



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

MARIA JÚLIA BARBOSA BEZERRA

RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LECTINA DE *Dioclea violacea*
Mart PARA ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA - FUNÇÃO

FORTALEZA

2011

MARIA JÚLIA BARBOSA BEZERRA

RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LECTINA DE *Dioclea violacea*
Mart PARA ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA - FUNÇÃO

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Coordenação do curso de Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade
Federal do Ceará como requisito
parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.**

**Orientador: Prof. Benildo Sousa
Cavada**

FORTALEZA

2011

MARIA JÚLIA BARBOSA BEZERRA

RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LECTINA DE *Dioclea violacea*
Mart PARA ESTUDO DA RELAÇÃO ESTRUTURA - FUNÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentada à Coordenação do Curso de Bioquímica e
Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Co-Orientador - UFC)

Prof. Dr. Plínio Delatorre (Examinador - UFPb)

À minha família

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus pela família maravilhosa, pela fé que me guia e por todas as oportunidades que me dá nessa vida.

Agradeço de forma mais que especial todo amor incondicional dos meus pais, José Humberto Bezerra e Wilca Barbosa Hempel. Exemplos que irei seguir para sempre. A vocês que são minha fortaleza meu, para sempre, muito obrigada.

Aos meus irmãos Déborah e Álisson que fizeram minha vida ser muito mais doce, ter muito mais graça. E ao meu cunhado Roberto pelo constante incentivo no mundo acadêmico.

Ao Felipe pelo amor e pelo apoio constante desde o início ao fim do mestrado. Agradeço pelas várias noites que ficou acordado até tarde, solidário, me dando força pra continuar os seminários e estudos. E pela vibração pelo meu trabalho e pelo meu futuro profissional.

Ao professor Benildo, pela honra que sinto de ser sua orientanda. Pelo grande incentivo e apoio durante tantos anos de orientação e principalmente por ensinar que não basta sonhar, mas que é preciso ter coragem para seguir seus sonhos. A ele meu muito obrigada.

Ao professor Bruno Anderson que mais do que meu co-orientador se tornou um grande amigo com quem pude contar diversas vezes. Obrigada por sua paciência e dedicação.

Ao professor Plínio Delatorre pelos ensinamentos de cristalografia e estrutura de proteínas e por aceitar participar da minha banca de defesa.

Ao meu “pai científico” Gustavo Arruda pela grande empolgação pela ciência que ele tem e transmite fazendo o impossível se tornar incrivelmente belo e fascinante e pela ajuda essencial na produção deste trabalho.

A minha “mãe científica” Taianá Oliveira por todo o carinho e por ser o exemplo que eu quero seguir sempre na vida acadêmica.

A professora Kyria e ao professor Celso por todo o apoio que me deram durante todos esses anos de convívio no BioMol-Lab.

A Raquel e a Camila pela amizade mais do que cultivada, por sempre me darem força nas horas de aperreio e por no fim rirem junto comigo quando tudo dá certo. E quando não dá também.

Aos grandes amigos Eduardo, Rafael e Júnior com quem dividi todos os ônus e os bônus dessa longa caminhada chamada mestrado. Obrigado pela força e pelo carinho. Nem imagino como teria sido sem vocês.

Por fim, agradeço a todos os amigos que fazem parte da família BioMol-Lab, lugar que por muito tempo freqüentamos mais do que nossas casas. Obrigada Tales, Helton, Ito, Raniere, Mayron, Alisson, Samia, Ana Claudia, Batista, Rômulo, Arthur, Kássia, Mayara T., Ivandra, Roniere, Mayara Q., Vanir, Vinicius, Rafael Q., Suzete, Fernando, Guilherme e Alfa.

E de todo coração, agradeço aos amigos de infância, aos amigos biólogos e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e para a produção deste trabalho.

RESUMO

As lectinas da subtribo Diocleinae pertencem à família de Leguminosae e são caracterizadas pela alta homologia entre suas sequências de aminoácidos. Apesar da alta similaridade estrutural o mesmo não acontece nas atividades biológicas das lectinas dessa família. Estudos mostram que a modificação de poucos aminoácidos em suas sequências é capaz de provocar grandes alterações nas atividades biológicas dessas lectinas, dessa forma o entendimento mais detalhado das estruturas tridimensionais dessas proteínas é essencial para a análise da relação entre estrutura e função. A lectina de *Dioclea violacea* foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. A proteína foi cristalizada na presença do ligante X-Man e os cristais foram obtidos pelo método de difusão de vapor em matriz esparsa por gota suspensa. Foram utilizando os kit “cristal screen” I e II da Hampton Research e a condição que obteve melhor cristal foi a condição 33 do kit I composta por 4M Formato de sódio. O cristal foi difratado a 2,61Å e apresenta grupo espacial I222 com cela unitária com dimensões de $a = 61,34$, $b = 66,11$, $c = 106,69$ Å e ângulos de $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Foi observada a presença de um monômero na unidade assimétrica contendo 42,04% de solvente no cristal. A substituição molecular foi feita utilizando a estrutura da lectina de *Dioclea rostrata* (PDB: 2ZBJ). O refinamento final obteve R_{factor} de 0,23 e R_{free} de 0,27 com ausência aminoácidos em regiões não permitidas do gráfico de Ramachandran. O ligante X-Man foi co-cristalizado e sua estrutura foi observada perfeitamente encaixada no domínio de reconhecimento a carboidratos. Em relação ao equilíbrio dímero tetrâmero, a lectina de *Dioclea violacea* apresenta o aminoácido HIS 131 e a posição da HIS 51 é semelhante ao mesmo aminoácido da *Dioclea grandiflora*, caracterizando esta lectina como tetrâmero mesmo em pH baixo. Foram feitas comparações entre as atividades biológicas de outras lectinas do gênero *Dioclea* e as distâncias entre os resíduos do sítio de ligação a carboidrato. Essa análise mostrou que a variação nessas distâncias influi no efeito e eficácia da atividade vasorelaxante em aorta de ratos.

PALAVRAS-CHAVES: Lectinas, *Dioclea violacea*, Cristalografia

ABSTRACT

Lectins from subtribe Diocleinae belong to the family from Leguminosae and are characterized by high homology among their amino acid sequences. Despite this high structural similarity the same is not true in the biological activities from this lectin family. Studies show that the modification of a few amino acids can cause large changes in biological activities of these lectins. Thus more detailed understanding of three dimensional structures of these proteins is essential for structure/function analyses. The *Dioclea violacea* lectin was purified by affinity chromatography on a column of Sephadex G-50. The protein was crystallized in the presence of the ligand X-Man and the crystals were obtained by the vapor diffusion method in hanging drop by sparse matrix. Crystallization kits “Crystal Screen I and II” from Hampton Research were used to obtain protein crystals and the better condition was 33 from kit I4 M sodium formate. The crystal was diffracted to 2.61 Å with space group I222 with unit cell dimensions $a = 61.34$; $b = 66.11$; $c = 106.69$ Å and $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. It was observed the presence of a monomer in asymmetric unit containing 42.04% of solvent in the crystal. The molecular replacement was made using *Dioclea rostrata* structure (PDB: 2ZBJ). The final refinement obtained R_{factor} of 0.23 and R_{free} of 0.27 in absence of any amino acid in regions not allowable in Ramachandran plot. The structure of X-Man was co-crystallized and observed perfectly placed in the carbohydrate recognition domain. Regarding the balance of the dimer-tetramer associations of plant lectins, the lectin from *Dioclea violacea* has the amino acid HIS 131 and the position of HIS 51 is similar to the same amino acid in *Dioclea grandiflora* lectin, characterizing these lectins as a tetramer even at low pH. It was made comparisons between the differences in biological activities of other lectins from Diocleinae and the distances of the residues from carbohydrate site. It was observed that differences in biological activities in vasorelaxant effects on vascular smooth muscle are probably related to the distances between the residues that compose the carbohydrate domain.

Keywords: Lectin, *Dioclea violacea*, crystallography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1 | Modificações pós traducionais na biossíntese das lectinas tipo ConA. Esquema do processo de permutação circular modificado a partir de Peumans Van Damme (1998)..... | 22 |
| FIGURA 2 | Esquema dos tipos de lectinas classificados por PEUMANS & VANDAMME em 1998..... | 24 |
| FIGURA 3 | Estrutura das lectinas representantes das sete famílias. 1. Abrina – RIP tipo II; 2. A. caudatus – Amarantina; 3. PHA-L – Leguminosa; 4. V. album – Ligante a quitina; 5. GNA – Monocotiledônealigante a manose; 6. Jacalina – Jacalinas..... | 25 |
| FIGURA 4 | Isomerização da ligação ALA 207 e ASP 208 nas lectinas de <i>Canavalia gladiata</i> e <i>Canavalia grandiflora</i> | 26 |
| FIGURA 5 | Esquema dos componentes do monômero de lectinas de leguminos..... | 28 |
| FIGURA 6 | Representação do sítio de ligação a metais conservados em lectinas de leguminosas..... | 29 |
| FIGURA 7 | Fotos da inflorescência e das sementes de <i>Dioclea violacea</i> | 32 |
| FIGURA 8 | (a) Gráfico da cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. A coluna foi previamente equilibrada e primeiramente eluída com 0,15M NaCl com 5mM CaCl ₂ e 5mM de MnCl ₂ . A proteína que interagiu com a coluna foi eluída com 0,15M NaCl com 5mM CaCl ₂ e 5mM de MnCl ₂ com 0,1M de glicose. (b) Gel de eletroforese SDS-PAGE da lectina purificada de <i>Dioclea violacea</i> . Poço 1 e 3 são as massas dos marcadores moleculares (A- fosforilase B 94.4 kDa; B- albumina sérica bovina 66 kDa; C- ovoalbumina 45,0 kDa; D- anidrase carbônica 29,0 kDa; E- mioglobina 17,5 kDa e F- lisozima 14,3 kDa. No poço 2 é a DioL composta pelas três subunidades α , β e γ . Adaptado de Moreira, 1996..... | 37 |
| FIGURA 9 | Esquema mostrando os elementos que constituem o método de difusão de vapor em gora suspensa. A figura mostra o poço da placa de Linbro contendo a solução de cristalização, a lamínula 22x22mm com a gota de proteína e solução de cristalização e o silicone entre a lamínula e o poço que veda o sistema evitando a evaporação rápida..... | 38 |
| FIGURA 10 | Diagrama representando a difração do cristal por raios X e a formação do padrão de difração..... | 39 |
| FIGURA 11 | Foto do cristal da lectina de <i>Dioclea violacea</i> obtido na condição 33 do Screen I da Hampton Research..... | 42 |

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 12 | Padrão de difração obtido do cristal de <i>Dioclea violacea</i> . | 43 |
| FIGURA 13 | Alinhamento das lectinas do gênero <i>Dioclea</i> . | 45 |
| FIGURA 14 | Gráfico de Ramachandran da estrutura final da lectina de <i>Dioclea violacea</i> calculado pelo programa MolProbit. | 47 |
| FIGURA 15. | Visão geral da estrutura tetramérica da lectina de sementes de <i>Dioclea violacea</i> com a presença dos metais Ca^{2+} em verde e Mn^{2+} em roxo e do ligante X-Man em rosa. | 48 |
| FIGURA 16 | Estrutura do monômero da lectina de <i>Dioclea violacea</i> . | 48 |
| FIGURA 17 | Sítio de ligação a metais da lectina de <i>Dioclea violacea</i> formado pelos resíduos, os metais Ca^{2+} e Mn^{2+} e as moléculas de água que fazem a ligação indireta dos metais com outros resíduos. | 49 |
| FIGURA 18 | Resíduo ASP 208 de DvoiL em diferentes conformações. Na proteína desmetalizada em verde (código PDB: 2GDF) e na proteína metalizada em azul. | 50 |
| FIGURA 19 | Representação dos resíduos PRO 206, ALA 207, ASP 208 e GLY 209 mostrando a conformação cis da ligação peptídica dos resíduos ALA 207 e ASP 208 importantes para a estabilização dos resíduos ASN 14 e ARG 228 do DRC. Em azul DVL e em rosa DRL. | 50 |
| FIGURA 20 | Localização das moléculas do aminoácido não protéico α -aminobutírico na interface do dímero. | 51 |
| FIGURA 21 | Estruturas sobrepostas de DVL em azul e DRL em roxo mostrando a conformação semelhante entre os resíduos que interagem com o Abu. | 52 |
| FIGURA 22 | Sobreposição dos resíduos HIS 131 de DVL em azul e Dgrand em verde. | 53 |
| FIGURA 23 | Sobreposição das estruturas de DVL em azul com as de Dgran em verde e Dgui em amarelo, mostrando a diferença na posição da HIS 51. | 54 |
| FIGURA 24 | Estrutura do tetrâmero da <i>Dioclea violacea</i> mostrando os resíduos HIS 51 e HIS 131 e a interação interdimérica formada por eles. | 54 |
| FIGURA 25 | Gráfico dos dados de ultracentrifugação analítica mostrando o comportamento tetramérico da lectina de <i>D.violacea</i> em pH maior do que 4,0 (CALVETE, 1999). | 55 |
| FIGURA 26 | Representação da densidade eletrônica no OmitMap da estrutura do X-Man. | 56 |
| FIGURA 27 | Molécula de X-Man interagindo com os resíduos que formam o sítio de ligação a carboidrato. | 56 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 28 Sobreposição dos resíduos presentes na DRC das lectinas DVL em azul, Dgrand em verde e Dgui em amarelo. É mostrado as moléculas de X-Man relativa a cada estrutura rosa de DVL, laranja de Dgui e cinza de Dgran..... | 58 |
| FIGURA 29 Superposição dos resíduos pertencentes ao sítio de ligação de carboidrato da DVL e DRL. Detalhe da dupla conformação apresentada pela leucina 99 da DVL..... | 58 |
| FIGURA 30 Representação dos resíduos do sítio de ligação a carboidrato de DVL em azul e de DRL em rosa e as distâncias..... | 59 |
| FIGURA 31 Gráfico do potencial de relaxamento do músculo liso de aorta de camundongo e a reversão da atividade das lectinas <i>D. violacea</i> e <i>D. rostrata</i> (RODRIGUES, 2010)..... | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----|---|----|
| 1. | Tipos de interfaces formadas durante oligomerização (SINHA, 2007)..... | 30 |
| 2. | Estatística dos dados de coleta..... | 44 |
| 3. | Estatística dos dados de substituição molecular e refinamento..... | 46 |
| 4. | Distâncias entre os resíduos do DRC e o X-Man..... | 57 |
| 5. | Distâncias entre resíduos do domínio de ligação a carboidratos de lectinas do gênero <i>Dioclea</i> | 59 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 Considerações gerais | 15 |
| 1.2 Histórico da cristalografia..... | 17 |
| 1.3 Lectinas..... | 18 |
| 1.3.1 Histórico de lectinas..... | 19 |
| 1.3.2 Lectinas de plantas..... | 21 |
| 1.3.3 Classificação..... | 22 |
| 1.3.4 Caracterização estrutural..... | 24 |
| 1.3.5 Lectinas de leguminosas..... | 26 |
| 1.3.6 Estrutura das lectinas de leguminosae..... | 27 |
| 1.3.7 Atividades biológicas de lectinas..... | 30 |
| 1.3.8 <i>Dioclea violacea</i> | 32 |
| 2. OBJETIVOS..... | 33 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 34 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 34 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 35 |
| 3.1 Purificação da lectina de <i>Dioclea violacea</i> | 36 |
| 3.2 Cristalização da DVL..... | 37 |
| 3.3 Coleta de dados..... | 38 |
| 3.4 Substituição Molecular..... | 39 |
| 3.5 Refinamento e Validação..... | 40 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 4.1 Cristalização da DVL..... | 42 |
| 4.2 Processamento de dados, substituição molecular e refinamento..... | 43 |
| 4.3 Estrutura tridimensional da DVL..... | 47 |
| 4.4 Relação dímero-tetrâmero da DVL..... | 53 |
| 4.5 Estrutura e função do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato..... | 55 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 61 |
| 6.BIBLIOGRAFIA..... | 63 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o avanço da tecnologia no meio científico foi visto que apenas o sequenciamento dos genes de diversas espécies com o estudo da genômica não seria capaz de responder a todas as perguntas biológicas como se esperava. Na busca de mais informações foram criadas subáreas da genômica como a genômica funcional e estrutural que visam o estudo sistemático dos genes e das proteínas expressas. A finalidade das análises gênicas é determinar a função biológica de cada produto gênico e a relação da função da proteína expressa. Essa análise é feita pela comparação da sequência da proteína de interesse com as de outras proteínas de função já conhecida utilizando as ferramentas da proteômica, termo criado em 1995 para descrever todas as proteínas que são expressas em um genoma (DI CIERO & BELLATO, 2009). No entanto, mesmo com os estudos de proteômica muitas perguntas ainda ficaram sem respostas.

