs *et al.*, 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.*, 1992).

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 de ligação a carboidrato (Collinge *et al.*, 1993).

1.2.6.5.4 Insetos

As células ao longo do epitélio do trato digestório de insetos fitófagos estão expostos 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 e Van Damme, 1995). Todavia, é bastante obvio 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 e 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, 2008; Sá 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 insto (Fitches *et al.*, 2001).

1.2.6.5.5 Animais superiores

Como nos insetos, as células epiteliais ao longo do trato digestório de animais superiores 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.

O exemplo de lectina que foi bem estudada quanto sua toxicidade para animais e seres humanos é a PHA. Inclusive um envenenamento acidental por PHA por seu feijão mal cozido. A PHA ingerida é altamente resistente a proteases do trato digestório, se liga a células com borda em escova do intestino onde é rapidamente endocitado. 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 *et al.*, 1991). Além disso, ingestão de PHA ou feijões cozidas 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.

1.2.7 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.

1.2.7.1 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, M. *et al* 2001).

1.2.7.2 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 glicodendrímeros 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 célula imunológicas pode levar a liberação de fatores de crescimento e alterar o padrão de crescimento de tumores. (Rüdiger e Gabius, 2001)

1.2.7.3 Transporte nuclear

Uma aplicação intrigante de lectinas na biologia celular e análise de glicanos vêm da detecção da O-GlcNAcilação de proteínas citoplasmáticas do núcleo por WGA (Shane e Hart, 1999). Apenas 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 e Gabius, 2001)

1.2.7.4 “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 *et al*, 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. As lectinas podem ser conjugadas com uma série de agentes que devem ser levados

para células de tumor. Estes podem incluir (1) drogas tumoricidas (2) radioisótopos como ^{125}I e ^{67}Ga para rádio imagem (“scintiscan”) e (3) antioxidantes fotoativados para terapia fotodinâmica (Mody R., *et al.*, 1995)

1.2.7.5 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)

1.2.7.6 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 antiinflamatório 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. 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 *et al.*, 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 antinonceptivo (Holanda *et al.*, 2009).

1.2.7.7 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 e 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 (Schuler *et al.*, 1998; Legaspi *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2006). Provavelmente, a lectina mais largamente estudada é a GNA. Seu gene foi introduzido com sucesso em diversas culturas (Gatehouse *et al.*, 1999; Legaspi *et al.*, 2004). Estas plantas mostraram ser parcialmente resistentes à insetos sugadores de floema, indicando que GNA é transportado para o floema. Exemplos incluem tabaco (Hilder *et al.*, 1995; Yuan *et al.* 2001), batata (Down *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.*, 1996), trigo (Stoger *et al.*, 1999), e arroz (Rao *et al.*, 1998; Foissac *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002). Além de insetos ela já mostrou aumentar resistência contra nematóides em *Arabidopsis thaliana* transgênica (Ripoll *et al.*, 2003).

Diversas outras atividade já foram descritas para estas proteínas, em especial para lectinas de Diocleinae como produção *in vitro* de oxido 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-Neto, *et al.*, 1996), o que justifica os estudos funcionais e estruturais desse grupo dentro da família de Leguminosae.

1.2.8 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 (25-30kDa), 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

seqüências das lectinas obtidas por técnicas químicas ou de genética molecular exibiram uma marcante homologia, com um número significativo de invariantes resíduos de aminoácidos, entre eles, os envolvidos na ligação ao metal (Sharon e Lis, 1990).

1.2.8.1 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-rol” foi primeiramente descrito na Concaivalina A. 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 6). O primeiro deles está entre as três folhas β , e o segundo se localiza entre a folha β da frente com os “loops” 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).

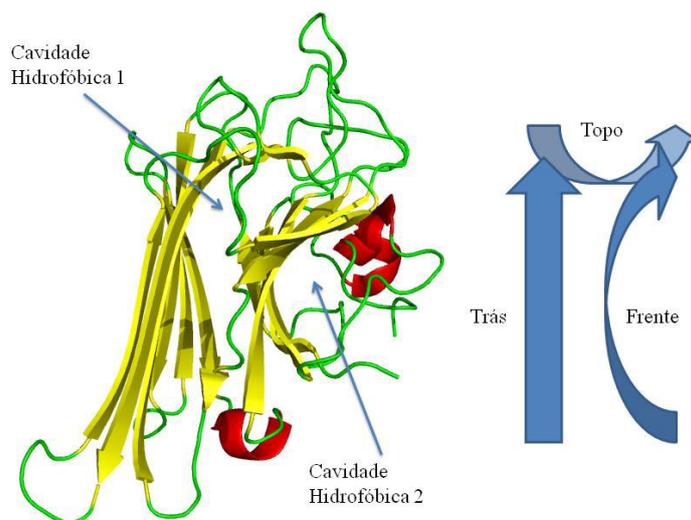


Figura 6 – Partes do monômero de lectinas de leguminosas. Estrutura de ConM e modelo esquemático. Baseado em Sinha *et al.*, 2007.

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 *et al.*, 1982) e é altamente conservado na estrutura de outras lectinas de leguminosas. O cálcio e o metal de transição estão distanciados aproximadamente por 4,5Å (no caso da ConA) e dois resíduos de aspartato fazem uma ponte (Figura 7) 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 *et al.*, 1978). A alta energia de ativação desse processo é provavelmente devido à isomerização da ligação peptídica entre os resíduos Ala207 e Asp208 (Figura 8). Esta ligação possui a conformação trans- em ConA desmetalizadas (Bouckaert *et al.*, 1995), 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 e 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, 2000). Os dois domínios estão interligados, uma molécula de água que faz ponte de hidrogênio com o cálcio realiza outra com a Asp208 (Loris, 1998).

O sítio de ligação a carboidratos também é altamente conservado em lectinas do tipo ConA. A importância dessa conservação dos aminoácidos para a interação com monossacarídeos tem sido amplamente descrita (Hamodrakas *et al.*, 1997). Os resíduos de aminoácidos que interagem com o monossacarídeo são conservados e, normalmente, ocorre a formação de cinco a oito pontes de hidrogênio entre estes e os aminoácidos das lectinas de Diocleinae (Hamodrakas *et al.*, 1997). Os resíduos de aminoácidos envolvidos neste domínio são Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228, eles são absolutamente conservados nas lectinas de leguminosas que adotam a associação tetramérica de ConA (Calvete *et al.*, 1999) classificada como tipo II (Brinda *et al.*, 2004)

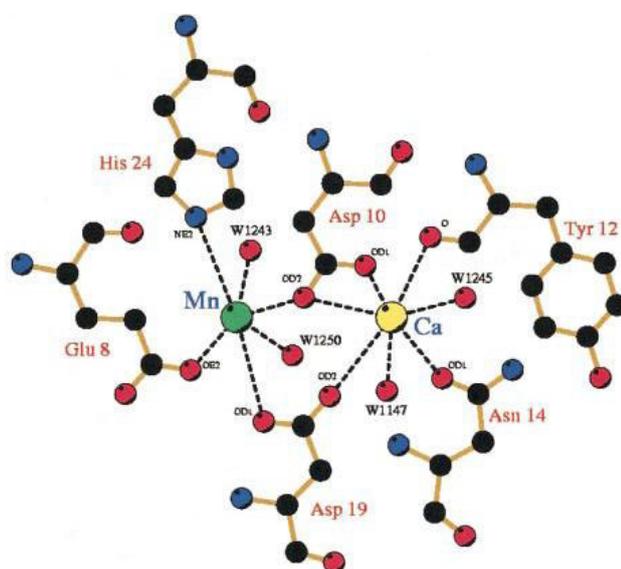


Figura 7 – Ponte de aspartato ligando o Ca^{2+} e o metal de transição presente nas lectinas de leguminosas. Reproduzido de Wah *et al.*, 2001.

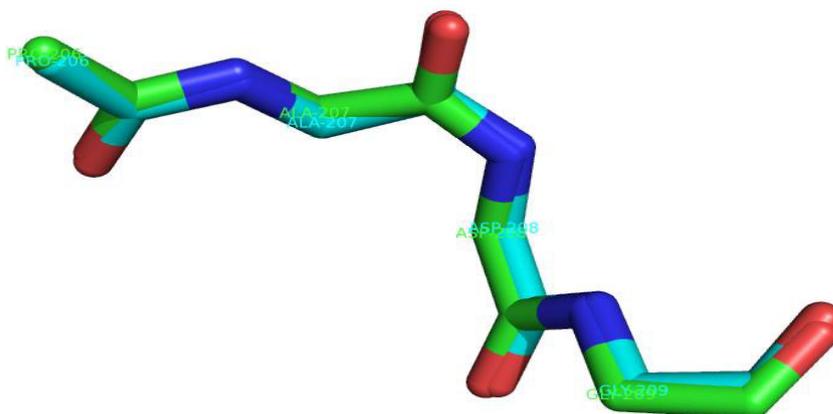


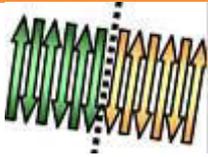
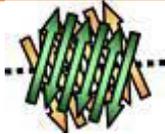
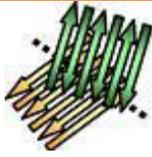
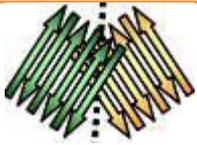
Figura 8 – Isomerização da ligação Ala207-Asp208 nas lectinas de CGL e *C. grandiflora*.

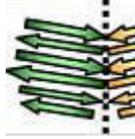
Todas as lectinas de leguminosas são dímeros ou tetrâmeros feitos de dímeros. Os tetrâmeros possuem principalmente duas interfaces, que possuem similaridades com as interfaces

entre os dímeros. Oligomerização entre essas lectinas diméricas ou tetraméricas é principalmente mediada por suas interações, da folha β plana da parte de trás, entre diferentes subunidades para produzir diferentes tipos de interfaces (Tabela 1).

A primeira lectina cuja estrutura foi resolvida foi a ConA (Edelman *et al.*, 1972). Esta lectina forma dímeros de dímeros. A dimerização inicial associação lado-a-lado da folha β plana de seis fitas, formando uma folha β contígua de 12 fitas. Subseqüentemente, 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) representam, as diferenças angulares, ϕ , entre as duas folhas β que estão em contato (Sinha *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Adaptado de Sinha 2007

Tipos de Interfaces formadas durante a oligomerização de lectinas de Leguminosas		
Tipos de interface	Exemplos e Características	Figuras esquemáticas
Interface canônica ou tipo II	Presentes em lectinas diméricas como PSL e UEA-I e lectinas tetraméricas como ConA e PSA	
Interface X1	Observado no dímero DB58 e em interfaces não canônicas de tetraméricas como SBA, PHA, etc.	
Interface X2	Observado somente em tetrâmeros, como a interface não canônica em proteínas como ConA e a lectina de <i>Dioclea grandiflora</i> (DGL)	
Interface X3 ou "aperto de mão"	Observada em ECorl e dímeros de WBA I e II	
Interface X4 ou "costa com costa"	Exibido em GS4, GS1 e PNA	

Interface X5	Observado em GS1. É o arranjo da X4 com um ângulo diferente de orientação mútua.	
Interface usual	não Observado na PNA entre as subunidades 3 e 4.	

1.2.8.1.2 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. Existe, porém, lectinas diméricas de estrutura conhecida que não formam o dímero canônico. Elas são as lectinas de *Erythrina corallodendron* (Shaanan *et al.*, 1991) e de *Griffonia simplicifolia* (Delbaere *et al.*, 1993). Estes dímeros, em algumas espécies se associam formando uma estrutura quaternária tetramérica, no caso da concavalina A estrutura quaternária é pH dependente, a proteína é dimérica em pH abaixo de 5,0 e tetramérica em pH neutro ou básico pela associação de dois dímeros (Bouckaert *et al.*, 1995).

Os tetrâmeros são principalmente dímeros de dímeros, e, portanto, são 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 *et al.*, 2005)

Além dessas associações quaternárias, a estrutura da lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTA) apresenta um arranjo diferente formado pelos seus dímeros tipo GS4, a 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 seqüência 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, localizado 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, nos monômeros de GSA a glicosilação ocorre no resíduo

Asn18. Enquanto o dímero de LTA tipo GS4 é uma associação de fitas β de monômeros adjacentes, a interface dimérica de LTA é estabilizada por pontes de hidrogênio e contatos hidrofóbicos entre os loops dos monômeros A/C e B/D (Figura 9). As duas interfaces de contato foram descritas como uma nova interface dimérica na LTA (Moreno *et al.*, 2008).

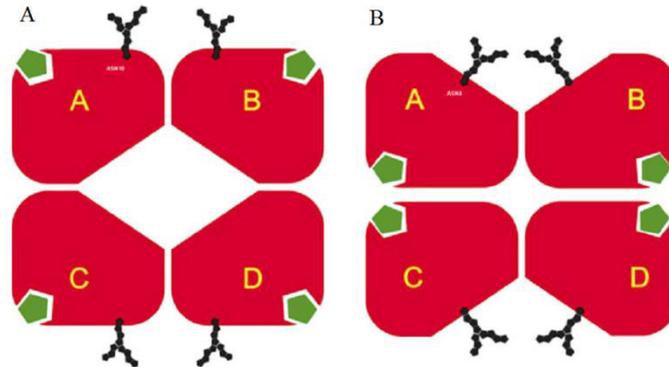


Figura 9 – Representação esquemática da associação dimérica das lectinas GSL e LTA. As caixas vermelhas representam o monômero lectínico, pontos pretos representam os padrões de glicosilação e caixas pretas representam domínios de ligação a carboidratos. A – Representação da interface de dímeros costa-com-costa 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 glicanos 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 pra 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).

1.2.8.1.3 Relação estrutura-função

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. Isto, por sua vez, pode modular a capacidade de lectinas de se ligar e agregar específicas glicoproteínas e glicolipídios receptores da superfície celular, 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)

Portanto, diversos fatos suportam a hipótese de que pequenas diferenças em pontos-chaves da estrutura primária de lectinas próximas filogeneticamente provocam um impacto no equilíbrio dímero-tetrâmero, são amplificados por oligomerização, e possuem conseqüências biológicas importantes (Calvete *et al.*, 1999).

1.2.9 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. marítima* (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 e 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). Além disso, diversas evidências mostraram que lectinas de Diocleinae exibem atividade biológicas diferenciadas como proliferação de linfócitos e produção de interferon γ (Barral-Netto *et al.*, 2001), estimulação de macrófagos peritoneais e reação inflamatória (Rodriguez *et al.*, 199), 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 *et al.*, 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 possuem equilíbrio dímero-tetrâmero dependente do pH. No entanto, apenas a forma tetramérica é capaz de realizar a ligação cruzada entre receptores de membranas de células e acionar a transdução de sinal de algum processo.

1.2.9.1 *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 2001 fez a caracterização bioquímica parcial da lectina *Canavalia grandiflora* Benth. A lectina foi isolada em Sephadex G-50, eluída com glicose 0,1M, e apresentou perfil eletroforético com lectinas do mesmo gênero, como a ConBr, possui cadeia α e fragmentos β e γ . Apresentou 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.

Algumas aplicações biológicas foram atribuídas à lectina desta espécie, como seu efeito modulador de eventos chaves da inflamação. A lectina de *Canavalia grandiflora* (ConGr), possui efeitos antiinflamatório 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 ConGr importante alvo para novas terapias antiinflamatórias e analgésicas (Nunes *et al.*, 2009).

CLASSIFICAÇÃO

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Subfamília: Faboideae

Gênero: *Canavalia*

1.3 CONTRATILIDADE

O mecanismo contrátil do músculo liso vascular é de grande importância para o conhecimento dos papéis funcionais, fisiológicos e fisiopatológicos do mesmo. O estado contrátil do músculo liso é regulado pela concentração de cálcio livre no citosol. Uma variedade de estímulos que induzem a contração do músculo liso, como despolarização da membrana, α -adrenérgicos, e agonistas muscarínicos ativam um aumento no nível de Ca^{2+} de níveis basais de 120-170 nmol para 500-700 nmol. Em níveis elevados de Ca^{2+} , Ca^{2+} se liga a calmodulina uma proteína multifuncional. A interação da calmodulina e o Ca^{2+} induz uma mudança conformacional e expõe sítios da proteína de interações com proteínas alvos, uma delas é a MLC quinase, e a interação da calmodulina com a MLCK resulta na ativação e fosforilação da miosina na serina-19 das duas cadeias leves de 20kDa. Esta fosforilação aciona as cíclicas ligações cruzadas entre a miosina e os filamentos de actina, bem como o desenvolvimento de força (Walsh, 1990). A reversão da contração ocorre com a diminuição na $[\text{Ca}^{+2}]_i$, deste modo levando à dissociação entre a calmodulina e a MCLK. Assim como através da atividade da miosina fosfatase de cadeia leve (MCLP), que ao ser ativada, desfosforila a MCLK, visto que miosina fosforilada é responsável pela manutenção da contração, levando ao relaxamento muscular. Deste modo pode-se afirmar que a modulação da contração ocorre por uma série de fatores, sendo que os mais importantes são os que controlam a $[\text{Ca}^{+2}]_i$ e os que modificam a relação MLCK/MLCP independente da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ (Alessi *et al.*, 1992; Karaki *et al.*, 1997).

A contração também pode ocorrer sem que haja uma elevação do cálcio intracelular $[\text{Ca}^{+2}]_i$. O processo contrátil pode ser deflagrado tanto pelo aumento da sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{+2} quanto pela ativação direta das proteínas responsáveis pela contração por proteínas quinase. Apesar do mecanismo mais amplamente aceito em termos de regulação da contração do músculo liso ser o da ativação da MCLK dependente da $[\text{Ca}^{+2}]_i$, evidências sugerem que esta relação é variável e que alguns estímulos podem ativar a MCLK independente da $[\text{Ca}^{+2}]_i$ (Feng *et al.*, 1999).

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 1981, Furchgot e Zawadiski, estudando a reatividade vascular em pequenos seguimentos em aortas de coelhos, observaram que a aplicação de acetilcolina, provocava vasodilatação do seguimento 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. 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 (Vane; Anggard; Botting, 1990; Lusher e Barton, 1997).

