



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

VANIR REIS PINTO JÚNIOR

ANÁLISE ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea lasiophylla*
Mart. ex Benth E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO VASORELAXANTE,
INFLAMATÓRIO E NOCICEPTIVO.

FORTALEZA

2016

VANIR REIS PINTO JÚNIOR

ANÁLISE ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea lasiophylla*
Mart. ex Benth E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO VASORELAXANTE, INFLAMATÓRIO
E NOCICEPTIVO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2016

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

- P732a Pinto Júnior, Vanir Reis.
Análise estrutural de uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth e avaliação do seu efeito vasorelaxante, inflamatório e nociceptivo / Vanir Reis Pinto Júnior. – 2016.
111 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Lectina. 2. *Dioclea lasiophylla*. 3. Espectrometria de massas. 4. Modelagem molecular. 5. Contratilidade. I. Título.

CDD 660.6

VANIR REIS PINTO JUNIOR

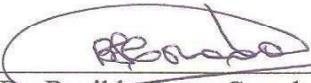
ANÁLISE ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea lasiophylla*
Mart. ex Benth E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO VASORELAXANTE, INFLAMATÓRIO
E NOCICEPTIVO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

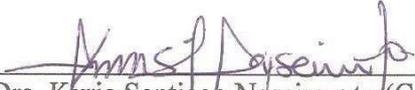
Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Aprovada em: 18 / 02 / 2016 .

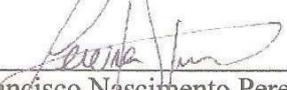
BANCA EXAMINADORA



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



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



Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

“Unir-se é um bom começo, manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória.”

Henry Ford

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida e pelas vitórias e bençãos que tem me proporcionado.

Aos meu pais, Vanir Reis Pinto e Maria do Socorro Viana Reis, por todo o amor, companheirismo, educação, saúde, e por todos os momentos de felicidade que tivemos juntos, essa é mais uma conquista que dedico a vocês, não só por terem me dado a vida, mas também por sempre se importarem com minha educação e essa vitória é um reflexo disso. Amo vocês.

Agradecimento especial a minha namorada, Mayara Queiroz de Santiago, que sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e tristes, por sempre ser companheira, amorosa e carinhosa. Nós nos formamos juntos, do Ensino Médio até o Mestrado, seguindo a mesma profissão, e sou muito feliz de ter você ao meu lado, tanto na vida pessoal, quanto a profissional, te amo muito, e que venham mais conquistas para nós.

Agradeço a toda minha grande família que tem me apoiado em vários momentos de minha vida, proporcionando ótimos momentos quando estamos juntos, grande abraço para todos. Um agradecimento especial a minha Avó Paterna, Glycia Haydée Reis Pinto, e meu padrinho Wilson Reis Pinto, por todo amor e apoio em vários momentos difíceis, sem vocês isso não seria possível, amo muito vocês.

A minha Tia Ivonete Viana e Silva, por todo apoio que você me deu na minha educação, que sempre acreditou em mim, nunca esquecerei da senhora, sempre estará no coração de todos.

Aos todos meus amigos, em especial Vinicius Osterne e Adolph Barreto, pelos momentos de diversão e companheirismo, formamos uma boa equipe juntos, tanto nos momentos de diversão, como também no trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Junior, pelo companheirismo, momentos divertidos e todos os ensinamentos teóricos e práticos, você vai longe! Também quero agradecer por ter aceito o convite de participar da minha banca examinadora do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada e Profa. Dra, Kyria Santiago do Nascimento, por ter me dado a oportunidade de iniciar minha carreira científica, por todo apoio e conhecimento proporcionado e pela ótima orientação durante a Graduação e Mestrado.

A todos os colegas do BioMol-LAB, que me deram suporte em toda jornada, trocando informações, conhecimento e momentos de descontração.

A FUNCAP pela bolsa de Mestrado e financiamento da pesquisa.

RESUMO

Lectinas são (glico)proteínas de origem não imune, capazes de se ligarem reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos, através de um domínio não catalítico. A família das leguminosas representa o grupo mais bem estudado, com muitas lectinas purificadas, caracterizadas estruturalmente e aplicadas em atividades biológicas e biotecnológicas. A subtribo Diocleinae apresenta lectinas que possuem alta similaridade estrutural, porém apresentam diferentes efeitos em ensaios de atividade biológica. Esta variabilidade é devido a pequenas diferenças que podem ser analisadas em estudos estruturais. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo caracterizar estruturalmente, bem como analisar o efeito em modelos de contratilidade, inflamação e nocicepção, de uma lectina presente em sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth, espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae. A lectina (DlyL) foi purificada em uma única etapa através de cromatografia de afinidade em matriz Sephadex G-50. A sequência de aminoácidos de DlyL foi determinada por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) em conjunto com o sequenciamento do gene que codifica para a lectina, que apresentou alta similaridade com outras lectinas de espécies da mesma subtribo. A estrutura tridimensional de DlyL complexada com X-Man foi predita *in silico* através de modelagem por homologia. DlyL apresentou efeito vasorelaxante em músculo liso de aortas endotelizadas de rato, como também atividade inflamatória no modelo de edema de pata em rato. A lectina apresentou efeito hipernociceptivo associado a inflamação, determinado pelo método Von Frey.

PALAVRAS-CHAVE: Lectina, *Dioclea lasiophylla*, espectrometria de massas, modelagem molecular, contratilidade, inflamação, nocicepção.

ABSTRACT

Lectins are (glyco)proteins of non-immune origin, capable of reversibly binding to specific mono or oligosaccharides, via a non-catalytic domain. The legume family is the most well-studied group, with many lectins purified, structurally characterized and applied in biological and biotechnological activities. The subtribe Diocleinae presents lectins that have high structural similarity, but different effects on biological activity assays. This variability is due to small differences which may be analyzed by structural studies. In context, this study aims to structurally characterize and analyze the effect on contractility, inflammation and nociception studies, of a lectin present in *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth seeds, species of the Leguminosae family, Papilionoideae subfamily, Phaseoleae tribe, Diocleinae subtribe. The lectin (DlyL) was purified in a single step by affinity chromatography on Sephadex G-50 matrix. The primary sequence of DlyL was determined by tandem mass spectrometry (MS/MS) and sequencing of the gene encoding to the lectin, showing high similarity with others lectins from species of the same genus. The three-dimensional structure of DlyL complexed with X-Man was predicted *in silico* by homology modelling. DlyL presented vasorelaxant effect on smooth muscle of rat's endothelialized aortas as well as inflammatory activity in the rat paw edema model. The lectin presented hipernociceptive effect associated with inflammation, determined by Von Frey method.

KEYWORDS: Lectin, *Dioclea lasiophylla*, mass spectrometry, homology modelling, contractility, inflammation, nociception.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da classificação dos quatro tipos de lectinas de plantas.	19
Figura 2 - Classificação das lectinas vegetais.	23
Figura 3 - Estruturas tridimensionais das lectinas do gênero <i>Parkia</i>	24
Figura 4 - Conformação de um monômero de lectina de leguminosa (<i>Jellyroll</i>).	27
Figura 5 - Representação da interface de dímero canônico da lectina de <i>Canavalia boliviana</i> (<i>ConBol</i>).	29
Figura 6 - Representação do posicionamento do sitio de reconhecimento a carboidrato e sitio de ligação a metais na estrutura tridimensional da <i>ConBol</i> (PDB 4K21).	29
Figura 7 - Representação esquemática do processo de permutação circular de lectinas do tipo <i>ConA</i>	32
Figura 8 - Liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio 37	37
Figura 9 - Evolução da inflamação aguda. Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.	39
Figura 10 - Sequência de eventos no recrutamento leucocitário.	41
Figura 11 - Transdução do estímulo doloroso ao Sistema Nervoso Central por nociceptores.	43
Figura 12 - Representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas.	45
Figura 13 - Esquema de um espectrômetro de massa em tandem do tipo triplo quadrupolo.	47
Figura 14 - Esquema de um espectrômetro de massa híbrido Q-ToF.	48
Figura 15 - Fotos da inflorescência e de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i>	53
Figura 16 - Perfil cromatográfico e eletroforético (SDS-PAGE) de <i>DlyL</i>	65
Figura 17 - Sequência primária do precursor e da proteína madura de <i>DlyL</i>	67
Figura 18 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i> (<i>DlyL</i>) com lectinas da subtribo <i>Diocleinae</i>	68
Figura 19 - Gráfico de Ramachandran das coordenadas da <i>DlyL</i>	70
Figura 20 - Representação do monômero de <i>DlyL</i> complexado com X-Man, por modelagem estrutural.	71
Figura 21 - Sobreposição das estruturas de <i>DlyL</i> - <i>DvirL</i>	72
Figura 22 - Demonstração do sitio de ligação a metais e sitio de reconhecimento da sobreposição <i>DlyL</i> - <i>DvirL</i>	74
Figura 23 - <i>DlyL</i> induz relaxação em aorta endotelizada pré-contraída com fenilefrina via NO.	76
Figura 24 - <i>DlyL</i> induz edema de pata de curta duração.	77
Figura 25 - <i>DlyL</i> induz hipernocicepção plantar.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tipos de interface formados entre monômeros de lectinas de leguminosas.	28
Tabela 2 - Exemplos de atividades biológicas de lectinas da subtribo Diocleinae.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstroms
ASC	Área sob a curva
BanLec	Lectina da banana
CFL	Lectina extraída de sementes de <i>Cratylia floribunda</i>
CGL	Lectina extraída de sementes de <i>Canavalia gladiata</i>
CID	Dissociação Induzida por Colisão
ConA	Lectina extraída de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBol	Lectina extraída de sementes de <i>Canavalia boliviana</i>
ConGF	Lectina extraída de sementes de <i>Canavalia grandiflora</i>
ConV	Lectina extraída de sementes de <i>Canavalia virosa</i>
CoxyL	Lectina extraída de sementes de <i>Canavalia oxyphylla</i>
CRL-1	Lectina 1 extraída de sementes de <i>Cymbosema roseum</i>
Da	Daltons
DlyLRV	Oligonucleotídeo iniciador da região 3'
DlyLFW	Oligonucleotídeo iniciador da região 5'
Dgui	Lectina extraída de sementes de <i>Dioclea guianensis</i>
DlyL	Lectina extraída de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i> Mart. ex Benth
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo tri-fosfatado
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidrato
DrfL	Lectina extraída de sementes de <i>Dioclea reflexa</i>
DSL	Lectina extraída de sementes de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
Dvir	Lectina extraída de sementes de <i>Dioclea virgata</i>
DVL	Lectina extraída de sementes de <i>Dioclea violacea</i>
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase
ESI	Ionização por ElectroSpray
FRIL	Lectina de <i>Dolichos lablab</i>
FT-ICR	Ressonância Ciclôtrônica de Íons com Transformada de Fourier
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
LC	Cromatografia líquida

L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz
ML-1	Lectina de <i>Viscum álbium</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Espectrometria de massa
MS/MS	Espectrometria de massa em sequência (tandem)
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NO	Oxido Nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalina-1-ona
PBL	Lectina 1 extraída de sementes de <i>Parkia biglobosa</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
pI	Ponto isoelétrico
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaeae</i>
PPL-1	Lectina 1 extraída de sementes de <i>Parkia platycephala</i>
PPL-2	Lectina 2 extraída de sementes de <i>Parkia platycephala</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletoforese em condição desnaturante ou na presença de SDS
SLM	Sítio de ligação a metais
SRC	Sítio de reconhecimento a carboidrato
ToF	Analisador de massa por tempo de voo
TxLCl	Lectina do bulbo de tulipa
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta
WGA	Aglutinina de gérmen de trigo
X-Man	5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-manose
α -CH3	α -metil-D-manosideo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Considerações iniciais	13
1.2 Lectinas.....	15
1.2.1 Breve histórico	15
1.2.2 Definição e classificação estrutural de lectinas.....	17
1.2.2.1 Merolectinas	18
1.2.2.2 Hololectinas.....	18
1.2.2.3 Quimerolectinas	18
1.2.2.4 Superlectinas	19
1.2.3 Lectinas de plantas.....	20
1.2.4 Aspectos gerais de lectinas de leguminosas.....	24
1.2.5 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas	26
1.2.6 Lectinas da subtribo Diocleinae	30
1.2.7 Aplicação e atividades biológicas de lectinas.....	32
1.3 Atividade vasorelaxante	34
1.4 Inflamação.....	37
1.5 Nocicepção.....	41
1.6 Espectrometria de massas.....	44
1.7 Sequenciamento de DNA por Sanger	48
1.8 Modelagem molecular	50
1.9 Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i> Mart. ex Benth.....	53
2 OBJETIVOS.....	54
2.2 Objetivo Geral	54
2.3 Objetivos específicos.....	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1 Material Vegetal	55
3.2 Purificação da lectina (DlyL) de sementes <i>Dioclea lasiophylla</i> Mart. ex Benth.....	55
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)	55
3.4 Digestão em gel e sequenciamento dos peptídeos por MS/MS	56
3.5 Extração de DNA genômico.....	57
3.6 Amplificação do gene codificador da lectina.....	58
3.7 Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T-easy.....	59

3.8	Transformação bacteriana	59
3.9	Purificação dos plasmídeos recombinantes e confirmação da transformação	60
3.10	Análise da sequência dos fragmentos	60
3.11	Análises de bioinformática da estrutura primária de DlyL	61
3.12	Modelagem Molecular.....	61
3.13	Avaliação do efeito vasorelaxante	62
3.14	Avaliação da atividade inflamatória em modelo de edema de pata.....	63
3.15	Avaliação do efeito nociceptivo no teste Von Frey	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1	Purificação da Lectina de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i>	65
4.2	Estrutura primária de DlyL	65
4.3	Estrutura terciária de DlyL.....	70
4.4	Efeito vasorelaxante de DlyL.....	75
4.5	Efeito inflamatório e hipernociceptivo de DlyL.....	77
5	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Carboidratos são a classe de macromoléculas mais abundantes da natureza, compostas principalmente por carbono, oxigênio e hidrogênio. Possuem estrutura complexa, devido à grande variedade de moléculas, inúmeras possibilidades de interligações e alto número de conformações que podem adotar (SHARON; LIS, 1993). Durante muitos anos, as únicas funções conhecidas para essas moléculas eram de fonte energética para seres vivos (na forma de monossacarídeos e oligossacarídeos) e como componentes estruturais, como exemplo temos a celulose em plantas e a quitina no exoesqueleto de insetos, ambos classificados como polissacarídeos.

Na década de 60, muitos estudos demonstraram a importância dessas moléculas em mecanismos de interação célula-célula e sinalização molecular intra- e extracelular, sendo elementos determinantes em processos de reconhecimento em vários processos biológicos (SHARON; LIS, 1997). Carboidratos estão presentes na superfície de células formando uma espécie de camada, chamada de glicocálice, e participam de mecanismos de reconhecimento por outras células, microrganismos invasores (vírus e bactérias, por exemplo) ou outras classes de moléculas, como proteínas, anticorpos, hormônios e toxinas. Dessa forma, os carboidratos podem atuar como mensageiros entre células atuando em fenômenos de proliferação, diferenciação e interações celulares em diversas condições fisiopatológicas (GABIUS, 2000).

Carboidratos também podem estar ligados covalentemente a outras biomoléculas (devido a um processo chamado de glicosilação), como lipídios e proteínas, influenciando na conformação tridimensional dessas moléculas, como também em mecanismos de sinalização celular (OHTSUBO; MARTH, 2006). Alguns estudos já mostraram que a identificação de padrões anormais de glicosilação em células podem ser utilizados para diagnóstico de algumas doenças, como por exemplo, o câncer (DENNIS; GRANOVSKY; WARREN, 1999; PINHO; REIS, 2015).

A composição, sequência e organização estrutural dos glicanos que estão conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células, formam o que é chamado de “glicocódigo”, no qual estarão associados a um tipo de biomolécula ou célula (OHTSUBO; MARTH, 2006). Lectinas têm-se mostrado excelentes ferramentas em estudos de processos biológicos envolvendo carboidratos como mediadores, devido a propriedade dessas proteínas

de interagir com carboidratos especificamente e serem capazes de decifrar glicocódigos (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Lectinas são definidas como (glico)proteínas de origem não imune capazes de reconhecer especificamente mono ou oligossacarídeos, ligando-se a estes sem, no entanto, alterar suas estruturas químicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LANOO; VAN DAMME, 2014). Em geral, as lectinas são oligoméricas, e a ligação a carboidratos é reversível envolvendo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Walls (SHARON; LIS, 2002).

Alguns fatos contribuem para importância da pesquisa de lectinas e sua aplicação na área médica e na agricultura, como sua ocorrência em inúmeras espécies de plantas em diferentes tecidos, sua capacidade de reconhecer diferentes carboidratos, sua diversidade estrutural, potencial uso como agentes de defesa em plantas, capacidade de reconhecer e diferenciar diversos tipos celulares em modelos animais promovendo diversos mecanismos, como apoptose, proliferação, indução na produção de metabólitos e a possibilidade de serem aplicadas em processos de “*drug delivery*” (RÜDIGER; GABIUS, 2001; BARBOSA *et al.*, 2001; BIES *et al.*, 2004; MAKHLOF *et al.*, 2010).

Com essas propriedades, as lectinas tem sido utilizadas como ferramentas biotecnológicas e apresentaram ótimos resultados, tais como: atividade anti- e pró-inflamatória (BEZERRA *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016), efeito vasodilatador (OSTERNE *et al.*, 2014; ROCHA *et al.*, 2015; BARROSO-NETO *et al.*, 2016), atividade antifúngica (SOUZA *et al.*, 2011) atividade inseticida (OHIZUMI *et al.*, 2009; BENETEAU *et al.*, 2010; ATALAH; SMAGGHE; VAN DAMME, 2014).

As lectinas mais bem estudadas são pertencentes à família *Leguminosae* que compreendem um amplo grupo de proteínas estruturalmente similares (CAVADA *et al.*, 2001). Dentre estas, as encontradas na subtribo *Diocleinae* exibem especificidade de reconhecimento aos monossacarídeos manose e glicose, e possuem elevado grau de similaridade em suas sequências de aminoácidos e estruturas tridimensionais, especialmente as lectinas dos gêneros *Dioclea* e *Canavalia*, que têm sido as mais extensivamente purificadas, caracterizadas, estruturalmente resolvidas e biologicamente caracterizadas (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2014; OSTERNE *et al.*, 2014; PEREIRA-JUNIOR, 2014; BARROSO-NETO *et al.*, 2014; BEZERRA *et al.*, 2014).

Apesar das lectinas possuírem alta conservação de sequência terciária, as respostas biológicas desencadeadas por elas podem diferir em tipo e intensidade. Devido a essas propriedades, tem despertado o interesse pela purificação e caracterização de novas lectinas para possíveis aplicações biotecnológicas (GABOR *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2003; SHARON; LIS, 2004).

1.2 Lectinas

1.2.1 Breve histórico

No século XIX alguns trabalhos evidenciaram a existência de moléculas capazes de aglutinar eritrócitos. O termo aglutinina foi proposto para denominar os extratos que possuíam capacidade de aglutinação, porém não foi bem aceito por alguns imunologistas, pois eram de origem vegetal. Apenas em 1954, quase um século depois, foi criada a primeira definição de lectinas proposta por Boyd e Shapleigh, que observaram especificidade de aglutinação de extratos de plantas por determinados grupos sanguíneos (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). O termo lectina, derivado da palavra em latim “*legere*” (significa escolher ou selecionar), tornou-se o mais apropriado, porque moléculas capazes de aglutinar eritrócitos são encontradas em quase todos tecidos examinados (DOYLE; SLIFIKIN, 1994).