Como ainda não é possível se resolver a estrutura de uma proteína apenas por sua sequência primária, outras técnicas são necessárias para resolver esse problema do enovelamento (PAWLOWSKI, BIERZYNSKI & GODZIK, 1996). Apesar de já ser estabelecido que a similaridade da sequência caracterize uma similaridade da estrutura, vários estudos provam que a modificação de poucos aminoácidos na sequência é responsável por modificações na estrutura tridimensional e com isso nas atividades biológicas dessa proteína.

Dessa forma a função da proteína se relaciona muito mais com sua estrutura tridimensional do que com sua sequência primária. Para resolver a estrutura tridimensional das proteínas e obter informações mais detalhadas fez-se necessário o uso das técnicas de cristalografia por difração de raios X ou Ressonância Magnética Nuclear (NMR). Sendo a primeira mais indicada por ser capaz de utilizar moléculas com até 10^6 Da, sendo favorável a uma maior quantidade de proteínas, já a NMR só pode ser utilizada em proteínas com peso molecular menor de 30.000 Da. (BLUNDELL, 1976). O objetivo do estudo estrutural das moléculas através de experimentos de raios X é determinar espacialmente a posição atômica de todos os átomos que constituem uma macromolécula biológica como, por exemplo, uma proteína.

A biologia estrutural teve seu início em 1930 quando os pesquisadores Linus Pauling e Robert Corey estudaram sobre a ligação peptídica e descobriram que a forma mais simples que uma cadeia polipeptídica pode assumir é a estrutura de α -hélice. Essa descoberta possibilitou a elucidação da estrutura tridimensional de diversas proteínas permitindo estudos

detalhados sobre diversos mecanismos de reações enzimáticas assim como processos de respostas imunológicas e de sinalização celular (ROPER, 2000; BARRE; 2001).

A cristalografia é uma ciência relativamente nova. A primeira difração protéica de raios X foi feita em 1934 por Bernal e Crowfoot em cristais de pepsina. Em 1937, M. F. Perutz obteve a estrutura cristalográfica da hemoglobina (BLUNDELL & JOHNSON, 1976).

Nos quinze anos seguintes foram desenvolvidas novas técnicas de análise da difração de moléculas por raios X e atualmente o número de proteínas resolvidas por difração de raios X tem aumentado rapidamente. Com o uso de computadores mais sofisticados e softwares com maiores capacidades de resolução ocorreu uma redução dramática no tempo gasto para resolver uma estrutura, assim como aumentou a precisão dos resultados (AZEVEDO, 2004).

Essa análise estrutural já deu origem a diversos prêmios Nobel, desde a descoberta dos raios X por Röntgen que ganhou o prêmio Nobel de Física em 1901, ao prêmio Nobel de Química mais recente, também envolvendo cristalografia, na descoberta da estrutura e função dos ribossomos por V. Ramakrishnan, em 2009, o que valida a extrema aplicabilidade desta técnica.

No campo da farmacologia, a cristalografia é atualmente de extrema importância para a indústria farmacêutica, pois permitiu que a produção de fármacos mudasse da tentativa e erro, onde milhares de compostos são sintetizados com o intuito de produzir alguns poucos eficazes, para uma produção racional, que utiliza essas informações estruturais para direcionar a produção de novos fármacos. Dessa forma é feita uma análise molecular do sítio ativo da enzima que atua em determinada doença para que esta seja inibida ou ativada por uma droga desenhada por métodos *in silico*. O composto sintetizado possui interação muito mais específica diminuindo assim os efeitos colaterais nos pacientes assim como os custos econômicos na síntese dos fármacos.

A tecnologia do DNA recombinante estimulou ainda mais a pesquisa da estrutura de diversas proteínas que previamente ao serem obtidas da fonte natural, possuíam pureza e rendimento ineficientes para a obtenção dos cristais. Outra aplicação dessa tecnologia é na modificação de proteínas por mutagênese sítio - dirigida que é utilizada em investigações científicas e na aplicação industrial. Neste caso a difração de raios X tem ação crucial para direcionar os biólogos moleculares na escolha de qual o melhor aminoácido a ser alterado, pois a modificação de certos aminoácidos tem interferência direta na estrutura tridimensional da proteína. Indústrias químicas e farmacêuticas fazem grandes investimentos nessa área pelo grande interesse no desenho de proteínas e de fármacos (DRENTH, 1994).

Um caso importante sobre essas suaves diferenças na sequência que influenciam em atividades biológicas ocorre nas lectinas purificadas de sementes de plantas da subtribo Diocleinae da família Leguminosae. As proteínas dessa família se caracterizam por possuírem alto grau de homologia e estudos comparativos mostram que a modificação de poucos aminoácidos nas sequências dessas proteínas causa diferenças significativas nas atividades biológicas tanto “*in vivo*” como “*in vitro*” (CAVADA, 2001).

Dessa forma o estudo da cristalografia de proteínas se torna fundamental na intenção de desvendar a estrutura tridimensional dos diversos tipos de proteínas, não só de lectinas, mas também de enzimas, anticorpos, transportadores moleculares, entre outras, e com isso somando aos estudos de atividades biológicas podem definir a exata função dessas proteínas nos sistemas.

Diversas lectinas já tiveram suas atividades biológicas avaliadas e com o uso da cristalografia é possível fazer comparações entre diversas estruturas relacionando suas atividades biológicas. Sendo as lectinas vegetais possuidoras de sequências homólogas e bastante conservadas, essa comparação pode definir quais dentre os poucos aminoácidos que se modificam ente as sequências são os responsáveis pelas atividades biológicas tão distintas.

1.2 HISTÓRICO DA CRISTALOGRAFIA

Em 1895, Wilhelm C. Röntgen construiu um tubo de raios catódicos envolvido em uma caixa e observou que após um tempo uma tela de cristal de platinocianidro de bário, distante do tubo, emitia fluorescência. Ele observou que a fluorescência não era devida à presença dos raios catódicos, visto que estes deveriam ser absorvidos pelo vidro, pela caixa e pelo ar da sala. Dessa forma Röntgen especulou que outro raio seria o responsável, como não sabia qual era, nomeou temporariamente como raios X. Pesquisando a capacidade de diversos materiais de pararem esses raios, ao testar o chumbo ele viu a primeira imagem radiográfica. A principal aplicação dos raios X, a radiografia, foi utilizada em hospitais e posteriormente em indústrias do mundo todo. Röntgen ganhou o prêmio Nobel em 1901 por essa descoberta.

Em 1912, M. Von Laue já conhecia, a partir dos experimentos de Röntgen, que o comprimento de onda dos raios X era da ordem de 10^{-8} cm. Ele suspeitou que um cristal servisse como uma grade ideal para experimentos de difração e juntamente com Friedrich e Knipping obteve sucesso com o primeiro diagrama de difração do cristal de sulfato de cobre, e em 1914 ganhou o prêmio Nobel pela difração de raios X por cristais.

W.H. Bragg e W.L. Bragg analisaram o trabalho de Laue tentaram explicar os pontos de difração produzidos por raios X. W.H. Bragg construiu um espectrômetro de raios X, o qual permitiu uma medida quantitativa das intensidades desses raios. Com esses estudos a dupla ganhou em 1915 o prêmio Nobel pelo uso de raios X para determinação da estrutura de cristais.

Vários avanços em bioquímica e biologia molecular têm sua origem em dados de cristalização e crescimento de cristais sendo os materiais biológicos tão antigos quanto à bioquímica. O primeiro surgimento de cristais de proteínas foi por volta de 1909 quando Funke, Hünefeld, Lehman e Teichman obtiveram cristais de hemoglobina de vários vertebrados e invertebrados, e isso indicou que os estudos de cristais trariam luz aos estudos da natureza de substâncias protéicas.

Em 1926 Sumner publicou a cristalização da uréase purificada de *Canavalia ensiformes* e posteriormente Northrop cristalizou a pepsina e uma série de outras enzimas proteolíticas. Outra conquista científica surgiu em 1935 quando Stanley cristalizou o vírus mosaico do tabaco. Influenciado pela concepção de Northrop sobre as enzimas, e utilizando métodos desenvolvidos para proteínas, ele preparou o vírus em um estado cristalino puro e mostrou que este mantém sua infectividade após várias recristalizações (DUCRUIX, 1992).

A primeira estrutura tridimensional de uma proteína a ser resolvida foi a de mioglobina em 1957 por M. Perutz e J. Kendrew que em 1962 ganharam o Prêmio Nobel de Química. Posteriormente milhares de outras proteínas foram cristalizadas e tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas e depositadas no Protein Data Bank (PDB), que atualmente contém 70.695 estruturas de proteínas depositadas.

1.3 LECTINAS

A descoberta das lectinas ocorreu a mais de um século, no entanto somente nos últimos vinte anos houve um avanço acentuado na lectinologia com o aumento do número de lectinas isoladas, caracterizadas e analisadas de acordo com suas atividades biológicas, de tal forma que se alcançaram definições mais claras a respeito de suas estruturas e funções.

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo já encontradas em fungos, vírus, bactérias, insetos, animais e plantas (MOREIRA *et al*, 1991), apresentando grande variedade de formas e tamanhos. Essas proteínas têm a capacidade de se ligarem a carboidratos atuando no reconhecimento específico de estruturas glicídicas diversas mediando

assim uma variedade de processos biológicos tais como interações célula-célula, renovação de glicoproteínas séricas e respostas imunes inatas (VIJAYAN & CHANDRA, 1999).

Após anos de estudos das propriedades e de caracterizações, atualmente a melhor definição para esse grupo de proteínas é que possuem a característica de serem proteínas de origem não imunológica que possuem pelo menos um sítio não catalítico de ligação a carboidratos, de forma específica e reversível, não alterando sua estrutura (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Essa definição faz esse grupo de proteínas possuírem uma vasta lista de propriedades biológicas, entre elas a capacidade de aglutinar eritrócitos e outras células como linfócitos, plaquetas, etc., além de induzir mitoses e efeitos citotóxicos sobre os linfócitos e aglutinação em vírus.

Um importante novo enfoque tem sido dado ao estudo de lectinas pelo reconhecimento a carboidratos, sendo estas moléculas conhecidas como portadoras de informações biológicas. Essas proteínas podem então ser analisadas como decodificadoras de glicocódigos (GABIUS, 2000) cuja interação com glicoconjugados intermédia processos biológicos de fundamental importância.

Diversos estudos relacionados às lectinas são realizados em diferentes áreas científicas, tendo se chegado à conclusão de que sua principal importância está centrada em suas propriedades biológicas, tendo sido encontradas envolvidas em intrincados processos bioquímicos e biológicos.

1.3.1 HISTÓRICO DE LECTINAS

Os primeiros relatos de atividade causada por lectina ocorreram em 1860, nos estudos realizados por S. Weir Mitchell em seus experimentos com a cobra da espécie *Crotalus durissus* (MITCHELL, 1860 e 1886). Foi provado que o veneno desta cobra possuía a capacidade de aglutinar eritrócitos. Em 1902 esta atividade foi confirmada por Simon Flexner & H. Noguchy, quando relataram com mais detalhes a aglutinação. (KILPATRICK, 2002).

Já as lectinas vegetais foram primeiramente descobertas e isoladas por Stillmark em 1888, quando ele estudava a toxicidade de semente de mamona (*Ricinus communis*) em sua tese de doutorado, e verificou que ao misturar eritrócitos com o extrato dessa semente ocorria hemaglutinação. A esta proteína foi dado o nome de ricina. Posteriormente, H. Hellin identificou efeitos semelhantes aos da ricina em proteínas de sementes de jiquiti (*Abrus*

preparatorius), que também eram tóxicos. A nova hemaglutinina foi nomeada de abrina. Essas duas proteínas foram eficientemente utilizadas nos estudos que estabeleceram os princípios de imunologia feitos por Paul Ehrlich em 1891. Ele observou que essas proteínas quando injetadas em ratos estimulavam a produção de anticorpos que inibiam a sua toxicidade e inibiam sua atividade aglutinante. Os anticorpos eram mais específicos e mais fáceis de utilizar do que antígenos de bactérias para elucidar a ação de antígenos e anticorpos.

O termo fitohemaglutinina foi primeiramente proposto por Elfstrand em 1898, referindo-se a proteínas hemaglutinantes vegetais. Karl Landsteiner, em 1900, descobriu as diferenças dos eritrócitos do grupo sanguíneo humano utilizando lectinas e criou o sistema ABO (WATKINS, 1999).

Em 1907, Landsteiner e Raubitschek reportaram pela primeira vez a presença de lectinas não-tóxicas em leguminosas como *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa*, demonstrando que a idéia de que a toxicidade não é uma propriedade intrínseca da proteína.

No ano de 1908, Landsteiner com a ajuda de H. Raubitschek testaram as atividades extratos de diferentes sementes com eritrócitos de diferentes animais e demonstraram que os extratos possuíam atividades variadas. Esse foi o primeiro indicio de que cada lectina possui capacidade hemaglutinante diferente uma das outras.

Dando continuidade á lectinologia, outra descoberta, em 1919, foi feita por James B. Summer que isolou do feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) uma proteína chamada de Concanavalina A. Duas décadas depois Summer e Howell em 1936, descobriram que a Concanavalina A era capaz de aglutinar tanto células como eritrócitos, assim como precipitar glicogênio em solução. Eles também mostraram que a sacarose foi capaz de inibir a atividade dessa proteína, demonstrando pela primeira vez a especificidade de lectinas por açúcares. Desde então diversos outros pesquisadores já conseguiram purificar e caracterizar diversas outras lectinas.

A descoberta da seletividade das lectinas por eritrócitos foi o principal motivo para a introdução no novo termo lectina (*legere*, do latim, significando escolher, selecionar) dado por C. Boyd e Elizabeth Shapleigh em 1954, para definir proteínas vegetais não só pela sua capacidade aglutinadora como também pelo seu sentido de selecionar especificamente essa interação.

O enfoque dos estudos sobre lectinas sofreu uma grande mudança quando em 1960, Peter C. Nowell mostrou que a lectina do feijão - mulatinho (*Phaseolus vulgaris*) apresentava ação mitogênica, estimulando linfócitos a entrarem em mitose. Isto teve impacto

não só na imunologia, mas também fez com que as lectinas passassem a ser aplicadas em estudos biomédicos.

1.3.2 LECTINAS DE PLANTAS

As Lectinas são proteínas que se tratando em um caráter filogenético, estão extremamente difundidas, estando presentes em todas as classes e famílias de seres vivos, desde bactérias e vírus até mamíferos (LIENER, 1986).

Em plantas, as lectinas têm sido isoladas principalmente de leguminosas (SHARON & LIZ, 1990; CAVADA, 1993; CALVETE, 1998) sendo encontrada em diferentes gêneros, principalmente na sub-família *Papilionoideae*. Essas proteínas são em grande parte encontradas nas sementes, geralmente em vacúolos de armazenamento protéico conhecidos como corpos protéicos. No entanto, podem estar presentes também em outras partes da planta como raízes, flores, folhas e casca. (VAN DAMME, 1998; ETZLER, 1996)

As lectinas de vegetais superiores têm sido as mais estudadas, tendo em vista a grande disponibilidade de sementes e sua facilidade de isolamento. Na classe das angiospermas, a família Gramineae possui o maior número de lectinas isoladas e caracterizadas entre as monocotiledôneas. Entre as dicotiledôneas, a classe das Magnoliatae tem sido amplamente estudada com lectinas isoladas de suas sementes e dos tecidos vegetativos (PEUMANS, 1986; LIENER, 1986).