Uma importante alteração do tônus vascular ocorre durante a inflamação, uma das primeiras mudanças é a vasodilatação. E esta vasodilatação é acompanhada de aumento do fluxo sanguíneo. Tudo isto funciona como aumento muito importante na pressão hidrostática no lúmen destes vasos. O aumento desta pressão faz com que haja uma força que leva à saída do líquido do interior dos vasos para o interstício. Quando isto acontece, as proteínas e os constituintes intersticiais vão ficar de alguma forma diluídos, há, portanto, uma diminuição da pressão osmótica, isto faz com que no território agora em que se deveria fazer a reabsorção do líquido saído na rede pré-capilar, por efeito da pressão hidrostática ainda maior do que o habitual e da pressão osmótica menor do que o habitual, essa reabsorção do líquido intersticial não é feita de uma forma eficaz. Resulta, portanto, a acumulação no espaço extravascular do líquido e esta acumulação do líquido no espaço extravascular designa-se por EDEMA! (Carneiro, 2006). Um importante fator derivado de endotélio, que provoca hiperpolarização e a vasodilatação, está comumente relacionado ao mecanismo de inflamação e a inibição de sua síntese fica atrelada a uma inibição da inflamação por moléculas edematogênicas, este fato é notoriamente observado para o NO (Figueiredo *et al.*, 2009)

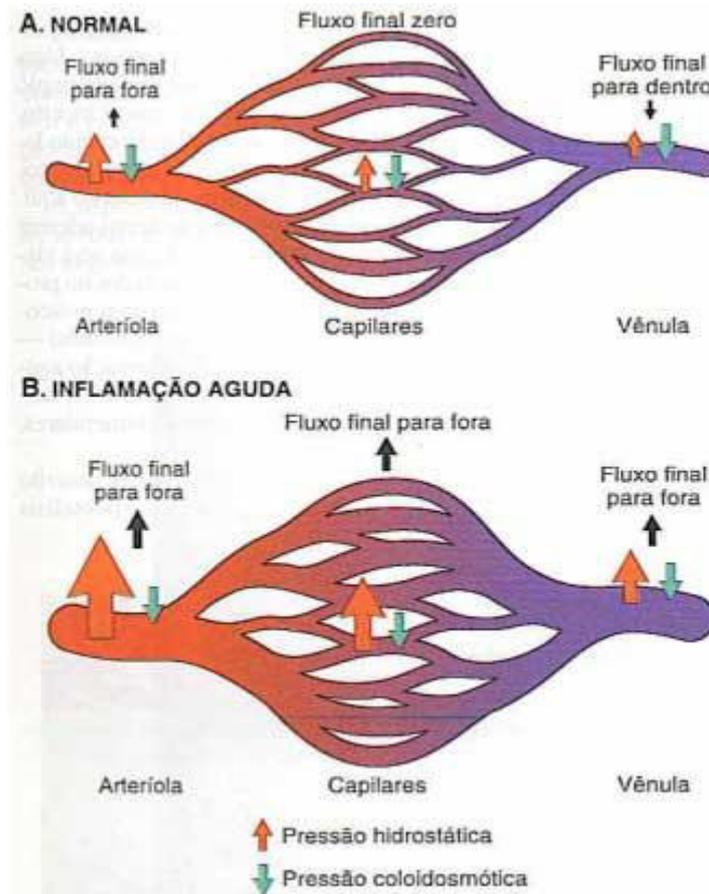


Figura 10 – Vasodilatação durante a inflamação aguda – Kumar, *et al.*, 2005.

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 liberação de substâncias vasoativas (Vane; Anggard; Botting, 1990; Lusher e Barton, 1997; Vapaatalo e Mervaala, 2001; Behrendt e Ganz, 2002). 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 (Figura 11). 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 (Vane; Anggard; Botting, 1990; Lusher e Barton, 1997; Vapaatalo e 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 (Vane; Anggard; Botting, 1990; Lusher e Barton, 1997; Vapaatalo e Mervaala, 2001).

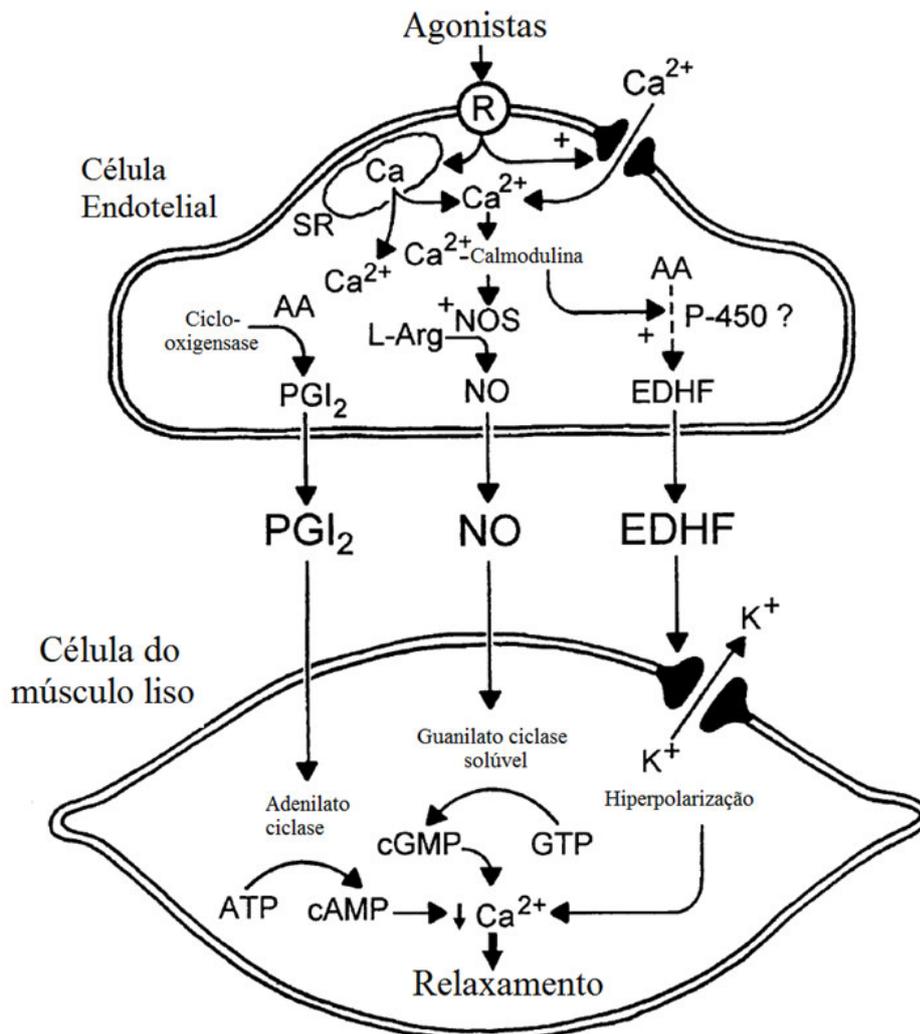


Figura 11 - Liberação dos fatores derivados do endotélio. Ativação do receptor endotelial (R) induz o fluxo de Ca^{+2} para o citoplasma da célula endotelial. Quando agonistas ativam as células do endotélio, um aumento do inositol fosfato (IP_3) pode contribuir para o aumento do Ca^{+2} citoplasmático pela sua liberação do retículo sarcoplasmático (SR). Seguido de interações com a calmodulina, o Ca^{+2} ativa a óxido nítrico sintase (NOS) e provoca liberação de fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF). O aumento do Ca^{+2} também acelera a produção de prostaciclina (PGI_2) a partir do ácido aracídico (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. Adaptado de Vanhoutte (2003).

1.3.3 Efeito do Óxido Nítrico nos vasos sanguíneos

O endotélio produz o óxido nítrico a partir da ação da enzima NO-sintetase (NOS) sobre o substrato L-arginina, com formação de NO e L-citrulina. O NO difunde-se para o interior das células musculares lisas, onde interage com o átomo de ferro do grupo heme da molécula de guanilato ciclase, levando à ativação dessa enzima; essa enzima ativada, por sua vez, atua sobre o trifosfato de guanosina (GTP), transformando-o no composto ativado monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento da concentração de GMPc nas células musculares leva à diminuição do cálcio intracelular e ao conseqüente relaxamento do vaso. Sob condições basais, NO é continuamente liberado pelas células endoteliais saudáveis (Lusher e Barton, 1997; Behrendt e Ganz, 2002; Anderson, 2003).

O NO também se difunde para as células circulantes e tem atuação principalmente nas plaquetas e glóbulos brancos, diminuindo a adesão e agregação dessas células. Diversas substâncias (como a bradicinina, a acetilcolina, a substância P) estimulam as células endoteliais a aumentar a produção de NO. Entretanto, é o próprio fluxo sanguíneo, um estímulo fisiológico, um dos estímulos mais importantes para uma maior produção de NO pelo endotélio. O movimento do sangue mantém uma força que tangencia a superfície das células endoteliais (chamado de “shear stress” ou força de cisalhamento), estimulando o endotélio a produzir NO e também prostaciclina, promovendo o relaxamento da musculatura do vaso. Acredita-se que a atividade física regular possa atuar de forma benéfica sobre os vasos também por meio do endotélio, aumentando o fluxo sanguíneo e estimulando a produção de vasodilatadores pelas células endoteliais (Anderson, 2003).

Outras substâncias vasodilatadoras que são produzidas no endotélio promovem dilatação dos vasos, atuando por meio de diferentes vias de sinalização. Por exemplo, a prostaciclina age por meio da estimulação da adenilciclase e pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc. O Fator Hiperpolarizante do Endotélio atua aumentando a condutância dos canais de potássio; a identidade e ações fisiológicas desse fator ainda são incertas (Lusher e Barton, 1997; Vapaatalo e Mervaala, 2001; Behrendt e Ganz, 2002; Anderson, 2003).

1.3.4 Efeitos vasculares de Lectinas

Na superfície das células existem glicoproteínas, inclusive nas células endoteliais (Sharon e Lis, 2001). Essas glicoproteínas podem funcionar como receptores das lectinas, esse fato se torna relevante na ação demonstrada de lectinas no relaxamento de músculo liso da parede de aortas endotelizadas. *In vitro*, as lectinas de *C.brasiliensis* e *C.glabrata* induziram o relaxamento dose-dependente de aortas contraídas. Este relaxamento mostrou ser estritamente dependente de endotélios intactos e ressaltam a importância do sítio de reconhecimento a carboidratos de lectinas. Uma variedade de respostas endotélio-dependentes de lectinas foram inibidas por seus açúcares específicos (Kleha *et al.*, 1991; Lima *et al.*, 2004; Gadelha *et al.*, 2005).

Outras lectinas também mostraram o efeito relaxante de aortas intactas, como as algas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *B. seafortii* (Lima *et al.*, 2004) e outra lectina de leguminosa *Canavalia maritima* (Gadelha *et al.*, 2005). O relaxamento ocorre via aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase, responsável pela síntese de óxido nítrico. Também foi demonstrado que as lectinas do germe do trigo (WGA) e a Concanavalina A (ConA) produzem relaxamento dependente de endotélio em aorta de coelhos (Kleha; Devesly; Johns, 1991). O mesmo ocorre com lectina *C. marítima* (ConM) (Gadelha *et al.*, 2005). O tratamento de coelhos com ricina (lectina extraída da planta *Ricinus communis*, conhecida vulgarmente como mamona) potencializa as contrações induzidas por serotonina e histamina em artérias coronárias (Zhang; Hsu; Robinson, 1994).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo, cristalizar, resolver a estrutura primária e tridimensional e avaliar os efeitos vasculares de uma lectina presente em sementes de *Canavalia grandiflora*.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a massa da lectina por espectrometria de massa;
- Determinar a seqüência protéica por espectrometria de massa;
- Analisar e comparar seqüência da lectina dentro da subtribo ao qual faz parte (Diocleinae)
- Cristalizar a lectina pelo método de difusão de vapor;
- Obter dados de difração de raios X;
- Determinar a estrutura tridimensional da lectina por cristalografia de raios X;
- Avaliar o potencial edematogênico da lectina no modelo de edema de pata em ratos.
- Avaliar o efeito relaxante em músculo liso de aorta de ratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da lectina de *Canavalia grandiflora* Benth

A lectina de *Canavalia grandiflora* foi obtida como descrita por Ceccato (2001). As sementes foram descascadas e muídas até se obter uma farinha fina. As proteínas foram extraídas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 com NaCl 0,15 M por 3h, em seguida o extrato foi centrifugado a 9000 rpm, o sobrenadante foi coletado e os resíduos descartados. O sobrenadante foi utilizado para se realizar a cromatografia de afinidade em Sephadex G-50, a coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão da amostra, o mesmo foi utilizado para eluir o pico não retido. Para eluição do pico retido foi adicionado ao tampão glicose para uma concentração final de 0,1M do açúcar. O pico retido foi dialisado, liofilizado e a pureza avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Ceccato, 2001).

3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Para a avaliação da pureza da lectina *Canavalia grandiflora* foi realizada uma eletroforese segundo metodologia descrita por Laemmli (1970), em sistema descontínuo de eletroforese em gel de poliacrilamida, adaptando-se o gel para o sistema de placas (de fora com 8,3 X 10,2 e de dentro com 7,3 X 10,2).

A amostra da lectina foi solubilizada em tampão Tris-HCl 0,0625M pH8,3 contendo SDS 1%, uma quantidade adequada de glicerol para aumentar a densidade da solução e azul de bromofenol 0,02%, usado para monitorar a corrida (frente de corrida).

O Gel de empilhamento utilizado continha 4% de poliacrilamida, montado com Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo SDS 1%. O gel de separação continha 12,5% de poliacrilamida dissolvido em Tris-HCl 1 M pH 8,8 contendo 1% de SDS.

A corrida eletroforética foi realizada com voltagem variando até 150 V, com potência até 5 W, e amperagem constante de 25 mA. O tampão de corrida utilizado continha Tris-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M, SDS 0,1%, pH 8,8.

O gel foi então corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção de 1:3,5:8 (v/v/v). O descoramento foi realizado utilizando água destilada aquecida com trocas suficientes para nitidez na visualização das bandas protéicas.

3.3 Determinação da especificidade da lectina de *Canavalia grandiflora* Benth por eritrócitos de coelhos nativos e tratados enzimaticamente

O sangue de coelho foi coletado de animais sadios da raça Nova Zelândia, os eritrócitos foram precipitados por centrifugação a 2000 g diversas vezes para retirada do soro e

lavados com solução salina para remoção do anticoagulante (heparina) utilizado na coleta. Partes dos eritrócitos lavados foram tratadas com enzimas tripsina e papaína em solução salina contendo 1% de enzima (p/v) por 1h, em seguida lavagens sucessivas foram realizadas para remoção das enzimas.

A lectina foi solubilizada no tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 e em seguida diluída 24 vezes na placa de microtitulação de 96 poços fundo de V contendo em cada poço 50 μ L do mesmo tampão usado para solubilizá-la. Em cada poço (até a 23ª diluição) foi adicionado 50 μ L de uma suspensão de eritrócitos (a 3%). O ensaio foi incubado a 37°C por trinta minutos e, após a esse mesmo período, à temperatura ambiente, a hemaglutinação foi avaliada macroscopicamente. O experimento foi realizado em duplicata e repetido para cada tipo de eritrócito: nativos, tripsinizados e papainizados

O título da hemaglutinação (Unidades de Hemaglutinação-UH) foi definido como sendo o inverso da maior diluição capaz de apresentar hemaglutinação visível macroscopicamente.

3.4 Dosagem de proteínas solúveis

A quantidade de proteínas solúveis utilizada nos ensaios de hemaglutinação foi determinada pelo método de Bradford (1976).

A cada 100 μ L de amostra, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados. A mistura foi colocada no aparelho vortex e deixada em repouso por cerca de dez minutos, em seguida teve sua absorbância determinada a 595 nm em um espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec II, Pharmacia). A concentração de proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada à partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina.

3.5 Ensaio de termoestabilidade

Para determinar a estabilidade da lectina de *C. grandiflora* em diferentes temperaturas, ela foi diluída em Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 em uma concentração de 2 mg/ml e aliqüotados 200 μ L em cada um dos oito microtubos de 0,5 mL. Cada tubo foi aquecido em diferentes temperaturas a partir de 30°C até 100°C em intervalos de 10°C. Em seguida foi realizado o ensaio de hemaglutinação em placa de microtitulação de 96 poços fundo em V utilizando eritrócitos de coelhos tripsinizados a 3% em solução salina (NaCl 0,15 M). O experimento foi realizado em duplicata para cada temperatura. Foi adicionado em cada poço 50 μ L de solução salina 0,15 M, em seguida, no primeiro poço foi adicionado a solução de lectina para uma dada temperatura e feita a diluição seriada até o final da fila no oitavo poço. Após a diluição foi adicionado 50 μ L de sangue. A placa foi levada a estufa a 37°C por meia

hora, retirada e após meia hora a temperatura ambiente foi detectada e avaliada a hemaglutinação macroscopicamente.

3.6 Ensaio de pH estabilidade

O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços fundo em V utilizando eritrócitos de coelhos tripsinizados a 3% em solução salina (NaCl 0,15 M). O experimento foi realizado em duplicata para todos os pH. Foi adicionado em duas colunas com oito poços da placa 50 μ L de uma solução tampão pH 4,0 0,1 M com NaCl 0,15 M, o mesmo foi feito para outras colunas em seguida com mudança em um ponto para mais no pH chegando ao máximo no pH 10; no primeiro poço de cada coluna foi adicionado a solução de lectina e feita a diluição seriada até o final no oitavo poço. Após a diluição foi adicionado 50 μ L de sangue. A placa foi levada a estufa a 37°C por meia hora, retirada e após meia hora a temperatura ambiente foi detectada e avaliada a hemaglutinação macroscopicamente.

Os tampões utilizados foram: acetato pH 4,0; acetato pH 5,0; citrato pH 6,0; fosfato pH 7,0, Tris-HCl 8,0, glicina pH 9,0 e glicina pH 10. Todos 0,1 M com NaCl 0,15 M.

3.10 Massa Molecular da lectina de *C. grandiflora* por espectrometria de massa (massa intacta)

A massa molecular nativa da lectina de *C. grandiflora* foi determinada por ionização eletrospray utilizando um híbrido quadrupolo/ Mobilidade iônica com aceleração ortogonal - Tempo de Voo (Synapt HDMS system-Waters Corp., Milford, USA).