O primeiro trabalho que reporta aglutinação de células sanguíneas foi em 1860, de S. Weir Mitchell, determinando a capacidade do veneno de *Crotalus durissus* de aglutinar eritrócitos de pombo. A primeira descrição de lectinas ocorreu em 1888 por Peter Hermann Stillmark, com seu trabalho de toxicidade de extratos de mamona, *Ricinus communis*, onde relatou uma proteína altamente tóxica capaz de aglutinar eritrócitos, nomeando-a de Ricina. Anteriormente a este trabalho (1884), Stillmark e seu grupo tinham avaliado a toxicidade de extratos de *Abrus precatorius*, porém somente em 1890, Hellin relatou a capacidade de *Abrus precatorius* em aglutinar eritrócitos, determinando que era uma lectina e a nomeou de Abrina (SHARON; LIS, 2004).

Em 1891, o pesquisador Paul Ehrlich conseguiu estabelecer princípios fundamentais de imunologia usando Ricina e Abrina, relatando o princípio da reação antígeno/anticorpo, a transferência de imunidade passada de mãe para filho e o fenômeno de memória imunológica (SHARON; LIS, 2004). Elfstrand em 1898, utilizou pela primeira vez o termo “hemaglutinina”, utilizado para classificar todas as proteínas capazes de aglutinar células (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Os relatos obtidos por Stillmark já indicavam seletividade da Ricina por células sanguíneas de alguns animais. Em 1900, o pesquisador Karl Landsteiner classificou os grupos sanguíneos humanos A, B e O. Anos mais tarde, ele reportou que extratos, não tóxicos, de sementes de plantas (*Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* e *Vicia sativa*) possuíam atividade hemaglutinante diferente quando testados com eritrócitos de animais diferentes (LANDSTEINER; RAUBITSCHKEK, 1907). Estes indícios levaram a crer que cada lectina tinha uma capacidade hemaglutinante diferente entre si (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, James B. Sumner na Universidade Cornell (Ithaca, Nova York) a partir de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), conseguiu purificar a primeira lectina vegetal e a nomeou de Concanavalina A. Sumner e Howell, em 1936, demonstraram que a Concanavalina A era capaz de aglutinar eritrócitos e células de levedura, como também precipitar glicogênio em solução. Além disso, conseguiram mostrar que a hemaglutinação era inibida por sacarose, demonstrando que a lectina possuía especificidade a carboidratos e sugeriram que a hemaglutinação induzida por Concanavalina A poderia ser consequência da ligação da lectina com carboidratos presentes na superfície de células sanguíneas (SHARON; LIS, 2004). Na década de 50, Watkins e colaboradores, demonstraram que a atividade hemaglutinante que as lectinas possuíam, era devido a capacidade dessas proteínas de interagirem com carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952).

Até 1960, apenas algumas lectinas haviam sido isoladas, principalmente a partir de plantas e invertebrados. O aumento do interesse em pesquisa com lectinas foi com a descoberta da PHA, lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*, que apresentou atividade mitogênica para linfócitos (MOREIRA *et al.*, 1991). Em pouco tempo, várias outras lectinas provaram ser mitogênicas. Em especial, a descoberta que a Concanavalina A era mitogênica, pois sua atividade podia ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos como a manose. Esta descoberta forneceu indícios que a atividade mitogênica de lectinas era devido a reação entre a proteína e os carboidratos presentes na superfície dos linfócitos.

Inicialmente o termo lectina era utilizado somente para nomear moléculas que possuíam capacidade de aglutinar células, o que gerou a necessidade de diferenciar essas proteínas de outras moléculas que possuem a mesma capacidade, como taninos, alguns lipídios, substâncias catiônicas. Com os avanços do conhecimento de lectinas, as definições para essas proteínas foram ampliadas, entretanto, todas se enquadram dentro de três requisitos principais, que são: são (glico) proteínas capazes de reconhecer carboidratos de forma específica, não se associam ao sistema imunológico e as lectinas não alteram a estrutura

química do seu ligante (GABIUS, 1997; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KOCOUREK; HOREJSI, 1983).

O fato das lectinas não causarem alterações estruturais às moléculas que ligam permite também as distinguir de certas enzimas como glicosiltransferases e glicosidases, que a baixas temperaturas ocorre diminuição da atividade de hidrólise das ligações glicosídicas e promove a ligação da enzima com a superfície das células, promovendo a aglutinação (SHANNON; HANKINS; STROBERG, 1981).

Para uma melhor compreensão das atividades biológicas das lectinas e seu grande potencial, pesquisas visaram analisar estruturalmente essas proteínas, até mesmo a nível molecular. Em 1972, a estrutura tridimensional de ConA foi determinada por cristalografia de raios X (EDELMAN *et al.*, 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1972).

Muitas lectinas foram isoladas de plantas, vírus, bactérias, invertebrados e vertebrados. Muitas estruturas primárias e terciárias foram determinadas nesses últimos anos (SINGH *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2013; BEZERRA *et al.*, 2014; BARROSO-NETO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2015; BARROSO-NETO *et al.*, 2016), a partir desses dados muitos fenômenos bioquímicos envolvendo lectinas foram relatados (DELATORRE *et al.*, 2007; DELATORRE *et al.*, 2013). Além disso, várias funções como reconhecimento célula-molécula e interações célula-célula em uma variedade de sistemas biológicos e aplicações de lectinas, por exemplo na glicoproteômica, tem sido estabelecidos (SHARON; LIS, 2004; ABBOTT; PIERCE, 2010; ZENG *et al.*, 2011).

1.2.2 Definição e classificação estrutural de lectinas

Lectinas são um grupo de proteínas muito heterogêneo e amplamente distribuído na natureza. Durante o processo evolutivo, essas proteínas conservaram uma característica em comum, que consiste na sua habilidade para reconhecer e ligar-se de forma reversível a carboidratos específicos sem alterar estruturalmente os mesmos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LANOO; VAN DAMME, 2014). De acordo com Peumans e Van Damme (1995), lectinas podem ser definidas como uma classe de proteínas de origem não imune capazes de se ligarem reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos através de um domínio não catalítico (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; LANOO; VAN DAMME, 2014). Essa definição se baseia no tipo de interação da proteína com seu ligante, não se detém às suas habilidades de hemaglutinação de células e glicoconjugados, sendo a definição mais aceita atualmente.

O grupo de Van Damme subdividiu as lectinas vegetais baseados em sua estrutura geral e as separou em quatro grupos: as merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (FIGURA 1) (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.2.2.1 Merolectinas

As merolectinas são proteínas que possuem apenas um único domínio de ligação a carboidrato. Devido a seu caráter monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Um exemplo de merolectina é a Heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que possui especificidade à quitina. (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

1.2.2.2 Hololectinas

As hololectinas são o tipo de lectinas mais estudadas, ao contrário das merolectinas, possuem mais de um sítio de ligação a carboidratos, sendo estes muito idênticos ou semelhantes, e assim são capazes de precipitar células e aglutinar glicoconjugados. Podemos citar as lectinas isoladas de espécies da subtribo Diocleinae, as lectinas de *Canavalia boliviana* (ConBol) (BEZERRA *et al.*, 2014), *Canavalia oxyphylla* (CoxyL) (SANTIAGO *et al.*, 2014), *Canavalia virosa* (ConV) (OSTERNE *et al.*, 2014), *Dioclea reflexa* (DrfL) (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016) e *Dioclea sclerocarpa* (DSL) (BARROSO-NETO *et al.*, 2016)

1.2.2.3 Quimerolectinas

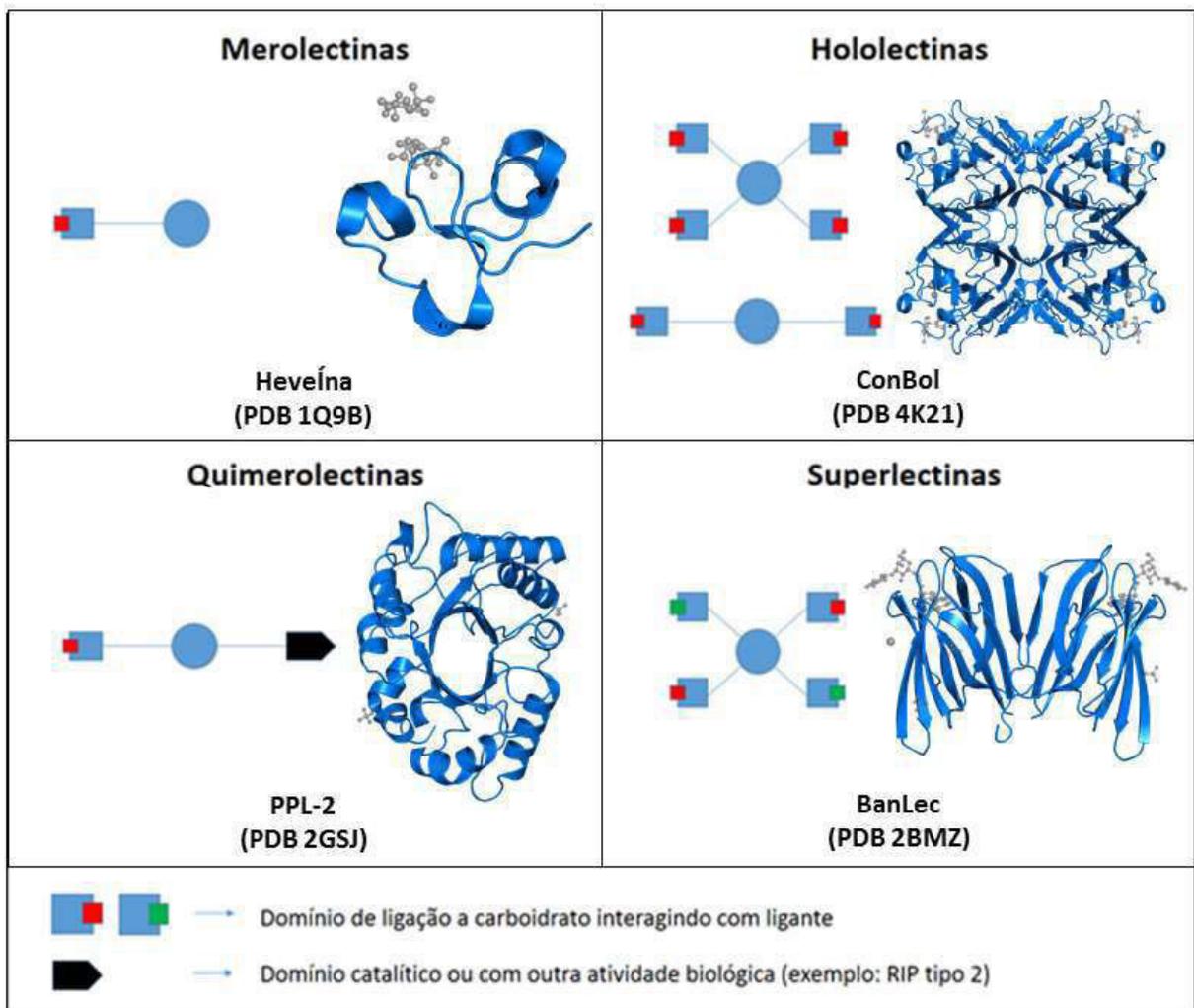
As quimerolectinas são proteínas que possuem, além do domínio de reconhecimento a carboidrato (DRC), um domínio que possui atividade catalítica, ou outra atividade biológica, independente do DRC. Dependendo do número de DRC's, podem ou não aglutinar hemácias. Como exemplo de quimerolectina temos a PPL-2, uma lectina isolada de sementes de *Parkia platycephala* que possui, além do sítio de reconhecimento a carboidrato, um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006). Outro exemplo, é a lectina 2 de *Dolichos lablab* que possui um domínio de reconhecimento a galactose e possui um sitio catalítico com atividade polifenoxidásica (KANADE *et al.*, 2009). Podemos destacar também as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP tipo 2), como exemplo temos a

Ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos, sendo capaz de aglutinar células, e um domínio para a inativação de ribossomo (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.2.2.4 Superlectinas

As superlectinas são um grupo de proteínas que possui dois ou mais DRC's que possuem especificidade a açúcares estruturalmente e funcionalmente diferentes. Como exemplo, podemos citar a lectina do bulbo de tulipa (TxLCl), que possui um DRC específico para manose e outro específico para GalNAc, e a lectina da banana (BanLec) (VAN DAMME *et al.*, 1996; SINGH; DEVI; NG, 2014)

Figura 1 -Representação da classificação dos quatro tipos de lectinas de plantas.



Fonte: adaptado de PINTO-JUNIOR, 2013

1.2.3 Lectinas de plantas

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas desde organismos mais simples, como vírus (GLICK *et al.*, 1991) e bactérias (IMBERTY *et al.*, 2004), como também em organismos mais complexos, como fungos (KAWAGISHI *et al.*, 2001), insetos (TAKASE *et al.*, 2009), animais e plantas (KILPATRICK *et al.*, 2002). Em plantas, elas podem ser obtidas de sementes (COELHO, 2006), onde são produzidas em maior concentração, que pode constituir até 10% das proteínas totais de semente (LORIS, 2002; SHARON; LIS, 2004), embora possam ser encontradas em outros tecidos das plantas, como folha (RATANAPO; NGAMJUNY; CHULAVATNATOL, 2001; PEREIRA *et al.*, 2008), caule (ZANETTI, 2007), raízes (YAN *et al.*, 2010), frutos (SAMPIETRO *et al.*, 2001), porém são produzidas em baixas concentrações (VAN DAMME, *et al.*, 1998).

Na tentativa de organizar as lectinas vegetais em grupos, Van Damme e colaboradores (1998) classificaram as lectinas relacionando estruturas primárias e terciárias presentes em bancos de dados, com dados filogenéticos, formando sete grupos ou famílias (FIGURA 2). Podemos destacar:

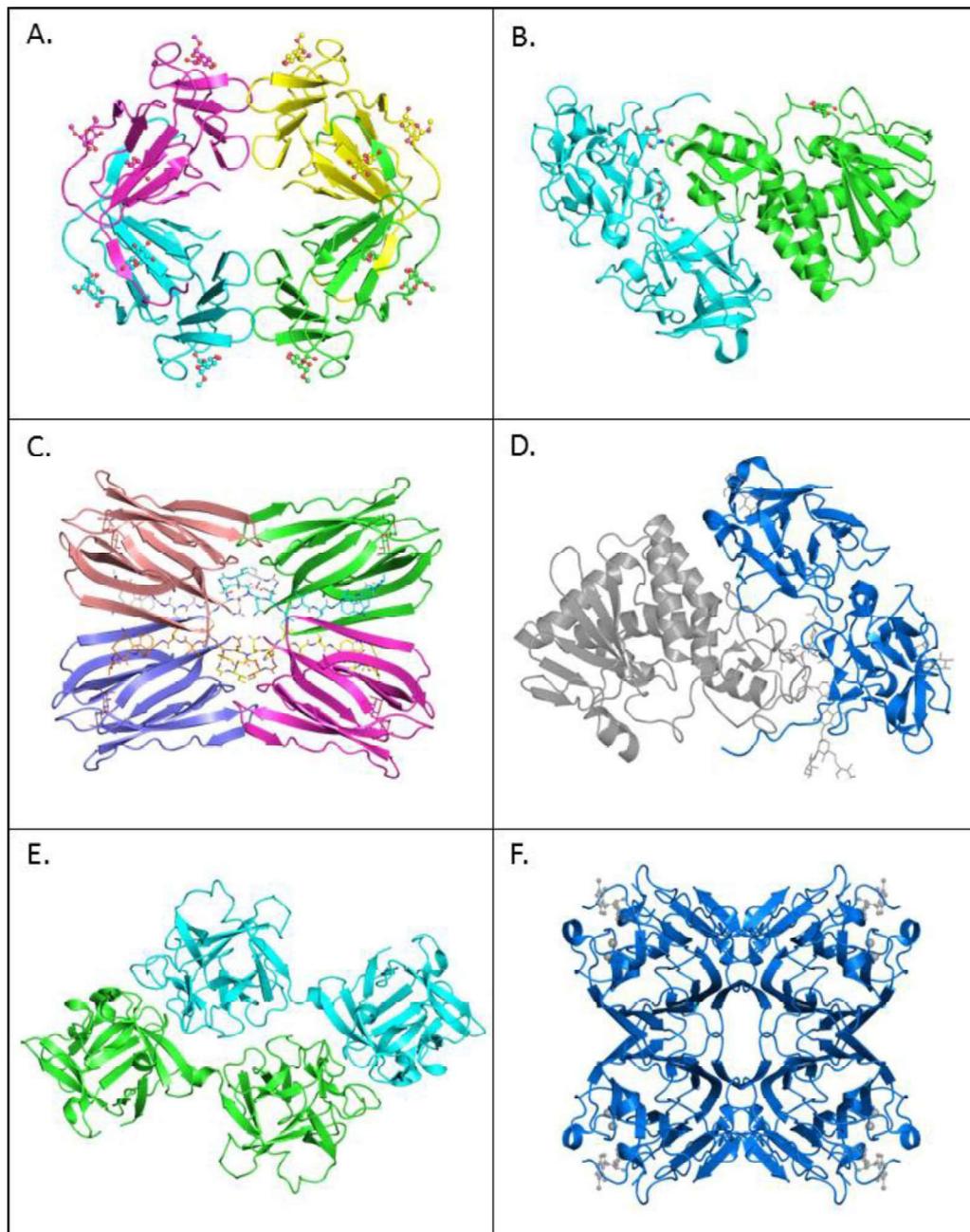
- a. *Lectinas de monocotiledôneas do tipo manose*: refere-se a lectinas com especificidade a manose, estreitamente relacionadas e que são encontradas em monocotiledôneas. Foram encontradas, até então, em seis diferentes famílias de plantas: *Alliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Araceae*, *Bromeliaceae*, *Liliaceae* e *Orchidaceae*. Apresentam alta similaridade de estrutura primária, mas são heterogêneas em relação a estrutura terciária (VAN DAMME *et al.*, 1998). A lectina de *Galanthus nivalis* é uma das principais representantes deste grupo (WRIGHT, HESTER, 1996).
- b. *Lectinas específicas a quitina e homólogas a heveína*: são lectinas capazes de interagir com quitina, mais especificamente à *N*-acetilglicosamina (unidade monomérica constituinte da quitina) e possuem um domínio de reconhecimento a carboidrato semelhante ao da Heveína (VAN DAMME *et al.*, 1998). O termo “domínio heveínico” refere-se a uma merolectina de 43 resíduos de aminoácidos, extraída do látex da *Hevea brasiliensis* (seringueira), que é capaz de reconhecer quitina (WALJUNO *et al.*, 1975). A aglutinina de gérmen de trigo (WGA) é a principal representante dessa classe, é composta de duas subunidades de 18 kDa consistindo de quatro domínios de Heveína estruturalmente semelhantes. (RAIKHEL; LEE;

BROEKAERT, 1993). Outro exemplo de lectina deste grupo é a ML-1, lectina de *Viscum album* (MEYER *et al.*, 2008). Lectinas pertencentes a esse grupo têm sido encontradas em diferentes famílias não relacionadas taxonomicamente, tais como *Gramineae*, *Leguminosae*, *Solanaceae*, *Urticaceae*, *Papaveraceae* e *Amaranthaceae*.