A biossíntese dessas proteínas é devido a um processo chamado de permutação circular que é conhecido em bactérias, mas nos eucariotos é exclusivo das lectinas tipo ConA, podendo a maioria das lectinas da tribo Diocleinae apresentar o mesmo processamento. Neste evento a proteína é traduzida como uma pré-pro-lectina formada pela sequência ligada a um peptídeo sinal e um segmento glicosilado. No retículo endoplasmático a proteína perde o peptídeo sinal se transformando em pro-lectina. No complexo de Golgi esta pro-lectina sofre uma quebra proteolítica perdendo um segmento glicosilado de quinze aminoácidos localizado no centro de sua estrutura e também um peptídeo próximo a região do C terminal. Esta quebra libera energia suficiente para que ocorra uma nova ligação posterior. Após esta quebra a cadeia inicial é dividida em dois fragmentos contendo o C-terminal chamada de β e a do N-terminal chamada de γ que são religadas após haver uma inversão entre as regiões N e C terminal. A nova ligação peptídica que liga os fragmentos se localiza entre os fragmentos 118 e 119 da lectina madura. Após a junção dessas duas cadeias é formada a cadeia α . Essa reação

é catalisada por uma asparaginil endopeptidase. No final da reação a lectina madura é composta por 60% da cadeia polipeptídica α de 237 aminoácidos, e 40% dos seus fragmentos β , do aminoácido 1 ao 118 com 14kDa e γ , do aminoácido 119 ao 237 com 12kDa. A cadeia α e seus fragmentos β e γ são observados em eletroforese em gel de poliácridamida nas lectinas de Diocleinae (Figura 1).

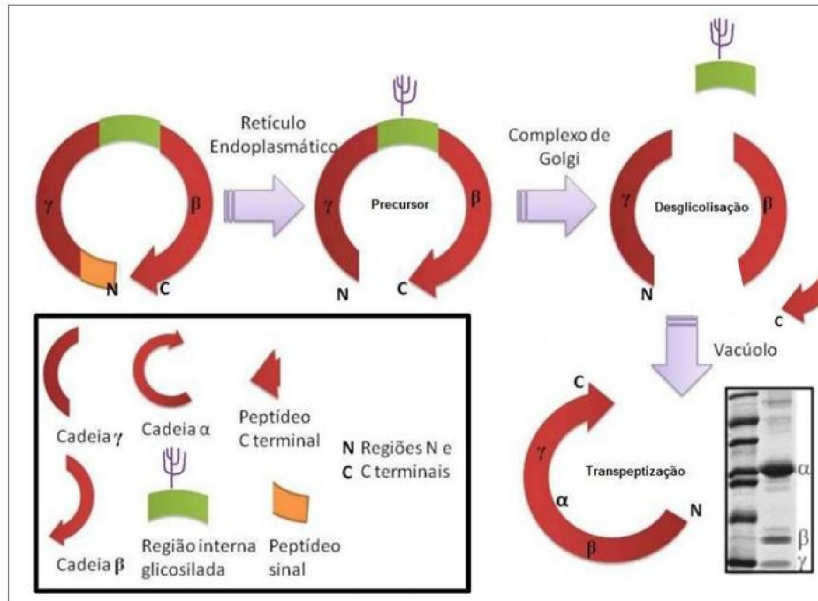


Figura 1. Modificações pós traducionais na biossíntese das lectinas tipo ConA. Esquema do processo de permutação circular modificado a partir de Peumans Van Damme (1998).

1.3.3 CLASSIFICAÇÃO

Analisando todas as características já observadas das lectinas, Peumans & Van Damme são os autores da atual e mais utilizada definição. Eles consideram que uma proteína é dita lectina quando apresenta pelo menos um domínio não-catalítico que se ligue reversível e especificamente a carboidratos. A partir dessa definição eles subdividiram, em 1995 e em 1998, as lectinas em **Merolectinas**, **Hololectinas**, **Quimerolectinas** e **Superlectinas**, mostradas na Figura 2. Essa sub-divisão segue de acordo com as diferentes maneiras de comportamento das proteínas tanto em relação de suas propriedades aglutinantes como de sua capacidade de interagir ou precipitar oligoconjugados.

As **merolectinas** são proteínas monovalentes possuindo apenas um sítio de ligação a carboidratos, não sendo capaz de aglutinar glicoconjugados ou células e não apresentando atividade hemaglutinante nem atividade catalítica. Exemplos desse grupo é a Heveína uma proteína quitina-ligante encontrada no látex da seringueira (VAN PARIJIS, 1998), e as proteínas manose-ligantes, presente em orquídeas, citado por (VAN DAMME, 1998).

As **hololectinas** possuem dois ou mais domínios homólogos ou idênticos que se ligam ao mesmo açúcar ou açúcares estruturalmente semelhantes, podendo assim aglutinar células ou glicoconjugados. Neste grupo estão presentes hemaglutininas em geral. Exemplos são a ConA, lectina de *Canavalia ensiformes* e a ConBr de *Canavalia brasiliense*.

As **quimerolectinas** correspondem ao grupo que contém proteínas que além da capacidade de se ligar a carboidratos, como as mero e hololectinas, possuem outro domínio que apresenta atividade catalítica ou outra atividade biológica, em outro sítio de ligação de ação independente. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidrato essas proteínas podem ou não apresentar atividade hemaglutinante. Exemplos desse grupo são as RIP's ("Ribosome Inactivating Proteins"), como a abrina e a ricina e outro exemplo de quimerolectina é a PPL2.

As **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 diferentes. A lectina de Tulipa é um exemplo desse grupo (VAN DAMME, 1998).

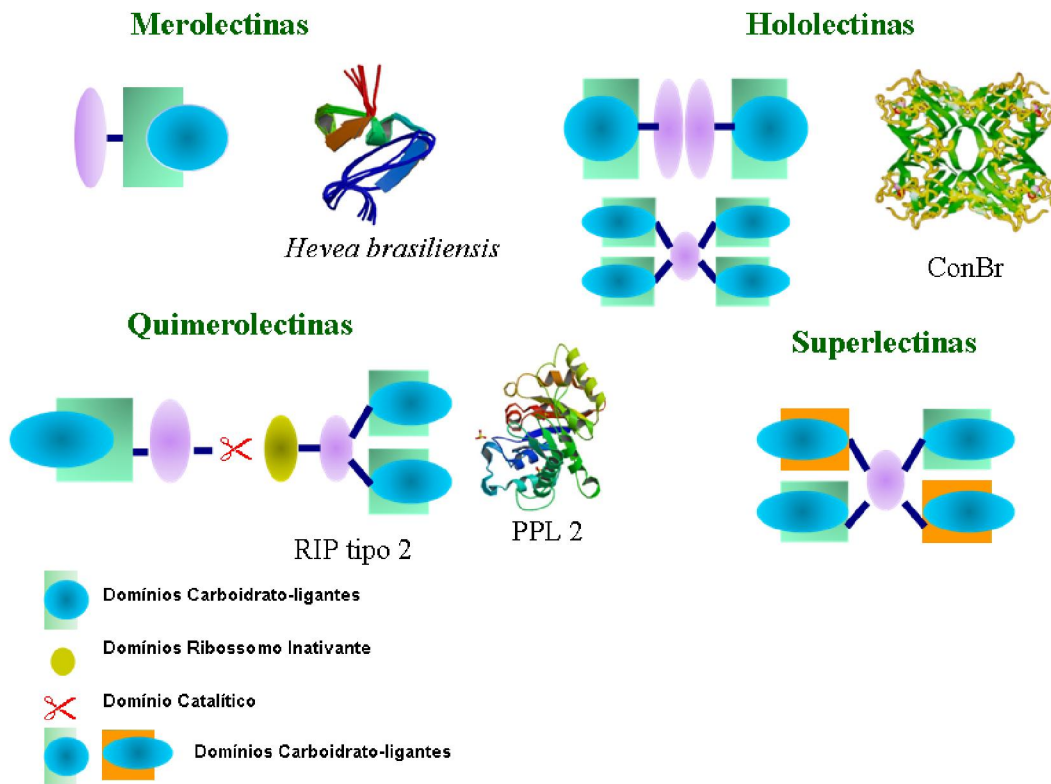


Figura 2: Esquema dos tipos de lectinas classificados por PEUMANS & VANDAMME em 1998.

1.3.4 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

Com os avanços da ciência principalmente das técnicas de biologia molecular, seqüenciamento de proteínas e com a análise estrutural por difração de raios X, foi possível de ser feita outra caracterização a partir da determinação das estruturas primárias e terciárias, de acordo com a análise das seqüências e caracterização físico-química de várias lectinas. Dessa forma foi feita uma divisão dessas moléculas em sete grupos distintos e evolutivamente relacionados (PEUMANS, 2000). Foram criadas as seguintes famílias de lectinas vegetais: lectinas de leguminosas, lectinas quitina-ligantes, lectinas do tipo RIP tipo II, lectinas de monocotiledôneas manose-ligantes, lectinas relacionadas à jacalinas, as lectinas das amarantinas e as lectinas de floema de curcubitacea (VAN DAMME, 1998). A Figura 3 mostra as estruturas das lectinas representante de cada família, no entanto ainda não foi resolvida nenhuma estrutura da família das lectinas de floema de curcubitacea.

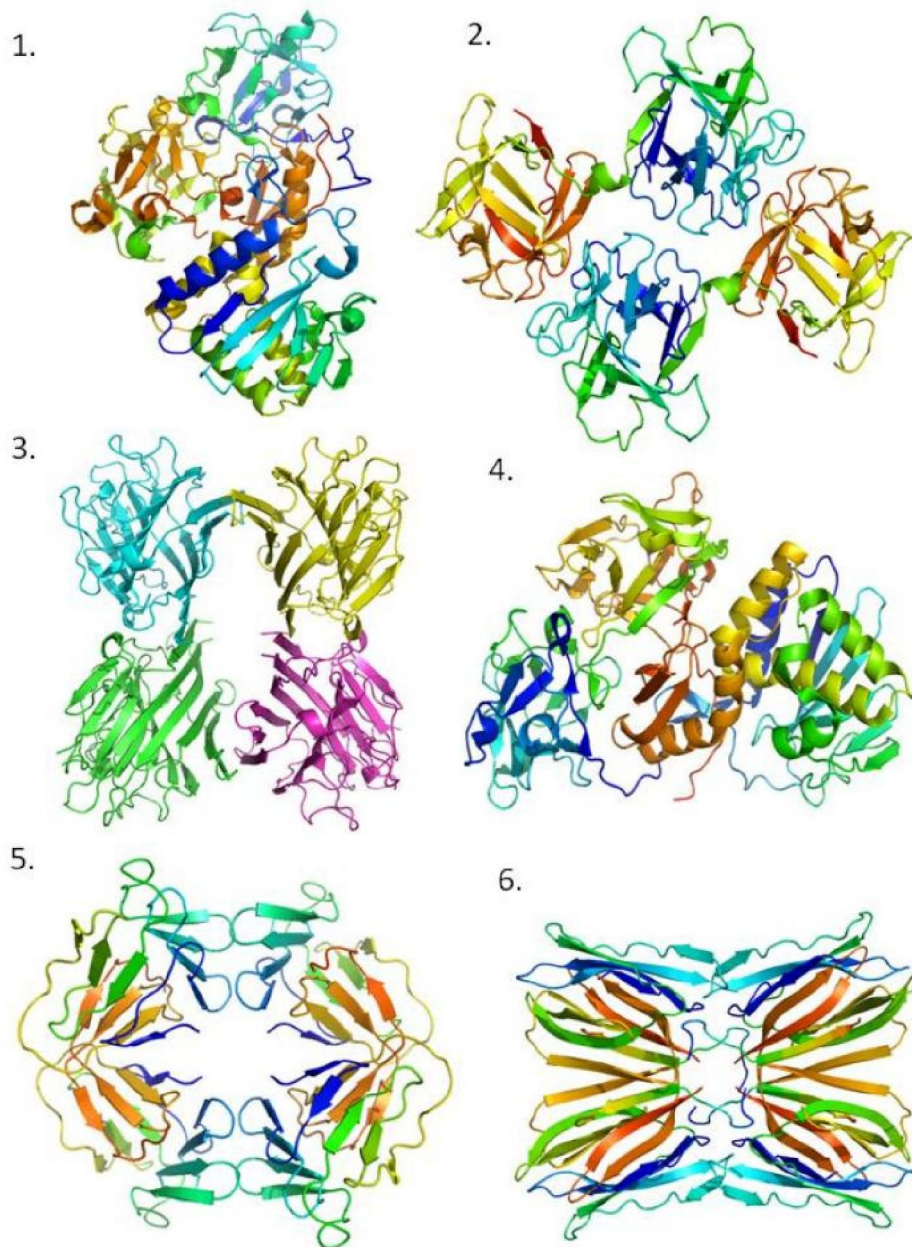


Figura 3. Estrutura das lectinas representantes das sete famílias. 1. Abrina – RIP tipo II; 2. *A. caudatus* – Amarantina; 3. PHA-L – Leguminosa; 4. *V. album* – Ligante a quitina; 5. GNA – Monocotiledônealigante a manose; 6. Jacalina - Jacalinas

Nessa classificação essas famílias possuem não só a estrutura tridimensional conservada, mas também os sítios de ligação a carboidratos, o que determina as especificidades muito similares dentro dessas famílias de lectinas.

1.3.5 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

A família leguminosa não só possui as lectinas mais estudadas no mundo, como é responsável pelo grande avanço nos estudos de lectinologia, a exemplo da lectina ConA purificada de *Canavalia ensiformes* que além de ser a mais estudada no mundo foi a primeira em que evidenciaram que lectinas se ligam a carboidratos (SUMNER & HOWELL, 1936). Outro exemplo é a lectina de *Phaseolus vulgaris* PHA responsável pelo conceito de lectinas como proteínas biologicamente ativas (NOWELL, 1960).

De forma geral as lectinas da família Leguminosa se caracterizam por serem tetraméricas na forma ativa com cada monômero apresentando massa molecular aparente entre 25-30 kDa. Cada monômero possui um sítio de ligação a carboidrato próximo aos resíduos de aminoácidos que se ligam aos íons metálicos Ca^{++} e Mn^{++} que possuem função de estabilizar a estrutura protéica mantendo a capacidade desta se ligar ao carboidrato. O efeito chave provocado pelos íons metálicos no domínio de ligação a carboidrato (DRC) é a isomerização da ligação peptídica entre alanina 207 e o aspartato 208 de trans para cis, mostrada na figura 4, onde o aspartato 208 é movido para uma região que favorece a ligação ao carboidrato. Foi visto que na estrutura as ConA desmetalizada o aspartato 208 se apresenta afastado do DRC (LORIS, 1998).

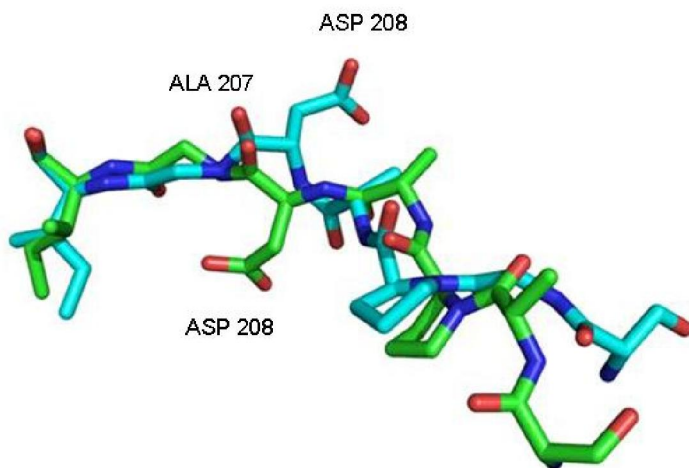


Figura 4. Isomerização da ligação ALA 207 e ASP 208 nas lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia grandiflora*.

A ligação da proteína com o carboidrato se dá principalmente por interações apolares entre as porções apolares do açúcar e os resíduos de aminoácidos aromáticos como tirosona e fenilalanina. As pontes de hidrogênio formadas entre as hidroxilas dos carboidratos

com as cadeias laterais e forças de Van der Waals também são responsáveis pelas interações proteína - carboidrato (LORIS, 1998; NAISMITH & FIELD, 1996).

Em relação a especificidade do sítio de ligação a monossacarídeos as lectinas da família Leguminosae podem ser divididas em cinco grupos: específicas a fucose, específicas a N-acetilglicosamina GlcNAc ou GlcNAc(b1-4)GlcNA, específicas a glicose/manose, específicas a galactose/N-acetilgalactosamina e as específicas a carboidratos complexos (SHARON & LIS, 1990). Esta especificidade é altamente utilizada em processo de purificação das lectinas em cromatografias de afinidade em que a matriz é constituída pelo seu açúcar específico.

1.3.6 ESTRUTURA DAS LECTINAS DE LEGUMINOSEAE

De acordo com o que já foi citado acima, as lectinas de leguminosas são geralmente diméricas ou tetraméricas formadas por monômeros de massa molecular aparente de 25-30 kDa, possuem em cada monômero um sítio de ligação a carboidratos e são proteínas dependentes de metais.