A voltagem do capilar e do cone foram ajustados em 3 kV e 40 V respectivamente. A proteína, numa concentração de 10 pmol/ μ L foi infundida no sistema com um fluxo de 10 μ L/min. A temperatura da fonte foi mantida a 100°C e o nitrogênio usada como ar seco (fluxo cerca de 150 L/h). A aquisição dos dados foi realizada pelo software Mass Lynx 4.0 e os espectros de múltiplas cargas foram deconvoluídos usando técnicas de máxima entropia (Ferrige *et al.*, 1992).

3.7 Seqüenciamento da lectina de *C. grandiflora* por espectrometria de massa

Após corrida eletroforética em SDS-PAGE, as bandas foram excisadas do gel de poliacrilamida em fragmentos de 1 mm, em seguida descoradas em solução de 50 mM de bicarbonato de amônio em 50% de acetonitrila. As bandas descoradas foram desidratadas em acetonitrila 100% e secas em fluxo de gás nitrogênio. O gel foi reidratado com uma solução 50 mM de bicarbonato de amônio contendo tripsina (Promega) ou quimiotripsina (Sigma) na proporção de 1:25 (enzima:proteína) e submetida a digestão a 37 °C por 4h. Os peptídeos foram

então extraídos por agitação dos fragmentos de gel em solução de acetonitrila 50% com ácido fórmico 5% e posteriormente concentrados em speedvac (Labconco). Os peptídeos produzidos foram isolados através de uma nanocoluna de fase reversa C18 (Waters nano ACQUITY UPLC BEH130 100 mm x 75 µm, 1,7 µm tamanho de partícula) equilibrada com ácido fórmico 0,1%. A separação foi realizada com fluxo de 0,2 µL/min em gradiente linear de 0-80% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% em 60 minutos. A cromatografia foi conectada a uma fonte nano eletrospray de um espectrômetro de massas híbrido quadrupolo/ Mobilidade iônica com aceleração ortogonal -Tempo de Voo (Synapt HDMS system-Waters Corp., Milford, USA). O espectrômetro de massas operou em modo positivo, utilizando a temperatura da fonte de 80°C e a energia do capilar ajustado em 3,5 kV. A calibração do espectrômetro foi realizada com os íons resultantes da fragmentação do peptídeo [Glu1] Fibrinopeptídeo ($M^+H^+ = 1570,6774$) operando com uma resolução de 10.000 e uma precisão de 10 ppm em modo V. Para realização do experimento de LC-MS/MS foi utilizada a função DDA (análise direta de dados) selecionando os íons precursores duplamente ou triplamente protonados, que foram fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) utilizando uma rampa de energia de colisão que variou de acordo com o estado de carga e a relação massa/carga do íon precursor. Foram coletados espectros de MS/MS de m/z 50 até m/z 3000. Os cromatogramas e espectros de massa foram coletados pelo programa Masslynx® (Waters).

3.8 Processamento dos espectros

Os espectros de MS obtidos durante a cromatografia dos peptídeos e os espectros de MS/MS gerados a partir da fragmentação dos íons precursores selecionados foram processados e analisados utilizando o programa Proteinlynx® (Waters) a partir da busca pela massa dos íons precursores (PMF – “Peptide Mass Fingerprint”) e pelo padrão de fragmentação dos mesmos (Ion Search).

3.9 Análise da seqüência de *C. grandiflora*

Foram utilizados programas de alinhamento para análise de similaridade e homologia entre a seqüência da lectina e todo o banco não redundante de proteínas depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI). Para alinhamentos locais e múltiplos os programas BLAST (Altschul *et al*, 1990) e ClustalW (Thompson *et al*, 1994) foram utilizados, respectivamente. O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando as seqüências com maior identidade identificados no BLAST.

3.11 Avaliação da atividade edematogênica da lectina de *C. Grandiflora*

Para a avaliação da atividade edematogênica, a lectina de *C. grandiflora* foi administrada s.c., na pata traseira direita de ratos, como estímulo nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg contidos em 0,1 mL/100 g de peso corporeo. O controle negativo recebeu salina (0,01

mL/Kg; s.c.) na pata contralateral. O edema foi medido pletismograficamente pelo volume de líquido deslocado pelas patas antes (tempo zero) e 0.5 – 32 h após a injeção da lectina s.c. e calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado antes e após o estímulo e expresso em mL. As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando o método do trapézio (Landucci *et al.*, 1995) e expressas em unidades arbitrárias. Resultados expressos como Média \pm E.P.M. (n=6).

3.12 Teste de contratilidade em aortas isoladas

Após o sacrifício dos animais por concussão cerebral, a aorta torácica foi removida e colocada em solução fisiológica de Tyrode (NaCl 136 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ mM, MgCl 0.98 mM, NaH₂PO₄ 0.36 mM, NaHCO₃ 11,9 mM e glicose 5.0 mM, pH 7.4). O tecido muscular foi seccionado em quatro anéis de aproximadamente 3mm de comprimento que foram montados em câmara para órgãos isolados com capacidade para 10 mL contendo Tyrode, a 37°C, pH 7,4, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Uma das extremidades da preparação foi presa a uma base fixa e a outra a um transdutor de força, que transforma força muscular mecânica em sinal elétrico, através de um amplificador ligado ao sistema computadorizado (Powerlab, AD Instruments). O software Chart® (versão 4.1) foi utilizado para análise de dados.

Foi adicionado ao tecido [0,1 μ M] de fenilefrina, um agonista α -adrenérgico. Após a obtenção de um platô estável da contração de fenilefrina, a lectina de *Canavalia grandiflora* foi adicionada ao tecido, em concentrações crescentes e cumulativas [10-100 μ g/mL]. Foram utilizadas aortas endotelizadas e sem endotélio.

Em todos os protocolos experimentais, o tecido foi estabilizado durante um intervalo de 40 min a 60 min, sob tensão de 2 g (Mateo; Artiñano, 2001). Os tecidos foram contraídos por KCL [60 mM], antes e ao término dos protocolos experimentais, para testar a condição contrátil da preparação.

3.13 Avaliação da participação do fator relaxante derivados do endotélio NO no efeito da lectina

Os tecidos foram incubados por 30 min com L-NAME [100 μ M], inibidor da enzima NOS. Em seguida o tecido recebeu fenilefrina [0,1 μ M] e após a obtenção de um platô estável a lectina [10-100 μ g/mL] foi adicionada sobre o tecido contraído

3.14 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 ou testes T pareados e não pareados, quando apropriados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3.15 Cristalização

A proteína liofilizada, previamente purificada, foi suspensa em água Milli-Q na concentração final de 10 mg/mL. A suspensão da proteína foi então centrifugada à 10.000rpm por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para os passos futuros. Para experimentos com o ligante, a proteína em solução foi encubada com Xman 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 inicialmente descrito por Jancarik e Kim (1991). Os kits utilizados foram o “crystal screen 1 e 2” (Hampton) onde as variáveis iniciais foram pH, sal e precipitantes. O método utilizado foi o de difusão de vapor e gota suspensa utilizando placas de cristalização de 24 poços. 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. Após a obtenção de cristais foi feita a otimização dessa condição 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.

3.16 Coleta de Dados, Seleção dos Modelos e Substituição Molecular

Os dados de difração de raios X foram coletados a temperatura de 100K. Para evitar formação de gelo os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora composta de 85% da solução de cristalização e 15% de glicerol. O cristal laçado com o loop foi alinhado utilizando-se o goniômetro e então submetido à coleta de dados. A estação experimental MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (Campinas-SP) foi utilizada para a coleta. A linha pode realizar coletas em diferentes comprimentos de onda (0,8 – 2,5 Å), contudo o comprimento de onda usado foi de 1,4 Å. O detector utilizado foi MarMosaic 225 (CCD com área de 225x225 mm²) e foram coletadas 360 imagens com oscilação de 0,5 graus totalizando 180°. Os dados foram processados, indexados e integrados utilizando-se o programa MOSFLM (Leslie, 1992) e as intensidades reduzidas utilizando o programa SCALA (Evans, 1997). Todos os programas utilizados fazem parte do pacote CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). 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.

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 MOLREP (Varghese e Taplyakov, 1997). Os modelos são passados por movimentos de rotação e translação para posicionar junto da molécula real na rede cristalina. Rotação e translação são operações

usadas em cristalografia, a rotação gira a molécula para a orientação correta e a translação move para a posição correta.

3.17 Refinamento e Validação da Estrutura

O modelo inicial foi submetido a ciclos de refinamento de corpo rígido e posicional através do programa REFMAC 5 (CCP4) e monitorados usando os valores do Rfator e Rfree (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, ou amplitude, e fase, que definem as propriedades das ondas espalhadas. O Rfator é uma medida de quão bem um modelo atômico descreve um conjunto de medições de difração de raios X observadas, usando 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 Rfator; Fatores da estrutura observados e Fatores da estrutura calculados.

Uma limitação do Rfator 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 Rfree-Rfator é usada por este motivo. O Rfree de equação usa exatamente o mesmo que o Rfator, 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 fornece uma indicação independente da qualidade do mesmo.

Após passos iniciais de refinamento moléculas de água foram adicionadas pelo REFMAC 5 em um passo de refinamento. As densidades eletrônicas foram visualizadas no programa COOT (Emsley e Cowtan, 2004), onde foram feitos ajustes manuais no modelo, posicionadas corretamente as moléculas de Xman, e verificadas as moléculas de água. Todos os passos manuais foram seguidos de ciclos de refinamentos posicionais e foram monitorados os valores do Rfator e Rfree.

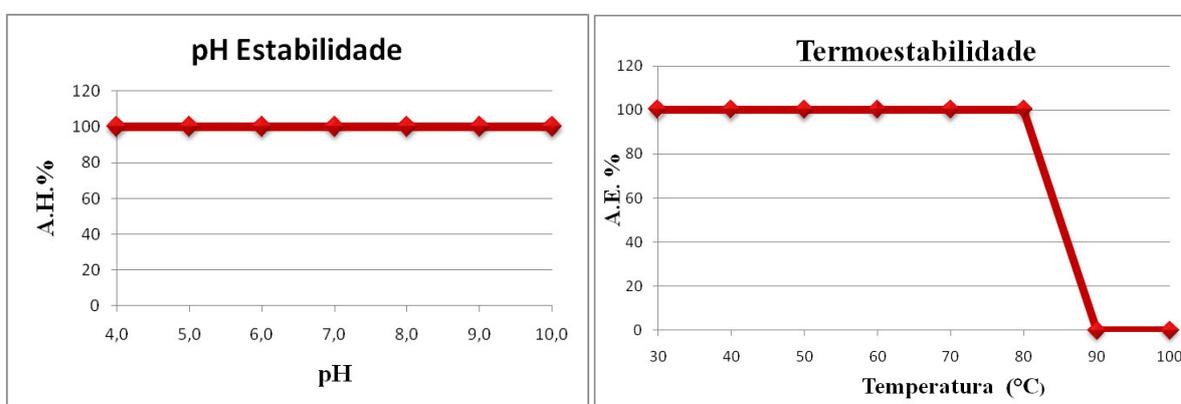
As análises estéreoquímicas, dos ângulos de ligação, distâncias interatômicas e interações foram checadas manualmente com ajuda do gráfico de Ramachandran e a análise final realizada através do programa Prochek (Laskowski *et al.*, 1993). As figuras foram feitas utilizando o programa PyMol (Delano, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E ESPECIFICIDADE POR ERITRÓCITOS DE COELHO

4.1.1 Estabilidade da Lectina de *C. grandiflora*

A lectina de *C. grandiflora* se mostrou estável em toda faixa de pH (de 4,0 a 10,0) ao qual submetida na atividade hemaglutinante. Quanto a sua termoestabilidade apresentou-se estável quando submetida a temperaturas de 30 a 80°C, para temperaturas acima desse valor pode ter ocorrido perda da estrutura tridimensional e “miss-folding” ao voltar, a solução contendo lectina, para a temperatura ambiente. Os resultados da estabilidade foram exibidos em forma de gráficos abaixo:



Gráficos da estabilidade da lectina de *C. grandiflora* em diferentes pH e temperaturas.

4.1.2 Ensaio hemaglutinante com eritrócitos de coelhos nativos e tratados

O trabalho publicado por Ceccato (2001) mostrou que a lectina de *C. grandiflora* aglutinava eritrócitos de coelhos, porém não determinou que tratamento para as hemácias fosse mais eficiente. Tratamentos com papaína e tripsina apresentaram uma atividade até a 23ª diluição e com sangue nativo até a 12ª, todos com a mesma quantidade de lectina aplicada (0,295 mg/mL). O resultado deste ensaio (Atividade Hemaglutinante Específica (A.H.E.) – $(2^{\text{a}} \text{ diluição}) / [\text{lectina solúvel}]$) está representado no gráfico abaixo:

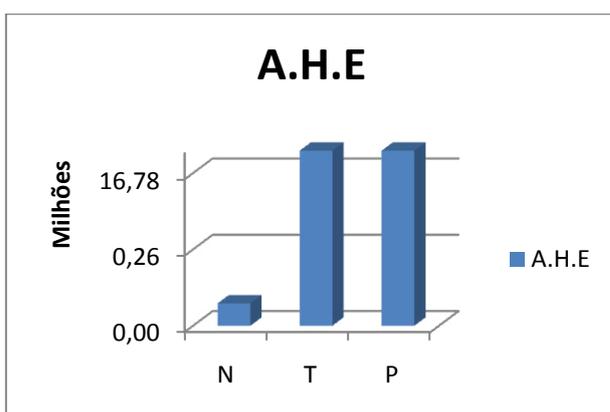


Gráfico da A.H.E..

4.1.3 Integridade estrutural da lectina de *C. grandiflora*

Para avaliar a integridade das amostras utilizadas nos experimentos realizados nesse trabalho fez-se necessário a realização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Figura 12)

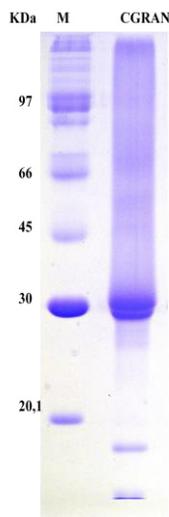


Figura 12 – Perfil eletroforético da lectina. No primeiro poço se encontra o marcadores: Fosforilase b (97000Da), Albumina (66000Da) Ovoalbumina (45000Da) Anidrase carbônica (30000Da) e Inibidor de tripsina (20100Da); No segundo poço se encontra a lectina pura de *C. grandiflora* (CONGR).

A eletroforese mostrou que o perfil da amostra correspondente as lectinas de Diocleinae, com a presença da cadeia α , e fragmentos β e γ , o perfil é o mesmo determinado por Ceccato, 2001.

4.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

4.2.1 Determinação da massa molecular por espectrometria de massas.

A massa molecular aparente da *C. grandiflora* já havia sido determinada por método eletroforético.

O método de espectrometria de massas determina com grande precisão a massa molecular de moléculas. A lectina de *C. grandiflora* teve sua massa determinada por este método. Pode se observar o espectro obtido (Figura 14) pelo software Mass Lynx 4.0, ao ser deconvoluído mostrou que os íons foram identificados principalmente como duas massas de respectivamente 12943Da e 25590Da. A primeira corresponderia as massas de um dos fragmentos β ou γ e a segunda corresponde a cadeia α madura. Para identificar diferenças de massa entre as cadeias β e γ pode-se analisar os espectros de múltiplas cargas e realizar os cálculos manualmente para determinar as massas dos peptídeos (Figura 13)

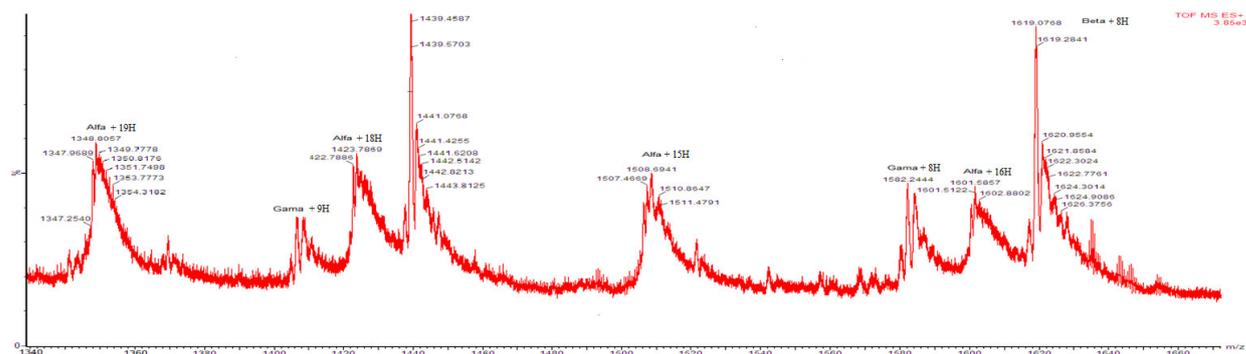


Figura 13 – Espectro de massa multicarregado da lectina intacta de *C. grandiflora*.

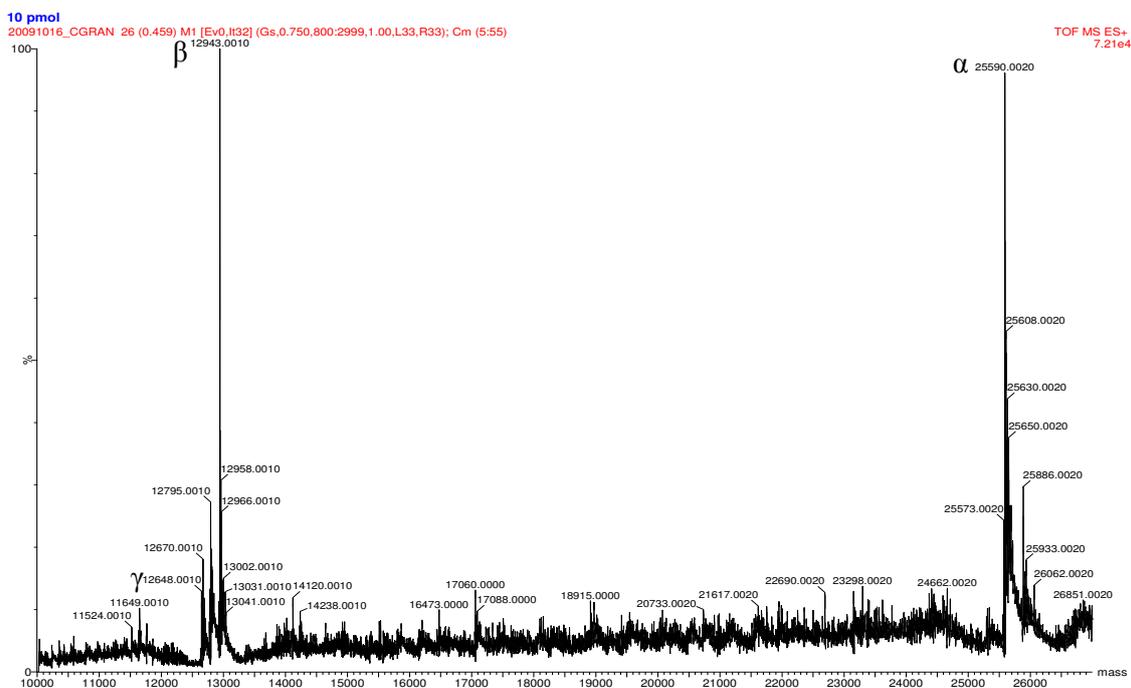


Figura 14 – Espectro das massas deconvoluídas das cadeias de *C. grandiflora*.