- c. *Lectinas homólogas a Jacalina*: grupo de lectinas que são evolutivamente e estruturalmente relacionadas às aglutininas presentes nas sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca). As lectinas de Jacalina se dividem em dois grupos, o grupo 1, que reconhecem galactose, e grupo 2 que reconhecem manose. O grupo 1 possui uma alta afinidade pelo antígeno-T [Gal β (1,3)GalNAc] (SASTRY *et al.*, 1986; SARKAR; WU; KABAT, 1981). Lectinas relacionadas à jacalina que se ligam a manose possuem duas ou quatro subunidades não glicosiladas de aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos e foram identificadas em muitas espécies em grupos taxonomicamente diferentes (BARI, 2015).
- d. *Lectinas homólogas ao tipo RIP-2*: constituem uma típica família de quimerolectinas formada a partir de uma molécula precursora, a qual sofre processamento pós-traducional, que consiste na excisão de uma ligação entre as cadeias formando duas cadeias polipeptídicas. O termo “proteína inativadora de ribossomos” (RIP) refere-se à capacidade destas de inativarem cataliticamente os ribossomos, que ocorre através da remoção enzimática de um resíduo de adenina específico de um loop na grande subunidade do RNA ribossomal 28 S. A primeira dessas cadeias (cadeia A) é formada por um polipeptídeo constituído de um domínio adenosina glicosidase e a outra cadeia (cadeia B) constituída por um domínio de ligação a carboidratos, sendo que as cadeias permanecem unidas por pontes dissulfeto. Ao penetrar nas células, esta ligação dissulfeto é quebrada e a cadeia A adquire uma forte atividade N-glicosidase tornando-se capaz de inativar cataliticamente ribossomos eucarióticos e procarióticos (VAN DAMME *et al.*, 1998). A atividade e especificidade de ligação a carboidrato das RIPs são estabelecidas somente por sítios de ligação a carboidratos situados na cadeia B. Estudos de especificidade indicaram que a maioria das RIPs são efetivamente inibidas por Galactose ou GalNAc ou por ambos. Todavia os inibidores mais potentes que quaisquer outros monossacarídeos são os dissacarídeos ou oligossacarídeos ricos em galactose. A Ricina (*Ricinus communis*) e Abrina (*Abrus precatorius*) são exemplos clássicos de RIPs tipo 2 com potentes atividades

- biológicas, já tendo sido bem caracterizadas (PEUMANS *et al.*, 2001; VAN DAMME *et al.*, 1998). A lectina de *Abrus pulchellus* (Pulchellina), possui especificidade por galactose, mas apresenta uma maior afinidade para sequências de lactose [β -D-Gal-(1,4)-D-Glc], N-acetilactosamina [β -D-Gal-(1,4)-D-GlcNAc] e lacto-N-biose [β -D-Gal-(1,3)-D-GlcNAc] (RAMOS *et al.*, 2001).
- e. *Lectinas da família das Amaranthaceae*: a amarantina, uma lectina extraída de *Amaranthus caudatus*, não se assemelha a nenhuma outra lectina de planta, tanto com relação a estrutura primária e terciária. Baseado nessas informações, a amarantina é considerada um protótipo da família de lectinas das *Amaranthaceae*. Várias outras lectinas extraídas de plantas do gênero *Amaranthus*, como por exemplo *Amaranthus leucocarpus*, contêm lectinas que são muito similares à amarantina, sendo todas elas lectinas específicas por N-acetilgalactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1998).
- f. *Lectinas de floema de Cucurbitaceae*: são lectinas diméricas compostas de duas subunidades idênticas de 24 kDa que se ligam a resíduos de N-acetilglicosamina. Todas as lectinas conhecidas dos floemas de *Cucurbitaceae* mostram um grau de similaridade de estrutura primária, mas não apresentam qualquer similaridade sequencial com outras lectinas de plantas ou proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1998). Até o momento, não há lectina com estrutura tridimensional resolvida.
- g. *Lectinas de leguminosas*: correspondem à família de lectinas mais estudadas até o momento, com várias lectinas purificadas e caracterizadas. As proteínas desse grupo possuem uma alta similaridade estrutural, porém, especificidade por carboidratos e propriedades biológicas distintas. Se enquadram nesse grupo a Concanavalina-A (ConA), extraída de sementes de *Canavalia ensiformes*, lectinas da tribo Dalbergieae (PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2012; BENEVIDES *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2015) e as lectinas extraídas de plantas da subtribo Diocleinae (SANTIAGO *et al.*, 2014; OSTERNE *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016).

Figura 2 - Classificação das lectinas vegetais.

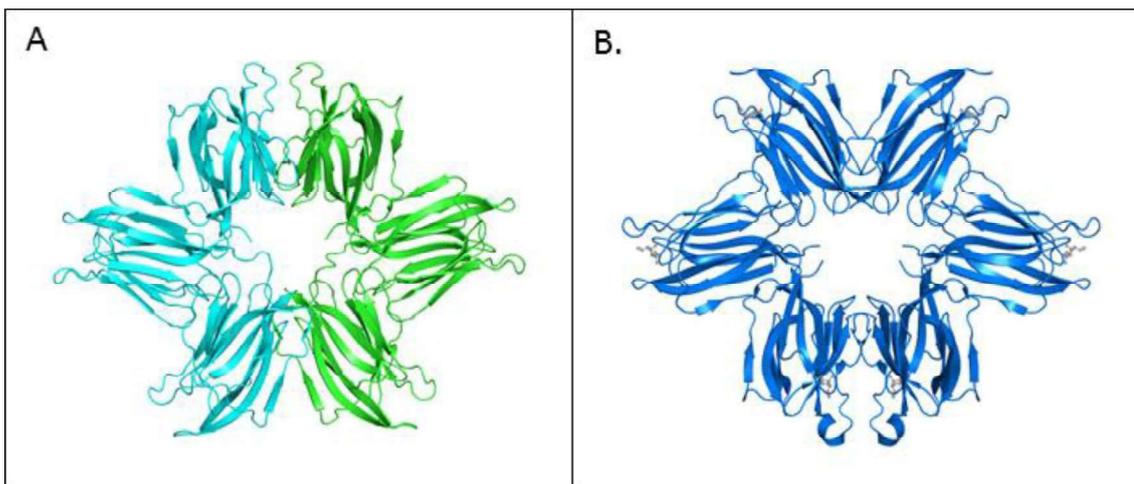


Fonte: Adaptado de VAN DAMME *et al.*, 1998.. (A) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) (PDB 1MSA); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, lectina de *Viscum album* (ML-1) (PDB 1CE7) (C) Lectinas relacionadas às Jacalinas, lectina de *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) (PDB 1M26); (D) RIP's do tipo II, Ricina (PDB 2AAI); (E) Lectina da família da amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA) (PDB 1JLY); (F) Lectinas de leguminosas, *Canavalia boliviana* (ConBol) (PDB 4K21).

Apesar do grupo de Van Damme ter definido essas famílias correlacionando aspectos evolutivos e estruturais das lectinas, na medida que novas lectinas vão sendo descobertas e caracterizadas, propriedades novas ou distintas estão sendo observadas, dessa

forma, essa classificação deixa de existir um limite taxonômico bem definido e passa a ser considerado somente o aspecto estrutural. O sequenciamento de genomas de soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis* revelou que essas espécies possuem centenas de genes que codificam lectinas pertencentes a todas as principais superfamílias de lectinas (JIANG; RAMACHANDRAN, 2010; PEREIRA-JUNIOR, 2014). Um exemplo claro deste fato são as lectinas encontradas nas sementes do gênero *Parkia* (*Parkia platycephala* e *Parkia biglobosa*), que são específicas para manose e glicose, cuja estrutura é composta por três domínios repetidos relacionados à jacalina, porém, são espécies de leguminosas (FIGURA 3) (MANN *et al.*, 2001; GALEGO DEL SOL *et al.*, 2005; BARI, 2015). Essas particularidades mostram que há a necessidade de uma atualização dos dados na literatura para criação de uma nova classificação de famílias de lectinas.

Figura 3 - Estruturas tridimensionais das lectinas do gênero *Parkia*.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Lectina de *Parkia platycephala* (PPL-1) (PDB 1ZGS); (B) Lectina de *Parkia biglobosa* (PBL) (PDB 4MQ0).

1.2.4 Aspectos gerais de lectinas de leguminosas

A família *Leguminosae* compreende 727 gêneros e 19.325 espécies, com cerca de 220 gêneros e 2736 espécies com ocorrência no Brasil. Muitas espécies desta família têm grande importância econômica pela produção de alimentos como: soja (*Glycine max*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e alfafa (*Medicago sativa*). A família leguminosa é morfologicamente subdividida em três subfamílias, *Caesalpinoideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*, sendo a última com maior número de trabalhos publicados envolvendo lectinas.

Lectinas de leguminosas correspondem a família de lectinas mais estudadas e que apresenta o maior número de lectinas isoladas e destacam-se principalmente nas sementes (SHARON; LIS, 1990; CAVADA *et al.*, 1993; CALVETE *et al.*, 1998), onde podem corresponder até 10% das proteínas totais (LORIS *et al.*, 1998; PRAKASHKUMAR *et al.*, 1998; SHARON, 1993). Mais de 100 lectinas dessa família são conhecidas, quase todas isoladas de sementes (SHARON; LIS, 1990).

Estruturalmente, lectinas de leguminosas são geralmente compostas de dois ou quatro monômeros, iguais ou diferentes, com massa molecular variando entre 25 a 30 kDa. Muitas vezes, em cada monômero é encontrado um domínio de um ou mais metais (geralmente cálcio ou manganês) e um sítio de ligação a carboidrato. O domínio de ligação a metais estabiliza o sítio de ligação a carboidrato, orientando os aminoácidos que interagem com os carboidratos (WEIS; DRICKAMER, 1996). Em termos de subunidades, as lectinas são quase sempre compostas de uma cadeia polipeptídica estabilizada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Entretanto, algumas lectinas possuem subunidades formadas por duas cadeias polipeptídicas, entre elas as lectinas da tribo Viciae, gêneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* e *Lens* (ROUGÉ *et al.*, 1987). Estas lectinas são dímeros formados por subunidades iguais e cada subunidade é constituída de uma cadeia α (5 a 7 kDa) e uma β (15 a 19 kDa) mantidas por ligações não-covalentes (SHARON; LIS, 1989).

Algumas espécies de leguminosas possuem isoformas, ou isolectinas, como por exemplo, a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) que é formada por duas subunidades gênicas diferentes, denominadas E (31,7 kDa) e L (29,9 kDa), que combinadas dão origem a uma família de cinco isolectinas tetraméricas: E4, E3L, E2L2, EL3, L4 (FELDESTED *et al.*, 1977). Esse fenômeno ocorre devido essas espécies possuírem famílias multigênicas para a lectina, ou seja, mais de um gene codificando uma lectina, como também pode ser atribuído a processamentos pós-traducionais incompletos (YOUNG *et al.*, 1995). Isolectinas também foram encontradas em *Acacia constricta* (GUZMÁN-PARTIDA *et al.*, 2004), *Sophora japonica* (HANKINS; KINDINGER; SHANNON, 1988), *Lathyrus odoratus* (KOLBERG, 1978), *Robinia pseudoacacia* (VAN DAMME *et al.*, 1995), *Dolichos lablab* (TEIXEIRA *et al.*, 2014) e espécies do gênero *Erythrina* (BONNEIL *et al.*, 2004). A presença de isoformas têm alto impacto sobre a função biológica de lectinas, e a existência de várias isoformas poderia oferecer uma estratégia alternativa ou uma adaptação evolutiva para compensar a baixa especificidade.

As lectinas de leguminosas podem ser agrupadas levando em consideração a especificidade por carboidratos (SHARON; LIS, 1990): (1) ligantes a fucose; (2) a GlcNAc/GlcNAc (β 1-4) GlcNAc; (3) a manose/glicose; (4) a galactose e/ou N-acetil-

galactosamina; (5) aquelas que não se ligam a monossacarídeos. Apesar da grande variabilidade quanto à especificidade por carboidratos, lectinas de leguminosas apresentam alta homologia de estrutura primária e terciária, aproximadamente 20% dos resíduos de aminoácidos são invariantes em todas as lectinas de leguminosas e outros 20% são similares, sendo, portanto, um modelo perfeito para estudos estruturais de proteínas (PEREIRA-JUNIOR, 2014). Os aminoácidos envolvidos na interação com o carboidrato e quase todos os resíduos que coordenam íons metálicos são bastante conservados nas lectinas dessa família (BANERJEE *et al.*, 1996; HAMELRYCK *et al.*, 1998)

1.2.5 Aspectos estruturais de lectinas de leguminosas

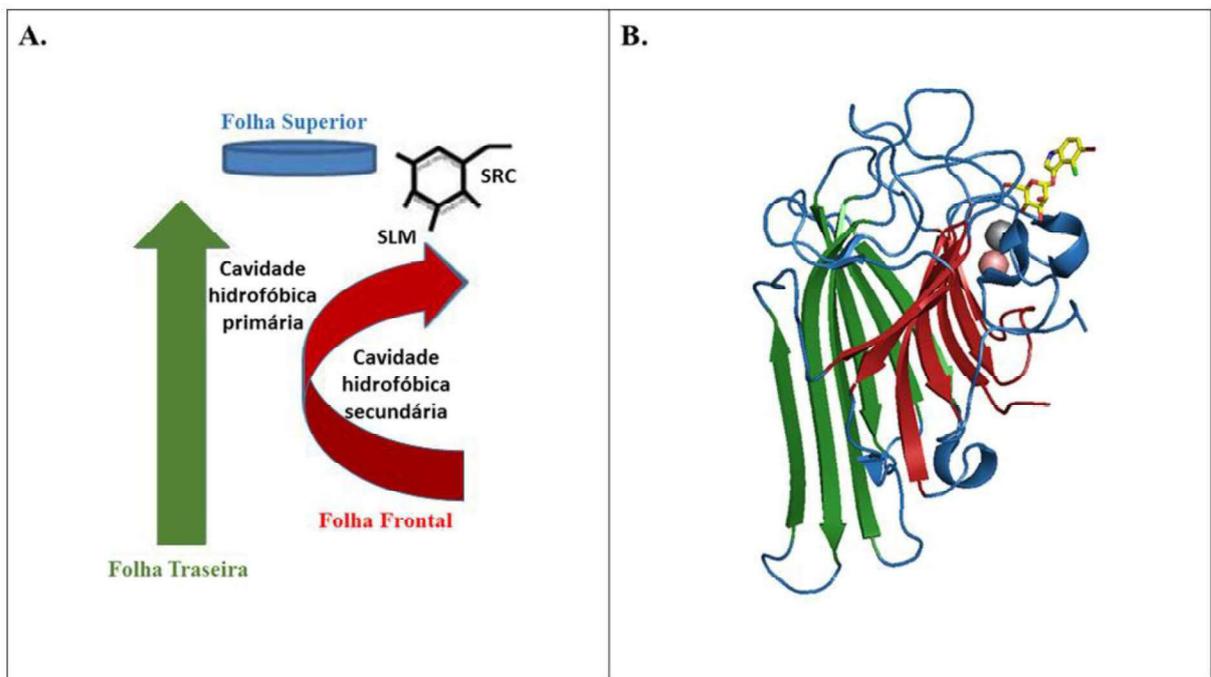
A estrutura tridimensional das lectinas de leguminosas é caracterizada pela presença do motivo proteico conhecido como *jellyroll* (FIGURA 4), também encontrado em outras proteínas e frequentemente associado ao processo de reconhecimento de carboidratos (KEITEL *et al.*, 1993; VARELA *et al.*, 1997). Cada monômero de lectinas de leguminosas é constituído de cerca de 60% de fitas- β antiparalelas arranjadas em duas ou mais folhas- β interconectadas por voltas, mais conhecido como enovelamento do tipo “ β -sanduíche”. O motivo *jellyroll* possui uma folha β parcialmente estendida de 6 fitas (folha traseira) e uma folha β curvada de 7 fitas (folha frontal), anti-paralelas e unidas entre si por uma terceira e curta folha de 5 fitas (folha superior) (CAVADA *et al.*, 2001). Tais folhas apresentam-se conectadas por alças (loops) que variam de tamanho dentre as diferentes lectinas e é estabilizada pela presença de dois núcleos hidrofóbicos (BANERJEE *et al.*, 1996). Esse motivo (também conhecido como *legume lectin fold*) foi visto pela primeira vez na estrutura da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) (VIAJAVAN; CHANDRA, 1999) e vem sendo observado de forma homóloga ou semelhante em outras lectinas de leguminosas, como por exemplo a lectina de *Canavalia boliviana* (ConBol) (BEZERRA *et al.*, 2014), de *Canavalia grandiflora* (ConGF) (BARROSO-NETO *et al.*, 2014), *Dolichos lablab* (FRIL) (TEIXEIRA *et al.*, 2014), de *Dioclea reflexa* (DrfL) (PEREIRA-JUNIOR, 2014) e *Dioclea sclerocarpa* (DSL) (BARROSO-NETO *et al.*, 2016).

Lectinas de leguminosas apresentam alta homologia de estrutura primária e terciária, porém as pequenas diferenças encontradas nas sequências de aminoácidos podem influenciar na forma que os monômeros se associam. Os monômeros podem se organizar de sete formas diferentes, que podem ser: de interface canônica (ou tipo II), X1, X2, X3, X4, X5,

e a chamada interface não usual da PNA (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007) (TABELA 1).

A interface canônica é a mais comumente observada, que consiste em uma disposição paralela das folhas β que se situam na folha traseira do motivo *jellyroll*, gerando uma espécie de folha contínua de 12 fitas, como pode ser visto na estrutura tridimensional da ConBol (PDB 4K20) (FIGURA 5). Entretanto, alterações nesse padrão podem ocorrer em decorrência de características intrínsecas da própria molécula, como a presença de glicosilações ou aminoácidos carregados no sítio de associação.

Figura 4 - Conformação de um monômero de lectina de leguminosa (*Jellyroll*).



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Diagrama esquemático da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas (SLM – sítio de ligação a metais, SRC – Sítio de reconhecimento a carboidrato); (B) Estrutura terciária do monômero da lectina de *Canavalia boliviana* (ConBol) complexada com X-Man (em amarelo) (PDB: 4K21), em vermelho, são as fitas correspondentes a folha frontal, em verde, são as fitas correspondentes a folha traseira. As duas esferas correspondem aos metais, Ca^{2+} (cinza) e Mn^{2+} (rosa).

Essas alterações permitem a formação dos diferentes tipos de interface, que são caracterizadas pela sobreposição dessas mesmas folhas, havendo variação apenas no ângulo de disposição (BRINDA *et al.*, 2004). Os tetrâmeros são geralmente dímeros de dímeros, apresentando principalmente dois tipos de interface. Essas diferenças estruturais têm influência direta na afinidade específica dessas lectinas, tendo em vista que o sítio de ligação a carboidrato irá expor-se de forma diferenciada em cada uma delas (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007).

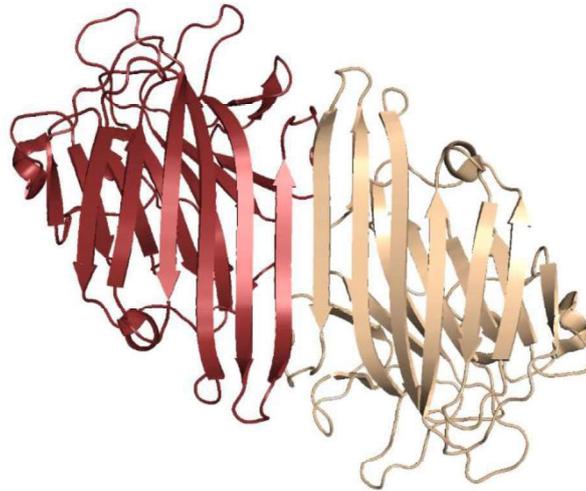
Tabela 1 - Diferentes tipos de interface formados entre monômeros de lectinas de leguminosas.