Os monômeros destas lectinas são bastante semelhantes e podem ser descritos como uma estrutura β -sanduíche que é formada por três folhas β de fitas antiparalelas. A primeira é uma folha plana de seis fitas chamada de folha anterior, a segunda é uma folha curva de sete fitas chamada de folha frontal e a terceira liga as outras duas e é uma pequena folha β formada por cinco fitas. Este enovelamento terciário é chamado de “jelly-roll”. O sítio de ligação a carboidratos se localiza no lado côncavo do β -sanduíche, formado pela folha β frontal curva ao lado dos sítios de ligação a metais (HAMELRYCK, 1998).

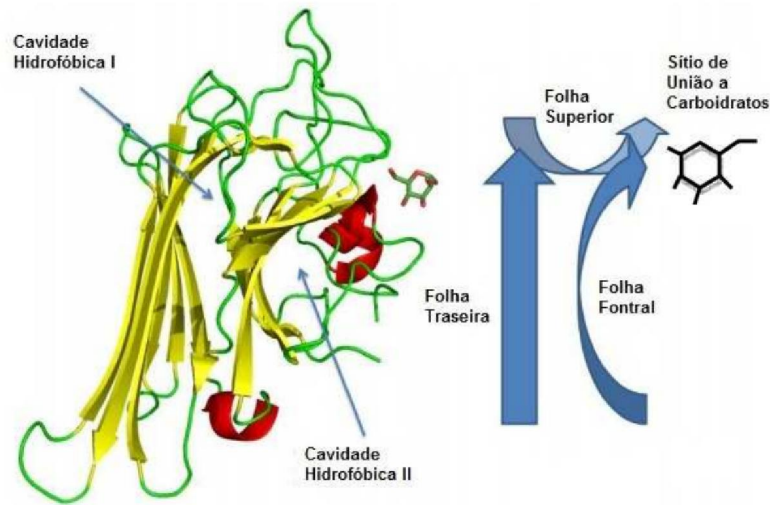


Figura 5. Esquema dos componentes do monômero de lectinas de leguminosa

O sítio de reconhecimento a carboidrato é formado por diversos “loops” com diferentes graus de variabilidade (SHAMA & SUROLIA, 1997). O domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) é composto pelos resíduos TRY 12, ASN 14, ASP 16, LEU 99, TRY 100, ASP 208 e ARG 228. (HARDMAN & AINSWORTH, 1976). Estes resíduos são altamente conservados em estruturas de Diocleinae. Estes resíduos abrangem uma região de “loop” (97-102) que possivelmente é a responsável por determinar a especificidade pelos monossacarídeos das lectinas de leguminosas (LORIS, 1998).

A importância do sítio de ligação a metais está em estabilizar esses loops permitindo a capacidade destes se ligarem aos carboidratos (LORIS, 2004). Como a atividade de se ligar a carboidratos só ocorre na presença dos íons de metais de transição, no caso Ca^{2+} e Mn^{2+} as lectinas são caracterizadas como metaloproteínas.

A comprovação do papel fundamental do sítio de ligação a metais para a formação do sítio de ligação a carboidratos é a alta conservação dos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com os metais em todas as lectinas de leguminosas (VAN DAMME, 1998). Os resíduos que interagem com o Ca^{2+} são ASP 10, ASN 14, ASP 19, TYR 12, duas moléculas de água e os resíduos ASP 208 e ARG 228 que interagem indiretamente, pois cada um interage com duas moléculas de água que interagem com o metal. Na interação com o Mn^{2+} estão envolvidos os resíduos GLU 8, ASP 10, ASP 19, HIS 24, duas moléculas de água e assim como o Ca^{2+} existem dois resíduos, VAL 32 e SER 34, que fazem interação com as águas que interagem com o metal atuando de forma indireta (Figura 6). Interessante observar

que os resíduos ASP 10 e ASP 19 estão envolvidos com os dois íons (HARDMAN & AINSWORTH, 1972).

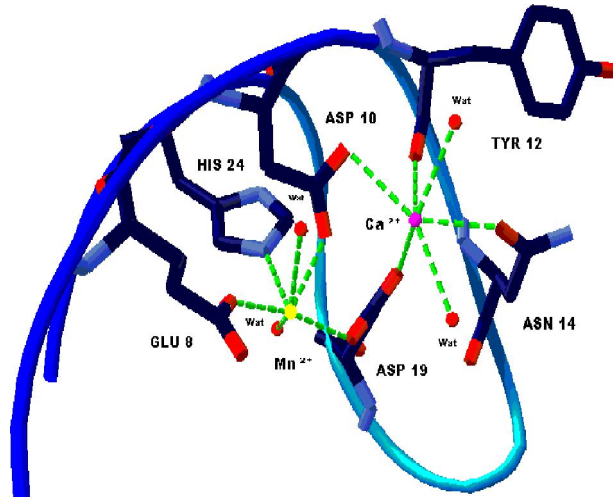


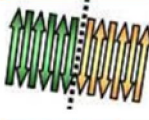


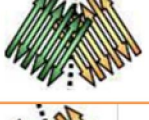
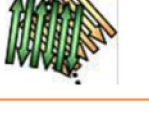
Figura 6. Representação do sítio de ligação a metais conservados em lectinas de leguminosas.

A estrutura quaternária das lectinas é formada por dímeros ou tetrâmeros formados por dímeros de dímeros. Cada subunidade possui um domínio de ligação a carboidrato e interage entre si por ligações não covalentes. Os arranjos quaternários dessa podem ser classificados de acordo com sete interfaces diméricas diferentes mostradas na tabela 1 (SINHA, 2007). A oligomerização entre as estruturas diméricas ou tetraméricas é principalmente mediada por interações das folhas β plana da parte de trás entre diferentes subunidades o que forma diferentes tipos de interfaces.

O tipo de interface encontrado nas lectinas da subtribo Diocleinae é o chamado dímero canônico também conhecido como associação Tipo II. Esta interface é estabilizada principalmente por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. O dímero canônico é formado pela associação lado a lado de duas folhas β anteriores, uma de cada monômero, formando por fim uma folha β contínua de dose fitas gerando uma estrutura rígida.

Nos últimos anos ocorreu um grande aumento no número de estruturas de lectinas resolvidas e a análise dessas estruturas vem possibilitando o aprofundamento dos estudos da interação lectina - carboidrato a nível molecular. As estruturas de lectinas também mostram que cada família de lectinas possui um enovelamento particular e característico (PEUMANS, 2000).

Tabela 1- Tipos de interfaces formadas durante oligomerização. (SINHA, 2007)

| 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 ECor1 e dímeros de WBA I e II |  |
| Interface X4 ou "costa com costa" | Exibido em GS4, GS1 e PNA |  |

1.3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE LECTINAS

Apesar das lectinas terem sido descobertas desde 1888 após os estudos com sementes de *Ricinus comunis* por Stillmark, a lectinologia só obteve avanço nos últimos vinte anos. Desde então, estudos mais aprofundados têm sido feitos sobre a capacidade de se ligarem a carboidratos simples e complexos, caracterizando estas proteínas como decodificadoras de glicocódigos (GABIUS, 2000). Diversas atividades biológicas estão relacionadas com a interação da lectina com os açúcares presentes nas superfícies celulares. Para comprovar a participação do domínio lectínico são feitos testes utilizando o açúcar específico da lectina para inibir sua ação. Os estudos relacionados ao reconhecimento celular pelas interações dos carboidratos em solução e em superfícies celulares têm contribuído notavelmente nos estudos da glicobiologia (SHARON & LIS, 1989).

Em plantas a real função das lectinas ainda não é totalmente entendida, mas há um forte indício que o papel principal seja como proteínas de reserva dado a grande quantidade presente nas sementes e que esta concentração diminui gradualmente ao longo da germinação (DA SILVA, 2000)

O fato das lectinas possuírem especificidade por carboidratos complexos não encontrados em vegetais, serem estáveis em variações de pH e temperatura além de resistirem

a degradação por proteases de insetos e outros animais, são provas que tais proteínas atuam em processos de defesa vegetal, além de provocar efeitos tóxicos contra predadores e patógenos (CAVADA,1993). Já foi mostrada também a participação de lectinas em resposta a estresses abióticos, sendo observado o aumento da síntese protéica em plantas que sofreram estresse de temperatura, hídrico, osmótico e oxidativo (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; BABOSHA, 2008).

Outra atuação importante dessas lectinas está no envolvimento do reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio com o propósito de facilitar a formação de cordões de infecção, a subsequente nodulação e o estabelecimento da simbiose entre a planta e o microorganismo (RUDIGER & GABIUS, 2001).A grande conservação dessas proteínas durante a evolução das leguminosas é uma evidencia que elas atuam de forma similar e principalmente que conferem grandes vantagens adaptativas a essas espécies. (MOREIRA, 1996).

Pela capacidade de interação com glicoconjugados, as lectinas são utilizadas como ferramentas valiosas nos estudos de processos farmacológicos de fundamental importância como: no processo de adesão de vírus, bactérias e protozoários às células de hospedeiro (SHARON & LIS, 2004), controle e tráfego de glicoproteínas presentes no sistema circulatório, adesão de agentes infecciosos em células hospedeiras, recrutamento de leucócitos para os locais de infecção, função antiinflamatória em mamíferos pela inibição da produção de citocinas (NAPIMOGA, 2007), efeito antidepressivo pela modulação do sistema nervoso central (BARAUNA, 2006), entre outros. A capacidade de aglutinação não ocorre apenas com eritrócitos, mas também leucócitos, fibroblastos e células tumorais são aglutinadas pelas lectinas (BEUTH, 1995; GOLDSTEIN, 1990).

As lectinas de plantas isoladas dos gêneros *Dioclea*, *Canavalia* e *Cratylia* apesar da elevada homologia estrutural possuem grandes diferenças em suas atividades biológicas, assim como em potência e eficácia em uma dada resposta. Nos processos inflamatórios as lectinas podem apresentar respostas anti ou pró-inflamatórias dependendo da via de administração utilizada. Em estudos de nocicepção foi observado que as lectinas de *Dioclea violacea*, *Dioclea guianensis*, *Canavalia marítima*, *Canavalia grandiflora*, pertencentes subtribo Diocleinae, eram capazes de inibirem as contorções abdominais induzidas por ácido acético se administradas por via oral (HOLANDA, 2009). Já por via endovenosa tanto a lectina de *Canavalia boliviana* como de *Canavalia grandiflora* são capazes de inibir a nocicepção (NUNES, 2009).

1.3.8 *DIOCLEA VIOLACEA*

Seu nome científico é *Dioclea violacea* Mart. ex Benth mas é conhecida popularmente como cipó-de-imbiri, coroanha, micunã, mucuná-assú, olho-de-boi e pó-de-mico. A planta é uma trepadeira lenhosa nativa do Brasil. As folhas são compostas por três folíolos elípticos ovalados. Possuem inflorescência em forma de espiga, longa e com flores roxas e de pétalas branco-amareladas na base. Os frutos são vagens grandes e lenhosas coberta por pêlos dourado-castanho, contendo várias sementes grandes, duras e de cor castanho-marrom de forma achatado globosa (LORENZI, 1999). As sementes são utilizadas popularmente como calmante nervoso, tônico, parasiticida e formicida. A medicina fitoterápica aposta em suas propriedades medicinais para prevenir derrames e remover seqüelas do mesmo além de ser indicado em casos de epilepsia.



Figura 7. Fotos da inflorescência, da vagem e das sementes de *Dioclea violacea*.

TAXONOMIA:

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Sub-classe: Rosidae

Ordem: Fabales

Família: Leguminosae

SubFamília: Papilionoideae

Tribo: Phaseoleae

Sub-tribo: Diocleinae

Gênero: *Dioclea*

Espécie: *Dioclea violacea*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Cristalizar, resolver e caracterizar estruturalmente uma lectina de *Dioclea violacea* e fazer uma análise de modo a aumentar os conhecimentos sobre a relação estrutura – função das lectinas de Diocleinae.

2.2 Objetivos específicos

- Cristalizar a lectina de *Dioclea violacea* pelo método de difusão de vapor;
- Difratar o cristal e obter o conjunto de padrões de difração;
- Resolver e refinar a estrutura da lectina de *Dioclea violacea*;
- Analisar a presença de ligantes na estrutura resolvida;
- Fazer a comparação da estrutura e função desta lectina com outras de Diocleinae;
- Depositar a estrutura da lectina de *Dioclea violacea* no PDB;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Purificação da lectina de DVL

A purificação da lectina de *Dioclea violacea* (DVL) foi feita seguindo o protocolo publicado por Moreira e colaboradores em 1996. As sementes foram coletadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e foram descascadas e moídas em moinho elétrico e peneiradas até a produção de uma farinha fina. Esta foi ressuspensa em 0,1 M Tris-HCl pH 6,0 com 0,1 M NaCl na proporção de 1:10, m/v e colocada em agitação contínua por três horas a temperatura ambiente. Em seguida o extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 20 minutos à 7 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado e submetido a um fracionamento protéico por sulfato de amônio a 80% de saturação por quatro horas e em agitação a temperatura ambiente. A fração 20-80 foi novamente centrifugada a 10.000 x g por 20 minutos à 7 °C e o precipitado foi ressuspensa e dialisado exaustivamente contra 0,15 M de NaCl com 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MnCl₂. Posteriormente foram feitos ensaios de concentração de proteína pelo método de Bradford (1976) e ensaios de hemaglutinação utilizando sangue de coelho e sangue humano dos tipos A, B e O tratados e não tratados com enzimas. Logo após o material recém dialisado foi aplicado em uma coluna de Sephadex G-50 previamente equilibrada com 0,15 M NaCl com 5 mM CaCl₂ e 5 mM MnCl₂. O material que não interagiu com a matriz cromatográfica foi eluído com este mesmo tampão e a lectina foi eluída com 0,15 M NaCl com 5 mM CaCl₂ e 5 mM MnCl₂ contendo 0,1 M glicose. Foram feitas medidas de absorvância a 280nm para acompanhar a saída da proteína da matriz cromatográfica. O pico retido desta cromatografia foi dialisado, liofilizado e armazenado. O gráfico da cromatografia em Sephadex G-50 é mostrado na figura 8.

A lectina purificada passou por uma análise de presença de carboidrato pelo método do fenol-ácido sulfúrico provando que a lectina de *Dioclea violacea*, assim como outras da sub-tribo *Diocleinae*, não é uma glicoproteína.

Foi verificada também a dependência de íons metálicos na atividade hemaglutinante da lectina fazendo diálises exaustivas da lectina purificada contra 0,2 M de EDTA seguida de outras diálises contra 0,1 M de NaCl. Foi visto que não houve atividade hemaglutinante da lectina após o tratamento com o EDTA e que só foi possível retomar esta atividade com a adição de ambos os metais Ca²⁺ e Mn²⁺.

Após a cromatografia foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE seguindo a metodologia de Laemmli (1970) para observar a pureza da amostra (figura 8). Foi observada a presença de três subunidades com massa molecular aparente de 29,5; 15,8 e 11,7 kDa

relativas as cadeias intacta α e os fragmentos β e γ derivados do processo pos-traducional das lectinas de *Diocleinae*. Este comportamento é similar em todas as lectinas desta sub-tribo.