A análise automatizada do íon por vezes não possibilita seu seqüenciamento por completo, deixando algumas regiões sem anotações, um exemplo está na figura 16, com regiões ampliadas abaixo, Figura 17A e 17B.

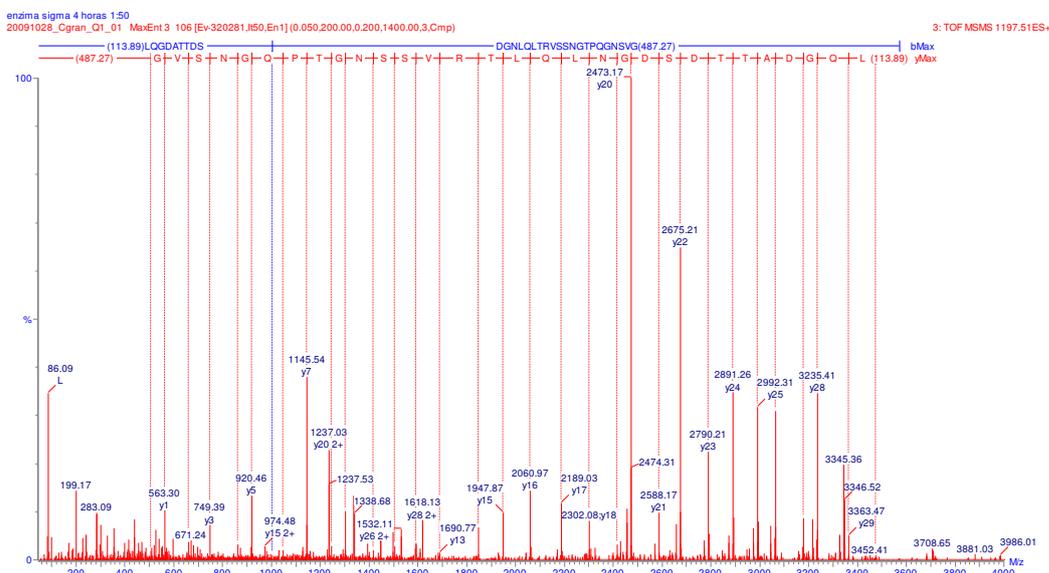


Figura 16– Imagem do seqüenciamento de um íon.

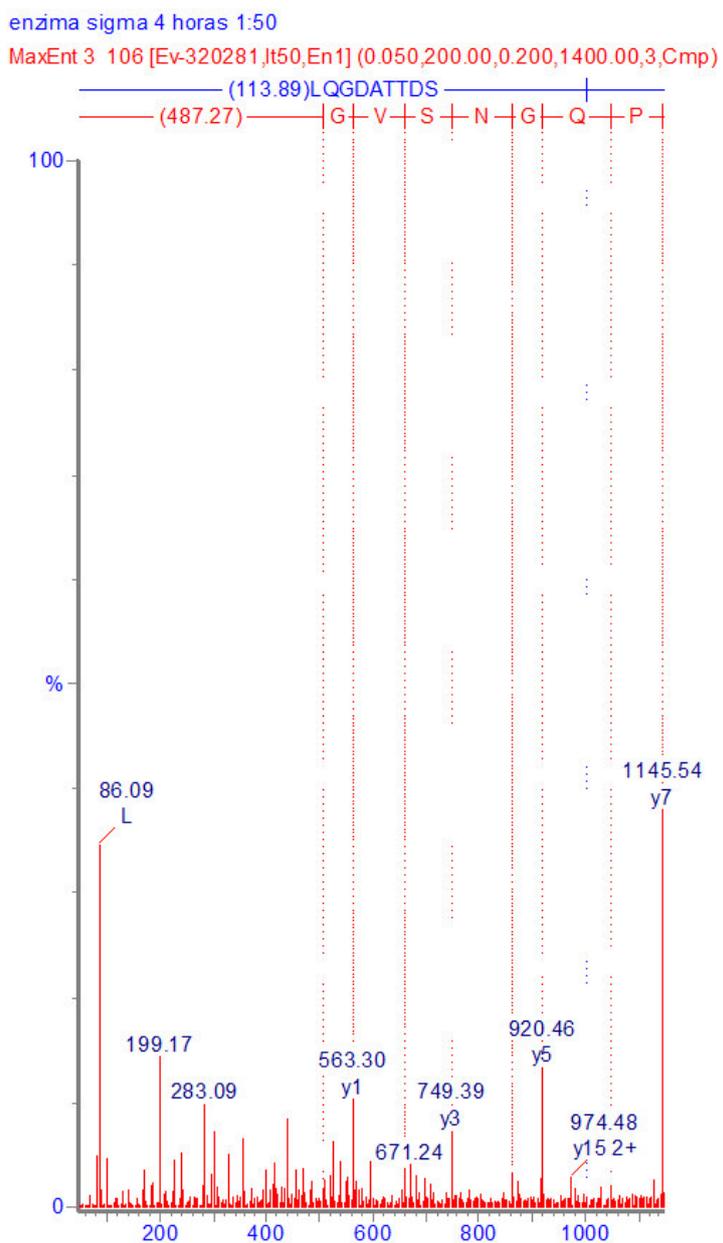


Figura 17A – Peptídeo com uma massa de 487,27 Da não identificada automaticamente.

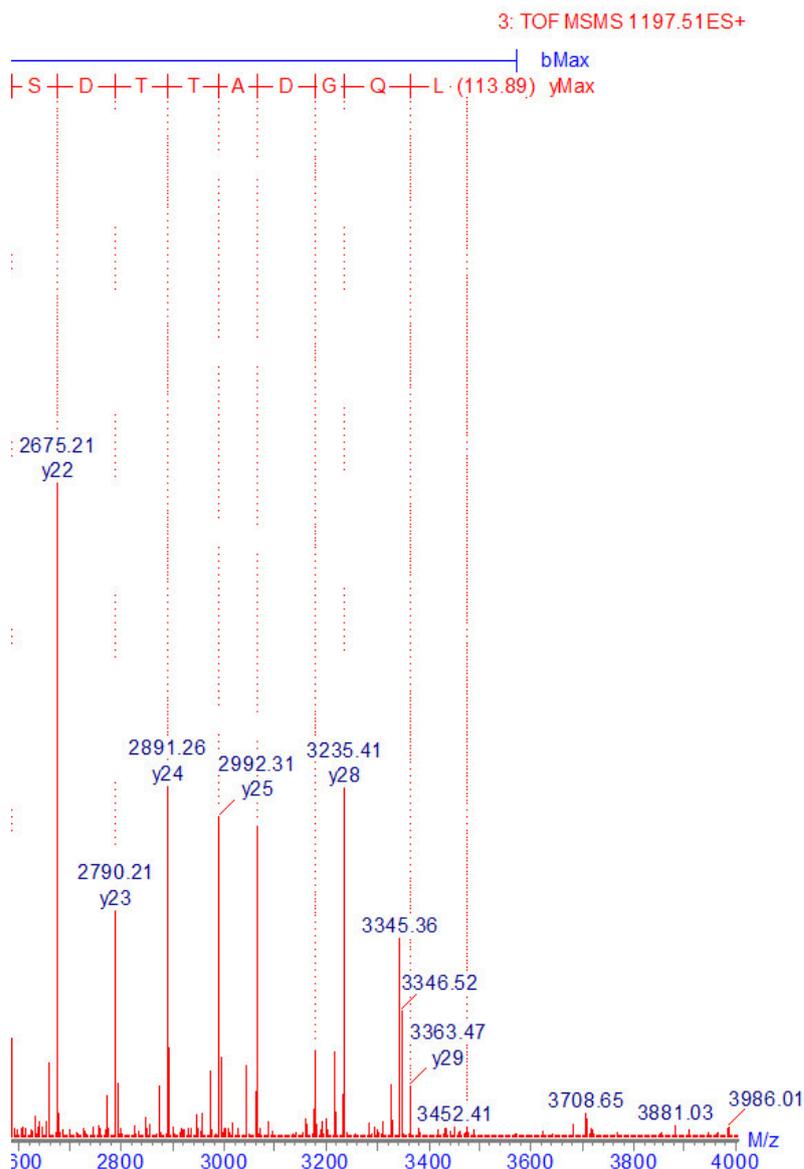


Figura 17B – o mesmo peptídeo possui uma massa de 113,89Da não identificada automaticamente.

Na figura 17A pode-se observar que a seqüência anotada para os íons y, porém pode se verificar uma região correspondente a um peptídeo de 487,27Da não anotada, para realizar a anotação desta região foi necessário fazer um alinhamento do fragmento parcialmente anotado com uma lectina de *Canavalia* e verificar os possíveis resíduos que corresponderiam a essa região. Para a mesma, esta massa poderia corresponder aos resíduos R, A, L e F que possuem respectivamente as massas 156,1, 71, 113,08 e 147 Da para seus imônios (íons gerados da fragmentação simultânea nas posições amino e carboxi-terminal) correspondente, a soma dessas massas correspondem a uma seqüência de 487,27, além disso, a seqüência desse íon faz parte de uma região altamente conservada das lectinas de Diocleinae, corroborando para a anotação feita manualmente. Ainda neste íon, ele possui em sua outra extremidade também uma massa não anotada (Figura 17B) com uma massa de 113,89Da, a mesma massa dos imônios de leucina e isoleucina que são isobáricos e mesmo que anotado pelo equipamento ele não teria a precisão de diferenciar resíduos isobáricos, a dúvida foi retirada ao analisar o alinhamento, para identificar

que ele seria um resíduo de isoleucina (seqüência do peptídeo citado e nas extremidades, em vermelho, os aminoácidos identificados manualmente: **ILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALF**).

Pode-se observar que o método espectrométrico não possibilitou o seqüenciamento completo, deixando duas regiões de dez e cinco resíduos de aminoácidos respectivamente, para preencher as lacunas se fez necessário o uso da seqüência parcial da mesma lectina, obtida por métodos de seqüenciamento de Sanger (fragmento com dez resíduos) e tradução da seqüência de cDNA de clones transformados com o gene da lectina realizados por Ceccato, 2001. Acredita-se que a seqüência não foi totalmente obtida por espectrometria devido a presença de múltiplos sítios de clivagem da enzima tripsina usada no método do seqüenciamento nas regiões citadas, ainda sim é possível posteriormente identificar essas regiões pelo mesmo método, porém utilizando outras enzimas para digestão da lectina para gerar fragmentos de peptídeos diferentes.

4.2.3 Análise da seqüência de completa *C. grandiflora*

>CONGR

ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSIKTAEWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKRL
SAVVSYPNADSATVSYDVDLDNVLPWVVRVGLSATTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNS
HETNALHFTFNQFTKDQKDLILQGDATTDSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSVGRALFYAPV
HIWESSAVVASFDATFTFLIKSPDHPADGITFFLSNMDSTLPSGSGGRLGLFPDAN

Os dados de seqüência primária da ConGr serão submetidos ao banco de dados “UniProt Knowledge Base” e o seu número de acesso, quando disponível, será disponibilizado *online* para consultas no NCBI.

De posse da seqüência, utilizando ferramentas do ExPasy, podem-se realizar algumas análises da proteína:

1. Número de aminoácidos: **237**; 2. Massa Molecular Calculada: **25653.4Da**; 3. pI Teórico: **4.96** e 4. Composição de aminoácidos (absoluto e %):

Ala (A)	17	7.2%
Arg (R)	6	2.5%
Asn (N)	16	6.8%
Asp (D)	19	8.0%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	6	2.5%
Glu (E)	6	2.5%
Gly (G)	17	7.2%
His (H)	6	2.5%
Ile (I)	14	5.9%
Leu (L)	20	8.4%
Met (M)	2	0.8%
Phe (F)	11	4.6%

Ser (S)	26	11.0%
Thr (T)	23	9.7%
Trp (W)	4	1.7%
Tyr (Y)	7	3.0%
Val (V)	16	6.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

4.2.3.2 Alinhamento de múltiplas seqüências

O alinhamento é feito em pares das seqüências fornecidas e a identidade entre elas gera um escore (em %), estes escores também são convertidos em distâncias na construção de árvores filogenéticas. As seqüências foram escolhidas após busca de similaridade em banco de dados não redundante do NCBI (“National Center of Biotechnology Information”) através do BLAST. A lectina de *C. grandiflora* mostrou alto grau de similaridade entre lectinas de Diocleinae (*Canavalia gladiata*, *C. virosa*, *C. lineata*, *C. marítima*, *C. ensiformes*, *C. brasiliensis*, *C. boliviana*, *Dioclea rostrata*, *D. grandiflora*, *D. guianensis*, *D. violacea*, *Cratylia mollis*, e *Cratylia floribunda*).

Tabela 3 - Identidade entre as seqüências fornecidas

CONGR SEQÜÊNCIA	X	Escore (%)
CGL		92
<i>C. virosa</i>		92
<i>C. lineata</i>		91
ConM		91
ConA		91
ConBr		91
Cbol		91
<i>D. rostrata</i>		84
<i>D. grandiflora</i>		83
<i>D. guianensis</i>		83
<i>D.violacea</i>		82
<i>C. mollis</i>		81
CFL		81

A seqüência de *C. grandiflora* obtida por espectrometria de massa possui alta similaridade com lectinas do gênero *Canavalia*, porém, diferentemente das lectinas deste gênero, ao longo de sua seqüência, ela apresenta diversas mutações correspondentes a aminoácidos comumente encontrados nas lectinas do gênero *Dioclea* (aminoácidos marcados em preto no alinhamento) o que pode nos indicar uma evolução comum da lectina *C. grandiflora* e lectinas do gênero *Dioclea*, para isto, em nível de seqüência protéica, um ancestral comum divergiu originando a *C. grandiflora* e as lectinas do gênero *Dioclea*.

È importante citar também a alta similaridade com lectinas do gênero *Cratylia*, elas apresentam uma maior similaridade com as lectinas do gênero *Dioclea* do que com as lectinas de *Canavalia*, e no seqüenciamento pode-se observar uma mutação presente na *C. grandiflora* (também marcada em preto) comum a esse gênero e somente em uma lectina de *Dioclea*.

Os resultados obtidos no seqüenciamento podem ser evidenciados na árvore filogenética abaixo, onde ficam evidenciadas as relações evolutivas entres as lectinas do gênero de *Diocleinae* (Figura 19).

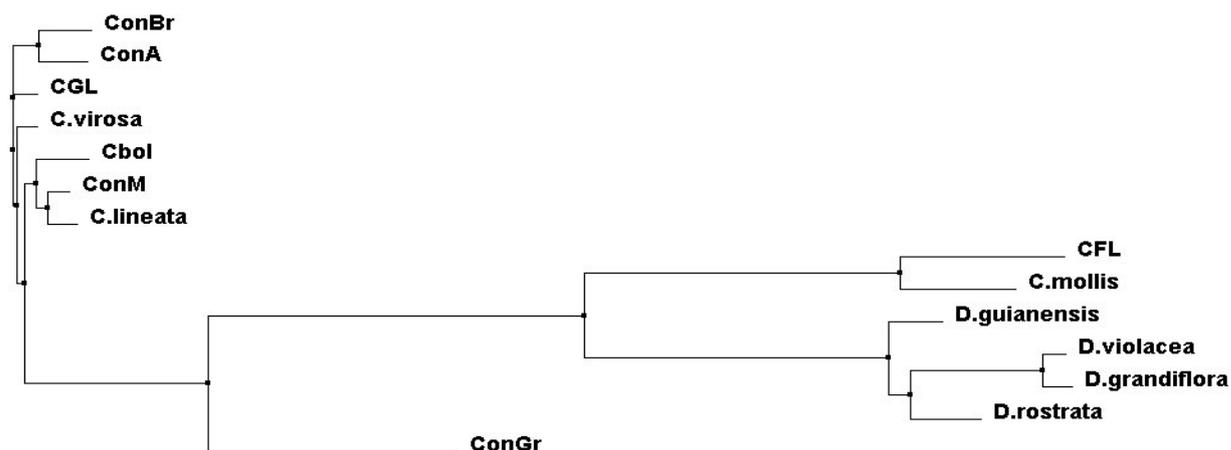


Figura 19 – árvore filogenética com seqüências de lectinas de Diocleinae.

A posição basal de *C. grandiflora* no subclado de Canavalias suporta e está de acordo com a suposição de que esta espécie representa o subgêneros mais primitivo das Canavalias (Sauer, 1964; Varela *et al.*, 2004).

4.3 ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

4.3.1 Cristalização

A proteína purificada foi previamente incubada por uma hora com 3 mM de Xman, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose, utilizado a partir de uma solução estoque de 12 mM em DMSO. O Xman contém manose em sua estrutura e foi utilizado para auxiliar na cristalização, para auxiliar na geração de dados suficientes para determinação da estrutura. A manose pode

auxiliar a cristalização por estabilizar o sitio de ligação e o restante da molécula parece ajudar no empacotamento cristalino. A lectina incubada com Xman foi submetida ao screen inicial de cristalização com o kit de cristalização da Hampton research, Crystal Screen I™, onde não se observou a formação de cristais, porém, quando utilizado o Crystal Screen II™ se obteve cristais nas condições 12 e 34, a condição 34 se obteve melhores resultados dos cristais na 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 1,0M (precipitante). Os cristais foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas/São Paulo, e difratados na linha de luz MX1, utilizada para experimentos de difração de raios X para macromoléculas.