Tipo de Interface	Ocorrência	Representação
Canônica ou Tipo II	Presente em Lectinas diméricas (PSL) ou tetraméricas (ConA).	
X1	Observada no dímero DB58 e nas interfaces não-canônicas da PHA e SBA.	
X2	Apenas em tetrâmeros, como na interface não canônica da ConA e DGL.	
X3	Dímero tipo EcorL.	
X4	Dímeros tipos GS4 e GS1.	
X5	Observada em dímeros do tipo GS1. Assemelha-se a interface X4, entretanto, com uma orientação diferente.	
Interface não-usual da PNA	Lectina de <i>Arachis hypogea</i> (PNA).	

Fonte: adaptado de SINHA *et al.*, 2007.

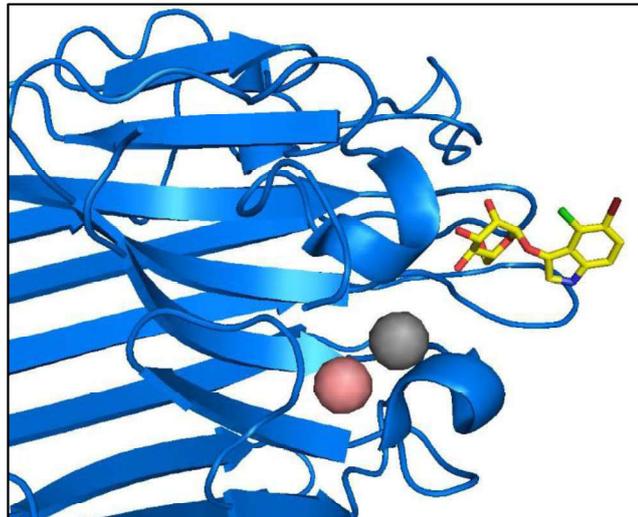
O sítio de reconhecimento a carboidratos se encontra próximo ao sítio de ligação a metais divalentes, que estão localizados na parte superior da folha frontal do *jellyroll*. O sítio de reconhecimento a carboidratos é composto por diversas voltas que são orientadas pela presença de íons de metais divalentes, geralmente cálcio e manganês, no sítio de ligação a metais (FIGURA 6) (SHARMA; SUROLIA, 1997; LORIS *et al.*, 1998; BOUCKAERT *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2014)

Figura 5 - Representação da interface de dímero canônico da lectina de *Canavalia boliviana* (ConBol).



Fonte: PDB 4K20

Figura 6 - Representação do posicionamento do sítio de reconhecimento a carboidrato e sítio de ligação a metais na estrutura tridimensional da ConBol (PDB 4K21).



Fonte: elaborado pelo autor.

O sítio de ligação a íons divalentes é amplamente conservado nestas proteínas, esses metais se localizam a uma distância de aproximadamente 4,5 Å e ambos são coordenados por cadeias laterais de pelo menos quatro aminoácidos e duas moléculas de água. O reconhecimento das lectinas de leguminosas por íons é reversível e a remoção desses metais resulta em importantes mudanças conformacionais no sítio de reconhecimento a carboidrato, resultando em uma instabilidade no sítio e na perda da capacidade de interagir com carboidratos (LORIS *et al.*, 2004). Em lectinas do tipo ConA, por exemplo, com a falta dos íons cálcio e manganês, o peptídeo Ala207-Asp208, que para participar efetivamente do reconhecimento ao seu carboidrato específico necessita estar na conformação *cis*, passa a

assumir uma conformação do tipo *trans* (BOUCKAERT *et al.*, 1995; BEZERRA *et al.*, 2014; PEREIRA-JUNIOR, 2014).

O sítio primário de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas consiste em uma região na superfície da molécula composto por quatro voltas que proporcionam a formação de uma cavidade na superfície da mesma, onde o reconhecimento específico de carboidratos se dá por intermédio de ligações de hidrogênio entre a lectina e o açúcar. Nestas voltas encontram-se três resíduos altamente conservados, Asp, Asn e Gly/Arg, os quais são responsáveis pela formação de quatro ligações de hidrogênio com as hidroxilas dos carbonos três e quatro presentes em monossacarídeos como manose ou glicose. Também participam do processo de reconhecimento, interações de Van der Waals estabelecidas entre o anel aromático do açúcar e as cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos, bem como interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácido como Phe, Tyr, Trp ou Leu (MORENO *et al.*, 2008, PEREIRA-JUNIOR, 2014). Contatos adicionais entre o carboidrato e a superfície da proteína (diretos ou mediados por moléculas de água) contribuem para a sua alta seletividade (WEIS; DRICKAMER, 1996; ELGAVISH; SANAN, 1997; PEREIRA-JUNIOR, 2014).

1.2.6 Lectinas da subtribo Diocleinae

As lectinas de leguminosas representam o grupo mais bem estudado dentre as lectinas de plantas, sendo a maioria dos estudos de lectinas extraídas de membros da subfamília Papilionoideae, principalmente da tribo Phaseoleae (MANN *et al.*, 2001). A subfamília Papilionoideae está representada por 483 gêneros e 13.800 espécies divididas em 28 tribos. No Brasil são 88 gêneros e 180 espécies nativas (BARROSO *et al.*, 1991; LEWIS *et al.*, 2005). Muitas lectinas de espécies desta subfamília foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente. Dentro da tribo Phaseoleae podemos destacar a subtribo de Diocleinae, reconheceu a presença de 13 táxons ao nível de gênero em Diocleinae: *Dioclea*, *Cleobulia*, *Macropsychanthus*, *Canavalia*, *Luzonia*, *Camptosema*, *Cratylia*, *Collaea* e *Galactia* (LACKEY, 1981; VARELA *et al.*, 2004).

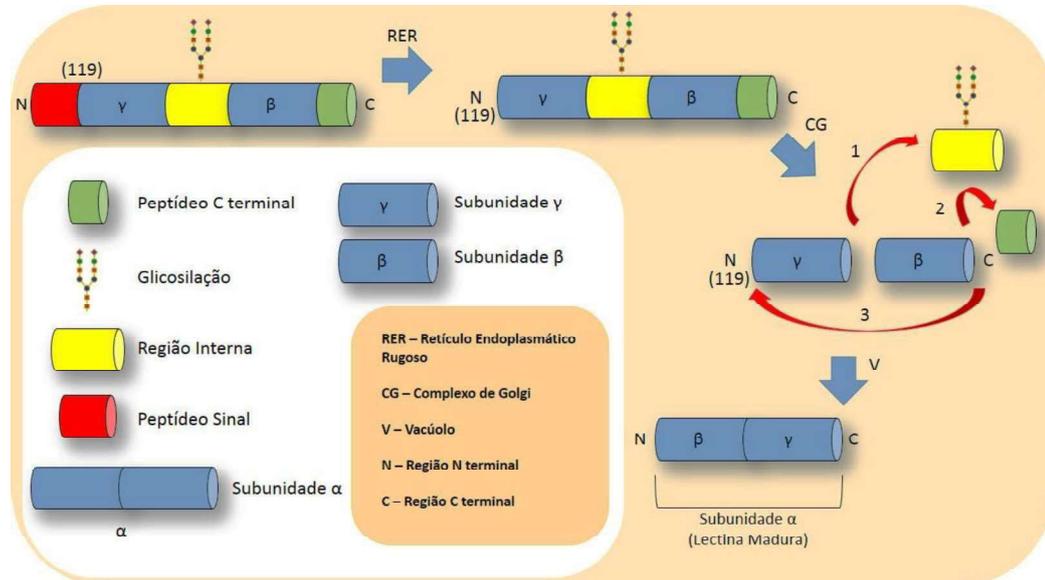
Lectinas dessa subtribo apresentam alta similaridade, algumas apresentam diferenças de apenas 3 resíduos de aminoácidos, mas apesar dessas pequenas diferenças, essas lectinas apresentam diferentes efeitos em ensaios de atividade biológica (DELATORRE *et al.*, 2006), como por exemplo, ensaios de relaxamento de aorta (ASSREUY *et al.*, 2009). Tais diferenças influenciam na conformação do sítio de reconhecimento a carboidratos dessas proteínas, influenciando na afinidade da lectina por seu ligante e diferindo em tipo e/ou

intensidade a resposta do efeito biológico. A oligomerização de muitas lectinas dessa subtribo dependem do pH do meio em que se encontram, onde a lectina pode se encontrar na sua forma de dímero ou tetrâmero (NAGANO *et al.*, 2008). O tipo de resposta ou grau de intensidade, que as lectinas promovem em atividades biológicas, pode diferir dependendo de qual forma a lectina está presente no meio, pelo fato dessas proteínas serem capazes de se ligar aos receptores glicconjugados da superfície celular com uma maior afinidade quando se encontra na forma tetramérica (DELATORRE, 2006).

O primeiro processo de síntese descrito e mais usado como base para entendimento da síntese de lectinas da subtribo Diocleinae, é processamento da Concanavalina A, lectina de *Canavalia ensiformes*. ConA é sintetizada nos cotilédones de sementes e acumulada em células parenquimatosas de reserva. Após a proteína ser traduzida a partir do seu mRNA correspondente, esta passa por um processo de modificação pós-traducional chamado de permutação circular (FIGURA 7). A proteína traduzida, pré-pró-ConA, corresponde a uma cadeia proteica com um peptídeo sinal. Depois da remoção co-translacional do peptídeo sinal, a cadeia proteica é endereçada para o retículo endoplasmático rugoso (RER) onde é N-glicosilado em um resíduo de asparagina localizado na parte central da cadeia, formando o precursor da lectina madura, chamado de pró-ConA (HERMAN *et al.*, 1985; CHRISPEELS *et al.*, 1986; FAYE; CHRISPEELS, 1987). Esta pró-lectina segue sua via pelo complexo de Golgi onde é removido um segmento glicosilado de quinze aminoácidos localizado no centro da cadeia. A porção C-terminal também é processada nesta etapa, perdendo um segmento de 9 aminoácidos. Devido à remoção do peptídeo glicosilado, a cadeia inicial é dividida em dois fragmentos contendo o N-terminal chamado de γ e o C-terminal chamado de β . Após essa divisão, as porções N- e C- terminal são religadas de maneira inversa, onde o fragmento γ passa a ser o C-terminal e o fragmento β passa a ser o N-terminal. Uma clivagem subsequente libera 4 resíduos de aminoácidos originando a lectina madura com 237 resíduos. (BOWLES *et al.*, 1986; BOWLES; PAPPIN, 1988). A nova ligação peptídica que liga os fragmentos se localiza entre os fragmentos 118 e 119 da lectina madura. Após a junção dos dois fragmentos é formada a cadeia α . Todo esse processo é catalisado por uma enzima asparaginil endopeptidase. Esta enzima não promove a religação de 100% dos fragmentos, 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 14 kDa e γ , do aminoácido 119 ao 237 com 12 kDa. Portanto, quando a lectina é analisada por SDS-PAGE, são observadas três bandas polipeptídicas. O mesmo padrão eletroforético é observado em lectinas isoladas do gênero *Canavalia* e *Dioclea*, indicando que outras lectinas da subtribo

Diocleinae passam pelo mesmo processo (NASCIMENTO *et al.* 2012; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014; OSTERNE *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016).

Figura 7 - Representação esquemática do processo de permutação circular de lectinas do tipo ConA.



Fonte: SANTIAGO, 2013.

1.2.7 Aplicação e atividades biológicas de lectinas

Devido à grande versatilidade de moléculas que as lectinas podem reconhecer, essas proteínas podem ser usadas como ferramentas em diversas áreas de estudo (agricultura, medicina, biotecnologia). Os carboidratos estão presentes em superfícies de células (glicocálice) e possuem conformações/composições diferentes de célula para célula. A capacidade das lectinas de interagir com glicanos presentes na superfície de células, torna essas proteínas potenciais ferramentas para estudos de interação celular.

Na medicina, as lectinas podem atuar como transportadores de drogas terapêuticas. Trabalhos já vem investigando essa possibilidade devido ao fato de diferentes células expressarem uma gama diferente de glicanos. Células são afetadas por certas doenças, como por exemplo, o câncer. Células afetadas expressam diferentes glicanos comparados com suas correspondentes células normais, o que modifica sua superfície celular. Portanto, lectinas podem reconhecer as “células doentes” e servir como carreadoras para endereçamento de drogas (BIES *et al.*, 2004). A lectina de *Pisum sativum* foi microencapsulada com esferas de alginato de cálcio, para liberação controlada da lectina na corrente sanguínea, como também, manter a lectina estável ao ser administrada via oral, sendo um agente promissor contra carcinoma hepatocelular (HCC) (EL-AASSAR *et al.*, 2014).

A capacidade de interagir com glicanos permite com que lectinas sejam capazes de detectar, purificar ou concentrar glicoproteínas, que é muito importante na glicobiologia e glicoproteômica. Lectinas podem ser imobilizadas em suportes sólidos para criação de colunas cromatográficas de afinidade a glicoproteínas ou glicoconjugados, como matrizes multilectina com ConA, WGA e Jacalina imobilizadas covalentemente em uma resina inerte POROS 20-AL (KULLOLLI *et al.*, 2008; ABBOTT *et al.*, 2010). Outros exemplos temos a lectina de *Dioclea lasiophylla*, que foi eficientemente imobilizada em CNBr-Sepharose 4B (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013) e a lectina de *Clathrotropis nítida* que foi ligada covalentemente em matriz de quitosana (ALVES *et al.*, 2015).

Alguns estudos relataram que lectinas são capazes de inibir o desenvolvimento de fungos e bactérias, devido a ligação a carboidratos na superfície das células destes microorganismos (GRAHAMSTOWN *et al.*, 2002). Como também há relatos de lectinas de leguminosas que são capazes de estimular o crescimento de *Rhizobium tropici* (VASCONCELOS *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Além disso, lectinas podem ser utilizadas em estudos de cicatrização (SILVA, 2011; NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012; CORIOLANO *et al.*, 2014), nocicepção (BITTENCOURT *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009; HOLANDA *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2013), atividades antitumorais (XU *et al.*, 2016; YAU *et al.*, 2015), indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001; CHOI; LYU; PARK, 2004), atividade antiproliferativa sobre células cancerígenas (CHOI *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2009; EL-AASSAR *et al.*, 2014), atividade anti (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2014) ou pró-inflamatória (SANTIAGO *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016), atividade vasorelaxante (ROCHA *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2015; BARROSO-NETO *et al.*, 2016), atividade antidepressiva (RIEGER *et al.*, 2014), atividade neuroprotetora (JACQUES *et al.*, 2013), atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2015; OHIZUMI *et al.*, 2009; ATALAH *et al.*, 2014), atividade antifúngica (SOUZA *et al.*, 2011; KLAFKE *et al.*, 2013), atividade antiviral (FUQUA *et al.*, 2015; SWANSON *et al.*, 2010; FUJIMOTO; GREEN, 2012) e antibacteriana (COSTA *et al.*, 2010; QADIR *et al.*, 2013). Alguns exemplos importantes advindos de lectinas extraídas de espécies da subtribo Diocleinae (TABELA 2).

Tabela 2- Exemplos de atividades biológicas de lectinas da subtribo *Diocleinae*.

Lectina	Atividade Biológica	Referência
Dgui (<i>Dioclea guianensis</i>)	Atividade antifúngica	ARAUJO-FILHO, <i>et al.</i> , 2010
ConBr (<i>Canavalia brasiliensis</i>), CFL (<i>Cratylia floribunda</i>), Dgui, DGL (<i>D. grandiflora</i>), Dvir (<i>Dioclea virgata</i>)	Efeito tóxico sobre moluscos	SANTOS <i>et al.</i> , 2010
CGL (<i>Canavalia gladiata</i>), ConBol (<i>Canavalia boliviana</i>)	Atividade antiinflamatória e analgésica	NUNES <i>et al.</i> , 2009; BEZERRA <i>et al.</i> , 2014
CoxyL (<i>Canavalia oxyphylla</i>); DrfL (<i>Dioclea reflexa</i>)	Atividade proinflamatória	SANTIAGO <i>et al.</i> , 2014; PINTO-JUNIOR <i>et al.</i> , 2016.
ConBol	Atividade antinociceptiva	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2009
ConBr, CGL, ConM (<i>Canavalia marítima</i>), CRL-1 (<i>Cymbosema roseum</i>)	Efeito vasodilatador	ASSREUY <i>et al.</i> , 2009; OSTERNE <i>et al.</i> , 2014; BARROSO-NETO <i>et al.</i> , 2016; ROCHA <i>et al.</i> , 2015
ConM, ConV (<i>Canavalia virosa</i>), DSL (<i>Dioclea sclerocarpa</i>)	Relaxação da aorta e liberação de óxido nítrico	GADELHA <i>et al.</i> , 2005; OSTERNE <i>et al.</i> , 2014; BARROSO-NETO <i>et al.</i> , 2016.
ConBr, DGL, DVL (<i>D. violacea</i>)	Ativação de linfócitos	BARBOSA <i>et al.</i> , 2001
ConBr	Atividade antidepressiva e neuroprotetora	BARAUNA <i>et al.</i> , 2006; RIEGER <i>et al.</i> , 2014; JACQUES <i>et al.</i> , 2013
ConA, ConBr, CFL, DVL, DGL	Interferências no processo de formação de biofilmes bacterianos	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2006

Fonte: Adaptado de PEREIRA-JUNIOR, 2014.

1.3 Atividade vasorelaxante

O mecanismo contrátil do músculo liso vascular é de grande importância para o conhecimento dos papéis funcionais, fisiológicos e fisiopatológicos do mesmo. O músculo liso vascular opera em um estado de tensão (causado pela pressão que o sangue exerce nos vasos), chamado de tônus, no qual o músculo pode sofrer contração ou pode relaxar, o que pode causar o aumento ou redução, respectivamente, da pressão no interior dos vasos (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1996).

O cálcio livre, presente no citosol das células do músculo liso, é o responsável por regular o estado de tônus do mesmo, que pode ser estimulado por diversos fatores, como

despolarização da membrana, α -adrenérgicos, e agonistas muscarínicos, que ativam um aumento no nível de Ca^{2+} (ALESSI *et al.*, 1992; KARAKI *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 2015). Os níveis de cálcio no citosol é de cerca de 120-170 nmol, que quando ocorre algum estímulo, aumenta para 500-700 nmol.

Em concentrações elevadas, o cálcio se liga à calmodulina, uma proteína multifuncional. A interação da Ca^{2+} -calmodulina, induz uma mudança conformacional na proteína e expõe sítios para interações com outras proteínas, uma delas é a MLC quinase ou MLCK. A interação da calmodulina com a MLCK orienta a MLCK a fosforilar a miosina em suas cadeias leves de 20 kDa, mais especificamente na Ser 19, que resulta em uma mudança conformacional da miosina, se tornando ativa. Esta fosforilação aciona as cíclicas ligações cruzadas entre a miosina e os filamentos de actina, bem como o desenvolvimento de força que faz a miosina se deslocar sobre a actina, promovendo a contração muscular (WALSH, 1990). A reversão da contração ocorre com a diminuição na concentração de Ca^{2+} livre, deste modo levando à dissociação entre a calmodulina e a MLCK. Através da atividade da miosina fosfatase de cadeia leve (MCLP), que ao ser ativada, desfosforila a miosina levando ao relaxamento muscular. Deste modo pode-se afirmar que a modulação da contração ocorre por uma série de fatores, sendo que os mais importantes são os que controlam a cálcio e os que modificam a relação MLCK/MLCP independente da concentração (ALESSI *et al.*, 1992; KARAKI *et al.*, 1997).