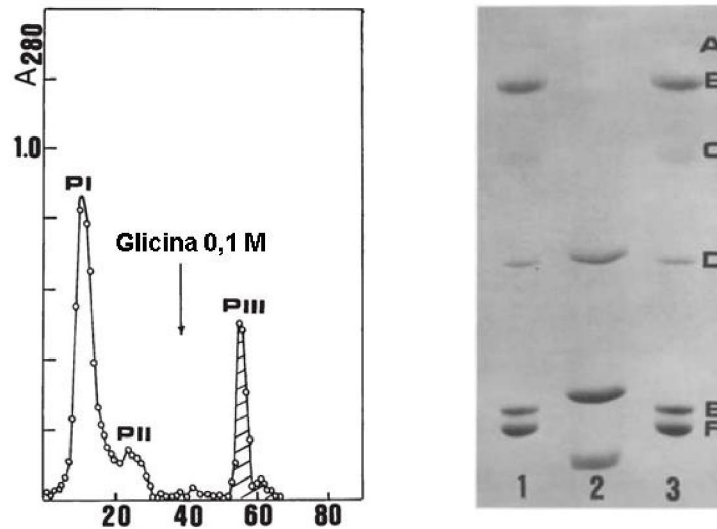


Figura 8. (a) Gráfico da cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. A coluna foi previamente equilibrada e primeiramente eluída com 0,15 M NaCl com 5 mM CaCl_2 e 5 mM de MnCl_2 . A proteína que interagiu com a coluna foi eluída com 0,15 M NaCl com 5 mM CaCl_2 e 5 mM de MnCl_2 com 0,1 M de glicose. (b) Gel de eletroforese SDS-PAGE da lectina purificada de *Dioclea violacea*. Poço 1 e 3 são as massas dos marcadores moleculares (A- fosforilase B 94,4 kDa; B- albumina sérica bovina 66 kDa; C- ovoalbumina 45,0 kDa; D- anidrase carbônica 29,0 kDa; E- mioglobina 17,5 kDa e F- lisozima 14,3 kDa. No poço 2 é a DioL composta pelas três subunidades α , β e γ . Adaptado de Moreira, 1996

3.2 Cristalização da DVL

Inicialmente foi feita uma solução a 10 mg/ml da proteína purificada em tampão 20 mM Tris-HCl pH 7,6 com 5 mM de CaCl_2 e MnCl_2 . A suspensão da proteína foi então centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi separado. Para a análise estrutural na presença de açúcar foi utilizado o ligante X-Man (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose). A solução de proteína foi encubada com o ligante na concentração final de 3 mM por uma hora antes dos experimentos. A proteína foi então submetida a uma varredura de soluções de cristalização utilizando o método da matriz esparsa criado por Jancarik e Kim (1991), utilizando os kits da Hampton ResearchTM Crystal Screen I e II. O kit é composto por 50 condições no Crystal Screen I e 48 no Crystal Screen II, dando um total de 98 condições que, de acordo com uma revisão feita pelos autores, são as mais indicadas para o crescimento

de cristais. Estas condições variam em pH, sal e precipitantes. O ensaio de cristalização foi feito em placas de Linbro de 24 poços e em cada poço foi colocado 300 μL de cada solução do kit de cristalização. Foi utilizado o método da gota suspensa, em que a gota foi formada por 2 μL da solução da proteína com o ligante e 2 μL da solução de cristalização em uma lamínula 22 x 22 mm previamente siliconada. Os poços foram vedados com silicone e deixados em repouso à temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$. A figura 9 mostra o modelo do experimento de difusão de vapor em gota suspensa.

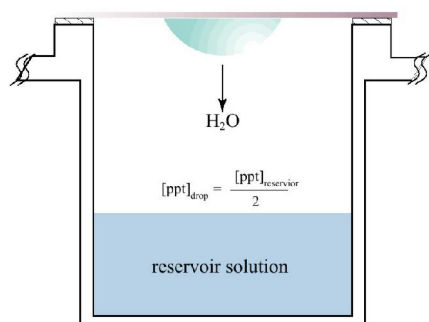


Figura 9. Esquema mostrando os elementos que constituem o método de difusão de vapor em gota suspensa. A figura mostra o poço da placa de Linbro contendo a solução de cristalização, a lamínula 22x22mm com a gota formada pela proteína e a solução de cristalização e o silicone entre a lamínula e o poço que veda o sistema evitando a evaporação rápida.

3.3 Coleta de dados

Os dados coletados a partir da difração do cristal de DVL foram obtidos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron na cidade de Campinas, São Paulo. Os dados de difração de raios X foram coletados a uma temperatura de 100 K mantida através de um jato de nitrogênio. Para evitar a formação de gelo, o cristal foi mergulhado em uma solução composta por 10% de PEG 400 e solução de cristalização. O cristal tratado foi laçado com um loop com o auxílio de uma lupa e posteriormente foi alinhado ao feixe goniômetro e submetido à coleta de dados. A coleta foi feita utilizando feixe de comprimento de onda de 1,47 \AA em uma placa de imagens CCD (MAR *Research*) com o cristal a uma distância de 130 mm do detector. O tempo de exposição foi de 60 doses e a amplitude de oscilação foi de 1 $^{\circ}$ sendo coletadas ao todo 120 imagens com resolução de 2,6 \AA . O conjunto de dados completo foi indexado, integrado e escalonado utilizando os programas XDS (KABSCH, 2010), PHENIX (ADAMS, 2010) e PHASER (MCCOY, 2007).

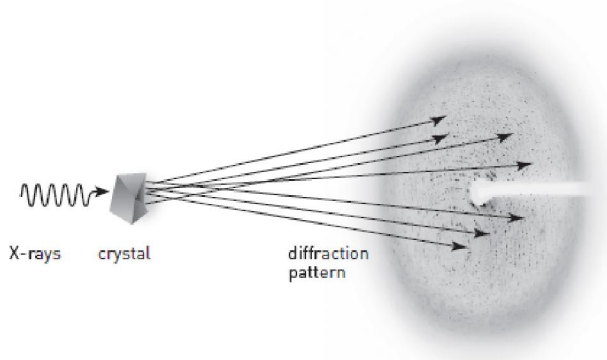


Figura 10. Diagrama representando a difração do cristal por raios X e a formação do padrão de difração.

3.4 Substituição Molecular

O total conhecimento sobre os feixes de raios X provindos da difração de um cristal é importante para analisar a distribuição de cargas elétricas da molécula cristalizada. Para isso é necessário saber a intensidade e a fase da radiação difratada. No entanto, durante o processo de difração a informação da fase da radiação é perdida, sendo necessário fazer uso de outra técnica para obter essa informação. Este problema é conhecido na cristalografia como “o problema da fase”. Para resolver esta incógnita é utilizado um modelo estrutural de uma molécula, no caso deste trabalho, foi usada uma lectina que possua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional semelhante à molécula de estudo. Este método de resolver o problema da fase é chamado de Substituição Molecular e necessita da observação do alinhamento de sequências primárias homologas que possuam enovelamentos similares para a escolha adequada do modelo a ser utilizado. Dessa forma foi feito o alinhamento para análise de similaridade e homologia entre a sequência primária da lectina de DVL com o banco de dados de proteínas depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) utilizando o programa BLAST. Do resultado desta análise foram escolhidas as proteínas com maior homologia e similaridade e feita a substituição molecular, que consiste em calcular o posicionamento do modelo com a molécula real através de movimentos de rotação e translação. Esse cálculo foi feito pelo programa Phaser e a escolha do modelo ideal é feita pela análise dos valores de log-likelihood gain, RFZ e TFZ obtidos pelo programa.

3.5 Refinamento e Validação

Após a substituição molecular a estrutura obtida foi submetida a refinamentos de corpo rígido e refinamentos posicionais para um melhor ajuste da molécula na unidade assimétrica através do uso do programa Phaser. A finalidade deste refinamento é encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto e a estrutura real da molécula, colocando o modelo na mesma posição que a molécula real ocupa na sua rede cristalina. Este procedimento utiliza movimentos de rotação e translação do modelo, sendo as coordenadas espaciais de seus átomos referentes ao seu posicionamento no próprio cristal. Para avaliar os resultados dos cálculos do refinamento devem ser observados os valores de R_{factor} e R_{free} . O fator da estrutura é calculado de acordo com o espelhamento de onda, em uma determinada direção e intensidade, no espaço recíproco definido pelos índices de Miller. Na obtenção de um modelo após substituição molecular com R_{factor} inicial de 50% um bom refinamento possui valores de R_{factor} de aproximadamente de 20% e R_{free} entre 10 e 5%.

Posteriormente foram adicionadas as moléculas de água pelo mesmo programa seguido de um novo refinamento e a estrutura foi submetida à validação pelo programa MolProbity que avalia os ângulos, a estereoquímica e as distâncias interatômicas. A avaliação da posição dos aminoácidos em relação às regiões permissíveis foi feita pelo gráfico de Ramachandran.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cristalização da DVL

A lectina de *Dioclea violacea* foi cristalizada a partir de uma solução de 10 mg/mL de proteína solúvel em 0,1 M Tris-HCl pH 7,6 com 5 mM Ca^{2+} e 5 mM Mn^{2+} previamente incubada com X-Man por uma hora antes da montagem da placa de cristalização. O tampão que foi utilizado para solubilizar a proteína contém cálcio e manganês para certificar que a proteína será cristalizada em sua forma ativa e com os metais ocupando o sítio de ligação a metais. O X-Man (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose), por conter manose em sua composição, foi utilizado para dar mais estabilidade ao sítio de ligação a carboidrato e o restante da molécula atua na estabilidade do empacotamento cristalino. Os cristais, mostrados na figura 11, foram obtidos através do método de difusão de vapor em gota suspensa e cresceram após duas semanas com a placa de Linbro deixada em repouso à temperatura constante de 20°C e a condição que obteve crescimento do cristal foi a 33 do kit de cristalização da Hampton ResearchTM Crystal Screen I composta por 4 M Formato de sódio.

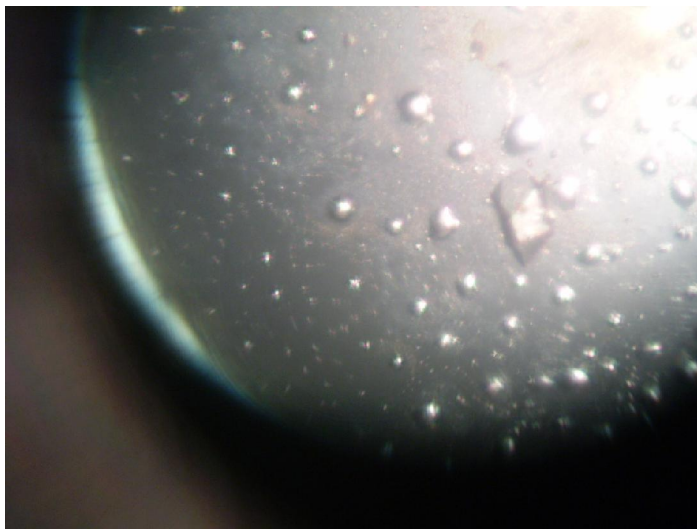


Figura 11. Foto do cristal da lectina de *Dioclea violacea* obtido na condição 33 do Screen I da Hampton Research.

4.2 Processamento de dados, substituição molecular e refinamento

Os cristais foram levados a estação de macromoléculas MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas-SP e difratados a 2,61 Å. Antes de posicionar o cristal no goniômetro foi preparada uma solução crio protetora formada por 10% de PEG 400 em solução da condição 33 do screen I para evitar a formação de gelo ao redor do cristal, o que prejudicaria muito a coleta dos dados. Foram coletadas 120 imagens com a placa de imagens distante de 130 mm, aplicando dose com tempo de exposição de 60 segundos e com oscilação de 1°. Os dados coletados foram indexados, processados e escalonados pelo programa XDS. A figura 12 mostra um padrão de difração obtido após a difração do cristal. Esses dados foram trazidos de volta para o laboratório para ser feito o processamento.

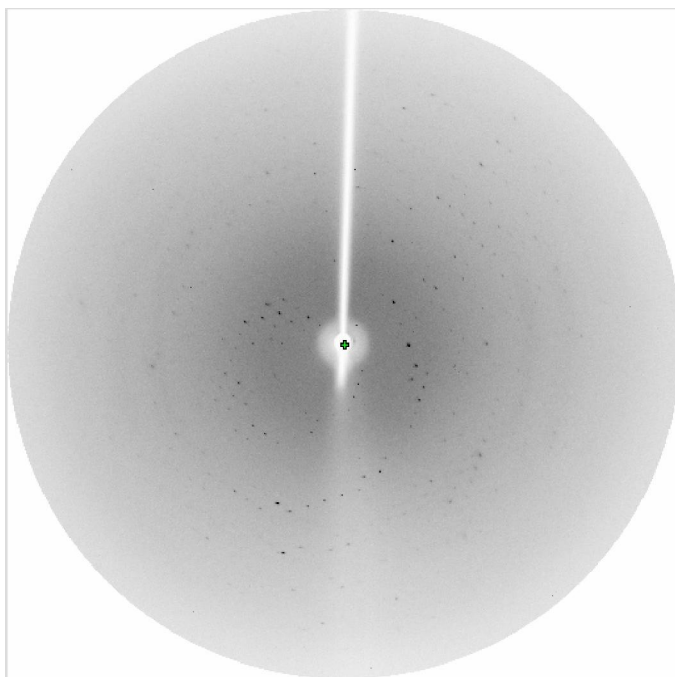


Figura 12. Padrão de difração obtido do cristal de *Dioclea violacea*.

O cristal possui grupo espacial I222 com parâmetros de cela de $a = 61,34$; $b = 66,11$ e $c = 106,69$ e os ângulos $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. O Coeficiente de Mattheus, calculado baseado no peso molecular de 25,5 kDa, foi de $2,12 \text{ \AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$ e indicou a presença de um monômero na unidade assimétrica e a presença de 42,04 % de solvente. A tabela 2 mostra as estatísticas dos dados de coleta.

Tabela 2. Estatística dos dados de coleta

| Difração de raios X | |
|---|--------------------------------------|
| R _{merge} | 9,7 (22,6)* |
| Limite de resolução | 34,38 (2,61)* |
| Grupo espacial | I222 |
| I/σ (I) | 7,0 (3,3)* |
| Completeza (%) | 92,7 (83,1)* |
| Redundância | 3,6 |
| Parâmetros de cela (Å) | a = 61,34 b = 66,11 c = 106,69 |
| Ângulos de cela | α = β = γ = 90° |
| Coefficiente de Matthews Å ³ .Da ⁻¹ | 2,12 |
| Quantidade de Solvente (%) | 42,04 |
| Comprimento de onda (Å) | 1,47 |
| Numero de reflexões totais | 22.900 |
| Numero de reflexões únicas observadas | 6.354 |

* Os valores em parêntese representam os resultados da última camada

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl) - \langle I(hkl)i \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl)i \rangle}$$

Para resolver o problema de fase foi escolhido um modelo de uma lectina semelhante já resolvida para fazer a substituição molecular. Essa busca foi feita com o auxílio do programa BLAST que compara a sequência da proteína de interesse com todas as proteínas depositadas no banco de dados do NCBI. Dessa forma foi escolhida a lectina de *Dioclea rostrata* (DRL) que possui 99% de similaridade com a *Dioclea violacea* como mostra o alinhamento na figura 13.

A substituição molecular foi feita através do programa PHASER com algumas das estruturas das lectinas que mostraram sequências de maior semelhança com a DVL. Foram feitos cálculos de rotação e translação para um melhor posicionamento do modelo com a molécula real na rede cristalina. Foi obtido o log-likelihood gain de 848.883 e RFZ de 13,1 e TFZ de 30 para a molécula da lectina de *Dioclea rostrata* (PDB: 2ZBJ), que demonstram a qualidade do refinamento feito pela molécula modelo escolhida. De acordo com esses dados foi comprovada a eficácia na escolha da lectina de *Dioclea rostrata* como modelo.