Figura 20 – Foto da gota contendo o cristal de *C. grandiflora* e foto ampliada.

4.3.2 Difração do Cristal

Os cristais difratados a uma distância de 100 mm da placa de imagem, o conjunto de dados foram gerados num resolução de 2,19 Å e o escalonamento com resolução entre 28,149-2,3 Å.

O cristal pertence ao grupo espacial ortorrômbico I222. E o coeficiente de Matthews calculado, 2,18 Å³.Da⁻¹, indica um monômero na unidade assimétrica e a porcentagem de solvente é 43,52%. A cela tem como dimensões a=67,70 Å, b=55,90 Å e c=107,46 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 4.

Tabela 4. Estatísticas dos dados de coleta e refinamento

Dados de Coleta	
$R_{merge}(\%)$	7,8 (40,6)

Limite de Resolução (Å)	28,149 (2,30)
I/σ(I)	8,7
Completeza (%)	92,5
Multiplicidade	4,9
Parâmetros de Cella	a=67,70 Å b=55,90 Å c=107,46 Å
Ângulos de Cella	α=β=γ=90°
Coefficiente de Mathews Å ³ .Da ⁻¹	2,18
Quantidade de Solvente (%)	43,52
Unidade Assimétrica	Monômero
Grupo Espacial	I222
Comprimento de Onda (Å)	1,458
Numero total de reflexões	171 187
Numero total de reflexões únicas observadas	1 458
Refinamento	
Faixa de Resolução (Å)	2,3
Rfator (%)	22,6
Rfree (%)	27,4
Numero de moléculas de água	52
RMS desvios dos valores ideais	
Comprimento das ligações (Å)	0,0171
Ângulos das ligações (graus)	1,978
Fatores de Temperatura	
Média do B-fator para toda a proteína (Å ²)	1,75
Gráfico de Ramachandran	

Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	204
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	32
Resíduos em regiões não permitidas (%)	1

O gráfico de Ramachandran (Figura 21) mostra que os ângulos ϕ e ψ se encontram ou em regiões mais favoráveis ou em regiões adicionalmente permitidas, como já observado na Tabela 3. Portanto, podemos observar na estrutura da lectina de *C. grandiflora* uma boa estereoquímica. As coordenadas da estrutura final da ConGr serão depositadas no banco de dados de proteínas (PDB).

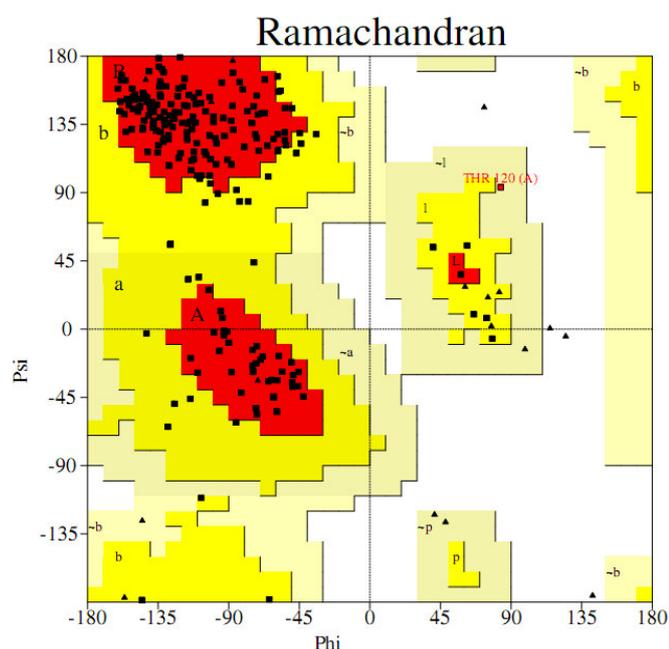


Figura 21 – Gráfico de Ramachandran da estrutura final da lectina de *C. grandiflora* calculada pelo programa COOT (Emsley e Cowtan, 2004).

4.3.3 Estrutura da lectina *C. grandiflora*

O problema de fase, para a resolução da estrutura da lectina de *C. grandiflora*, foi solucionado pelo método substituição molecular usando as coordenadas moleculares da estrutura do monômero da lectina de sementes de *C. gladiata* (PDB code 2d7f; Delatorre *et al.*, 2007).

Como nos monômeros das lectinas de leguminosas, o monômero de *C. grandiflora* possui a mesma estrutura terciária, exibindo o domínio “jelly-roll”, e carrega o necessário para interagir com o ligante.

Na unidade assimétrica existe uma cadeia polipeptídica de 237 aminoácidos, correspondente ao monômero, dois íons metálicos, um carboidrato modificado (Xman), e uma

molécula de ABU (figura 22). Os domínios de interação dos íons metálicos e carboidrato estão integralmente nos monômeros, apenas o domínio de ligação da molécula de ABU fica somente completo quando se forma o dímero canônico. Ainda no monômero, surge em sua estrutura duas regiões com a presença de íons Cd^{2+} .

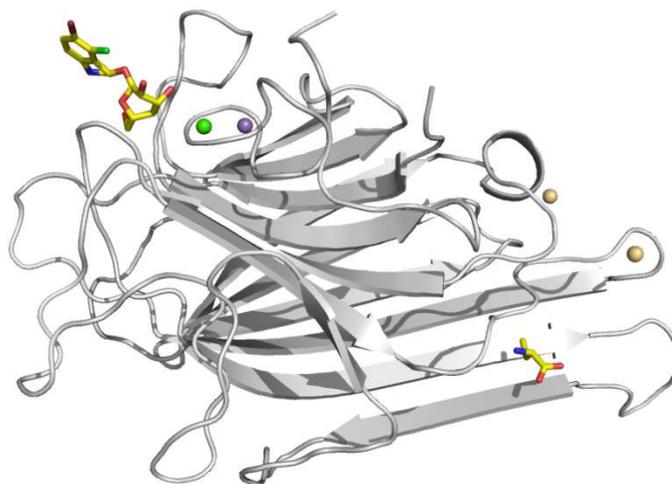


Figura 22 – Monômero de *C. grandiflora*.

Em condições biológicas, os monômeros de leguminosas se oligomerizam e se apresentam na forma tetramérica (Figura 23), formada por dímero de dímeros canônicos, semelhantes à lectina tipo ConA. Pequenas mudanças nesses monômeros de lectinas de leguminosas implicam em mudanças na oligomerização e formação de dímeros e tetrâmeros (Srinivas *et al.*, 2001). Ainda assim, os resíduos His51, Arg60, Asn55, Asp78, Asn118 e Ser119 são absolutamente conservados em lectinas de leguminosas com associação tetramérica típica da ConA (Calvete *et al.*, 1999). A oligomerização desses monômeros fornece uma estabilidade estrutural para a molécula e transmite para a lectina a especificidade fina necessária para a atividade biológica (Reddy *et al.*, 1999)

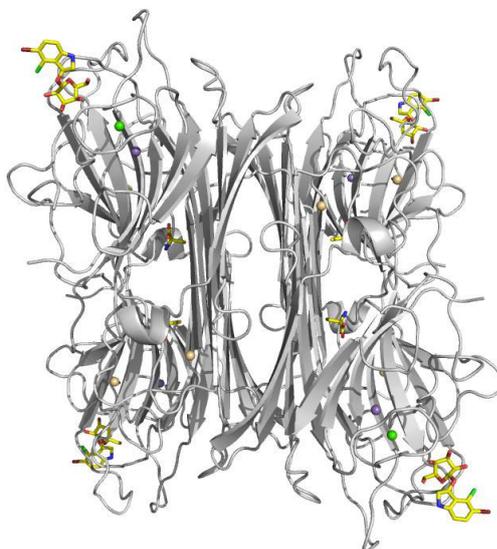


Figura 23 – Estrutura geral da lectina de *C. grandiflora*.

4.3.4 Sítios de interação aos metais

O sítio foi primeiramente descrito para a ConA, e mostrou ser bastante conservado nas lectinas de leguminosas, inclusive na lectina de *C. grandiflora*. O cálcio e o íon metálico estão ligados por uma ponte formada por dois resíduos de aspartato (Asp10 e Asp19). Os dois íons interagem com quatro ligantes protéicos e duas águas, como apresentada na figura 24, representando as interações e suas distâncias. Os outros resíduos de aminoácidos presentes nesse sítio conservado também estão presentes na lectina deste estudo (Glu8, Tyr12, Asn14 e His24)

A ligação do monômero ao íon cálcio induz a uma isomerização trans-cis da ligação peptídica Ala207-Asp208, que é conservada em todas as lectinas de leguminosas com estruturas conhecidas. A isomerização passa a ser importante na estabilização tanto do sítio de reconhecimento a carboidrato e inclusive para o sítio de ligação a metais.

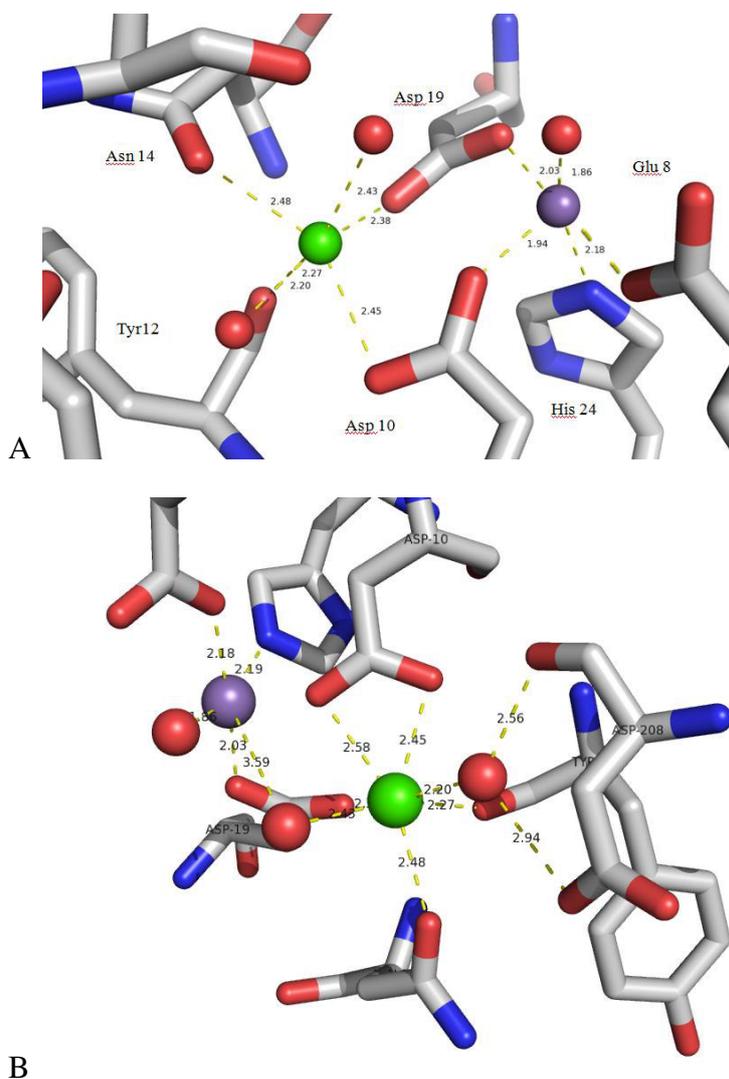


Figura 24 – Sítio de ligação a metal da lectina de *C. grandiflora*. A – estrutura do sítio e as distâncias formadas entre os íons e resíduos e águas. B – molécula de água liga o domínio metálico ao resíduo Asp208 do sítio de ligação a carboidrato

Os átomos de cádmio presentes no monômero não fazem parte da estrutura nativa da proteína. Eles se encontram na condição de cristalização e não são necessários para a proteína realizar sua função, mas acabam interagindo com certos resíduos da lectina. Um dos átomos é coordenado pelos resíduos Asp80 e Asp82 e o outro átomo é coordenados pelos resíduos Glu87 e Glu183 (Figura 25).

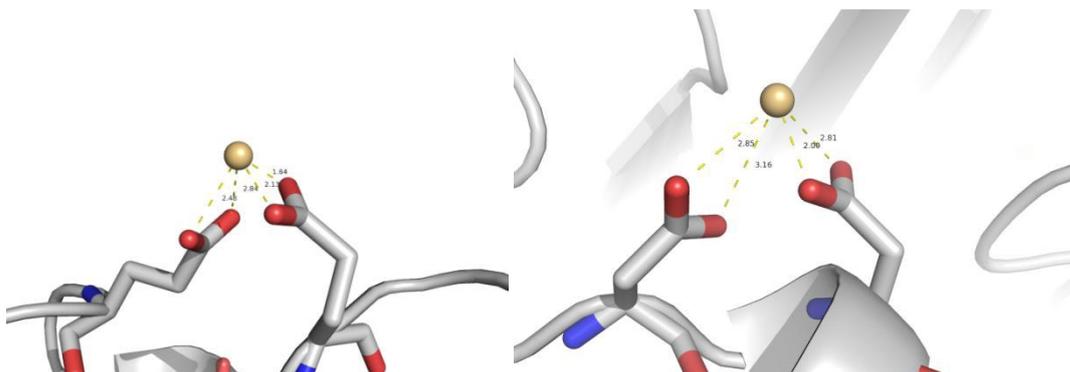


Figura 25 – Sítios de interação de Cd^{2+} .

4.3.5 Sítio do ácido α -aminobutírico

A presença do ácido α -aminobutírico (ABU) na estrutura de lectinas de plantas contribui fortemente para a característica de lectinas em carregar metabólitos secundários.

A comparação da sequência de aminoácidos de lectinas dessa família mostra que o sítio em que o Abu se encontra é conservado e fornece evidências de sua relevância biológica. E inclusive fortalece o papel das lectinas no mecanismo de defesa nas plantas (Delatorre *et al.*, 2007). Na estrutura do monômero de *C. grandiflora* se apresentam íons Cd^{2+} e Xman que foram adicionados no processo de cristalização, porém no tocante a molécula de Abu encontrada nessa lectina ele foi co-purificado durante processo de isolamento da proteína, o que nos permite inferir que a interação entre a molécula e a proteína é altamente estável

Não diferentemente de outras lectinas de Diocleinae, o sítio de ligação do Abu, na lectina de *C. grandiflora*, está posicionado na interface de contato dos monômeros que formam o dímero canônico, como já descrito para CGL, ConBr, CRLI, CBol e DRL. O sítio foi primeiramente descrito para a CGL (PDB: 2D7F) e posteriormente foi investigado para outras lectinas da mesma subtribo.

Os resíduos envolvidos na interação com o ABU (Asn124, Ala125, Leu126, Gln137, Asp139 e Val179) estão presentes nas lectinas de Diocleinae inclusive na *C. grandiflora*. Em outras lectinas de leguminosas, esse bolso hidrofóbico, pode ocorrer com substituições conservativas de alguns resíduos envolvidos (Delatorre *et al.*, 2007), mas isso não impediria a

interação com o Abu, o que torna interessante a investigação deste aminoácido não protéico em lectinas fora desta subtribo (Figura 27).

Além do papel de defesa, o Abu pode desempenhar um importante papel na estabilização do dímero canônico, já que ele se encontra na interface de contato entre os dois monômeros e interagem com resíduos de ambos (Figura 26)

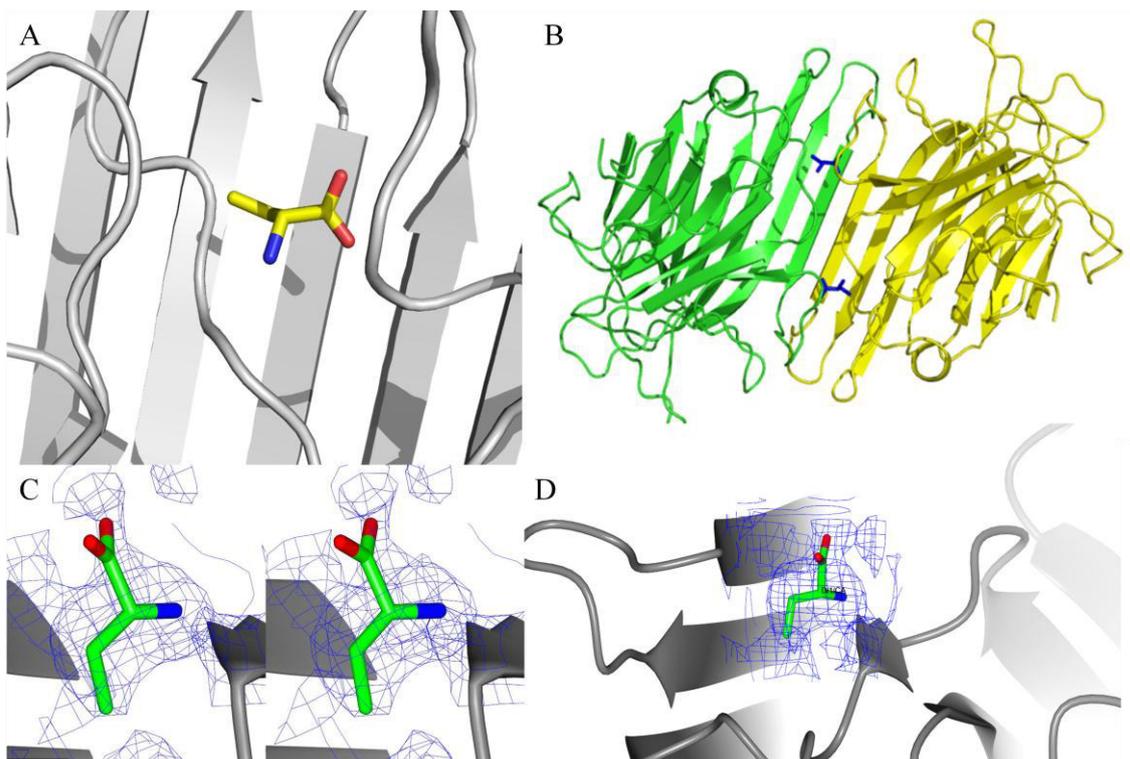


Figura 26 – A – Sítio do Abu na lectina de *C. grandiflora*; B – Localização das moléculas de Abu na interface do dímero; C – Representação em visão estéreo referente ao Abu, na estrutura da lectina de *C. grandiflora*. D – densidade eletrônica no OmitMap.