É possível que a contração também ocorra independente do aumento da concentração de cálcio na célula. O processo contrátil pode ser ocorrer pela ativação direta das proteínas responsáveis pela contração por proteínas quinase, quanto pelo aumento da sensibilidade da maquinaria contrátil ao cálcio intracelular, que em baixas concentrações pode estimular todo o processo de contração. Apesar do mecanismo mais amplamente aceito em termos de regulação da contração do músculo liso ser o da ativação da MLCK dependente de cálcio, evidências sugerem que esta relação é variável e que alguns outros estímulos podem ativar a MLCK (FENG *et al.*, 1999).

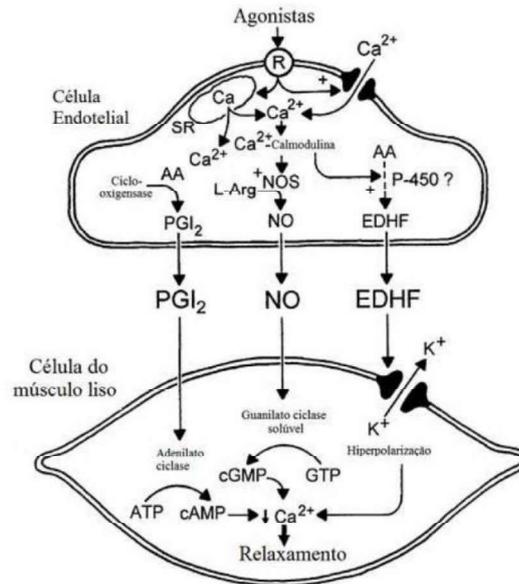
O endotélio tem função de regular estado de tônus da musculatura lisa adjacente em resposta a estímulos fisiológicos e farmacológicos. Esse processo envolve a ativação de receptores presentes na membrana da célula endotelial por diferentes fatores (hormônios, ácidos graxos, proteínas, catecolaminas), que resulta na ativação de complexas vias de sinalização intracelular que promovem a síntese e liberação de substâncias vasoativas (VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990; LUSHER; BARTON, 1997; VAPAATALO; MERVAALA, 2001; BEHRENDT; GANZ, 2002).

Várias substâncias vasoativas que são produzidas pelas células endoteliais difundem-se ou são liberadas, tanto para o sangue como para as outras camadas do vaso, atingindo células musculares lisas e as células que os circulam que participam das funções regulatórias. Dentre os fatores produzidos, destacam-se o óxido nítrico (NO), a prostaciclina, o tromboxano, as endotelinas, a angiotensina II, o fator hiperpolarizante do endotélio, a bradicinina, a serotonina, a histamina e os radicais livres de oxigênio, dentre outros (VANE; ANGGARD; BOTTING, 1990; LUSHER; BARTON, 1997; VAPAATALO; MERVAALA, 2001).

Uma dessas funções regulatórias consiste no controle dos tónus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição (CARVALHO *et al.*, 2001). Dentre os fatores relaxantes, o NO é o mais potente e sua síntese ocorre no endotélio através da atividade da enzima NO sintase, que utiliza L-arginina como substrato, com formação de NO e L-citrulina. O NO difunde-se para o interior das células musculares lisas, onde interage com o átomo de ferro do grupo heme da molécula de guanilato ciclase, levando à ativação dessa enzima; essa enzima ativada, por sua vez, atua sobre o trifosfato de guanosina (GTP), transformando-o no composto ativado monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento da concentração de GMPc nas células musculares leva à diminuição da $[Ca^{2+}]$ e ao conseqüente relaxamento do vaso. Sob condições basais, o NO é continuamente liberado pelas células endoteliais saudáveis (FIGURA 8) (SILVA, 2006).

Vários trabalhos demonstram que lectinas de plantas são capazes de induzir o relaxamento de aortas contraídas *in vitro*, com efeito dose-dependente, na superfície das células, inclusive nas células endoteliais, existem glicoproteínas e podem funcionar como receptores para lectinas. As lectinas do germe do trigo (WGA) e a Concanavalina A (ConA) foram as primeiras a terem sua atividade vasorelaxante demonstrada, com efeito dependente de endotélio em aorta de coelhos (KLEHA *et al.*, 1991).

Figura 8 - Liberação dos fatores relaxantes derivados do endotélio



Fonte: Adaptado de VANHOUTTE *et al.*, 2005. Ativação do receptor endotelial (R) induz o fluxo de Ca^{2+} para o citoplasma e liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SR). Seguido de interações com a calmodulina, o Ca^{2+} ativa a óxido nítrico sintase (NOS) e a ciclooxigenase (COX). NO e PGI_2 promovem aumento de GMPc e AMPc que leva à diminuição da Ca^{2+} intracelular e ao consequente relaxamento do vaso. EDHF causa hiperpolarização e relaxamento ao abrir canais de K^+ .

Trabalhos recentes mostram a potencialidade das lectinas da subtribo Diocleinae em estudos *in vitro* de contratilidade de aorta. Este relaxamento mostrou ser estritamente dependente de endotélios intactos, foi inibido pela incubação prévia da lectina com seus açúcares específicos, que ressaltam a importância do sítio de reconhecimento a carboidratos de lectinas e ocorreu via a enzima óxido nítrico sintase, responsável pela síntese de óxido nítrico (NÓBREGA *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012; BEZERRA *et al.*, 2013; OSTERNE *et al.*, 2014; BARROSO-NETO *et al.*, 2016)

1.4 Inflamação

A inflamação é um evento de defesa local estimulado por traumas (injúria por exemplo) que serve para destruir, diluir ou repelir tanto o agente nocivo quanto o tecido injuriado. A resposta inflamatória é desencadeada por sinais de natureza química, liberados por tecidos ou células do sistema imune (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004). As características clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas foi Celsius o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação (rubor, dor, calor e tumor), um escritor romano do século I d.C., que relatou o aumento no fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos (rubor), a

permeabilidade vascular aumentada (tumor), que levaria a um aumento na temperatura local (calor) e à passagem de células do sangue circulante e dor local (PIRES, 2011). Posteriormente, no século XIX, Virchow relatou o quinto sinal da inflamação, que é a lesão aguda dos tecidos com perda de função dos órgãos. Até fim do século XIX, o processo foi visto como um efeito indesejável, que prejudicava o indivíduo, mesmo muitos pesquisadores já considerarem como um processo de cura.

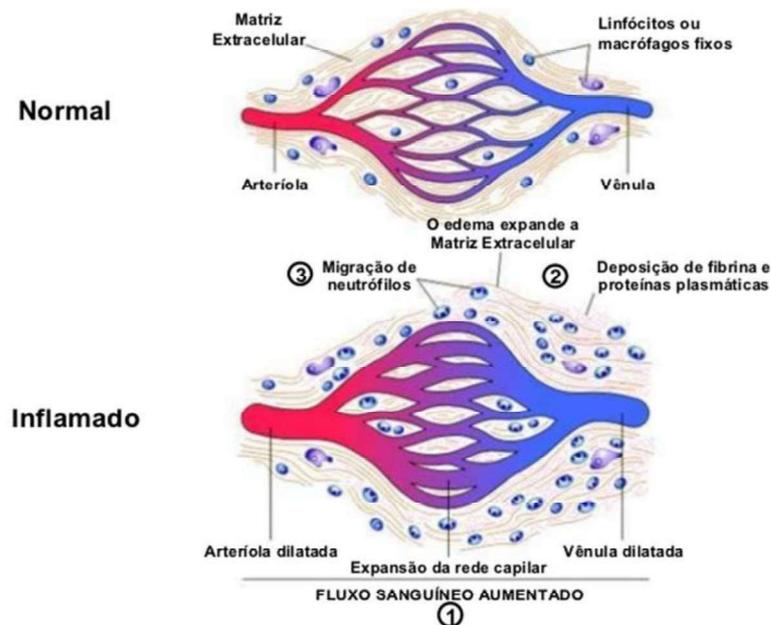
A resposta inflamatória pode ser dividida em dois tipos, aguda e crônica, que depende da duração e características patológicas da reação inflamatória. A inflamação aguda tem curta duração (horas ou dias) e é caracterizada por vasodilatação (devido liberação de fatores como NO, prostaglandinas), exsudação de fluido rico em proteínas, com formação de edema, migração de células (primariamente neutrófilos) para o sítio lesado e, em alguns casos, ativação da cascata de coagulação (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O processo inflamatório compreende dois eventos que ocorrem simultaneamente durante o curso evolutivo (eventos vasculares e celulares). (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004). Em situações de homeostase, normalmente as proteínas plasmáticas e as células circulantes estão contidas no interior dos vasos, em movimento no sentido do fluxo sanguíneo. Diante de um estado inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem alterações (vasodilatação), que facilitam a passagem de proteínas plasmáticas e células da circulação para o local da lesão ou da infecção, deste modo, as células do endotélio funcionam como barreira semipermeável (ALLER *et al.*, 2007; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Em decorrência das alterações no vaso sanguíneo, ocorre aumento do leito dos capilares, que aumenta o fluxo de sangue na região, levando à vermelhidão e ao calor locais, e aumento da permeabilidade vascular dos capilares e vênulas, que ocorre por contração das células endoteliais pós-capilares (MAJNO; PALADE, 1961) e pela abertura de canais intracelulares nas próprias células endoteliais (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997). Esses eventos são decorrentes a liberação substâncias vasoativas como histamina, bradicinina, leucotrienos, produtos da ativação do complemento e da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamado (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004) e promovem o aumento do espaço intercelular, que leva ao extravasamento de fluido rico em proteínas, como a albumina, do compartimento intravascular para o interstício, formando o edema (FIGURA 9) (CARNEIRO, 2009; ALLER *et al.*, 2007; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Um dos objetivos fundamentais do processo inflamatório é facilitar a chegada de células de defesa e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de

lesão tecidual (ALLER *et al.*, 2007; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Os agentes agressores e restos celulares (tecido necrótico) presentes no local da inflamação, são fagocitados pelas células de defesa, que impedem o crescimento de um eventual microorganismo patogênico e estimulam o início do processo de reparação tecidual (FORD-HUTCHINSON, 1992). A migração de neutrófilos, monócitos e células “natural killer” é, comumente, iniciada em respostas inatas, através da geração local de mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas específicas (NOURSHARGH; MARELLI-BERG, 2005).

Figura 9 - Evolução da inflamação aguda. Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.



Fonte: Adaptado de ABBAS *et al.*, 2010.

A migração de leucócitos (FIGURA 10) do lúmen vascular para o local da injúria ocorre através de etapas, que são: rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão firme às células endoteliais, diapedese (passagem através das células endoteliais) e a transmigração para o sítio de injúria (SPRINGER, 1995; WAGNER; ROTH, 2000).

O processo de recrutamento dos leucócitos inicia-se pela ativação da monocamada de células endoteliais por sinais químicos teciduais (moléculas produzidas no local da injúria) que estimula secreção de mediadores inflamatórios pelo endotélio e a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, como também nos leucócitos (VIDEM; STRAND, 2004; WAGNER; ROTH, 2000). As etapas iniciais do processo, de rolamento à adesão, são mediadas por selectinas. São proteínas que apresentam um número variável de repetições consenso de uma sequência encontrada em proteínas reguladoras do sistema complemento,

um domínio transmembrana, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico e um domínio N-terminal semelhante ao domínio lectínico que é responsável por sua propriedade adesiva (ROSSITER; ALLON; KUPPER, 1997; CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993).

Existe três selectinas que se destacam no processo, a E-selectina e a P-selectina presentes no endotélio ativado, e em plaquetas, e a L-selectina, presentes na superfície nos leucócitos. A função destas proteínas é formar ligações de baixa afinidade entre os leucócitos e a monocamada endotelial, diminuindo a velocidade destas células dentro das vênulas e promover a sua captura e rolamento sobre a camada (SPRINGER, 1995, MULLER, 2002). Durante a etapa de rolamento os leucócitos são ativados por quimiocinas e outros fatores atraentes, mudando seu padrão de expressão de receptores na superfície da célula, expressando moléculas específicas para esses fatores, como para as moléculas de adesão que se encontram no endotélio (VIDEM; STRAND, 2004). Essa ativação promove a formação e distribuição das integrinas leucocitárias, seguindo-se uma mudança conformacional nas mesmas, que facilita uma forte interação com moléculas expressas no endotélio ativado, um tipo de imunoglobulina. O aumento da aderência leva a uma diminuição do rolamento dos leucócitos, fazendo com que os mesmos parem, apesar do fluxo sanguíneo contínuo (DIAMOND; SPRINGER, 1993; MULLER, 2002).

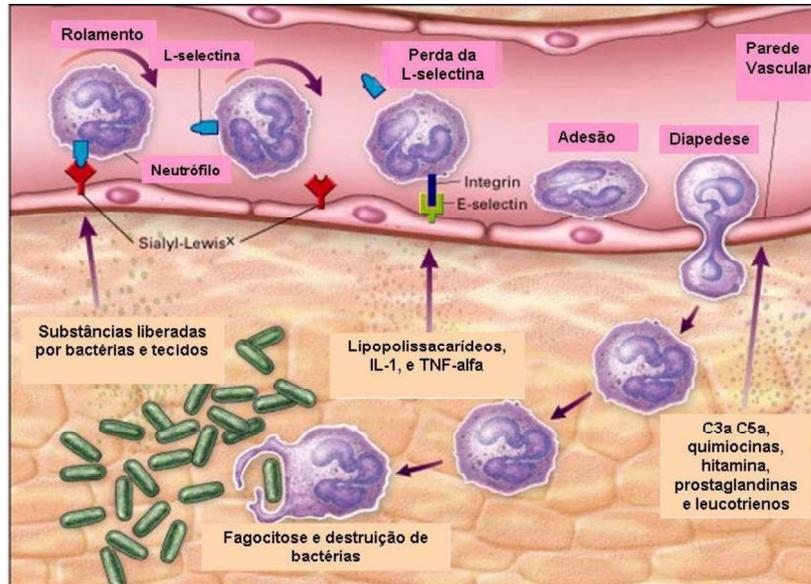
A firme fixação do leucócito promove um achatamento celular que aumenta a área de contato da célula com a superfície endotelial vascular, diminuindo a influência do fluxo sanguíneo. Firmemente aderidos ao endotélio, os leucócitos iniciam então o processo de transmigração do espaço intra- para o extravascular através das junções endoteliais. Após o extravasamento os leucócitos emigram nos tecidos em direção à região injuriada através de um processo denominado de quimiotaxia ou locomoção através de um gradiente químico. A inflamação aguda finaliza-se com a resolução de todos os eventos do processo inflamatório e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY *et al.*, 2004, ADEREM; SMITH, 2004. ABBAS *et al.* 2010).

É importante citar que a liberação de mediadores em tecidos inflamados pode sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva (VANEGAS; SHAIBLE, 2004), levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo, fenômeno chamado de hiperalgesia (SANDKUHLER, 2009).

Em geral, muitas lectinas de leguminosas possuem efeitos pró- e/ou anti-inflamatórias dependendo da via de aplicação (local ou sistêmica). Por exemplo, lectinas da subtribo Diocleinae, quando aplicadas por via sistêmica, inibem o edema de pata induzido por

carragenina, sendo, portanto, anti-inflamatórias por essa via (ASSREUY *et al.*, 1997; BEZERRA *et al.*, 2014).

Figura 10 - Sequência de eventos no recrutamento leucocitário.



Fonte: adaptado de WALZOG; GAEHTGENS, 2000. Sinais liberados por macrófagos teciduais ativam o endotélio a expressar moléculas de adesão e a secretar mediadores inflamatórios, levando a captura de leucócitos circulantes, rolamento, ativação, adesão, extensão, diapedese transendotelial e migração.

Quando as lectinas são aplicadas por via local a resposta tende a promover a inflamação, tendo-se como exemplo algumas lectinas do gênero *Canavalia*, como a CoxyL, lectina de *Canavalia oxyphylla* (SANTIAGO *et al.*, 2014), a DrfL, lectina de *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016), a CRL-I, lectina de *Cymbosema roseum* (ROCHA *et al.*, 2011), Todas essas são lectinas manose-específicas que induzem edema e/ou peritonite em ratos, por esse motivo, elas são consideradas pró-inflamatórias por via local, esses efeitos puderam ser parcialmente revertidos através do uso do açúcar específicos dessas lectinas, evidenciando a participação do sítio de reconhecimento a carboidrato.

1.5 Nocicepção

A Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão, que provoca reações protetoras motoras que geram comportamento evasivo (MELZACK; LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA; ROIZENBLATT, TUFIK, 2004; ZIMMERMAN, 2001). A diferença entre os termos

nociceção e dor, é que o primeiro se refere a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (MELZACK; LOESER, 1999; ALMEIDA; ROIZENBLATT, TUFIK, 2004).

De acordo com o tipo e/ou mediadores envolvidos, a dor pode ser classificada como nociceptiva, neuropática e idiopática, associadas à estimulação excessiva de nociceptores, ao dano tecidual neural, a dano no sistema nervoso central ou periférico, inespecífica de origem desconhecida, respectivamente (FÜRST, 1999; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). Somando-se a isso, alguns distúrbios estão relacionados com a sensação dolorosa como a hiperalgesia, característica principal da dor patológica e resulta de alterações no sistema nervoso, que são denominadas plasticidades do sistema nervoso, é um fenômeno que acontece no sistema nervoso periférico (nervos), por redução do limiar de ativação dos nociceptores, bem como no sistema nervoso central (medula e encéfalo), pela resposta aumentada da medula espinhal aos estímulos sensoriais. Alodínia, que é a dor em resposta a um estímulo mecânico ou térmico, normalmente não doloroso e a hiperestesia, sensibilidade anormal a um estímulo sensorial (BESSON, 1999; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

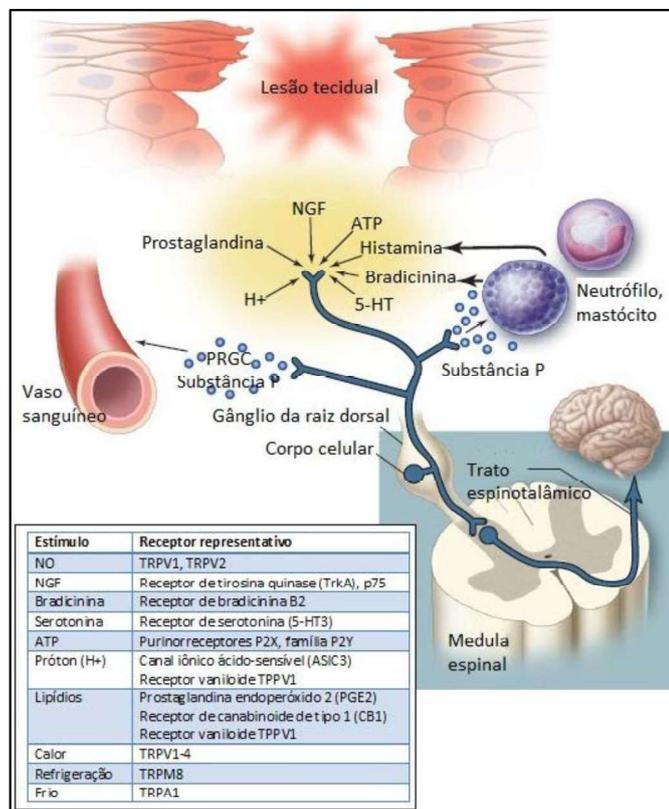
Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ser pontualmente delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico, sistema nervoso simpático é ativado, causando aumento da frequência cardíaca e respiratória, elevação da pressão arterial, dilatação pupilar e hiperglicemia. A dor crônica persiste por um longo período, sendo associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (ALMEIDA; ROIZENBLATT, TUFIK, 2004). Em geral, processos inflamatórios podem estar relacionados aos mecanismos que envolvem a nociceção (LEVINE; REICHLING, 1999). A propagação da dor da região lesionada até o sistema nervoso central é iniciada com a ativação de receptores sensíveis aos estímulos nocivos, que podem ser encontrados na pele, membranas, tecidos conjuntivos de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sanguíneos (JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT, TUFIK, 2004). Os nociceptores correspondem às terminações nervosas livres e representam a parte mais distal dos neurônios aferentes de primeira ordem, que consistem em fibras de pequeno diâmetro (tipos A δ e C) (JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA; ROIZENBLATT, TUFIK, 2004).