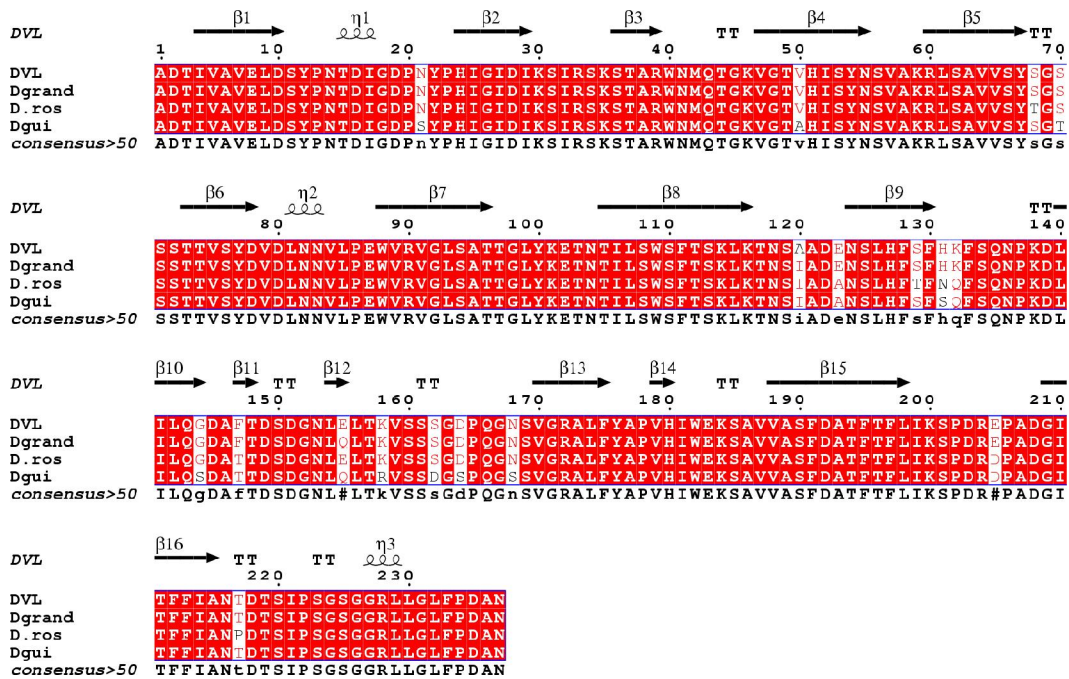


Figura 13. Alinhamento das lectinas do gênero *Dioclea*

Posteriormente foram realizados refinamentos de corpo rígido e refinamentos posicionais que buscam encontrar uma melhor concordância entre o modelo e a estrutura da molécula. O acompanhamento da qualidade dos passos de refinamento foi monitorado pelos valores de R_{factor} e R_{free} . O R_{factor} é uma fórmula que calcula o somatório das diferenças absolutas entre os fatores de estrutura observados (Fobs) e os fatores de estrutura calculados (Fcal) sobre a somatória dos fatores observados (MCREE, 1999), de acordo com a seguinte equação:

$$R = \frac{\sum || \text{Fobs} | - | \text{Fcal} ||}{\sum | \text{Fobs} |}$$

Para evitar que o R_{factor} seja superefinado artificialmente e cause uma redundância dos dados é necessária uma porcentagem de reflexões que não sofram refinamentos. Geralmente consiste de 5 a 10% das reflexões isentas de minimização artificial chamado de R_{free} . Esses fatores estruturais correspondem ao espalhamento da onda obtida na difração assim como a direção e a intensidade, relacionadas com os índices de Miller. Os aminoácidos foram posicionados corretamente um a um utilizando o programa Coot assim como a molécula de X-man, de acordo com a densidade eletrônica obtida, e posteriormente foram adicionadas 60 moléculas de água. Após o ultimo refinamento a estrutura obteve resolução máxima de 2,61Å. Com valores de R_{factor} de 0,23 e R_{free} de 0,27. Os dados de substituição molecular assim como os de refinamento são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 3. Estatística dos dados de substituição molecular e refinamento

| Substituição Molecular | |
|--|---------|
| Log-likelihood | 848,883 |
| RFZ | 13,1 |
| TFZ | 30,0 |
| Refinamento | |
| R _{factor} (%) | 0,23 |
| R _{free} (%) | 0,27 |
| B-factor (Å ²) | 25,98 |
| Distribuição dos resíduos no gráfico de Ramachandran (%) | |
| Regiões mais permitidas | 92,51 |
| Regiões adicionalmente permitidas | 6,61 |
| Desvio médio padrão | |
| Para comprimento de ligações (Å) | 0,014 |
| Para ângulo de ligações (°) | 0,848 |

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

e o R_{free} é 5% das reflexões que não sofrem refinamento

A qualidade da estereoquímica da estrutura é comprovada a partir do gráfico de Ramachandran que analisa as torções dos ângulos ψ e ϕ . O gráfico mostra a ausência de resíduos em regiões não permitidas e generosamente permitidas sendo somente 6,61% dos resíduos presentes em regiões adicionalmente permitidas. O gráfico é mostrado na figura 14 a seguir.

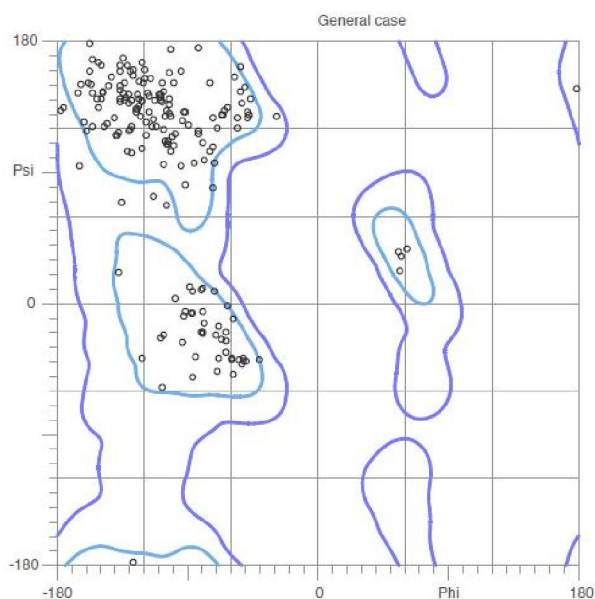


Figura 14. Gráfico de Ramachandran da estrutura final da lectina de *Dioclea violacea* calculado pelo programa MolProbit.

4.3 Estrutura tridimensional da DVL

A estrutura tridimensional completa da DVL complexada com X-Man é mostrada na figura 15 e a estrutura do monômero na figura 16. É possível observar a molécula de X-Man localizada no sítio de ligação a carboidrato assim como os metais Ca^{2+} e Mn^{2+} situados no sítio de ligação a metais.

A estrutura do tetrâmero é semelhante com as de ConA like formados por dois dímeros canônicos que se associam por folhas β e fazem contato cruzado (cross-link) sendo este arranjo quaternário descrito como *jelly-roll* que parece ter evoluído independentemente diversas vezes. Assim como ocorre em outras lectinas de Diocleinae o mapa de densidade eletrônica é pouco conclusivo na região dos loops 118-122 e 149-151, sendo que no primeiro loop é completamente inconclusivo tanto na estrutura da *Dioclea rostrata*, utilizada como modelo na substituição molecular, quanto na nuvem eletrônica pertencente à *Dioclea violacea*, sendo os resíduos, que compõem este loop, retirados da estrutura.



Figura 15. Visão geral da estrutura tetramérica da lectina de sementes de *Dioclea violacea* com a presença dos metais Ca^{2+} em verde e Mn^{2+} em roxo e do ligante X-Man em rosa.

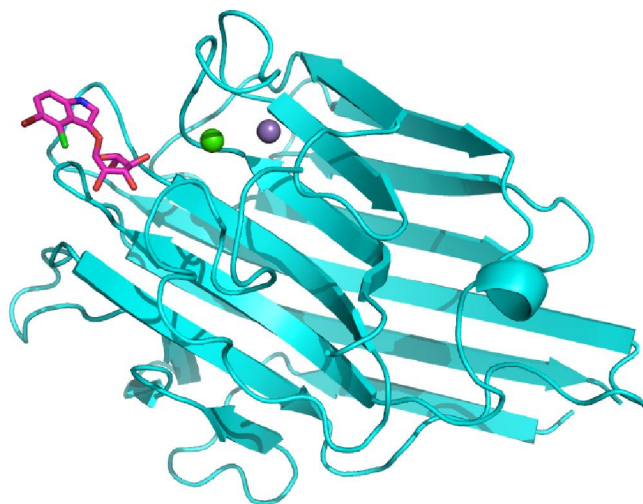


Figura 16. Estrutura do monômero da lectina de *Dioclea violacea*.

Foi observado também na estrutura da *Dioclea violacea* que o sítio de ligação a metais é conservado composto pelos resíduos ASN 14, TYR 12 que interagem com o cálcio, o GLU 8 e HIS 24 que interagem com o manganês e os resíduos ASP 10 e ASP 19 que interagem com ambos. Ocorrem interações indiretas formada por moléculas de água entre os metais e os resíduos VAL 32 e SER 34 com o Mn^{2+} e ASP 208 e ARG 228 com o Ca^{2+} . Esta orientação dos resíduos e dos metais é semelhante a outras ConA like.

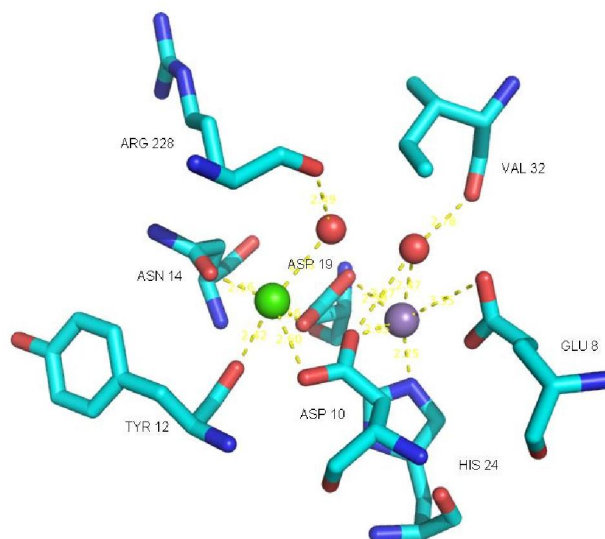


Figura 17. Sítio de ligação a metais da lectina de *Dioclea violacea* formado pelos resíduos, os metais Ca^{2+} e Mn^{2+} e as moléculas de água que fazem a ligação indireta dos metais com outros resíduos.

Comparando a estrutura da DVL deste trabalho com a anteriormente depositada no PDB sem o ligante (código PDB: 2GDF), foi possível observar a diferença do resíduo ASP 208. A estrutura depositada é desmetalizada e a conformação do resíduo está em direção inversa ao sítio dos metais. Já a estrutura resolvida na presença do X-Man o ASP 208 está na sua conformação adequada na forma da proteína ativa. A modificação destes resíduos é visto na figura 18.

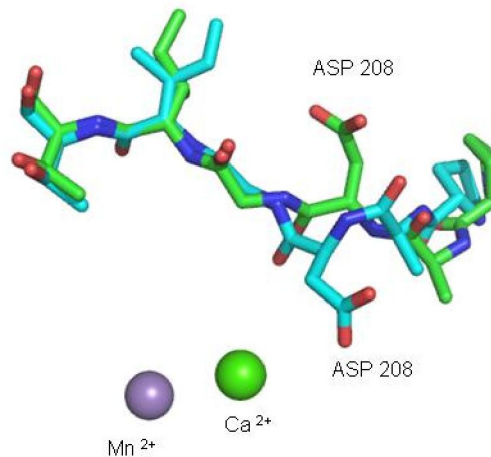


Figura 18. Resíduo ASP 208 de DVL em diferentes conformações na proteína desmetalizada em verde (código PDB: 2GDF) e na proteína metalizada em azul.

Seguindo de acordo com a literatura a isomerização da ligação peptídica conservada em família de leguminosas está presente na estrutura da DVL que possui os resíduos alanina 207 e asparagina 208 na conformação Cis mostrado na figura abaixo. Essa isomerização é extremamente importante para a estabilidade do sítio de ligação a carboidratos, pois direciona os resíduos ASN 14 e ARG 228 (LORIS, 1998 BOUCKAERT, 2000).

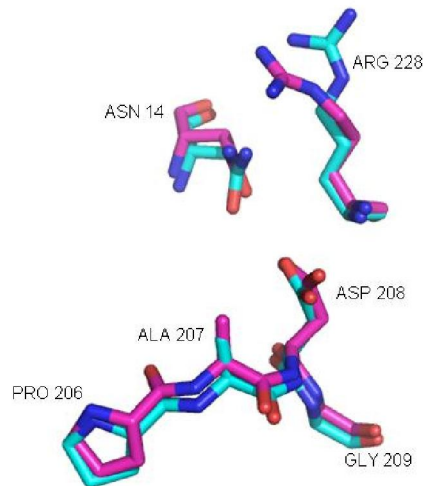


Figura 19. Representação dos resíduos PRO 206, ALA 207, ASP 208 e GLY 209 mostrando a conformação cis da ligação peptídica dos resíduos ALA 207 e ASP 208 importantes para a estabilização dos resíduos ASN 14 e ARG 228 do DRC. Em azul DVL e em rosa DRL.

Foi observada a ausência do aminoácido não protéico Abu (α -aminobutírico) na estrutura da lectina de *Dioclea violacea*. Este aminoácido foi primeiramente encontrado no sítio hidrofóbico da estrutura da lectina de *Canavalia gladiata* por Delatorre e colaboradores em 2007. Esta molécula se encontra na interface dos monômeros que compõem o dímero canônico como mostra a figura 20. A presença deste aminoácido já foi observada em diversas outras lectinas da sub-tribo Diocleinae, sugerindo uma grande importância biológica na conservação desta molécula. Um fato importante é que esta molécula é co-purificada junto com a lectina provando sua estabilidade a todos os processos bioquímicos durante a purificação. O Abu é relatado na literatura como uma molécula que atua na defesa vegetal. Delatorre (2007) propõe que a presença deste aminoácido nas lectinas reforça ainda mais a idéia destas serem proteínas de defesa.

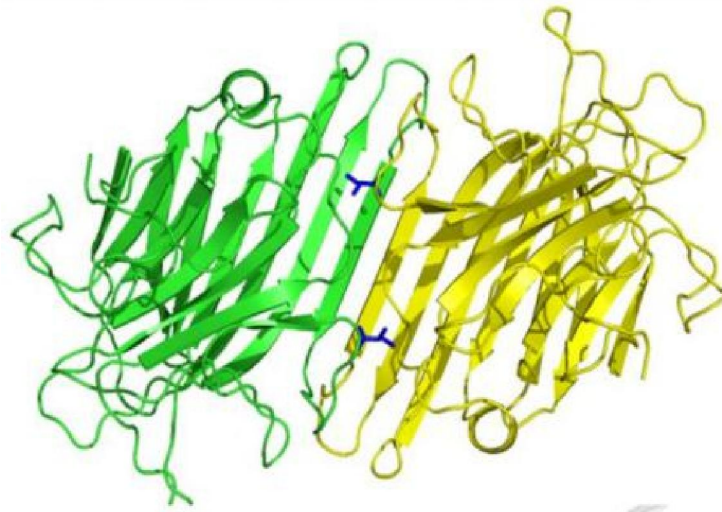


Figura 20. Localização das moléculas do aminoácido não protéico α -aminobutírico na interface do dímero.

O sítio hidrofóbico em que o Abu é encontrado é bastante conservado. Na estrutura de *Dioclea rostrata* ele é composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos: LEU 115, ASN 124, SER 125, LEU 126, ASP 139, PRO 137 e VAL 179, sendo diferente da estrutura de *Canavalia gladiata* apenas os resíduos de 125 e 137, que neste caso são alanina e glutamina. Estes resíduos também são conservados na estrutura da DVL e estão posicionados de maneira semelhante a da estrutura de DRL como visto na figura 21.

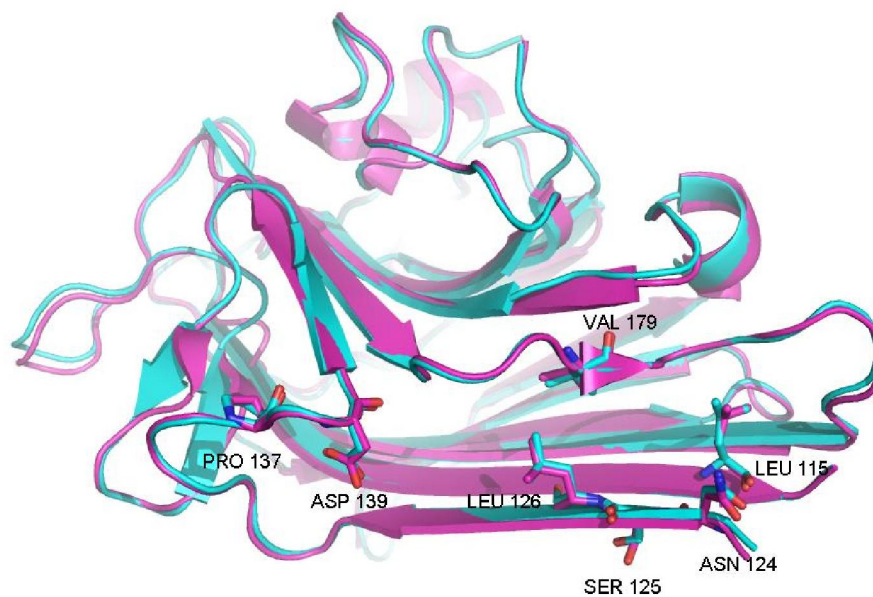


Figura 21. Estruturas sobrepostas de DVL em azul e DRL em roxo mostrando a conformação semelhante entre os resíduos que interagem com o Abu.

No entanto a ausência da densidade do Abu na estrutura de *Dioclea violacea* possivelmente pode ser explicador por dois fatores. O primeiro pode ser devido a esta estrutura ter sido resolvida na baixa resolução de 2,61 Å. O Abu é uma molécula pequena e sua concentração na gota de cristalização é a mesma da proteína, já a molécula de X-Man foi colocada em concentração muito maior para garantir a presença deste no cristal. Dessa forma sendo o X-Man inserido em maior concentração e por ele possuir maior tamanho molecular, permitiu a obtenção de sua densidade eletrônica mesmo em baixa resolução.