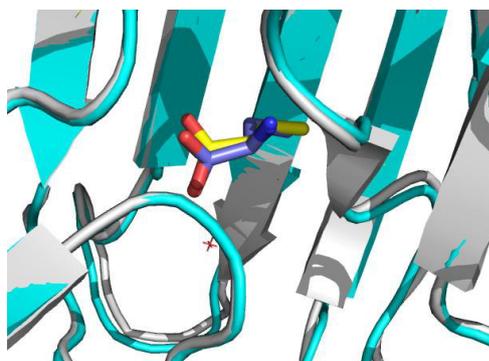


Figura 27 - Sobreposição de sítios do Abu de duas Canavalias. Os resíduos envolvidos neste sítio de interação com o Abu são conservados nas Canavalias.

4.3.6 Sítio de reconhecimento a carboidrato

Como nas outras lectinas de leguminosas, o sítio de ligação a carboidrato também está conservado na lectina de *C. grandiflora* em todos os resíduos relacionados (Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228). A isomerização já citada entre os resíduos 207 e 208 tem o papel de orientar os resíduos Asn14 e Arg228 neste sítio, bem como a estabilização do mesmo.

Podemos observar a presença do Xman na estrutura em seu mapa de densidade eletrônica (Figura 28), e sua localização no seu domínio (Figura 29).

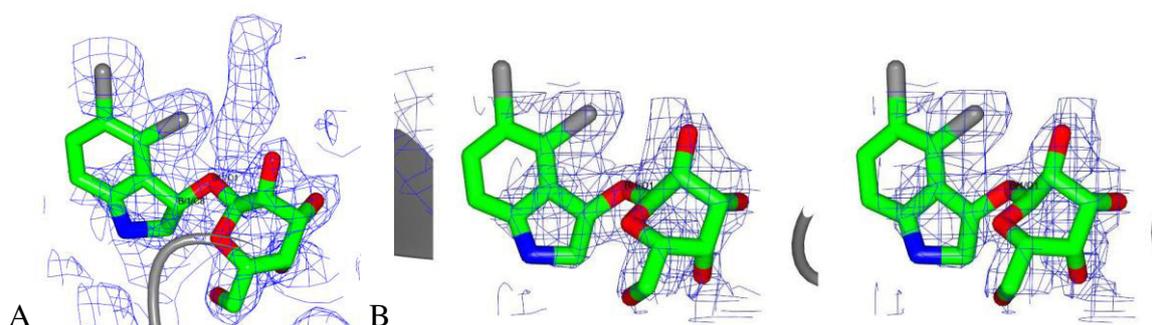


Figura 28 – A. Densidade eletrônica no OmitMap B. Representação em visão estéreo do ligante Xman, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose, na estrutura da lectina de *C. grandiflora*.

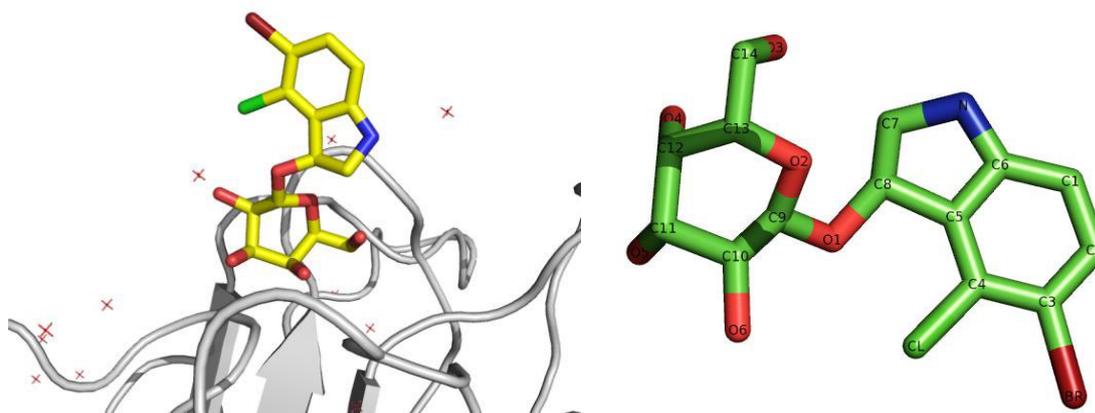


Figura 29 – Posicionamento do Xman no domínio de reconhecimento a carboidrato e esquema da estrutura do Xman.

A arquitetura do sítio para as lectinas da subtribo Diocleinae, por seus resíduos serem conservados, também mostra um arranjo conservado. O desenho do sítio (Figura 30) pode ser feito calculando-se a distância entre alguns resíduos. Estes desvios entre os resíduos de uma estrutura para outra (Tabela 5) destas lectinas podem contribuir, em parte, para justificar as diferenças nas especificidades por carboidratos, como descrito por Dam e colaboradores (1998) utilizando lectinas desta subtribo e diferentes trimanosídeos, com isso, podemos inferir também

que estas diferenças podem contribuir para justificar as distâncias entre os efeitos de lectinas altamente similares em diversos modelos.

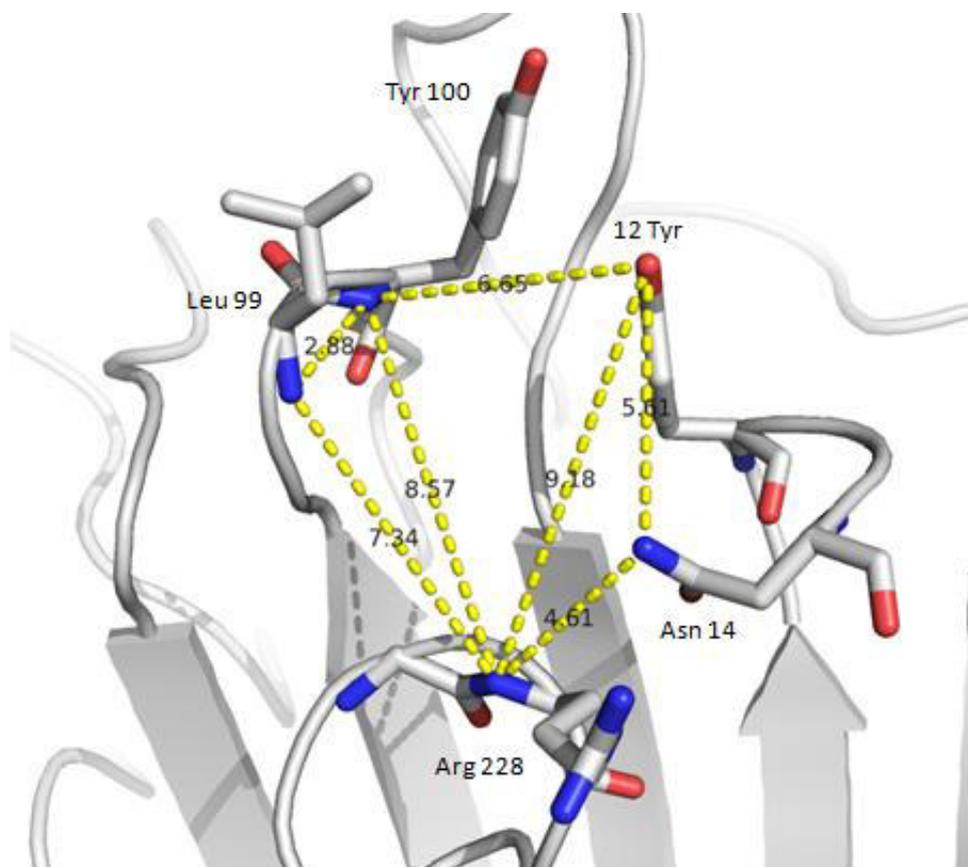


Figura 30 – Desenho do sítio da *C. grandiflora*.

Tabela 5 – Distância entre resíduos que forma o sítio de reconhecimento a carboidrato em Canavalias.

Resíduos \ Lectina	ConGr	CGL	ConBr	ConM	ConA	CBol
ARG228 N \ TYR12 OH	9,56 Å	9,18 Å	8,86 Å	8,94 Å	9,88 Å	9,11 Å
ARG228 N \ ASN14 ND2	5,08 Å	4,61 Å	4,97 Å	4,97 Å	5,48 Å	4,97 Å
TYR100 N \ TYR12 OH	6,96 Å	6,65 Å	6,47 Å	6,68 Å	7,26 Å	7,15 Å
TYR100 N \ LEU99 N	2,77 Å	2,88 Å	2,68 Å	2,70 Å	2,74 Å	2,79 Å
TYR12 OH \ ASN14 ND2	5,66 Å	5,61 Å	5,26 Å	5,44 Å	5,83 Å	5,27 Å
ARG228 N \ LEU99 N	7,15 Å	7,34 Å	7,34 Å	7,34 Å	7,55 Å	7,36 Å
ARG228 N \ TYR100 N	8,34 Å	8,57 Å	8,67 Å	8,77 Å	8,59 Å	8,72 Å

Podemos também observar estas diferenças nas distâncias quando comparamos dois sítios de lectinas diferentes sobrepostas, como exemplo a lectina de *C. grandiflora* em relação à CGL (Figura 31).

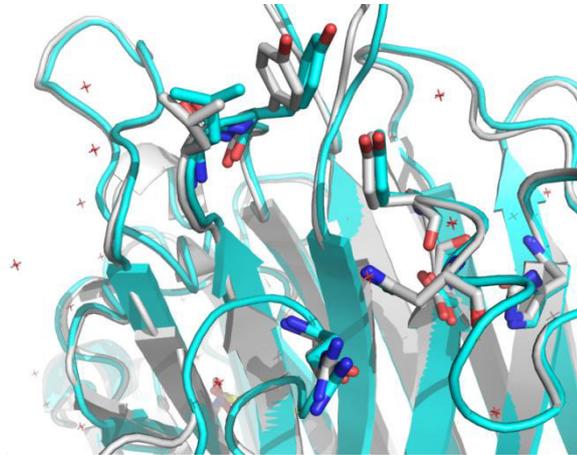


Figura 31 – Resíduos envolvidos no reconhecimento a carboidrato nas lectinas de *C. grandiflora* (azul) e *C. gladiata* (cinza).

Portanto, diferenças no posicionamento dos resíduos podem significar especificidade diferenciada, incluindo diferença na ligação a receptores celulares, contribuindo para explicar como proteínas tão homólogas apresentam atividades biológicas diferentes. É importante incluir que as distâncias entre os domínios de reconhecimento também contribuem por diferenças nas ligações cruzadas entre as proteínas e células, e portanto nas atividades desencadeadas.

4.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS CARACTERIZADAS PARA A LECTINA DE *C. GRANDIFLORA*

4.4.1 Efeito edematogênico da lectina de *C. grandiflora*

Observando-se o curso temporal do efeito edematogênico da ConGr administrada por via subcutânea intraplantar nas doses de 0,01; 0,1 e 1mg/Kg, verificou-se que esta induziu edema de pata somente na dose de 1mg/Kg, com efeito máximo na primeira meia hora após sua administração e constatado o desaparecimento após a trigésima segunda hora. Estes dados demonstram que o processo inflamatório produzido pela lectina é característico de fase aguda e de natureza osmótica. De fato, outros achados da literatura sobre lectinas do gênero *Canavalia* são sugestivos de tal ação, a exemplo da formação do edema de pata induzido pelas lectinas *C. marítima*, *C. brasiliensis* e *C. gladiata*, (Assreuy *et al.*, 2009), comparado com essas lectinas o efeito da *C. grandiflora* é de menor intensidade, porém exhibe perfil semelhante quanto ao pico de inflamação na primeira meia hora (Figura 32).

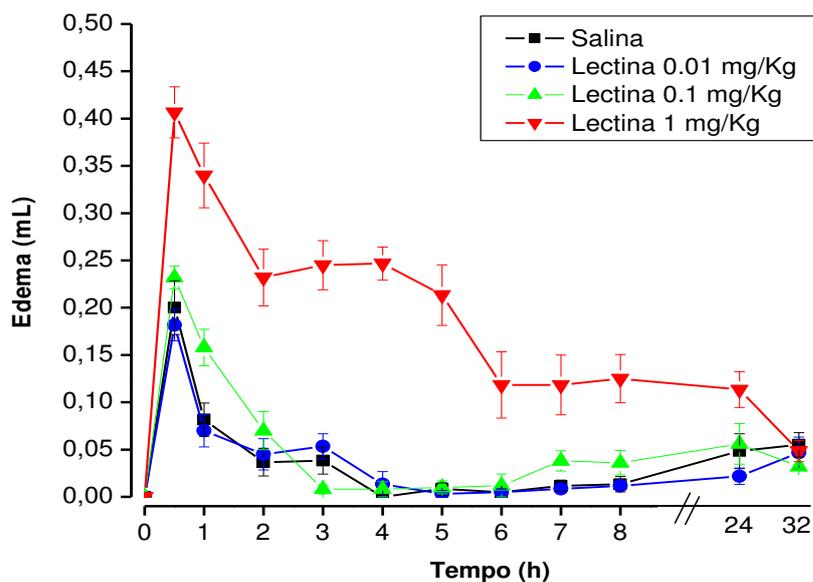


Figura 32 – Lectina de *Canavalia grandiflora* induz edema de pata em ratos. A lectinas foi administrada (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg; s.c.) na pata traseira direita de ratos. O controle negativo recebeu salina (0,01 mL/Kg; s.c.) na pata contralateral. O edema foi medido antes (tempo zero) e 0,5 – 32 h após a injeção da lectina e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. Resultados expressos como Média \pm E.P.M. (n=6).

4.4.2 A lectina de *C. grandiflora* relaxa aortas endotelizadas

A fenilefrina (0,1 μ M) induziu contrações tônicas estáveis em segmentos de aortas de rato. Em aortas endotelizadas, a ConGr adicionada cumulativamente (10-100 μ g/mL) sobre as contrações induzidas por fenilefrina, induziu relaxamento apenas na concentração de 100 μ g/mL (cerca de 25%) (Figura 34). Por outro lado, em aortas com endotélio não preservado, as lectinas não produziram resposta relaxante.

Em todos os experimentos, a lectina de *C. grandiflora*, não alterara a responsividade do tecido, visto que, após lavagem da preparação com Tyrode (TN), a adição de KCl produziu resposta contrátil, como se pode observar no registro típico (Figura 33).

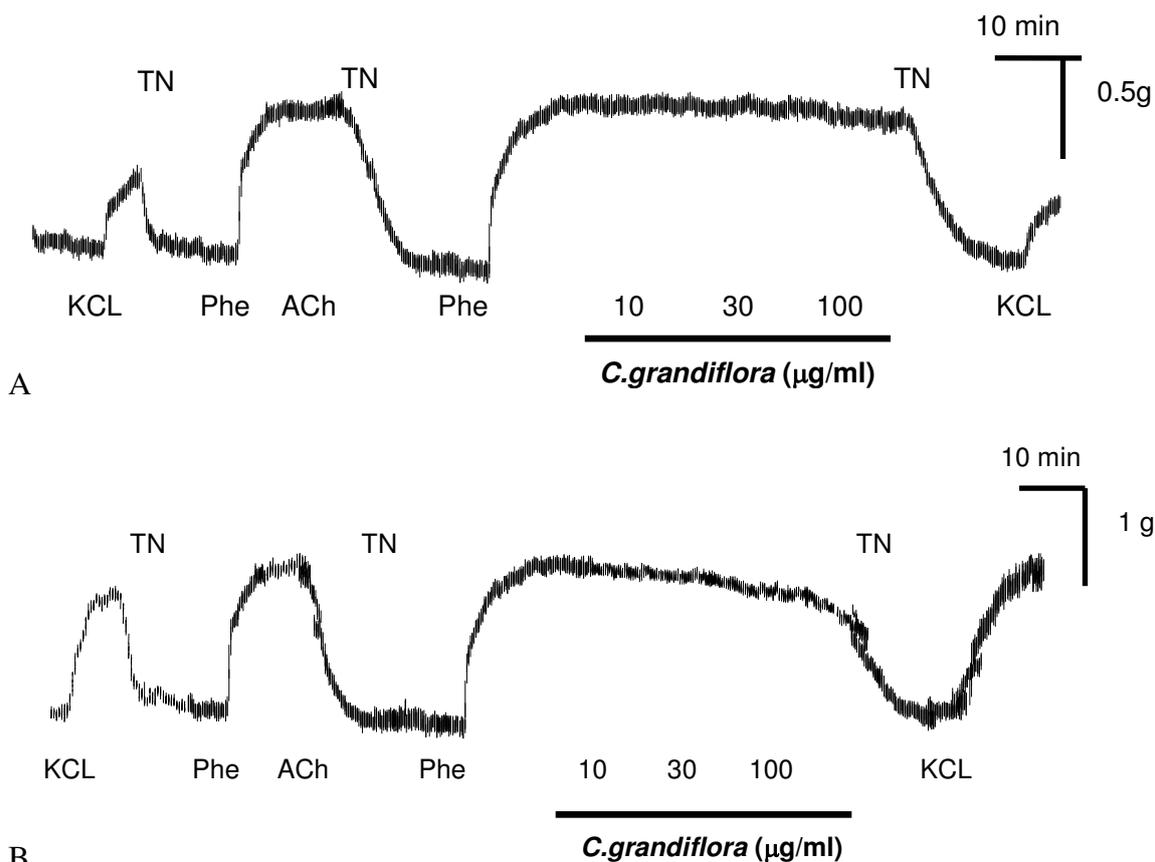


Figura 33 – Registros típicos de ConGr; A – aorta não endotelizada; B – aorta endotelizada

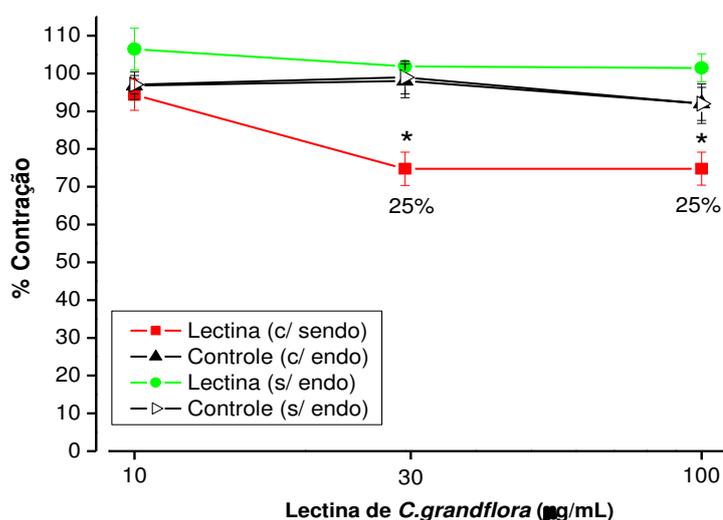


Figura 34 – Efeito relaxante da lectina de *Canavalia grandiflora* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina. Resultados expressos como Média \pm E.P.M. * $p < 0.05$ em relação ao controle (100% de contração).