Os neurônios aferentes primários são ativados por uma gama de mediadores, liberados no tecido lesionado. A lesão tecidual pode ser desencadeada por estímulos térmicos,

traumas mecânicos, invasão com agentes infecciosos e reações antígeno-anticorpo, existindo nociceptores para cada tipo de estímulo (SAWYNOK, 2003).

Alguns mediadores como a colecistocinina, encefalinas, glutamato e NO também estão envolvidos nesses processos (MILLAN, 1999; VANEGAS, 2004; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). De maneira geral, os mediadores que participam da resposta nociceptiva podem ser produzidos pelo sistema vascular, células imunes, tecido lesado, nervos sensoriais (FIGURA 11). Dentre esses incluem-se: cininas, histamina, serotonina, adenosina trifosfato (ATP), prótons, peptídeos, prostaglandinas e citocinas (DRAY; BESSON; DICKENSON, 1997; JULIUS; BASBAUM, 2001; SAWYNOK, 2003).

Figura 11 - Transdução do estímulo doloroso ao Sistema Nervoso Central por nociceptores.



Fonte: OAKLANDER, 2011. Estes receptores especializados respondem a estímulos térmicos (calor e frio), mecânicos e químicos intensos

A antinocicepção é descrita como redução na capacidade de perceber a dor, isso tem um importante efeito para o organismo, quando em situações de emergência. O efeito contrário, ou seja, o aumento na capacidade de perceber a dor, gerando uma maior sensibilidade, é chamado de hipernocicepção.

Diversas lectinas apresentaram atividade nociceptiva, muitos trabalhos envolvendo lectinas de algas marinhas (NEVES *et al.*, 2007; BITENCOURT *et al.*, 2008, FIGUEIREDO *et al.*, 2010). Com relação a lectinas de leguminosas, foi demonstrado que as lectinas de *Lonchocarpus sericeus* (NAPIMOGA *et al.*, 2007), de *Parkia platycephala* (BARI, 2015) e *Parkia biglobosa* (SILVA *et al.*, 2013), inibem a hipernocicepção inflamatória.

Muitas lectinas de Diocleinae apresentaram atividade antinociceptiva, como a ConBr (lectina de *Canavalia brasiliensis*), ConM (lectina de *Canavalia marítima*) e CGL (lectina de *Canavalia gladiata*) (PINTO *et al.*, 2013), como também a ConBol (lectina de *Canavalia boliviana*) (FIGUEIREDO *et al.*, 2009) e ConGF (lectina de *Canavalia grandiflora*) (NUNES *et al.*, 2009). Todas lectinas tiveram sua atividade inibida pelo açúcar específico da lectina, mostrando a participação do sitio de reconhecimento a carboidrato no mecanismo.

1.6 Espectrometria de massas

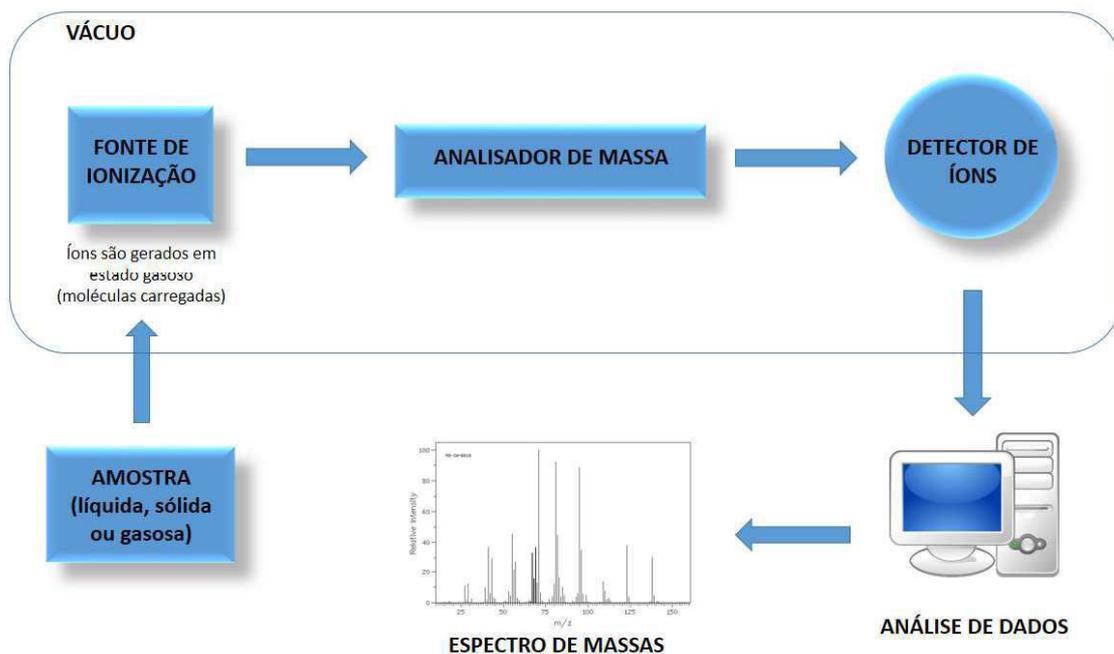
Espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de fornecer informações sobre composição de amostras e dados estruturais de modo que possa a identificar moléculas. Espectrômetro de massas é um equipamento composto por uma fonte de ionização, um analisador de massas, um detector e um sistema capaz de processar dados (FIGURA 12). Ao injetar a amostra no equipamento, ela será endereçada para fonte de ionização, onde será convertida em íons pela ação de um agente ionizante. Os íons gerados são acelerados em direção ao analisador de massas. A função do analisador de massas é promover a separação desses íons de acordo com a sua relação massa-carga (m/z), que imediatamente serão encaminhados ao detector para análise de intensidade.

Novas técnicas de ionização foram desenvolvidas para manter integridade de amostras, como a eletronebulização (ElectroSpray Ionization ou ESI) (FENN *et al.*, 2002) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (HILLENKAMP *et al.*, 1991). Desta maneira, a análise de biomoléculas foi impulsionada e a técnica de espectrometria de massas se tornou um dos principais métodos para análise de peptídeos e proteínas. Essa técnica é uma alternativa para superar limitações existentes em outros métodos de sequenciamento de proteínas, como a Degradação de Edman.

Diferente da Espectrometria de massas, a Degradação de Edman é uma técnica que requer uma quantidade maior de proteína pura (SIMÕES, 2011). Outra limitação é que o

método de Edman normalmente há falhas no sequenciamento de proteínas, pois este método necessita que haja resíduos amino-terminal livres para que ocorra a reação de Edman e alguns aminoácidos podem ter seu N-terminal bloqueado por acetilação, fosforilação, entre outros. A técnica de espectrometria vem sendo utilizada principalmente na proteômica para identificação de proteínas, como também para sequenciamento da estrutura primária de proteínas e peptídeos (SIMÕES, 2011; PEREIRA-JUNIOR, 2014).

Figura 12 - Representação esquemática dos componentes de um espectrômetro de massas.



Fonte: PINTO-JUNIOR, 2013.

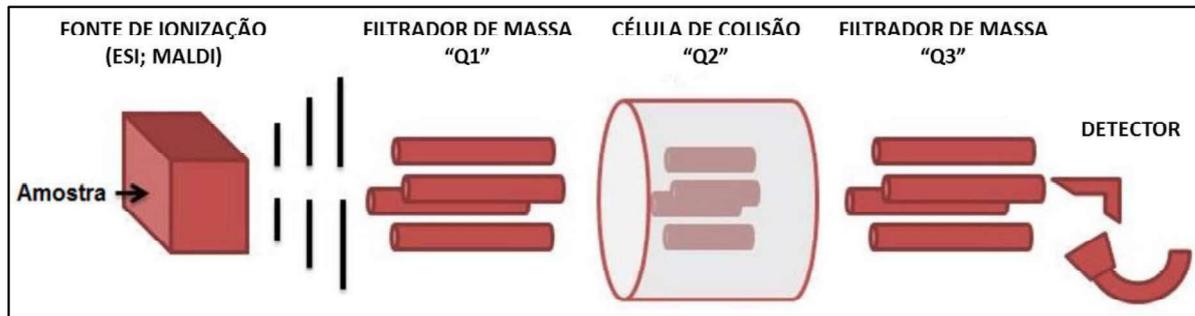
O método de ionização por *Electrospray* é adequado para substâncias termolábeis, pois é uma técnica de ionização branda, possibilitando ionização de moléculas sem fragmentação. A solução percorre um capilar sobre um campo elétrico intenso, formando gotículas altamente carregadas na ponta do capilar. Quando o solvente evapora por nebulização, ocorre a diminuição do volume da gota e isso aumenta a repulsão das moléculas carregadas. Com aumento das taxas de repulsão, ocorre o fenômeno chamado de explosão coulômbica, liberando moléculas ionizadas para o analisador de massa. Esse processo é auxiliado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente nitrogênio) por fora do capilar. Este gás auxilia o direcionamento do *spray* para o espectrômetro de massas e a evaporação do solvente (HOFFMAN; STROOTBART, 2007). Moléculas com vários sítios de ionização irão produzir um espectro de íons multicarregados (MORAES; LAGO, 2003). O ESI possui a capacidade para análise de moléculas de 100 até 1.000.000 Daltons.

Para ionização de amostras por MALDI, o analito é misturado com uma matriz (composto capaz de absorver luz UV), em um solvente específico, e posteriormente colocados em uma placa. Após a evaporação do solvente a matriz cristaliza, juntamente com o analito. Dentro da fonte e sob vácuo, o cristal (matriz e amostra) será irradiado por um laser pulsado durante um determinado período de tempo, que vai promover o processo de dessorção. O mecanismo de ionização por MALDI não é completamente elucidado, porém postula-se que a irradiação pelo laser provoca um rápido aquecimento do cristal formado pela matriz através do acúmulo de uma grande quantidade de energia na fase condensada pela excitação da matriz. Este rápido aquecimento causa a sublimação dos cristais da matriz, ablação de uma porção da superfície cristalina e expansão da matriz para a fase gasosa, levando o analito intacto na pluma em expansão. A transferência de elétrons da matriz para a amostra ocorre durante o processo de dessorção, gerando íons monocarregados. (DREISEWERD, 2003). A ionização por MALDI possui características muito importantes, como a necessidade de baixíssima concentração de amostra, que é importante para proteínas com baixo rendimento de purificação, a reprodutibilidade e tolerância a contaminação das amostras com sais, tampões, detergentes, que é de grande importância para análises proteômicas (CHEN; CARROLL; BEAVIS, 1998; STUMP *et al.*, 2002).

Atualmente é possível encontrar vários tipos de analisadores de massas. Cada um possui sua vantagem e desvantagem ao analisar biomoléculas, porém, para superar essas limitações, é possível utiliza-los de forma combinada (híbrido) para uma melhor obtenção de dados. Tais equipamentos permitem que experimentos em sequência (*tandem*) sejam realizados, isto é, sendo possível detectar um determinado íon e posteriormente submetê-lo a uma etapa de fragmentação. Uma vez separados, esses íons são detectados por eletromultiplicadoras que constituem os detectores mais largamente usados (CANTU *et al.*, 2008). O Triplo Quadrupolo é o primeiro e mais conhecido aparelho a ser comercializado, que é constituído de três analisadores quadrupolo em sequência (FIGURA 13). Como exemplo de outros analisadores de massas podemos citar os *ion-trap* (tridimensionais e lineares), Tempo de voo (ToF), Ressonância Ciclotrônica de Íons com Transformada de Fourier (FT-ICR), orbitrap (CANTU *et al.*, 2008).

Os analisadores de massa em sequência tornaram possível desvendar a estrutura química de diversos compostos como peptídeos e proteínas. Entre as diversas técnicas utilizadas, a Dissociação Induzida por Colisão (CID) é a que gera melhores resultados e é a mais utilizada em trabalhos de caracterização de estrutura primária de proteínas.

Figura 13 - Esquema de um espectrômetro de massa em tandem do tipo triplo quadrupolo.

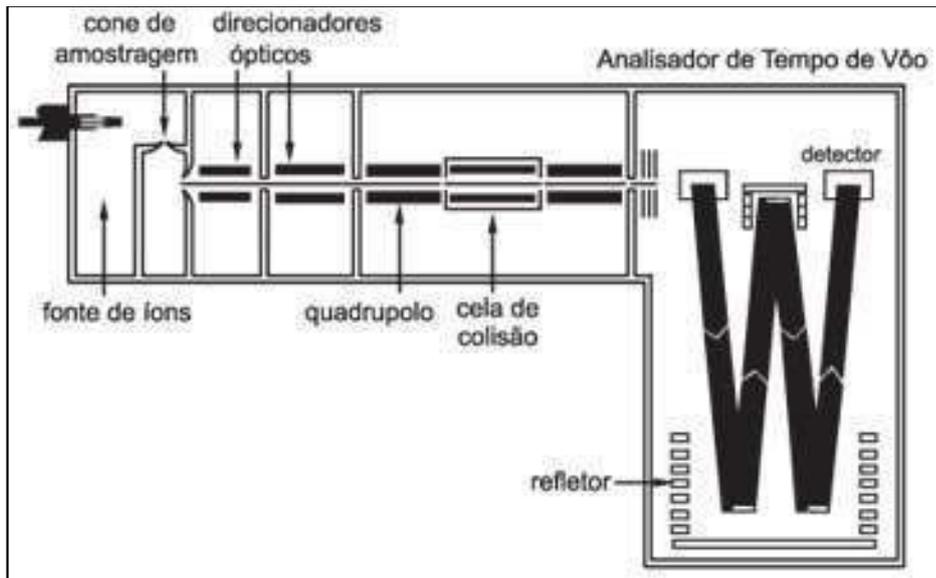


Fonte: Adaptado de HOFFMAN *et al.*, 2007. Q1 é o quadrupolo responsável por detectar o íon molecular ou filtrar o íon precursor. Q2, pode ser um quadrupolo ou hexapolo, e é responsável pela colisão das moléculas contra um gás inerte (geralmente Argônio), fragmentando os íons provenientes de Q1. Q3 é o analisador que separa os fragmentos gerados em Q2.

Essa técnica consiste em selecionar o íon (peptídeo carregado) a ser fragmentado (íon precursor) utilizando o primeiro analisador de massa (Q1) (atua como filtro de íons de acordo com suas relações m/z), e em seguida enviá-lo a uma célula de colisão, um quadrupolo adaptado, onde este íon irá colidir com um gás inerte, geralmente Argônio. A energia cinética gerada pela colisão das moléculas será transferida parcialmente em energia vibracional, que promoverá rompimento de ligações químicas dos íons precursores. Os fragmentos resultantes serão analisados por um segundo analisador de massa (Q2), de forma que os fragmentos que possuem mesma relação m/z cheguem ao mesmo tempo ao detector (HOFFMAN *et al.*, 2007).

A clivagem pode acontecer em diferentes regiões das ligações peptídicas, gerando carga residual que pode permanecer na região N-terminal (chamados íons-b), ou na C-terminal (íons-y) do peptídeo, sendo mais comum na ligação entre o nitrogênio da amida e o carbono da carbonila. Tendo-se os valores de m/z e as intensidades dos íons b e y juntamente com a m/z do íon precursor, a sequência do peptídeo pode ser determinada (HOFFMAN *et al.*, 2007). A inserção de *reflectrons* nos analisadores ToF foi um incremento significativo à resolução desse analisador (FIGURA 14). O acoplamento de um analisador quadrupolo como filtro de íons e um analisador do tipo ToF com *reflectron* (gerando os equipamentos do tipo Q-ToF) foi um salto de qualidade nas análises de estrutura de peptídeos, possibilitando diferenciar aminoácidos que possuem diferenças de milidaltos em sua massa monoisotópica (HOFFMAN *et al.*, 2007; CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

Figura 14 - Esquema de um espectrômetro de massa híbrido Q-ToF.



Fonte: CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008.

Após separação e análise dos íons pelo analisador, o detector é capaz de transformar os íons gerados em um sinal elétrico que será interpretado em um computador, utilizando softwares específicos (HOFFMAN *et al.*, 2007). Esses dados podem ser utilizados para determinar massa intacta de peptídeos e proteínas, sequenciar estrutura primária de proteínas, como também obter informações sobre a estrutura tridimensional de proteínas (SIMÕES, 2011; SILVA, 2013; PEREIRA-JUNIOR, 2014).

Várias lectinas já foram analisadas por espectrometria de massas e foram depositadas em banco de dados, como o Protein Data Bank (PDB) e Uniprot Databank, entre elas estão as lectinas de *Vatairea guianensis* (SILVA *et al.*, 2012), *Canavalia bonariensis* (SILVA, 2013), *Dioclea sclerocarpa* (CORREIA *et al.*, 2011), *Haliclona caerulea* (CARNEIRO *et al.*, 2013), *Dioclea reflexa* (PEREIRA-JUNIOR, 2014) e *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

1.7 Sequenciamento de DNA por Sanger

O genoma do bacteriófago phi-X174 (SANGER *et al.*, 1977) foi o primeiro a ser sequenciado, onde foi utilizado uma técnica chamada de *plus-and-minus* (SANGER & COULSON, 1975). Após o sucesso do primeiro sequenciamento, em 1977, dois novos métodos de sequenciamento de DNA foram propostos: o método de terminação de cadeia (SANGER *et al.*, 1977) e o método de sequenciamento químico (MAXAM & GILBERT, 1977).

Devido a maior facilidade de execução, a metodologia abordada por Sanger foi a mais utilizada na comunidade científica e tornou-se o método padrão de sequenciamento (SCHUSTER, 2008).

O método de terminação de cadeia (ou método de Sanger) se baseia no uso de dideoxinucléotídeos terminadores (2'3'-didesoxirribonucleotídeos) durante a etapa de polimerização, atuando como competidores dos análogos naturais (2'-desoxirribonucleotídeos). Por não apresentarem a hidroxila no carbono 3', os dideoxinucléotídeos quando são inseridos da nova cadeia de DNA polimerizada, não permitem a adição de novos nucleotídeos, visto que se torna impossível a formação de uma ligação fosfodiéster pela DNA-polimerase.

Como a reação ocorre sob a presença de ambos os tipos de nucleotídeos, e a concentração de dideoxinucléotídeos é relativamente menor que a de deoxinucléotídeos, a síntese da nova fita de DNA durante a PCR é interrompida em diferentes pontos, de acordo com a incorporação ou não dos terminadores. Deste modo, para determinar a sequência do DNA é necessária uma corrida eletroforética dos produtos da PCR, que possuem diferentes tamanhos de comprimento, de cada reação com um determinado terminador utilizado (T, C, G ou A), totalizando 4 reações. Desse modo analisando o perfil eletroforético de cada uma das reações, e combinando-os, é possível determinar a sequência do DNA estudado.

A técnica original utilizava uma marcação isotópica de um dos desoxirribonucleotídeos (geralmente o [32P]dATP) e posteriormente utilizaram-se terminadores marcados radioativamente.

Com a automatização do método, passou-se a empregar terminadores conjugados com moléculas fluoróforas, que sob a incidência de um feixe de laser, emitem luz em diferentes comprimentos de onda, correspondentes às cores vermelho, azul, verde e amarelo. Todo o sistema de detecção passou a ser automatizado, a corrida eletroforética que era realizada em géis muito finos de poliacrilamida passou a ser feita por eletroforese capilar empregando-se múltiplos capilares, permitindo assim aumentar muito a quantidade de dados gerados.