O outro fator importante que pode explicar a ausência do Abu na estrutura é o fato da semente de *Dioclea violacea* ter sido coletada no Jardim Botânico de Porto Alegre no Rio Grande do Sul. Este local possui solo e clima característicos que não sofrem estresse hídrico nem estresse salino, ou seja, as condições de crescimento do vegetal são completamente favoráveis. Como dito anteriormente, esta molécula está relacionada à defesa e resistência da planta podendo a expressão gênica desta ocorrer apenas quando a planta sofre alguns tipos de estresse.

4.4 Relação dímero-tetrâmero da DVL

Outro fato importante que pode interferir nas atividades biológicas de lectinas de alta similaridade como as de Diocleinae é o equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH. Apenas a forma tetravalente é capaz de formar ligações cruzadas de receptores na membrana celular podendo desencadear uma série de processos de transdução de sinal. A oligomerização pH dependente assim como a orientação relativa dos resíduos de aminoácidos do sítio de reconhecimento a carboidrato são fatores que indicam as diferenças de atividades biológicas e potencias de lectinas de Diocleinaes (SANZ-APARICIO, 1997; WAH, 2001).

Para avaliar qual o comportamento predominante da lectina de *Dioclea violacea* foi feita uma comparação estrutural com uma lectinas predominantemente dimérica como a *Dioclea guianensis* e outra predominantemente tetramérica como a *Dioclea grandiflora*.

Este comportamento foi observado de acordo com dados estruturais foi feito a comparação entre as estruturas das lectinas de DVL, Dgui e Dgran. Foi visto que assim como a Dgran, a lectina de DVL possui o resíduo de HIS 131 que promove um aumento nas interações entre os dímeros favorecendo a formação do tetrâmero. A estrutura da *Dioclea guianensis* possui uma asparagina na posição 131 o que causa uma menor interação (WAH, 2001). O detalhe da comparação deste resíduo é mostrado na figura 22.

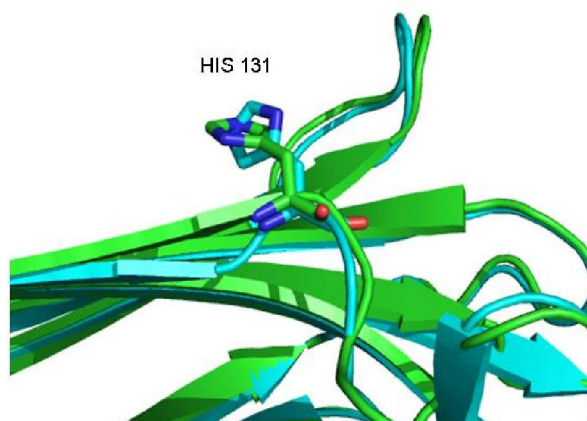


Figura 22. Sobreposição dos resíduos HIS 131 de DVL em azul e Dgrand em verde.

O posicionamento da histidina 51 também é importante no equilíbrio dímero-tetrâmero. Comparando as estruturas foi visto que a posição da HIS 51 da *D.violácea* foi a mesma da estrutura de *D. grandiflora* e diferente de *D.guianensis*. Esta posição permite uma série de interações de Van der Waals e hidrofóbicas tanto com resíduos da mesma cadeia:

THR 49, VAL 64 e THR 194, como com resíduos do outro dímero: LYS 166, VAL 187 e VAL 188. O resíduo HIS 51 é importante também na estabilização do *loop* 177-122.

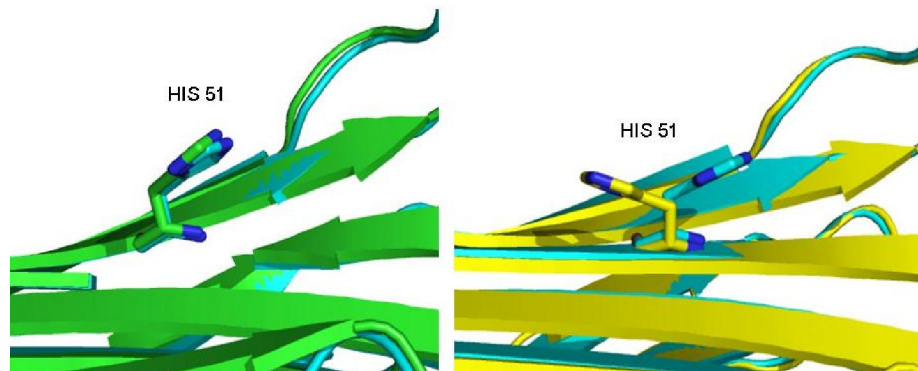


Figura 23. Sobreposição das estruturas de DVL em azul com as de Dgran em verde e Dgui em amarelo, mostrando a diferença na posição da HIS 51.

De acordo com o mostrado pelas estruturas, a lectina de *Dioclea violacea* possui a conformação tetramérica em pH maior do que 4,0. Essa afirmação foi devido à presença da HIS 131 e da conformação da HIS 51 sendo ambas predispostas a formar interações interdiméricas. Todas as interações entre aminoácidos da mesma cadeia assim como de dímeros diferentes são vistas na figura 24, que mostra o tetrâmero de DVL com os resíduos de histidina 131 e 51.

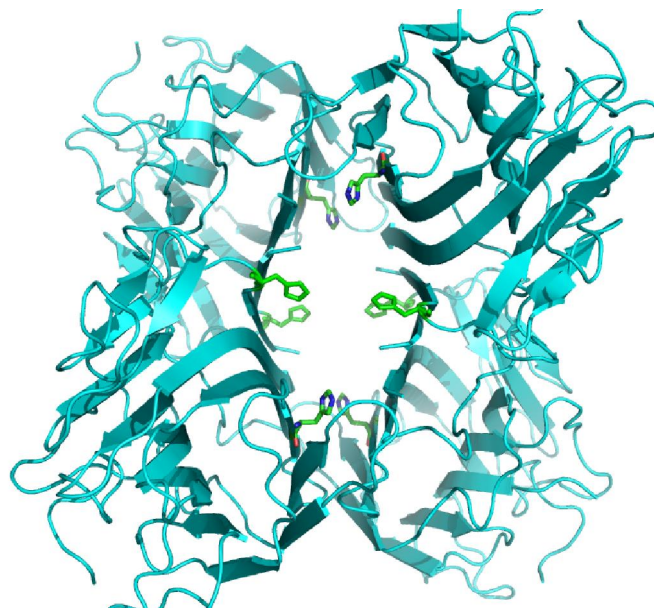


Figura 24. Estrutura do tetrâmero da *Dioclea violacea* mostrando os resíduos HIS 51 e HIS 131 e a interação interdimérica formada por eles.

Um estudo que também fez essa comparação, no entanto utilizando dados de ultracentrifugação foi feito por Calvete e colaboradores em 1999. Deste estudo foi obtido o gráfico abaixo que mostra a predominância da forma tetramérica de DVL.

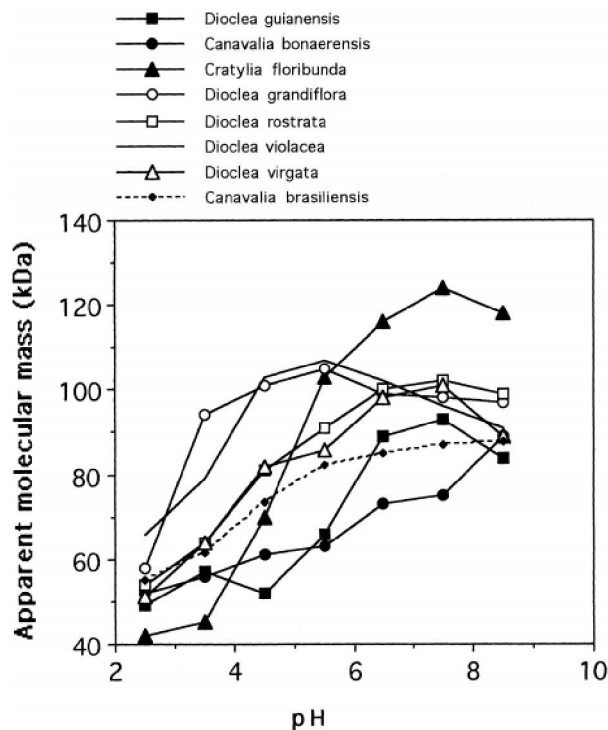


Figura 25. Gráfico dos dados de ultracentrifugação analítica mostrando o comportamento tetramérico da lectina de *D.violacea* em pH maior do que 4,0 (CALVETE, 1999).

Como foi visto, vários fatores contribuem para as diversas atividades biológicas de lectinas semelhantes estando entre eles a oligomerização dependente de pH, a posição relativa dos resíduos do sítio de ligação a carboidratos e algumas pequenas mudanças em aminoácidos localizados em posições-chave relacionadas com a conformação quaternária (WAH et al., 2001; BRINDA et al., 2004).

4.5 Estrutura e função do Domínio de Reconhecimento a Carboidrato

O domínio de reconhecimento a carboidrato é formado pelos resíduos LEU 12, ASN 14, LEU 99, TYR 100, ASP 208 e ARG 228 são conservados assim como outras lectinas de Diocleinae. A estrutura do ligante X-Man foi observada estando perfeitamente encaixada na nuvem eletrônica. Como dito anteriormente a interação deste ligante com os

resíduos de aminoácidos que compõem o sítio de reconhecimento a carboidrato promove uma maior estabilidade na estrutura da lectina.

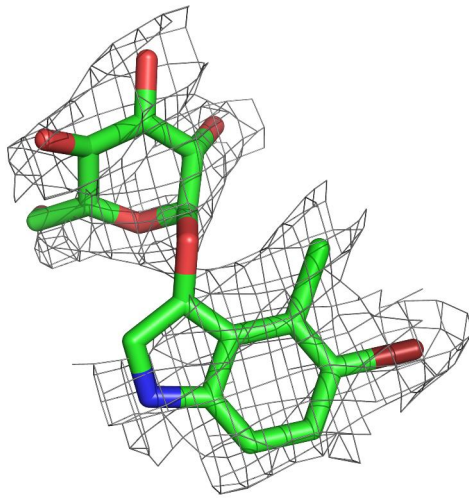


Figura 26. Representação da densidade eletrônica no OmitMap da estrutura do X-Man.

A molécula de X-Man, mostrada na figura 26, possui o açúcar manose que se liga ao domínio de reconhecimento a carboidrato produzindo uma estabilidade neste sítio da proteína. Esta estabilidade promove um arranjo cristalino mais estável permitindo a formação do cristal. A concentração da solução de X-Man que é utilizada na produção do cristal é alta, aproximadamente 3 mM, para garantir a entrada do ligante à molécula. A presença desta molécula na estrutura permite analisar as interações que ocorre entre o açúcar manose e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio de ligação a carboidrato.

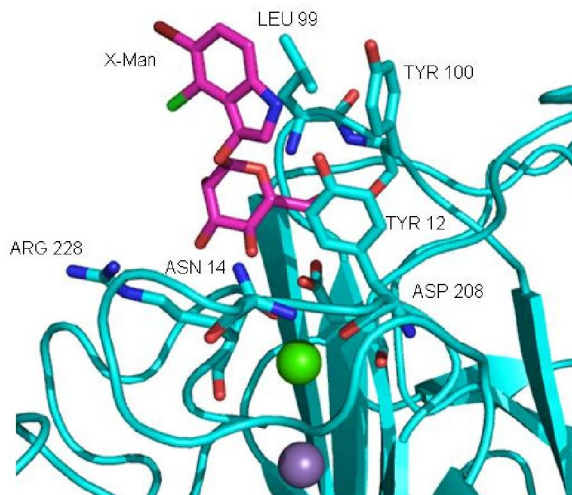


Figura 27. Molécula de X-Man interagindo com os resíduos que formam o sítio de ligação a carboidrato.

Outras lectinas como a *Dioclea grandiflora* e a *Dioclea guianensis* já foram cristalizadas na presença deste ligante. Isto permitiu a análise das distâncias das pontes de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos que compõem o sítio de ligação a carboidrato e os oxigênios presentes na molécula do X-Man. O estudo dessa interação entre o carboidrato e a proteína citados promove o entendimento de como ocorre a interação entre o domínio de reconhecimento a carboidrato de diversas lectinas do gênero *Dioclea* com um carboidrato específico. Partindo do princípio que as lectina possuem atividades biológicas diferentes, estas atividades podem estar relacionadas às intensidades das interações entre proteína – carboidrato. As distâncias das três lectinas comparadas são mostradas na tabela 4.

Tabela 4. Distâncias entre os resíduos do DRC e o X-Man.

| | | <i>D.violacea</i> | <i>D.grandiflora</i> PDB: 2JE9 | <i>D.guianensis</i> PDB: 2JDZ |
|--------------------|----------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| ASN 14 N | XMan O4 | 2,96 | 2,84 | 2,73 |
| ASP 208 OD1 | XMan O4 | 2,63 | 2,60 | 2,59 |
| ASP 208 OD2 | XMan O6 | 2,92 | 2,88 | 2,80 |
| LEU 99 N | XMan O5 | 3,08 | 3,25 | 3,32 |
| LEU 99 N | XMan O6 | 3,04 | 3,20 | 3,22 |
| TYR 100 N | XMan O6 | 2,94 | 3,18 | 3,05 |

Comparando as distâncias entre o X-Man e as três estruturas de Diocleas mostradas na tabela 4, foi observada a pouca diferença entre as estruturas dos resíduos pertencentes ao domínio de reconhecimento a carboidrato combinados com a molécula de X-Man como é possível observar na figura 28.

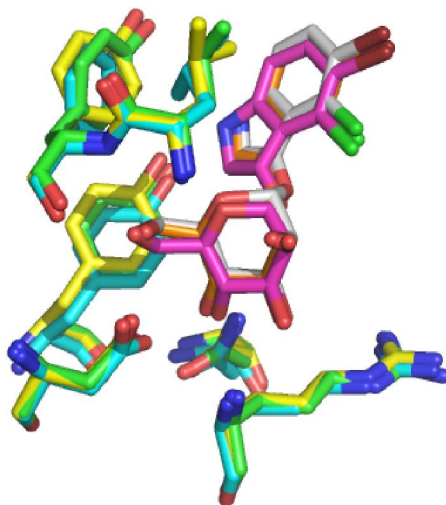


Figura 28. Sobreposição dos resíduos presentes na DRC das lectinas DVL em azul, Dgrand em verde e Dgui em amarelo. É mostrado as moléculas de X-Man relativa a cada estrutura rosa de DVL, laranja de Dgui e cinza de Dgran.

Um fato importante a ser observado ocorre em relação ao resíduo LEU 99 da estrutura de *Dioclea violacea*. É observada a ocorrência de dupla conformação neste resíduo o que permite a esta lectina uma maior mobilidade de interações. De acordo com a nuvem eletrônica calculada pelos dados de coleta a cadeia lateral da leucina 99 pode esta virada para a esquerda ou para a direita. O fato de este resíduo apresentar esta mobilidade e pertencer ao sítio de ligação a carboidrato permite que a lectina possa interagir de forma mais flexível com os glicanos.

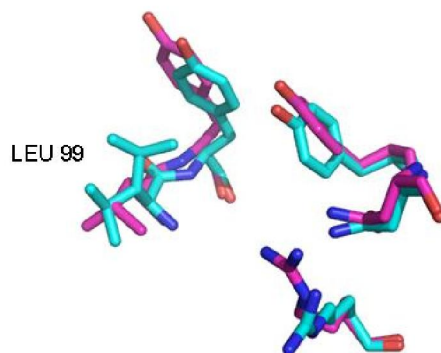


Figura 29. Superposição dos resíduos pertencentes ao sítio de ligação de carboidrato da DVL e DRL. Detalhe da dupla conformação apresentada pela leucina 99 da DVL.

A geometria que forma o sítio de ligação a carboidratos pode ser calculada pela distância entre os resíduos que a compõe. Essa geometria é também conservada entre as lectinas de Diocleinae, no entanto pequenas variações nas distâncias que formam o desenho deste sítio são responsáveis pela diferença nas especificidades por carboidratos (DAM, 1998).