Os efeitos da vasodilatação em aortas endotelizadas, provocados por lectinas, também exibem exemplos de lectinas do gênero *Canavalia* (*C. marítima*, *C. brasiliensis* e *C. gladiata*, (Assreuy *et al.*, 2009)) e não diferentemente do efeito edematogênico em patas de ratos, a lectina

de *C. grandiflora* apresenta uma atividade menor que as outras lectinas do gênero, como exemplo a lectina de *C. gladiata* que tem efeito aproximadamente quatro vezes maior que a de *C. grandiflora* na dose de 100 μ g/mL.

4.4.3 O L-NAME reverte o efeito relaxante da lectina de *Canavalia grandiflora*

O NO é o principal mediador do relaxamento dependente de endotélio no músculo liso vascular (Furchgott e Zawadzki, 1980). O efeito vasodilatador da ConGr foi completamente inibido pelo inibidor não seletivo da NOS L-NAME (100 μ M). O registro típico mostra que a adição da lectina não promoveu resposta no tônus mesmo na dose mais elevada na presença de L-NAME (Figura 35)

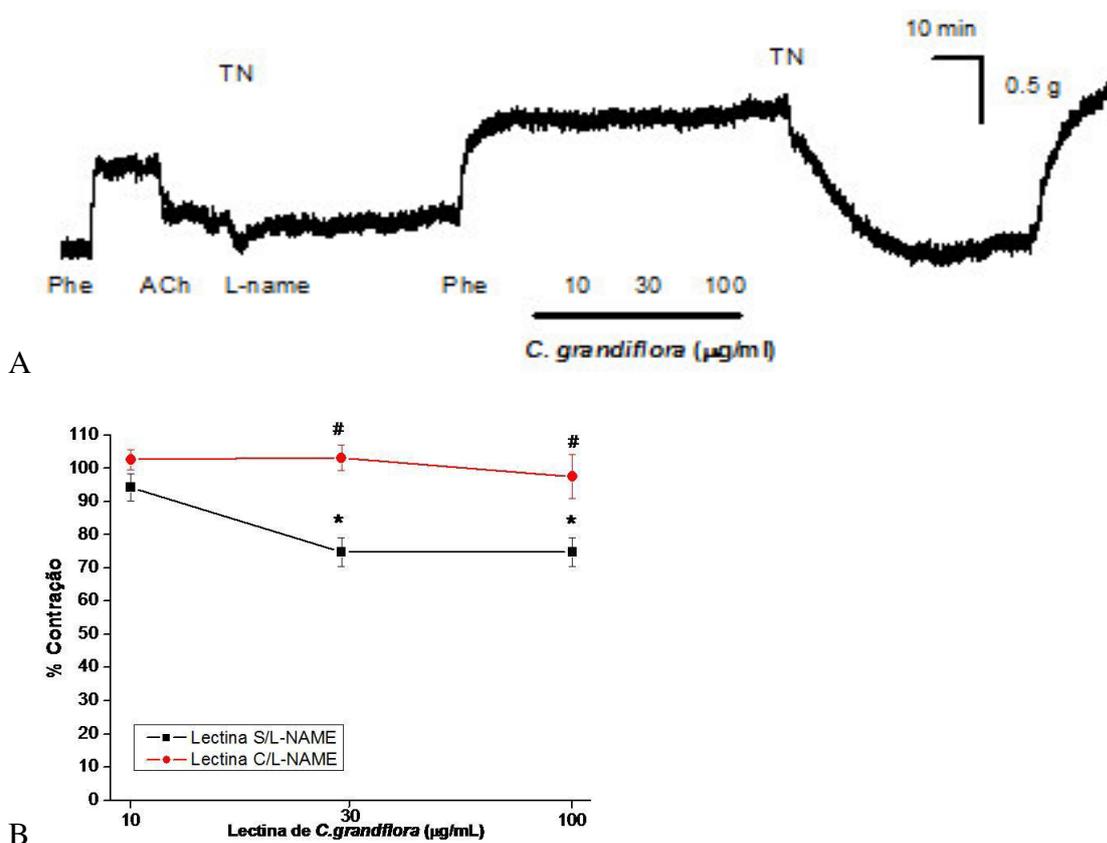


Figura 35 – A. Registro típico de ConGr na presença de L-NAME. B. Efeito relaxante da lectina de *Canavalia grandiflora* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina na presença ou não do L-NAME.

O NO juntamente com a prostaciclina são os fatores derivados do endotélio principais responsáveis pelos efeitos das lectinas no vasorelaxamento (Assreuy *et al.*, 2009). O L-NAME bloqueou o efeito causado pela ConGr, assim como descrito para a ConBr, e inibe fortemente o efeito da CGL (Assreuy *et al.*, 2009), além disso também está envolvido no relaxamento provocado pelas lectinas *C. maritima* e *C. ensiformis* (Gadelha *et al.*, 2005) e a lectina de alga de *Bryothamium triquetrum* (Lima *et al.*, 2004).

5. Conclusão

O presente trabalho forneceu a estrutura primária e tridimensional da lectina de *Canavalia grandiflora* Benth. E ao longo de sua estrutura (primária e terciária) apresentou alta grau de homologia com as lectinas da subtribo de Diocleinae, possuindo domínios de ligação conservados (metais, carboidrato e Abu). Na sua estrutura primária pode-se observar um fato importante, diversas mutações, ao se comparar as seqüências do gênero *Canavalia*, eram as mesmas encontradas no gênero *Dioclea* o que torna essa lectina mais próxima desse grupo.

A lectina de *C. grandiflora* apresentou em sua estrutura a molécula de Abu que foi co-purificada com a proteína, o que torna mais claro a definição de um sítio conservado para essa molécula nas lectinas de Diocleinae e o fortalecimento do papel de lectinas e do aminoácido não protéico na defesa de plantas. O trabalho também apresentou dados significativos em relação ao efeito edematogênico em patas de ratos e relaxante do músculo liso de aortas endotelizadas, mostrando que esta lectina tem um efeito pró-inflamatório no modelo citado e relaxante em aortas, porém com baixa intensidade comparada com outras lectinas da mesma subtribo. Como um dos mecanismos envolvido no efeito do vasorelaxamento tem-se a produção de óxido nítrico, comumente encontrado na ação provocada por lectinas.

Portanto, o trabalho oferece novas informações para somar aos estudos das lectinas de Diocleinae, no âmbito estrutural e funcional. Porém alguns estudos ainda seriam de grande relevância determinar a especificidade fina dessa lectina por microcalorimetria, reversão de seus efeitos biológicos por carboidratos e estudos de outros mecanismos envolvidos na sua ação nos modelos testados.

Referências

- AGRAWAL, B.B.I., GOLDSTEIN, I.J.. Specific binding of concanvalin A to cross-linked dextran gels. **Biochem. J.** 96, 23C–15C. 1967.
- ALESSI, D., MACDOUGALL, L.K., SOLA, M.M., IKEBE, M., COHEN, P.. The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. **Eur J Biochem.** v. 210, p. 1023-1035, 1992.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J.. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215:403-10, (1990).
- ANDERSON, T.J.. Nitric oxid, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. **Heart Fail Rev.** 8:71-86, 2003.
- ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M.V., CAVADA, B.S., BARRAL-NETTO, M.. Lectin-Induced No Production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.
- ARASON, G.J.. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. **National University Hospital of Iceland**, Landspítalinn, 101, Reykjavik, Iceland.
- ARGOS, P., T. TSUKIHARA, M. G. ROSSMANN.. A structural comparison of concanavalin A and tomato bushy stunt virus protein. **J. Mol. Evol.** 15:169-179, 1980.
- ARNT, R. Tesouro verde. **Exame.** São Paulo, ano 35, n. 9, p. 52-64, maio, 2001.
- ASSREUY, A. M. S., SHIBUYA, M. D., MARTIN, G. J., DE SOUZA, M. L. P., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A.. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of In ammation.** 6, 201-210, 1997.
- ASSREUY, A.M., MARTINS, G.J., MOREIRA, M.E.F., BRITO, G.A.C, CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A.. Prevention Of Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis By Glucose-Mannose Binding Plant Lectins. **The Journal of Urology.** v. 161, p. 1988-1993, 1999.
- ASSREUY, A.M., FONTENELE, A.R., PIRES, A.F., FERNANDES, D.C., RODRIGUES N.V.F.C., BEZERRA, E.H.S., MOURA, T.R., DO NASCIMENTO, K.S., CAVADA, B.S.. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.** 380:509–521, 2009.
- AUB, J.C., SANFORD, B.H., COTE, M.N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proc.NatlAcad.Sci.USA.** 54, 396–399, 1965.
- AYOUBA, A., CAUSSE, H., VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., CABBILLAU, C., ROUGÉ, P.. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochem Syst Eco1.** 22:153-159, 1994.
- BABOSHA, A.V.. Inducible Lectins and Plant Resistance to Pathogens and Abiotic Stress. **Biochemistry (Moscow).** Vol. 73, No. 7, pp. 1007-1022, 2008.

BANERJEE, R., DAS, K., RAVISHANKAR, 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.281–296, 1996.

BARAUNA, M.P., KASTER, B.T., HECKERT, NASCIMENTO, K.S., ROSSI, F.M., TEIXEIRA, E.H. et al., Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice, **Pharmacol Biochem Behav.**,85: 160–169, 2006.

BARBOSA, F.B.C.. A biotecnologia e a conservação da biodiversidade amazônica, sua inserção na política ambiental. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília.** v.18, n.2, p.69-94, maio/ago, 2001.

BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B., GRANGEIRO, T.B., FREITAS, L.A.R., BARRAL-NETTO, M.. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by Lectins of the Diocleinae Subtribe. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.** Vol. 96(5): 673-678, 2001.

BARONDES, S.H., CASTRONOVO, V., COOPER, D.N.W., et al. Galectins: a family of beta-galactoside-bindinglectins. **Cell.** 76, 597–598, 1994.

BARRAL-NETTO, M., SOHSTEN, R. L., TEIXEIRA, M., SANTOS, W. L. C., POMPEU, M. L., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B.S., FALCOFF, E.; BARRAL, A.. 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.

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

BEHRENDT, D., GANZ, P.. Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. **Am J Cardiol.** 90:40L-8L, 2002.

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

BOULANGER, C.M., VANHOUTTE, P.M.. G-proteins and endothelium dependent relaxations. **J Vascul Res.** 34:175–85, 1997.

BOUCKAERT, J., LORIS, R., POORTMANS, F., WYNS, L.. Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. **Proteins: Struct.Funct. Genet.** 23, 510–524, 1995.

BOUCKAERT, J., POORTMANS, F., WYNS, L., LORIS, R.. Sequential Structural Changes upon Zinc and Calcium Binding to Metal-free Concanavalin A **J. Biol. Chem.** Vol. 271, No. 27, Issue of July 5, pp. 16144–16150, 1996.

BOUCKAERT, J.; HAMELRYCK, T. W.; WYNS, L.; LORIS, R.. The crystal structures of Man (alpha 1–3)Man(alpha 1-0)Me and Man(alpha 1–6)Man(alpha 1-0)Me in complex with concanavalin A. **J Biol Chem.** 274: 29188-29195, 1999.

- BOUKAERT, J., DEWALLEF, Y., POORTMANS, F., WYNS, L., LORIS, R.. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. *J. Biol. Chem.* 275,19778–87, 2000.
- BOYD, W.C., SHAPLEIGH, E.. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*. 119, 419, 1954.
- BOWLES, D. J., MARCUS, S. E., PAPPIN, D. J. C., FINDLAY, J. B. C., ELIOPOULOS, E., MAYCOX, P.R., BURGESS, J.. Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. *Journal of Cell Biology*. 102: 1284-1297, 1986.
- BOWLES, D. J., PAPPIN, D. J.. Traffic and assembly of concanavalin A. *Trends in Biochemical Sciences*. 13:60-64, 1988.
- BRADFORD, M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-534, 1976.
- 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*. 160, 1025–33, 2001.
- BRINDA, K.V., MITRA, N., SUROLIA, A., VISHVESHWARA, S.. Determinants of quaternary association in legume lectins. *ProteinSci*. 13, 1735–1749, 2004.
- BRINDA, K.V., SUROLIA, A., VISHVESHWARA, S.. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. *Biochem.J.* 391,1–15, 2005.
- BROEKAERT, W.F., PEUMANS, W.J.. Lectin release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol 5., pp 57-65, 1986.
- BROEKAERT, W.F., VAN PARIJS, J., LEYNS, F., JOOS, H., PEUMANS, W.J.. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*. 245:1100-1102, 1989.
- BRÜNGER, A.T.. The Free R value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature*. 355, 472-474, (1992).
- CAMMUE, B.P.A., BROEKAERT, W.F., KELLENS, J.T.C., RAIKHEL, N.V., AND PEUMANS, W.J.. Stress-Induced Accumulation of Wheat Germ Agglutinin and Abscisic Acid in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiol.*, vol. 91, pp. 1432–1435. 1989.
- CALVETE, J. J., THOLE, H. H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO A., GRANGEIRO, T. B., RAMOS, M. V., ALMEIDA DA ROCHA, I. M, GUIMARÃES, F.N., CAVADA, B.S.. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1430, 367-375, 1999.
- CARNEIRO, F. Biopatologia: Inflamação Aguda. **Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**. Aula nº4, 2006.

- CAVADA, B.S., MOREIRA-SILVA, L.I.M., GRANGEIRO, T.B., *et al.*. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. Seeds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Denmark, Textop, v.11, pp. 74-80, 1996.
- CAVADA, B. S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., *et al.* Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons From End Potential Biotechnological Use Of The Diocleinae Subtribo Lectins. **Curr. Prot. Peptide. Science**. v.2, n.2, p.123-135, 2001.
- CAVADA, B. S. , IGLESIAS, M. M. , TRONCOSO, M. F. , TEIXEIRA, H , TURYN, D., DOMINICI, F.P.. 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., ASSREUY, A.M.S.. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. 374:1–10, 2006.
- CECCATO, V.M.. Sequencia parcial de DNA, caracterização bioquímica da lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth, e suas relações com filogenia de leguminosas. **Tese de Doutorado**, UFC, 110pp, 2001.
- CHELVANAYAGAM, G., HERINGA, J., ARGOS, P.. Anatomy and evolution of proteins displaying the viral capsid jellyroll topology. **J. Mol. Biol**. 228: 220–242, 1992.
- CHRISPEELS, M. J., HARTL, P. M., STURM, A., FAYE, L.. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**. 261(22): 10021-10024, 1986.
- COLLINGE, D.B., KRAGH. K.M., MIKKELSEN, J.D., NIELSEN, K.K., RASMUSSEN, U., VAD, K. Plant chitinases. **Plant J.**, 3: 31-40, 1993.
- DAM, T.K., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., SANTOS, C.F., DE SOUSA, F.A.M., OSCARSONI, S., BREWER, C.F.. Diocleinae Lectins Are a Group of Proteins with Conserved Binding Sites for the Core Trimannoside of Asparagine-linked Oligosaccharides and Differential Specificities for Complex Carbohydrates. **J. Biol. Chem**. Vol. 273, No. 20, pp. 12082–12088, 1998.
- DE HOFF, P.L., BRILL, L.M., HIRSCH, N.M.. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Mol Genet Genomics**. 282:1–15, 2009.
- DELANO, W. L.. The Pymol Molecular Graphics System. **DeLano Scientific, San Carlos, CA**. 2002.
- DELATORRE, P., NASCIMENTO, K.S., MELO, L.M., DE SOUZA, E.P., DA ROCHA, B.A.M., BENEVIDES, R.G., DE OLIVEIRA, T.M., BEZERRA, G.A., BEZERRA, M.J.L.B., DA CUNHA, R.M.S., FREIRE, V.N., CAVADA, B.S.. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Acta Cryst**. F62, 166–168, 2006.
- DELATORRE, P., ROCHA, B. A., SOUZA, E. P., *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct. Biol**. v.7, p.52, 2007.

DELBAERE, L. T. J., VANDONSELAAR, M., PRASAD, L., QUAIL, J. W., WILSON, K. S., DAUTER, Z. 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.** **230**, 950–965, 1993.

DOWN R.E., GATEHOUSE A.M.R., HAMILTON W.D.O. AND GATEHOUSE J.A.. 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.** 42: 1035-1045, 1996.

DOYLE, R.J. e SLIFIKIN, M.. Lectin – microorganism interection. **Marcel Denker, inc.** New York, New York 10016, 1994.

DZAU, V.J., GIBBONS, G.H.. Endothellium and growth factors in vascular remodeling of Hypertension. **Hypertension.** 18:III 115-21, 1991.

EDELMAN, G.M, CUNNINGHAM, B.A., REEDE, G.N., BECHER, J.W., WAXDAL, M.J., WANG, J.L.. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci USA.** 69:2580–2584, 1972.

EHRlichN, P.. Experimentelle Untersuchungen über Immunität.II. Ueber Abrin. **DtschMedWschr.** 17,1218–9, 1891.

EMSLEY, P., COWTAN, K.. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.** 60, 12 I: 2126-2132, 2004.

ESTEBAN, R., DOPICO, B., MUNOZ, F. J., ROMO, S., LABRADOR, E.. A seedling specific vegetative lectin gene is related to development in *Cicer arietinum*. **Physiol. Plant.** 114, 619-626, 2002.

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

FENG, J., ITO, M., NISHIKAWA, M., OKINAKA, T., ISAKA, N., HARTSHORNE, D.J., NAKANO, T. Dephosphorylation of distinct sites on the 20KDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. **FEBS.** v. 448, p. 101-104, 1999.

FERRIGE, A.G., SEDDON, M.J., GREEN, B.N., JARVIS, S.A., SKILLING, J.. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 6, 707–711, 1992.