Apesar do método de Sanger ter sido amplamente utilizado para o sequenciamento genomas, ele apresenta várias limitações:

- 1) há necessidade de uma concentração elevada de amostra de DNA para realizar o sequenciamento;
- 2) depende da clonagem e amplificação do material que se deseja sequenciar em vetores, que podem ser susceptíveis a contaminação;

- 3) geração de dados é baixa;
- 4) custo elevado comparado a outras plataformas atuais, mais indicado para sequenciamento de genes.

Utilizando-se o método de Sanger, muitos organismos tiveram o seu genoma sequenciado. Entre os marcos do sequenciamento genômico, podemos citar os seguintes: o sequenciamento genômico do primeiro organismo celular, a bactéria *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN *et al.*, 1995), do primeiro eucarioto unicelular, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (GOFFEAU *et al.*, 1996), do primeiro eucarioto multicelular, o helminto *Caenorhabditis elegans* (C. elegans Sequencing Consortium, 1998), da mosca *Drosophila* (ADAMS *et al.*, 2000) e, finalmente, a publicação da versão rascunho (draft) do genoma humano (LANDER *et al.*, 2001).

Novos equipamentos, denominados de sequenciadores de nova geração, estão revolucionando o campo do sequenciamento genômico, permitindo explorar e responder questões biológicas com uma velocidade e precisão nunca antes atingida, obtendo um maior custo/benefício em projetos de sequenciamento de genomas.

1.8 Modelagem molecular

O mecanismo evolutivo que ocorre ao longo do tempo, parte dele graças as mutações, leva a divergências gênicas entre espécies, levando a formação de proteínas homologas (que evoluíram a partir do mesmo ancestral), que possuem sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional similares, e podem exercer a mesma função ou não. Duas proteínas homologas podem possuir alta similaridade, ou ser diferentes, devido ao grande número de mutações. A grande vantagem da modelagem molecular baseado na homologia é que, geralmente, a similaridade de estrutura terciária é bem maior do que a primária, sendo possível deduzir estruturas utilizando modelos de proteínas filogeneticamente distantes (HÖLTJE *et al.*, 2003).

As estruturas tridimensionais de proteínas homólogas são altamente conservadas, principalmente as regiões correspondentes aos domínios, pois são cruciais para o desempenho de funções específicas. Os loops são as regiões que apresentam as maiores diferenças de aminoácidos entre proteínas homologas, principalmente os que estão presentes nas áreas mais externas da molécula (superfície). De forma geral, a análise de diferentes famílias de proteínas

homologas demonstra que os aminoácidos localizados nas regiões mais internas das proteínas variam com menor frequência e com menor distinção de propriedades físico-químicas (SILVA; SILVA, 2007).

Modelos tridimensionais de proteínas podem ser construídos por comparação de estruturas primárias da proteína de interesse com as de proteínas homólogas, ou outras proteínas similares, com estruturas resolvidas em banco de dados. Temos por exemplo, o Protein Data Bank (PDB), maior banco de dados de estrutura atualmente, com crescimento rápido e contínuo de novos depósitos. Esse procedimento comparativo para construção de modelos estruturais é conhecido como modelagem molecular por homologia estrutural ou modelagem comparativa (DEANE; BLUNDELL, 2003).

Modelagem comparativa baseia-se no fato que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos, e que as diferenças que podem ser encontradas na estrutura primária, não vão gerar grandes diferenças na estrutura terciária (NAYEEM; SITKOFF; JUNIOR, 2006). É necessário apenas um modelo de proteína homóloga com estrutura resolvida para que seja possível a utilização do método de predição por comparação (HÖLTJE *et al.*, 2003). Esse método utiliza o conjunto de coordenadas dos aminoácidos da cadeia principal e laterais, e é capaz de informar quais as regiões de maior e menor resolução de dados. Embora a modelagem por homologia gere modelos menos precisos do que os métodos experimentais de alta resolução estrutural, como a cristalografia de raios-X, a mesma pode ser utilizada para análise de conservação de domínios e na verificação de hipóteses em biologia molecular (DEANE; BLUNDELL, 2003).

Para uma melhor resolução dos dados é necessário um *software* de alta performance. A comparação de modelos de proteínas gerados por vários *softwares* disponíveis atualmente, verificaram que na maioria dos casos, para obtenção de modelos de maior fidelidade é necessária uma homologia de estrutura primária maior que 40% e, se possível, as regiões dos domínios estejam conservadas. Os modelos gerados através da estratégia de modelagem comparativa estão em alto nível de exatidão, não havendo diferenças tão significativas quando comparados às estruturas cristalográficas, sendo possível a aplicação de simulações de *docking* e *screening* virtual (NAYEEM; SITKOFF; JUNIOR, 2006).

O primeiro passo na modelagem por homologia é a identificação de estruturas tridimensionais em banco de dados. Esta identificação pode ser realizada levando-se em consideração vários aspectos como: similaridade sequencial, conhecimento estrutural, similaridade da função e correlação filogenética (DEANE; BLUNDELL, 2003). A construção das regiões de loops estruturalmente variáveis é uma tarefa desafiadora. Diferenças em

relação ao número de aminoácidos, causadas por inserções ou deleções, são situações que dificultam ainda mais o procedimento de modelagem, proteínas com alta homologia possui resolução aceitável nessas regiões, mas deve-se avaliar qual a melhor ferramenta para construção do modelo (HÖLTJE *et al.*, 2003).

Cadeias laterais adotam, geralmente, um número reduzido de conformações possíveis e através da análise de trabalhos envolvendo resolução de estruturas tridimensionais de proteínas, foi possível criar pacotes de *software* que contem coleções de rotâmeros. A coleção desenvolvida por Ponder & Richards é a mais utilizada por *softwares* de modelagem por homologia para gerar as cadeias laterais de proteínas homólogas, a qual contem 67 rotâmeros para 17 aminoácidos (HÖLTJE *et al.*, 2003). O ambiente onde o aminoácido se encontra na proteína real e o contato com outros resíduos de aminoácidos são os dois fatores que irão influenciar as conformações das cadeias laterais. No interior das proteínas globulares, interações hidrofóbicas são predominantes e resultam em um enovelamento que comprime os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Modificações devem ser aplicadas, por exemplo, quando aminoácidos estão envolvidos em interações específicas, como pontes dissulfeto, pontes salinas, interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio. Variações também ocorrem quando os resíduos de aminoácidos estão localizados na superfície da proteína. As exceções apresentadas devem ser tratadas especificamente em cada caso (HÖLTJE *et al.*, 2003).

Algumas lectinas tiveram sua estrutura tridimensional resolvida por modelagem por homologia. A lectina de *Acacia farnesiana* teve sua estrutura tridimensional resolvida utilizando o programa SWISS-MODEL, baseado na estrutura da lectina de *Phaseolus vulgaris*, na qual possui 64% de similaridade de estrutura primária, resultando em um modelo com boa resolução (ABRANTES *et al.*, 2013). A lectina de *Viscum álbum* teve sua estrutura resolvida utilizando também o programa SWISS-MODEL, baseado na estrutura da lectina de *Ricinus communis* (ricina) que tinha 41% de homologia de estrutura primária, resultando em um modelo com resolução mediana, devido a ricina ser um heterodímero (ESCHENBURG *et al.*, 1998). A estrutura da lectina de ovos de *Echinometra lucunter* foi modelada utilizando o programa I-TASSER, usando como modelo a estrutura da lectina de ovos de *Oncorhynchus keta*, na qual possui 43% de identidade (CARNEIRO *et al.*, 2015).

1.9 Lectina de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth

Dioclea lasiophylla Mart. ex Benth (FIGURA 15) é uma espécie trepadeira da família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae* e subtribo *Diocleinae*. De maior ocorrência na costa do Nordeste do Brasil, *D. lasiophylla* e outras onze espécies pertencentes a esse gênero formam um grupo de plantas conhecidas popularmente como “olho-de-boi” ou “mucunã”. Essas plantas são utilizadas pela população local como analgésicos, para o tratamento de cálculo renal, reumatismo e suas sementes como calmante nervoso, tônico, parasiticida e formicida.

A lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla*, nomeada de DlyL, foi purificada em uma única etapa através de cromatografia de afinidade em matriz Sephadex® G-50 e demonstrou especificidade por α -metil-D-manosídeo e D-manose, como também foi capaz de interagir com as glicoproteínas, ovalbumina e fetuína. Semelhante a outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, DlyL possui três cadeias (α , β e γ) com massas de 25.417, 12.585 e 12.848 Da, respectivamente, e não possui ligações dissulfeto. DlyL foi caracterizada físico-quimicamente, apresentando atividade ótima em pH 8,0, estável a uma temperatura de 70 °C e mostrou-se ser dependente de metais bivalentes, como Ca^{2+} e Mn^{2+} . A lectina exibiu baixa toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp., sendo este efeito dependente da concentração da lectina em solução, e foi imobilizada em Sepharose® 4B ativada com brometo de cianogênio sendo capaz de capturar glicoproteínas em solução (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013).

Figura 15 - Fotos da inflorescência e de sementes de *Dioclea lasiophylla*.



Fonte: PINTO-JUNIOR, 2013

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Determinar estrutura primária e terciária da lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) e analisar a resposta da lectina em ensaios de atividade biológica.

2.3 Objetivos específicos

- Purificar DlyL por cromatografia de afinidade;
- Extrair o DNA de sementes de *Dioclea lasiophylla*;
- Amplificar o gene de DlyL (*dlyl1*) por PCR;
- Determinar a sequência de aminoácidos de DlyL por espectrometria de massas (MS/MS) e sequenciamento do gene da lectina;
- Determinar a estrutura terciária de DlyL por modelagem molecular;
- Caracterizar a estrutura terciária de DlyL;
- Determinar atividade vasorelaxante da lectina em modelo *in vitro*;
- Determinar atividade inflamatória da lectina em experimento de edema de pata em ratos;
- Determinar o efeito nociceptivo da lectina;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Sementes maduras de *D. lasiophylla* foram coletadas no Ceará (Brasil) e identificado no Herbário Prisco Bezerra EAC no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 Purificação da lectina (DlyL) de sementes *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth

O protocolo de purificação de DlyL foi realizado de acordo com Pinto-Junior e colaboradores (2013). As sementes foram descascadas e moídas até obtenção de um pó fino em um moinho de café (Cadence MDR301 Monovolt). As proteínas solúveis foram extraídas em NaCl 0,15 M com CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM relação 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C durante 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e filtrado em um papel de filtro (Whatman™). O sobrenadante resultante foi aplicado em coluna de afinidade Sephadex® G-50 (6,5 × 1,8 cm) previamente equilibrada com solução de extração. O material não ligado (P1), foi lavado com a mesma solução, e a lectina foi eluída com D-glucose 0,1 M na solução de equilíbrio. Frações eluídas foram monitoradas por absorbância a 280 nm. O material eluído foi recolhido, dialisado contra água destilada e liofilizado. A homogeneidade da amostra foi monitorada por SDS-PAGE e a proteína pura foi utilizada para os demais ensaios.

3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

Uma amostra de DlyL foi submetida a SDS-PAGE em conformidade com o procedimento descrito por Laemmli (1970) utilizando um Mini-Protean II aparelho (BioRad, Milão, Itália), em placas de gel de 0.75 milímetros verticais que contêm o gel de poliacrilamida de separação e o gel de poliacrilamida de empilhamento.

As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,88 M pH 6,8 com SDS 2%, com azul de bromofenol 1% para monitorar a corrida e glicerol 12,5% para aumentar a densidade da solução, seguido de aquecimento a 100 °C durante 5 minutos.

O Gel de empilhamento (*stacking gel*) utilizado continha 4% de poliacrilamida e foi preparado com Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 contendo SDS 1%. O gel de separação (main gel) continha 12,5% de poliacrilamida dissolvido em Tris-HCl 1 M pH 8,8 contendo 1% de SDS. A corrida de eletroforese foi conduzida a corrente constante de 25 mA, durante 60 minutos, com voltagem variando até 150 V. O tampão de corrida utilizado continha Tris-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M, SDS 0,1%, pH 8,8.

As bandas foram visualizadas por coloração com Azul Brillhante de Coomassie R-250 a 0,05% dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção de 1:3,5:8 (v/v/v). O gel foi descorado para a visualização das bandas de proteínas por uma solução descorante, contendo metanol, ácido acético e água destilada a uma proporção de 4:1:5 (v/v/v).

Os marcadores moleculares foram fosforilase b (97 kDa), albumina de soro de bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbónica (29 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina, (14 kDa). A presença de ligações dissulfeto foi determinada por adição de β -mercaptoetanol 2% em tampão de amostra.

3.4 Digestão em gel e sequenciamento dos peptídeos por MS/MS

As bandas referentes a cadeia α de DlyL (em torno de 29 kDa) foram retiradas do gel e recortadas com auxílio de uma ponteira plástica. As bandas de gel excisadas foram transferidas para tubos de micro centrifuga, onde foram descoradas em uma solução de 50% de acetonitrila contendo 25 mM de bicarbonato de amônio, desidratadas em 100% de acetonitrila e secas em Speedvac (LabConco).

Os géis foram então reidratados em uma solução de 50 mM de bicarbonato de amônio contendo a enzima tripsina (Promega) ou quimiotripsina (Sigma-Aldrich), cada enzima em um tubo diferente, na proporção de 1:50 (peso/peso; enzima: substrato). A reação de digestão permaneceu 12 h a 37 °C, sendo interrompida com a adição de ácido fórmico a 2%.

Os peptídeos oriundos da digestão foram extraídos do gel utilizando uma solução de 5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila sob agitação durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido 3 vezes, o sobrenadante contendo os peptídeos extraídos foram unidos e concentrados em Speedvac e ressuspensos com 25 μ L com ácido fórmico 0,1%. Estes peptídeos foram injetados em um sistema nanoAcquity (Waters Corp) conectado a uma fonte de nano electrospray de um espectrômetro de massas (SYNAPT HDMS – Waters Corp).

O espectrômetro foi calibrado na faixa de m/z 50-1600 com os fragmentos do íon de [Glu1]-fibrinopeptídeo B. A amostra foi aplicada a uma coluna de fase reversa C18 (75 μm x 100 mm) e eluída com um gradiente linear partindo de 10% a 85% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico.

O espectrômetro de massa operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 90 °C e a voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados de acordo com a função DDA (Direct Data Acquisition – Aquisição Direta de Dados) os íons precursores com carga entre 2+ e 4+ foram selecionados para análise de MS/MS sendo fragmentados através de CID (Collision Induced Decomposition – Decomposição induzida por colisão), utilizando argônio como gás de colisão. Os dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp).

Os peptídeos com sequência de aminoácidos comuns a outras proteínas foram identificados por buscas em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos. Foram utilizados os programas ProteinLynx 2.4 (Waters Corp) e MASCOT (Matrix Science). Os demais peptídeos tiveram suas sequências determinadas através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (sequenciamento *de novo*) utilizando a ferramenta PepSeq.

3.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi isolado a partir de folhas frescas da planta (*Dioclea lasiophylla*) através do método CTAB (detergente brometo de cetiltrimetilamônio) (DOYLE; DOYLE, 1987). As folhas foram congeladas e maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino (0,8 g) que foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 8 mL de tampão de extração CTAB (Tris 100 mM pH 8,0; CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM; 2-mercaptoetanol 0,2% v/v) contendo de 1% de PVP (polivinilpirrolidona) (0,08 gramas, p/v) previamente aquecido a 60°C, o qual permaneceu em incubação por 1 hora a 60 °C, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. A emulsão foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 $\times g$, a 4°C, o sobrenadante foi coletado e posteriormente transferido para um novo tubo falcon onde foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v), submetido a agitação suave por 5 minutos.

A emulsão foi novamente centrifugada, o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo falcon e foi adicionada a este 0,3 volumes de isopropanol. O tubo foi

invertido gentilmente e incubado no freezer -20°C por 30 minutos. O DNA genômico foi precipitado por centrifugação por 10 minutos, a $10.000 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. O precipitado (DNA) foi recolhido e transferido para um microtubo, para uma nova lavagem com etanol, e foi realizada outra centrifugação por 10 minutos, a $10.000 \times g$ e a 4°C . O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto à temperatura ambiente até total evaporação do álcool. O DNA isolado foi ressuscitado em 50 μL de água ultrapura estéril e estocado a 4°C .

Foi feita eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio (EtBr) para análise da integridade do DNA genômico obtido. O gel foi submerso em tampão de corrida TBE (Tris-Borato 90 mM, pH 8,8, contendo EDTA 2 mM) e foi submetida a uma voltagem constante de 100 V. O DNA será visualizado através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador. O DNA genômico foi quantificado pelo NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences) a partir da absorbância a 260 nm e contendo a razão A260/A280 entre 1,8 e 2,2.

3.6 Amplificação do gene codificador da lectina

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um microtubo 0,2 mL estéril *Axygen Scientific Inc.* (Union City – CA, EUA), usando 1 unidade da enzima Taq High Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific). Os iniciadores DlyIFW (5'-CCATGGATGGGTATTTCAAAAAAATC-3') e DlyIRV (5'-TCAGACGACGGATGCAAT-3') foram desenhados especificamente para regiões conservadas das lectinas da subtribo Diocleinae. Ambos foram utilizados juntamente com o tampão da Taq HF DNA polimerase e Cloreto de Magnésio (ambos fornecido pelo kit) mais o DNA genômico da planta e dNTP Mix. A reação de amplificação ocorreu no termociclador *Eppendorf MaxyGene gradient*, programado para um passo inicial de desnaturação (5 min a 94°C), seguido por 45 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a uma temperatura de 50°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). No último ciclo, foi realizado uma última fase de extensão prolongada (72°C por 7 min). Após a reação de PCR o termociclador foi programado a incubar as amostras a 4°C . Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% na presença de um marcador de DNA.

3.7 Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T-easy

O produto amplificado foi ligado ao plasmídeo pGEM-T *Easy Vector* (Promega, USA), de acordo com as especificações do fabricante. O inserto foi ligado na região de inserção do sítio múltiplo de clonagem do tipo T/A. O vetor tem o marcador de seleção LacZ. A fórmula fornecida pelo manual do fabricante foi utilizada para calcular a quantidade de DNA necessária para a reação de ligação com o vetor, com uma razão de 10:1 (inserto: vetor).

$$\frac{[\text{vetor (ng)} \times \text{tamanho do inserto (pb)}] \times \text{razão} = \text{inserto (ng)}}{\text{tamanho do vetor (pb)}}$$

Para a reação foi utilizado 25 ng do vetor de clonagem. Concentração de DNA utilizado a equação 1:

$$\frac{(25 \text{ ng} \times 500 \text{ pb}) \times 10}{3000 \text{ pb}} = 41,6 \text{ pb}$$

A ligação foi realizada usando 41,6 ng de DNA e com o vetor de clonagem pGEM-T-*easy* a 4°C por 16 horas em termociclador *Eppendorf MaxyGene gradient*.

3.8 Transformação bacteriana

O método utilizado para transformação de cepas DH5α de *Escherichia coli*, com o produto da reação de ligação, foi o choque térmico.