A partir de comparações feitas por estas distancias é possível explicar diferentes efeitos de lectinas de alta similaridade em modelos de inflamação e nocicepção. Para avaliar a relação estrutura função das lectinas foram comparadas as distâncias entre os resíduos que formam o sítio de ligação a carboidrato das lectinas de *Dioclea violacea* e *Dioclea rostrata*, pois ambas apresentam atividade vasorelaxante em músculo liso de aorta de ratos dependente de endotélio (artigo a ser publicado). Estas distâncias são mostradas na figura 30 e na tabela 5.

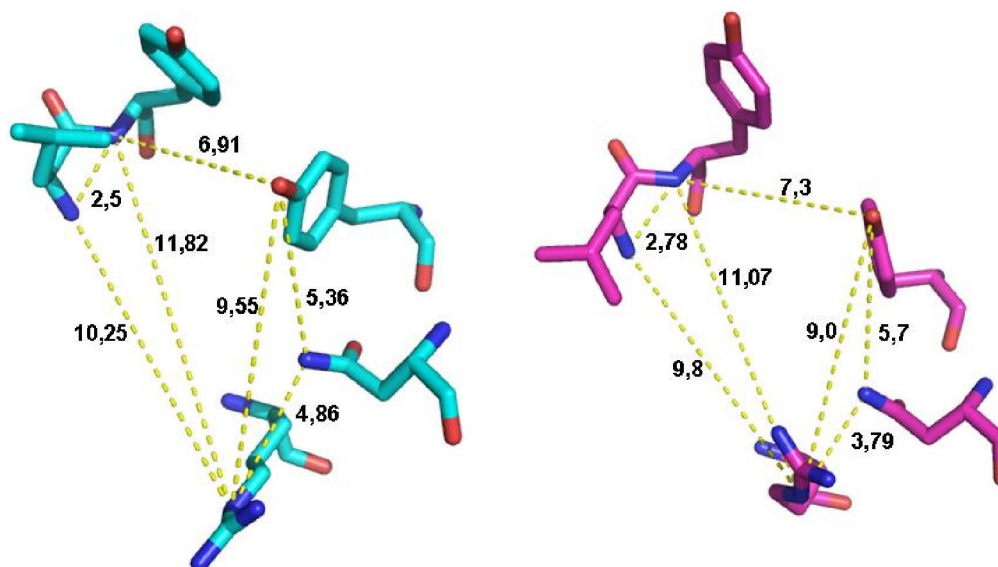


Figura 30. Representação dos resíduos do sítio de ligação a carboidrato de DVL em azul e de DRL em rosa e as distâncias.

Tabela 5. Distâncias entre resíduos do domínio de ligação a carboidratos de lectinas do gênero *Dioclea*

| Resíduos | Distancias entre os resíduos (Å) | |
|------------------------|----------------------------------|-------|
| | DVL | DRLt |
| ARG 228 N – TRY 12 OH | 9,55 | 9,00 |
| ARG 228 N – ASN 14 ND2 | 4,86 | 3,79 |
| TYR 100 N – TYR 12 OH | 6,91 | 7,30 |
| TYR 100 N – LEU 99 N | 2,65 | 2,78 |
| TYR 12 OH – ASN 14 ND2 | 5,36 | 5,77 |
| ARG 228 N – LEU 99 N | 10,25 | 9,80 |
| ARG 228 N – TYR 100N | 11,82 | 11,07 |

Em relação às distancias entre os resíduos no domínio de ligação a carboidrato das lectinas *Dioclea violacea* e *Dioclea rostrata* foi observado que as principais diferenças estão nas distâncias entre ARG 228-ASN 14 e ARG 228-TYR 100. Essas modificações entre as distâncias dos resíduos podem ser responsáveis pela diferença na atividade dessas duas lectinas. Comparando a geometria formada pelos resíduos de aminoácidos é proposto que a

Dioclea violacea possui o sítio mais largo e raso promovendo uma interação mais fraca entre a lectina e o açúcar, já a *Dioclea rostrata* apresenta sítio mais estreito e fundo. Esses dados comprovam a maior atividade vasorelaxante da lectina de *Dioclea rostrata* já que quanto maior é a interação entre os resíduos de aminoácidos com o açúcar maior é a atividade biológica.

Foi comprovada que este efeito é causado pelo sítio lectínico, pois ambas tiveram seu efeito de relaxamento diminuído ao serem ministradas com α -D-glicose. A atividade vasorelaxante do músculo liso em aorta de ratos pode ser observada na figura 31.

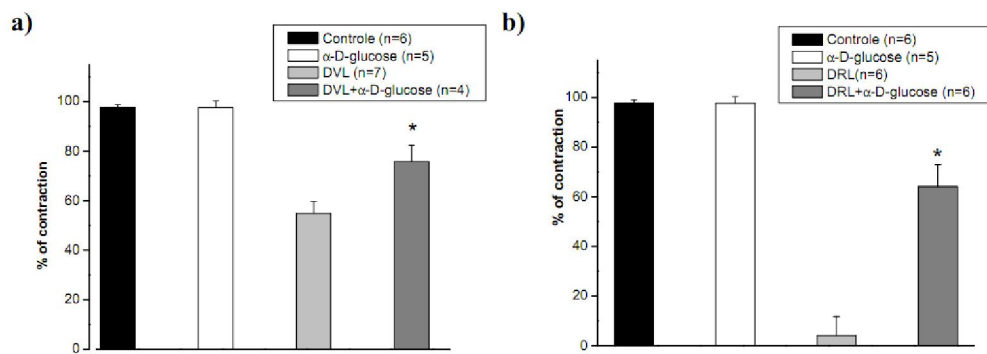


Figura 31. Gráfico do potencial de relaxamento do músculo liso de aorta de camundongo e a reversão da atividade das lectinas *D. violacea* e *D. rostrata* (RODRIGUES, 2010).

As lectinas utilizadas neste estudo não causaram toxicidade na aorta, uma vez que não alteraram a capacidade de resposta do tecido nem o tônus basal da aorta, não mostrando nenhum efeito sobre a fisiologia normal do músculo. Dessa forma estas lectinas podem ser ferramentas importantes no estudo de doenças vasculares como hipertensão já que atuam nos vasos apenas quando estes já estão contraídos não alterando seu estado fisiológico.

5. CONCLUSÃO

A estrutura da lectina de *Dioclea violacea* foi resolvida na presença do ligante X-Man a uma resolução de 2,61 Å. A DVL se apresenta predominantemente na forma tetramérica pois possui os resíduos de HIS 51 e HIS 131 na mesma conformação que a *Dioclea grandiflora*. A análise da interação do ligante com o domínio de reconhecimento a carboidrato permitiu avaliar o comportamento desde sítio, comprovando a estabilidade provocada pelo X-Man tanto no sítio de ligação a carboidrato quanto no arranjo cristalino auxiliando na formação do cristal. A relação estrutura - função foi avaliada por comparações entre a estrutura da lectina de *Dioclea violacea* com a da lectina de *Dioclea rostrata*, comprovando que pequenas diferenças nas distâncias entre os resíduos que formam o sítio de ligação a carboidrato são responsáveis por diferenças na atividade vasorelaxante no músculo liso em aorta de ratos em ambas lectinas. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, essas lectinas podem ser úteis como ferramentas no estudo de patologias vasculares como a hipertensão.

6. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, P.D.; AFONINE, P.V.; BUNKÓCZI, G.; CHEN, V.B.; DAVIS, I.W.; ECHOLS, N.; HEADD, J.J.; HUNG, L. W.; KAPRAL, G.J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; MCCOY, A.J.; MORIARTY, N.W.; OEFFNER, R.; READ, R.J.; RICHARDSON, D.C.; RICHARDSON, J.S.; TERWILLIGER, T.C.; ZWART, P.H.; PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D66*, 213-221 2010.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; 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 Inflamm*, Fortaleza, v. 6, n. 3, p. 201-10, 1997.

AZEVEDO, W.F., *Cristalização de macromoléculas biológicas*, São José do Rio Preto. SP, 2004.

BABOSHA, A. V.. Inducible lectins and plant resistance to pathogens and abiotic stress. *Biochemistry. Biokhimiya*, 73(7):812-25, 2008.

BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; DO NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, Florianópolis, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARRE, A. et al. Mannose-binding plant lectins: Different structural scaffolds for a common sugar-recognition process. *Biochimie*, v.83, n.7, p.645-651, Jul. 2001.

BEUTH, J.; KO, H.L.; PULVERER, G.; UHLENBRUCK, G. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. *Glycoconjugate J*, Cologne, v. 12, n. 1, p. 1-6, 1995.

BLUNDELL, T. L. & JOHNSON, L. N. *Protein Crystallography*. Academic Press. USA. 1976.

BOUCKAERT, J., DEWALLEF, Y., POORTMANS, F., WYNS, L. & LORIS, R. The structural features of conca-navalin A governing non-proline peptide isomerization. *J. Biol Chem*. 275, 19778-19787. 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of proteins-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.

BRINDA, K.V., MITRA, N., SUROLIA, A., VISHVESHWARA, S.. Determinants of quaternary association in legume lectins. *ProteinSci.* 13, 1735–1749, 2004.

CALVETE, J.J., SANTOS, C.F., MANN, K., GRANGEIRO, T.B., NIMTZ, M., URBANKE, C., CAVADA, B.S.; Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vaitairea macrocarpa* seeds. *FEBS Letters*. 425: 286-292. 1998.

CAVADA, B.S., MOREIRA R.A., OLIVEIRA, J.T.A., GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plants lectins. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 5 (1): 193-201. 1993.

CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasil*, v. 8, n. 1, p. 31-36, 1996a.

CAVADA, B. S.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MOREIRA, R. A.. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasil*, v. 8, n. 1, p. 37-42, 1996b.

CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T. B., BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Sciences*, 2 (2), 123-135. 2001.

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.

DA SILVA, L. I. M. M.; RAMOS, M. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; FERREIRA, P. R.; CARVALHO, C. A. V.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, B. T.; DA SILVEIRA, J. A. G.; CAVADA, B. S.. Lectins From *Pisum arvense* Seeds Behave Differently From Storage Proteins During Germination In The Darkness. *Bras. Fisiol. Veg.* 12, 255-262, 2000.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.A.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K.S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins, *J. Struct. Biol.*, Ceará, v. 154, p. 280–286, 2006.

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.M.; SOUZA, E.P.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA G.A.; MORENO F.B.; FREITAS B.T. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. *BMC Struct. Biol.*, Ceará, v. 7, p. 52-60, 2007.

DI CIERO, L; BELLATO, C.M.; proteoma avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa ano 5, n 29 - nov/dez 2002

DRENTH, J., *Principles of Proteins X-Ray Crystallography*. Springer-Verlag. New York, USA, 1994

DUCRUIX, A. AND GIEGÉ, R. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A Practical Approach)*. Oxford University Press. 1992.

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

ETZLER, M.E., The *Dolichos biflorus* Lectins Family: A Model System for Studying Legume Lectin Structure and Function. In: VAN DRIESSECHE, E., ROUGÉ, P., BEECKMANS, S., BOG-HANSEN, T. C. Eds. *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, 11: 3-9. 1996.

GABIUS H. J. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code, *Naturwissenschaften*, v. 87, p. 108-121, 2000.

GOLDSTEIN, A.M.; AMOS, C.I. Segregation analysis of breast cancer from the cancer and steroid hormone study: histologic subtypes. *J Natl Cancer Inst*, Bethesda, v.82, n. 24, p.1911-7, 1990.

HAMELRYCK, T.W., LORIS, R., BOUCKAERT, J., WINS, L. (1998) Structural features of the legume lectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 10 (55), 349-360.

HARDMAN, K.D., AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4 Å resolution *Biochemistry*, 11(26), 4910-4919. 1972

HARDMAN, K.D., AINSWORTH, C.F. Structure of the concanavalin A methyl alpha-D-mannopyranoside complex at 6-Å resolution. *Biochemistry* 15 (5), 1120-1128. 1976

HOLANDA, F.R.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; ASSREUY, A. M. S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; PIRES, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid- induced writhing test in mice. *Protein and Peptide Letters, Fortaleza*, v. 16, n. 9, p. 1088-1092, 2009.

KABSCH, W. *XDS. Acta Cryst.* **D66**, 125-132; 2010.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica*, 1572: 187-197 2002.

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

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

LIENER, I. E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I. J. *The lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, New York, Academic Press, p. 600, 1986.

LORENZI H., HARRIS M.S.; *Plantas ornamentais do Brasil: arbustos, herbáceas e trepadeiras*; 2ª Ed. rev. E ampl. Nova Odessa, SP; Instituto Plantarum, 1999.

LORIS R.; HAMELRYCK T.; BOUCKAERT J.; Legume lectin structure, *Biochim Biophys Acta*, v.1383, p.9-36, 1998.

LORIS, R., VAN WALLE, I., DE GREVE, H., BEECKMANS, S., DEBOECK, F., WYNS, L., BOUCKAERT, J. Structural basis of oligomannose recognition by the *Pterocarpus angolensis* seed lectin. *Journal of Molecular Biology*, 335 (5), 1227–1240. 2004.

MCCOY, A.J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R.W.; ADAMS, P.D.; WINN, M.D.; STORONI, L.C.; READ, R.J.; *Phaser* crystallographic software *J. Appl. Cryst.* 40, 658-674, 2007

MCREE, D.E. *Practical Protein Crystallography*. Academic Press, inc. USA. 386 pp. 1999

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

MITCHELL, S.W.; REICHERT, E.T. Researches upon the venoms of poisonous serpents. *Smithson. Contrib. Knowl.*, v. 155, 1886.

MOREIRA, R. A., AINOUIZ, I. L., OLIVEIRA, J. T. A. & CAVADA, B. S. Plant Lectins Chemical and Biological Aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86 (Suppl II), p. 211-218, 1991.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; MARTINS, J. L.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasil*, v. 8, n. 1, p. 23-29, 1996.

NAISMITH, J.H. & FIELD, R.A. Structural Basis of Trimannoside Recognition by Concanavalin A. *The Journal of Biological Chemistry* v. 271, N 2(12), p. 972–976, Jan. 1996.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.; MOTA, M.L.; BITTENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPLAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. *Int Immunopharmacol, Uberaba*, v. 7, n. 6, p. 824-835, 2007.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research*, 20, 462–466. 1960.

NUNES, B.S.; RENSONNET, N.S.; DAL-SECCO D.; VIEIRA S.M.; CAVADA B.S.; TEIXEIRA E.H.; MOURA T.R.; TEIXEIRA C.S.; CLEMENTE-NAPIMOGA J.T.; CUNHA F.Q.; NAPIMOGA M.H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Uberaba, v. 379, n. 6, p. 609-616, 2009.

PAWLOWSKI, K.; BIERZYNSKI, A.; GODZIK, A.. Structural Diversity in a Family of Homologous Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 258, 349–366, 1996.

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

PEUMANS, W.J. et al. Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign plectins. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, v.12, n.64, p.83-101, Mar. 2000.

PEUMANS, W.J.; ALLEN, A.K. & CAMMUE, B.P.A. A new lectin from meadow saffron (*Colchicum autumnale*). *Plant. Physiol.* V.82, p. 1036-1039, 1986.

PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger and P. H. Zwart. *Acta Cryst. D66*, 213-221 2010.

ROPER, D. I. et al. The molecular basis of vancomycin resistance in clinically relevant Enterococci: crystal structure of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.16, p.8921-8925, Aug. 2000.

RUDIGER, H.; GABIUS, H.J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjug. J.*, v.18, p.589– 613, 2001.

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

SHARMA, V., SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site “loops” and their primary specificity. *Journal of Molecular Biology* 267, 433–445. 1997

SHARON, N. & LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. *FASEB J.*, 4: 3198-3208. 1990.

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

SHARON, N.; LIS H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, Rehovot , v. 246, p. 227-34, 1989.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A.. Subunit assembly of plant lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, Volume 17, Issue 5, Pages 498-505, 2007.

SUMMER, J. B. AND HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. *Journal of Bacteriology*, 32, 227-237. 1936.

VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different manose-binding lectin from tulip bulbs. *Eur. J. Biochem.*, v. 236, p. 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*, 17(6), 575–692. 1998

VAN PARAJIS, J., BROEKAERT, W. E. & GOLDSTEIN, J. I. Hevein an antifungal protein for a rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Plant*. 183, p. 258-262, 1998.

VIJAYAN, M. & CHANDRA, N. Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 9, 707–714. 1999.

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.

WATKINS, W.M. A half century of blood-group antigen research: some personal recollections. Trends Glycosci. Glycotechnol. V. 11, p. 391-411, 1999.

Visitado em:

http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Dioclea_violacea.htm