FIGUEIREDO, J.G., BITENCOURT, F.S., MOTA, M.R., SILVESTRE, P.P., AGUIAR, C.N., BENEVIDES, R.G., NASCIMENTO, K.S., DE MOURA, T.R., DAL-SECCO, D., ASSREUY, A.M., CUNHA, F.D., VALE, M.R., CAVADA, B.S., ALENCAR, N.M.. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D.rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon.** 54:736–744, 2009.

FITCHES, E., WOODHOUSE, S.D., EDWARDS, J.P., GATEHOUSE, J.A.. In vitro and in vivo binding of snowdrop (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA) and jack bean (*Canavalia*

ensifformis; ConA) lectins with in tomato moth (*Lacana bioalderacea*) larvae; mechanisms of insecticidal action. **J.InsectPhysiol.** 47, 777–787, 2001.

FOISSAC, X., LOC N.T., CHRISTOU P., GATEHOUSE, A.M.R., GATEHOUSE J.A.. 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.** 46: 573-583, 2000.

FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V.. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.** 288:373-6, 1980.

GABIUS, H.J.. Animal lectins, **EurJBiochem.** 243,543–76, 1997.

GABIUS, H.. Biological Information Transfer beyond the Genetic Code: The Sugar Code. Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, D-80539 München, Germany. 2001.

GADELHA, C.A., MORENO, F.B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., ROCHA, B.A., ASSREUY, A.M.. Metal Native crystal structure of a nitric oxide releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **JStructBiol.** 152:185–194, 2005.

GATEHOUSE, A.M.R., DOWN, R.E., POWELL, K.S., SAUVION, N., RAHBÉ, Y., NEWELL C.A., MERRYWEATHER, A., HAMILTON, W.D.O., GATEHOUSE, J.A.. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach- potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata.** 79: 295-307, 1996.

GATEHOUSE, A.M.R., CLEMENT S.L., QUISENBERRY, S.S.. Biotechnological applications of plant genes in the production of insect-resistant crops. **Global Plant Genetic Resources for Insect-Resistant Crops.** C. pp. 263-280, 1999.

GIBSON, K.E., KOBAYASHI, H., WALKER, G.C.. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. **Annu Rev Genet.** 42:413–441, 2008.

GOMES, J.C., FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 132-5, 1994.

GRANGEIRO, T. B. Clonagem, seqüenciamento e expressão do gene da lectina (ConBr) de sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Fortaleza, Universidade Federal do Ceará**, 134p. Tese de Doutorado. 1996.

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

HAMODRAKAS, S.J., KANELLOPOULOS, P.N., PAVLOU, K., TUCKER, P.A.. The Crystal Structure of the Complex of Concanavalin A with 48-Methylumbelliferyl-D-glucopyranoside. **J. Struc. Biol.**, 118: 23–30. 1997.

HARDMAN, K. D., AGARWAL, R. C., FREISER, M. J.. Manganese and calcium binding sites of concanavalin A, **J. Mol. Biol.** 157, 69–86, 1982.

HERMAN, E. M., SHANNON, L. M., CHRISPPEELS, M.J.. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**. 165:23-29, 1985.

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

HILDER V.A., POWELL K.S., GATEHOUSE A.M.R., GATEHOUSE J.A ., GATEHOUSE L.N., SHI Y., HAMILTON W.D.O., MERRYWEATHER A., NEWELL C.A., TIMANS J.C., PEUMANS W.J., VAN DAMME E., BOULTER D.. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. *Transgenic Research*. 4:18-25, 1995.

HOGERVORST, P.A.M.. **Transgene products in honeydew: estimating risks for non-target insects**. 2006. A thesis submitted to the University of Neuchâtel for the degree of Doctor of Natural Sciences - Zurich, Switzerland.

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

KARAKI, H., OZAKI, H.; HORI, M., MITSUI-SAITO, M., AMANO, K., HARADA, K., MIYAMOTO, S., NAKAZAWA, H., WON, K. J., SATO, K.. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**. v. 49, p. 157-230, 1997.

KLEHA, J.F., DEVESLY, P., JOHN, S A.. The effects of lectins on the Release of EDRF from rabbit aorta. **BrJPharmacol**. 104:287–288, 1991.

KOCOUREK, J., HOREJS, V.. A note on the recent discussion on the definition of the term “lectin”. **In Lectins–Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Vol.3, pp.3–6, 1983.

KOENIG, S.H., BREWER, C.F., BROWN, R.D.. Conformation as the determinant of saccharide binding in concanavalin A: Ca²⁺ concanavalin A complexes. **Biochemistry**. 20: 4251-4260. 1978.

KOUL, O., DHALIWAL, G.S.. Transgenic crop protection: concepts and strategies. **Science Publishers**. Enfield (NH), USA, pp. 85-116, 2004

KUMAR, V., ABBAS A.K., FAUSTO, N.. Eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7th Edition. **Elsevier Inc International Edition**. 2005.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage t4. **Nature**. 227:680-685, 1970.

LANDSTEINER, K., RAUBITSCHKE, H.. Beobachtungen über Agglutination und Agglutination. **Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.**, 45,600–607, 1907.

LANDUCCI, E.C.T., ANTUNES, E., DONATO, J.L., FARO, R., HYSLOP, S., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., De NUCCI, G.. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotoxin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br J Pharmacol**. v. 114, p. 578-583, 1995.

- LASKOWSKI, R. A., MCARTHUR, M. W., MOSS, D. S., THORNTON, J. M..
PROCHECK: a program to check the estereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. 26, 283, 1993.
- LEGASPI, J.C., LEGASPI, B.C.J., SÉTAMOU, M.. Insect-resistant transgenic crops expressing plant lectins. **Science Publishers, Inc.** 2004.
- LESLIE, A. G. W.. MOSFLM User's Guide: MOSFLM Version 5.50. **MRC Laboratory of Molecular Biology**. Cambridge, England, 1997.
- LIMA, R.F., CRIDDLE, D.N., SOUZA, E.P., SAMPAIO, A.A., NASCIMENTO, K.S., CAVADA, B.S., ASSREUY, M.A.S.. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **JPharmPharmacol**. 56:1415–1421, 2004.
- LIS, H.V., SHARON, N.. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chem.Rev.** 98,637–674, 1998.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J.. Legume lectin structure. **Biochim Biophys Acta**, v.1383, p.9–36, 1998.
- LUSHER, T.F., BARTON, M.. Biology of the endotellium. **Clin Cardiol**. 20:II310, 1997.
- MÄKELA, O.. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. **Ann. Med. Exp. Fenn.** Suppl. 11, 1957.
- MATEO, A. O., ARTIÑANO, M. A. A.. Effect of high extracellular Ca²⁺ levels in spontaneously hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 432, p. 177-185, 2001.
- MITCHELL, S.W.. Researches about the venom of the rattle snake. **Smithsonian Contributions to Knowledge**. XII, 89–90, 1860.
- MODY, R., JOSHI, S., CHANEY, W.. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. **JPM** .Vol. 33, No. 1, 1-10, 1995.
- MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S. Lectin from *CANAVALIA BRASILIENSIS* (Mart.). Isolation, characterization na behavior during germination. **Biologia Plantarum**. 26:113-120, 1984.
- MOREIRA, R.A., AINOUS, I.L., DE OLIVEIRA, J.T., CAVADA, B.S.. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Vol. 86, Suppl. II, 211-218, 1991.
- MORENO, F.B.M.B., BEZERRA, G.A., OLIVEIRA, T.M., SOUZA, E.P., ROCHA, B.A.M., BENEVIDES, R.G., DELATORRE, P., CAVADA, B.S., AZEVEDO JR, W.F.. New crystal forms of Diocleinae lectins in the presence of different Dimannosides. **ActaCryst. F** 62,1100–1103, 2006.

- MORENO, F., DE OLIVEIRA, T., MARTIL, D., VICOTI, M., BEZERRA, G., ABREGO, J., CAVADA, B., AZEVEDO JR, W.F.. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology**. v. 161, p. 133-143, 2008.
- MORGAN, D.A., RUSCETTI, F.W., GALLO, R.. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**. 193, 1007–1008, 1976.
- MOTA, M.R.L., CRIDDLE, D.N., ALENCAR, N.M.N., GOMES, R.C., MEIRELES, A.V.P., SANTI-GADELHA, T., GADELHA, C.A.A., OLIVEIRA, C.C., BENEVIDES, R.G., NAKAGAWA, R., YASOKAWA, D., OKUMURA, Y., NAGASHIMA, K.. Cloning and sequence analysis of cDNA coding for a lectins from *Hrlianthus tuberosus* callus and its jasmonato-induced expression. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 64, 1247-1254, 2000.
- NOWELL, P.C.. Phytohemagglutinin: a initiator of mitosis in culture of animal and human leukocytes. **CancerRes**. 20, 462–46, 1960.
- NUNES, B., RENSONNET N.S., ADAL-SECCO, D., VIEIRA, S.M., CAVADA, B.S., TEIXEIRA, E.H., MOURA T.R., TEIXEIRA, C.S., NAPIMOGA, J.T.C., CUNHA, F.Q., NAPIMOGA, M.H.. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**. 379:609–616, 2009.
- ODA, A., SAKUTA, C., MASUDA, S., MIZOGUCHI, T., KAMADA, H., AND SATOH, S.. Possible involvement of leaf gibberellins in the clock-controlled expression of XSP30, a gene encoding a xylem sap lectin, in cucumber roots. **Plant Physiol.**, 133, 1779-1790, 2003.
- OLDROYD, G.E.D., DOWNIE, J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annu Rev Plant Biol**. 59:519–546, 2008.
- 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 amarylifolius* (Panadanaceae). **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 36, 1440-1446, 2004.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M.. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. v109, p 347-352, 1995.
- PLETSCH, M.. Compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Brasília, ano 1, n.4, p. 12-15, jan./fev. 1998.
- PUSZTAI, A. Plant lectins. **Cambridge University Press, Cambridge**, 1991.
- RAO, K.V., RATHORE, K.S., HODGES, T.K., FU, X., STOGER, E., SUDHAKAR, D., WILLIAMS, S., CHRISTOU, P., BHARATHI, M., BOWN, D.P., POWELL, K.S., SPENCE, J., GATEHOUSE, A.M.R. AND GATEHOUSE, J.A.. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. **Plant Journal**. 15: 469-477, 1998.
- REDDY, G.B., SRINIVAS, V.R., AHMAD, N., SUROLIA, A.. Molten globule like state of peanut lectin monomer retains its carbohydrate specificity: Implications in protein folding and legume lectin oligomerization. **J. Biol. Chem**. 274, 4500-4503, 1999.

- REEKE JR, G.N., BECKER J.W., EDELMAN, G.M.. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A: Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. **J. Biol. Chem.** 250, 1525–1547, 1975.
- RIFKIN, J. O século da biotecnologia. **São Paulo: Makron Books**, 1999.
- RIPOLL, C., FAVERY, B., LECOMTE, P., VAN DAMME, E., PEUMANS, W., ABAD, P., JOUANIN, L.. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science.** 164: 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.** Vol. 258, No. 22, pp. 13820-13824, 1983.
- ROBLEDO M, JIMÉNEZ-ZURDO J.I, VELÁZQUEZ E., *et al.*. Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. **Proc Natl Acad Sci USA.** 105:7064–7069, 2008.
- RODRIGUEZ, D., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A., RUSSO, M.. 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. 823-6, 1992.
- RÜDIGER, H., GABIUS, H.. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal.** 18, 589–613, 2001.
- SÁ, R.A., NAPOLEAO, T.H., SANTOS, N.D.L., GOMES, F.S., ALBUQUERQUE, A.C., XAVIER, H.S., COELHO, L.C.B.B., BIEBER, L.W., PAIVA, P.M.G.. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation.** 1-5, 2008.
- SÁ, R.A., SANTOS, N.D.L., SILVA, C.S.B., *et al.* Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 149, 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.** 223: 1329-1343, 2006.
- SANTI-GADELHA, T., GADELHA C.A.A., ARAGÃO K.S., OLIVEIRA, C.C., MOTA, M.R.L., GOMES, R.C., PIRES, A.F., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., ALENCAR, N.M.N., CRIDDLE, D.N., ASSREUY, A.M.S., CAVADA, B.S.. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 350, 1050–1055, 2006.
- SAUER, J.. Revision of Canavalia. **Brittonia.** 16, 106–181. 1964.
- SCHEGGIA, C., PRISCO, A.E., DEY P.M., DALEO G.R., LEZICA R.P.. Alteration of lectin pattern in potato tuber by virus X. **Plant Science.** 58, nº1, pp. 9-14, 1988.

- SCHULER, T.H., POPPY, G.M., KERRY B.R., DENHOLM, I.. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**. 16: 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**. 254, 862–866, 1991.
- SHANE, A.C., HART, G.W., Dynamic cytoskeletal glycosylation and neuro degenerative disease, **TrendsGlycosciGlycotechnol**. 11, 355–70, 1999.
- SHARON, N., LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**. Vol 4, 3198-3208, 1990.
- SHARON, N., LIS, A.. Lectins second edition. **Klwer academic publisher**. The Neteherlands, 2003
- SHARON, N., LIS, A.. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, vol.14 no.11 pp.53R–62R, 2004.
- SHARON, N.. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition molecules. **The journal of biological chemistry**. vol.282, No.5, pp.2753–2764, 2007.
- SRINIVAS , V.R., REDDY, G.B., AHMAD, N., SWAMINATHAN C.P., MITRA, N., SUROLIA, A.. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochim. Biophys. Acta**. 1527, 102–111, 2001.
- SILVA, R.BL.. Endotélio: Um novo alvo terapêutico no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista Médica Hospital Ana Costa**. 2006.
- 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**. 30,145–50, 2000.
- SINHA, S., GUPTA, G., VIJAYAN, M., SUROLIA, S. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. 7:498–505, 2007.
- STILLMARK, H.. Ueber Ricin ein giftiges Fermentaus den Samen Von Ricinus comm. L.und ein igenan der em Euphorbiaceen, **Schnakenburg's Buchdruckerei**, Dorpat,1888.
- STOGER, E., WILLIAMS, S., CHRISTOU, P., DOWN, R.E., GATEHOUSE, J.A.. 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**. 5: 65-73, 1999.
- SUMNER, J.B., HOWELL, S.F.. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalinA. **J.Bacteriol.**, 32, 227–237, 1936.
- SUN, X., WU, A., TANG, K.. Transgenic rice lines with enhanced resistance to the small brown planthopper. **Crop Protection**. 21: 511-514. 2002.

- SUROLIA, A.. Legume lectin family, the `natural mutants of the quaternary state, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1527, 102-111, 2001.
- TEICHBERG, V.I., SILMAN, I., BEITSCH, D.D., RESHEFF, G.. A β -D-Galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proc.NatlAcad.Sci.USA**. 72,1383–1387, 1975.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J.. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment through Sequence Weighting, Position-specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Res**. 22:4673-4680, 1994.
- TON, J., MAUCH-MANI, B.. γ -amino-butyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose. **Plant J**. 38:119-130. 2004
- TRABULSI, R.. Microbiologia. 3^a ed. **Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan**, 2000.
- VAN DAMME, E.J.M., BRIKE, F., WINTER, H.C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN I.J., PEUMANS, W.J.. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem**. 236, 419-427, 1996.
- VAN DAMME, E.J.M., PEUMANS, W.J., BARRE, A., ROUGÉ, P.. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 1549-7836, Volume 17, Issue 6, Pages 575 – 692, 1998.
- VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W.F., GOLDSTEIN, I.J., PEUMANS W.J.. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta** 183: 258-262, 1991.
- VAN PARIJS, J., JOOSEN, H.M., PEUMANS, W.J., GEUNS, J.M., VAN LAEIRE, A.J.. Effect of the lectin UDA (*Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakeslemzus* Burgeff. **Arch Microbiol** 158 19-25, 1992.
- VANE, J.R., ANGGARD, E.E., BOTTING, R.M.. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N. Engl. J. Med**.323:27-36, 1990.
- VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history **Pharmacological Research**. 49, 503–508, 2004.
- VAPAATALO, H., MERVAALA, E.. Clinically important factors influencing endontheial function. **Med Sci Monit**. 7:1075-85. 2001.
- VARELA, E.S., LIMA, J.P.M.S., GALDINO, A.S., PINTO, L.S., BEZERRA, W.M., NUNES, E.P., ALVES, M.A.O., GRANGEIRO, T.B.. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**. 65, 59–69, 2004.
- VARGIN, A.; TEPLYAKOV, A.. MolRep: An automated program for molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**. 30,1022-1025, 1997.

VASCONCELOS, I.M., OLIVEIRA, J.T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**. 44, 385–403, 2004.

WAH, D.A., ROMERO, A., DEL SOL, F.G., CAVADA, B.S., RAMOS, M.V., GRANGEIRO, T.B., SAMPAIO, A.H., CALVETE, J.J.. Crystal Structure of Native and Cd/Cd-substituted Diocleaguanensis Seed Lectin. A Novel Manganese Binding Site and Structural Basis of Dimer-tetramer Association. **J.Mol.Biol.** 310, 885-894, 2001.

WALSH M. Calcium-dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. **Biochem Cell Biol.** 20:771–800, 1991.

WATKINS, W.M., MORGAN, W.T.J.. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**. 169,825–826, 1952.

WU, A., SUN, X., PANG, Y., TANG, K.. Homozygous transgenic rice lines expressing GNA with enhanced resistance to the rice sap-sucking pest *Laodelphax striatellus*. **Plant Breeding**. 121: 93-95, 2002.

YAMAUCHI, D., NAKAMURA, K., ASAHI, T., MINAMIKAWA, T.. Nucleotide sequence of cDNA for concanavalin A from *Canavalia gladiata* seeds. **Plant Cell Physiology**. 30 (1):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**. 260(1):127-130, 1990.

YIM, M., ONO, T., IRIMURA, T.. Mutated plant lectin library useful to identify different cells. **PNAS**. 2222–2225, vol.98, no. 5, 2001.

YUAN, Z.Q., ZHAO, C.Y., ZHOU, Y., TIAN, Y.C.. Aphid-resistant transgenic tobacco plants expressing modified GNA gene. **Acta Botanica Sinica**. 43: 592-597, 2001.

ZHANG, L., HSU, C.H., ROBINSON, C.P.. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax in vitro. **Toxicol App Pharmacol**. v. 129, n. 1, p. 16-22, 1994.