Uma colônia de *E. coli* DH5α foi crescida em meio LB ágar contendo produto da reação de ligação e 200 μL de CaCl₂ 200 mM, necessário para transformação por choque térmico. Para submeter o choque térmico, a mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos seguido de banho maria a 42°C, por 90 segundos, e novamente em banho de gelo por 2 minutos. Posteriormente as células foram transferidas para um tubo falcon contendo 800 uL de meio SOC (2% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 0,05 % de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ e 20 mM de glicose), previamente aquecido a 37°C, e foram incubadas por 1 hora a 37°C, com agitação de 200 rpm. Com o auxílio da alça de Drigalsk foram incorporadas 200 μL das células transformadas com o produto da reação de ligação em placas de petri contendo meio SOB (2% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 0,05 % de NaCl, 2,5 mM de KCl e 10 mM de MgCl₂) ágar, ampicilina 100 μg/mL, IPTG 0,5 mM e X-Gal 40 μg/mL, sendo incubadas por 16 horas a 37°C. Foi utilizado o método de X-Gal para seleção de colônias transformadas, onde as colônias brancas foram consideradas transformadas conforme o método de seleção LacZ do vetor pGEM-T-*easy*.

3.9 Purificação dos plasmídeos recombinantes e confirmação da transformação

As colônias de *E. coli* DH5 α transformadas foram submetidas a extração do DNA plasmidial de acordo com o AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen biosciences) com algumas modificações. As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio LB broth contendo ampicilina 100 μ g/ μ L e incubadas por 16 horas a 37°C, com agitação de 200 rpm.

A cultura foi centrifugada a 4.000 \times g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 250 μ L do tampão S1 (tampão de equilíbrio) às células precipitadas e foram ressuspensas com um agitador. Em seguida, foram adicionados 250 μ L do tampão S2 (tampão de lise) e a mistura foi invertida cuidadosamente. Na mistura foram adicionados 350 μ L do tampão S3 (tampão de neutralização), novamente invertido cuidadosamente e centrifugado a 12.000 \times g por 10 minutos e a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para uma coluna de miniprep em um microtubo de 2 mL (fornecido), centrifugado a 12.000 \times g por 1 minuto a 4°C e o filtrado foi descartado. Na coluna foi adicionado 700 μ L de tampão W2 (tampão de lavagem), centrifugado a 12.000 \times g por 1 minuto a 4°C e o filtrado novamente descartado. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril e os plasmídeos foram recuperados em 20 μ L de água ultrapura estéril.

3.10 Análise da sequência dos fragmentos

Os plasmídeos foram sequenciados em sequenciador automático MegaBACE (GE Healthcare) pelo método de Sanger (ou método dideoxi). Os oligonucleotídeos iniciadores usados foram promotor T7 (senso) e promotor SP6 (anti-senso) para realização do sequenciamento por ambos os sentidos do plasmídeo. As *reads* foram analisadas pelo programa Phred-Phrap-Consed (EWING *et al.*, 1998).

As *contigs* formadas foram traduzidas em aminoácidos pelo programa Expsy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) e as sequências de aminoácidos foram comparadas com os dados obtidos por espectrometria de massas sequencial para determinação de regiões não determinadas por MS/MS e dedução das regiões processadas na modificação pós-traducional por permutação circular de lectinas de Diocleinae.

3.11 Análises de bioinformática da estrutura primária de DlyL

Uma vez obtida à estrutura primária completa de DlyL, foram utilizados programas de bioinformática para análise de similaridade e homologia, entre a sequência de aminoácidos obtida e todo o banco não redundante de proteínas depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI). Primeiramente, foi utilizado o programa pBLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e as proteínas com maior identidade foram selecionados para os alinhamentos de sequências utilizando o Clustal-Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (MCWILLIAM *et al.*, 2013). As análises do alinhamento foram realizadas utilizando ESPrpt 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014), para determinar regiões conservadas e predição de estruturas secundárias (com base no modelo PDB 4NOT).

As informações de ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular média teórica da sequência de aminoácidos da lectina foram calculadas usando a ferramenta *PeptideMass* (http://web.expasy.org/peptide_mass/) e *Compute pI/MW* (http://web.expasy.org/compute_pi/) (GASTEIGER *et al.*, 2009). A presença de sítios de N-glicosilação foi avaliada usando a ferramenta *NetNGlyc* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004). A sequência obtida por DNA foi submetida ao software SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para identificação do peptídeo sinal (PETERSEN *et al.*, 2011).

3.12 Modelagem Molecular

A predição da estrutura tridimensional de DlyL foi realizada pelo programa MODELLER v9.16, que é um programa que utiliza abordagem de modelagem por homologia de proteínas (WEBB; SALI, 2014). Foram utilizados modelos cristalográficos do PDB que possuem acima de 80% de similaridade com DlyL e resolução maior que 2.3 Å. Para modelagem dos metais (Ca^{2+} e Mn^{2+}) e o carboidrato ligante (X-man), foi utilizado o modelo da lectina de *Dioclea virgata* (PDB: 3RS6). Para avaliação da qualidade da estrutura modelada foi utilizado a ferramenta SaliLab *Model Evaluation Server*, que indica valores de z-DOPE (avalia qualidade geral da estrutura, deve ser menor que -1) e GA341 (indica a correlação entre estruturas e o modelo, deve ser maior que 0.8) e o programa Verify_3D, que indica a correlação entre estrutura primária e secundária, cada aminoácido deve ter escore

acima de 0.2 (ERAMIAN *et al.*, 2008; BOWIE; LUTHY; EISENBERG, 1991). Parâmetros geométricos foram avaliados pelo WINCOOT v0.8.2. Para análise estrutural do modelo geral e dos domínios da lectina, foi realizada sobreposição do modelo gerado com a estrutura cristalográfica de DvirL (PDB 3RS6). As imagens utilizadas neste trabalho e sobreposição de estruturas foram realizadas pelo PyMOL v. 1.7.4.5.

3.13 Avaliação do efeito vasorelaxante

Ratos Wistar machos (250-300 g), manipulados de acordo com os princípios estabelecidos pelo Comitê de Ética da UECE (CEUA N° 10.130.208-8/40), foram sacrificados por atordoamento e a aorta torácica foi removida. Segmentos de anel de aorta (3-5 mm) foram preparados, para gravação da tensão (2 g), em banho para órgãos de 10 mL preenchidos com solução de Tyrode modificada (136 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 0,98 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 0,36 de NaH₂PO₄, 11,9 de mM NaHCO₃, e 5,5 mM de glicose) em pH 7,4, 37 °C, 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. Após um período de equilíbrio de 40 minutos, os anéis foram testados com 60 mM de KCl para assegurar a viabilidade do tecido. A resposta contrátil foi medida usando um transdutor de força, ligado a um pré-amplificador e um sistema de aquisição de dados computadorizado (Chart 4.1; PowerLab ADInstruments, Inc., Austrália).

DlyL foi adicionada em concentrações cumulativas (1, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) em intervalos de 10 minutos nos tecidos, pré-contraídos com fenilefrina (0,1 µM), com endotélio da aorta intacto ou retirado. A de-endotelização foi avaliada por meio de fricção mecânica da superfície interna da aorta e o endotélio intacto foi considerado para respostas relaxantes a acetilcolina (1 µM) superior a 75 % (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980).

A participação do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) de óxido nítrico no efeito relaxante de DlyL, foi avaliada por incubação da aorta endotelizada com metil éster de N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; 100 mM), inibidor da enzima óxido nítrico sintase, e 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ; 10 µM), inibidor da guanilil ciclase sensível a NO, por 30 min antes da adição da lectina no platô da contração induzida pela fenilefrina. O envolvimento domínio de lectina foi avaliada por incubação, durante 1 h a 37 °C, de DlyL (30 µg /ml) com o seu açúcar específico (glicose, 0,1 M) antes da adição aos tecidos.

3.14 Avaliação da atividade inflamatória em modelo de edema de pata

Foram utilizados ratos fêmeas Wistar (150-200 g) obtidas do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e acomodadas em condições adequadas de luz (ciclo claro/escuro de 12 h) com ração e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas no laboratório por um período de 1 h antes dos experimentos para a adaptação. Todos os experimentos foram conduzidos em concordância com os princípios éticos e legais aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA nº 10130208-8/40).

O edema de pata foi induzido por administração subcutânea (s.c.) intraplantar da DlyL (200 µg/pata). O edema foi mensurado por pletismometria (Panlab 7500), calculado como a diferença entre o volume deslocado pelas patas imediatamente antes da indução (tempo zero) e nos tempos de 30 min-24 h após o estímulo e expresso em mL ou área sob a curva (ASC) pelo método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995).

A participação do sítio de reconhecimento a carboidrato no efeito da lectina foi avaliada pela administração s.c. de DlyL previamente incubada, por 1 h a 37 °C, com o carboidrato específico, α -metil-D-manosídeo (0,1 M; α -CH₃) (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013). A participação do óxido nítrico no efeito inflamatório de DlyL foi avaliada pela administração intravenosa (i.v.) de L-NAME (30 mg/kg) 30 min antes da lectina. O grupo controle recebeu apenas salina estéril 0,9 % em substituição a lectina. Os resultados foram expressos como Média \pm E.P.M. (n=6) e as diferenças estatísticas determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste corretivo de Bonferroni, considerando-se valores de $p < 0,05$ como significativos.

3.15 Avaliação do efeito nociceptivo no teste Von Frey

A hipernociceção foi induzida por administração s.c. intraplantar da DlyL e avaliada em analgesímetro eletrônico Von Frey (Insight Equipamentos LTDA, Brasil) após colocação dos animais individualmente em caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm) com plataformas elevadas de malha de arame para permitir o acesso a face ventral das patas traseiras. Os animais foram habituados nas caixas por 15 min antes do início da avaliação.

As patas dos animais foram estimuladas por um transdutor de força (sustentado pela mão do avaliador) contendo em sua extremidade uma ponta de polipropileno de 0,5 mm² de diâmetro colocada perpendicularmente a área central das patas posteriores com aumento

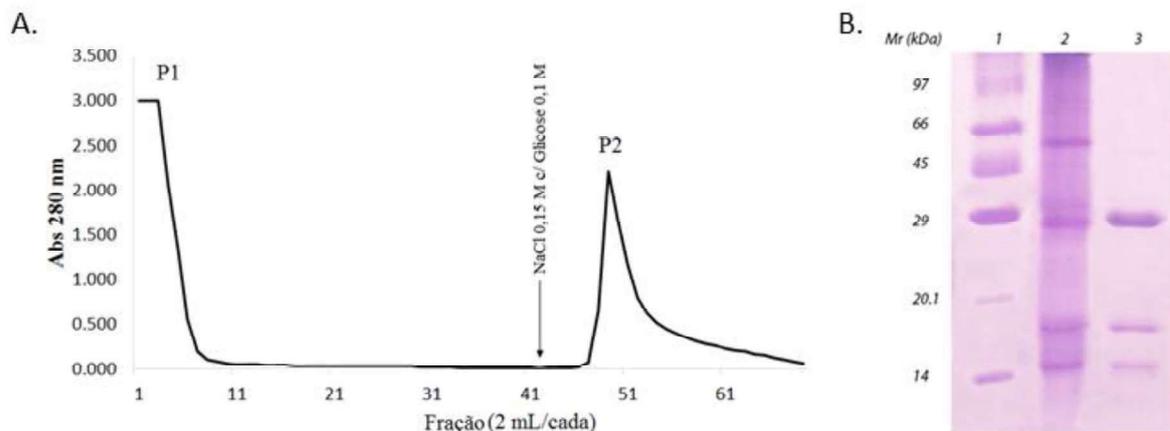
gradual de pressão, a fim de provocar movimento reflexo de retirada das patas. A hipernocicepção foi mensurada automaticamente pelo equipamento e expressa em gramas (g), sendo realizadas 3 avaliações por pata. Os resultados foram expressos como Média \pm E.P.M. (n=6) e as diferenças estatísticas determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste corretivo de Bonferroni, considerando-se valores de $p < 0,05$ como significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da Lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla*

DlyL foi purificada por um único passo de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013). Em seguida, foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE, seguindo a metodologia de Laemmli (1970), para observar a pureza da amostra. DlyL apresenta perfil cromatográfico e eletroforético, com massas aparentes de 29 (cadeia- α), 14 (cadeia- β) e 12 kDa (cadeia- γ), semelhante à de outras lectinas manose/glicose da subtribo Diocleinae (FIGURA 16), como as lectinas de *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016), de *Canavalia oxyphylla* (SANTIAGO *et al.*, 2014) e de *Canavalia virosa* (OSTERNE *et al.*, 2014).

Figura 16 - Perfil cromatográfico e eletroforético (SDS-PAGE) de DlyL.



Fonte: Elaborado pelo autor. A) Extrato total ($V_{amostra} = 15$ mL) aplicado em uma coluna Sephadex G-50 (6.5 x 1.8 cm) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo $MnCl_2$ 5 mM e $CaCl_2$ 5 mM. A fração não retida (P1) foi eluída com o tampão de equilíbrio e a fração retida (P2) foi eluída com solução de NaCl 0,15 M contendo glicose 0,1 M. Em cada tubo foram coletadas alíquotas de 2 mL com fluxo de 1 mL/min. Absorbância: 280 nm; B) No poço 1 se encontram os marcadores: Fosforilase b (97 kDa), Albumina sérica bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anidrase carbônica (29 kDa), Inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -Lactalbumina (14 kDa); Poço 2 se encontra extrato bruto; Poço 3 se encontra DlyL pura (30 μ g).

4.2 Estrutura primária de DlyL

DlyL foi digerida com as enzimas Tripsina e Quimiotripsina, e foram obtidos 12 peptídeos trípticos e 13 quimiotrípticos, em seguida foram sequenciados e totalizaram 230 aminoácidos, cerca de 97% de cobertura da sequência completa da lectina. Para obtenção dos peptídeos restantes, primers de regiões homologas (DlyLFW e DlyLRV) foram desenhados, a

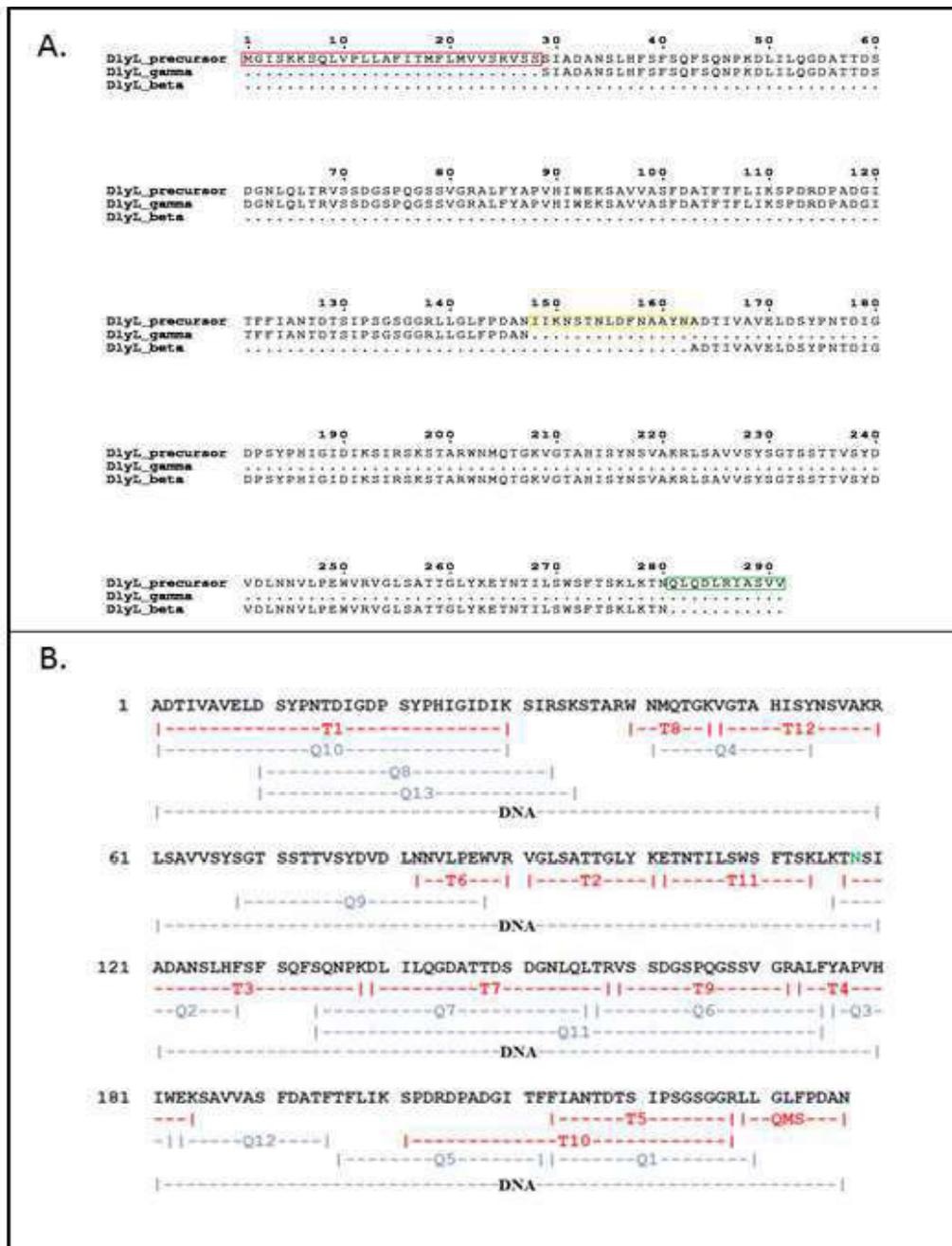
partir da sequência obtida por MS/MS, para amplificação do gene de DlyL a partir do DNA genômico extraído de sementes.

O DNA genômico foi eficientemente extraído pelo método de CTAB, sem degradações e contaminações. O gene de DlyL (*dlyl1*) foi amplificado eficientemente por PCR com os primers desenhados, o DNA amplificado foi inserido em vetores de clonagem pGEM-T-easy e utilizados para transformar cepas de *E. coli* DH5 α . As cepas transformadas foram selecionadas pelo método de X-Gal (colônias brancas), seus plasmídeos purificados e posteriormente sequenciados por um sequenciador MegaBACE (GE Healthcare), que tem como base o método de Sanger automatizado.

A sequência de DNA obtida foi utilizada para dedução da sequência de aminoácidos utilizando a ferramenta *ExPasy translate tool*, obtendo assim a sequência do precursor da lectina (FIGURA 17A). O precursor de DlyL, como todas as outras lectinas da subtribo Diocleinae, sofre processamento pós-traducional por permutação circular (HERMAN *et al.*, 1985; CHRISPEELS *et al.*, 1986; FAYE & CHRISPEELS, 1987; BOWLES *et al.*, 1986; BOWLES; PAPPIN, 1988), desse modo, para deduzir a sequência de DlyL madura, a sequência foi submetida à análise pela ferramenta SignalP 4.1, indicando a sequência N_T-MGISKKSQLVPLLAFITMFLMVVSRVSS-C_T como peptídeo sinal, e depois comparada com a sequência obtida por MS/MS para dedução de regiões que são clivadas durante o processamento (região interna: N_T-IIKNSTNLDFNAAYN-C_T; região C-terminal: N_T-QLQDLRIASVV-C_T) e as sequências das cadeias β e γ .

Com os dados obtidos, foi possível determinar a sequência de aminoácidos completa da lectina, através da dedução do processamento pós-traducional (retirada de sequências clivadas e inversão da cadeia- γ e cadeia- β), utilizando a sequência de DNA e MS/MS (FIGURA 17B). A sequência da proteína completa totalizou 237 aminoácidos com uma massa de 25.399,15 Da, um pouco diferente da massa intacta medida por MS, que foi de 25.417 Da (PINTO-JUNIOR, 2013) e pI teórico de 5,68, não possuindo sítios para glicosilações.

Figura 17 - Sequência de aminoácidos do precursor e da proteína madura de DlyL.

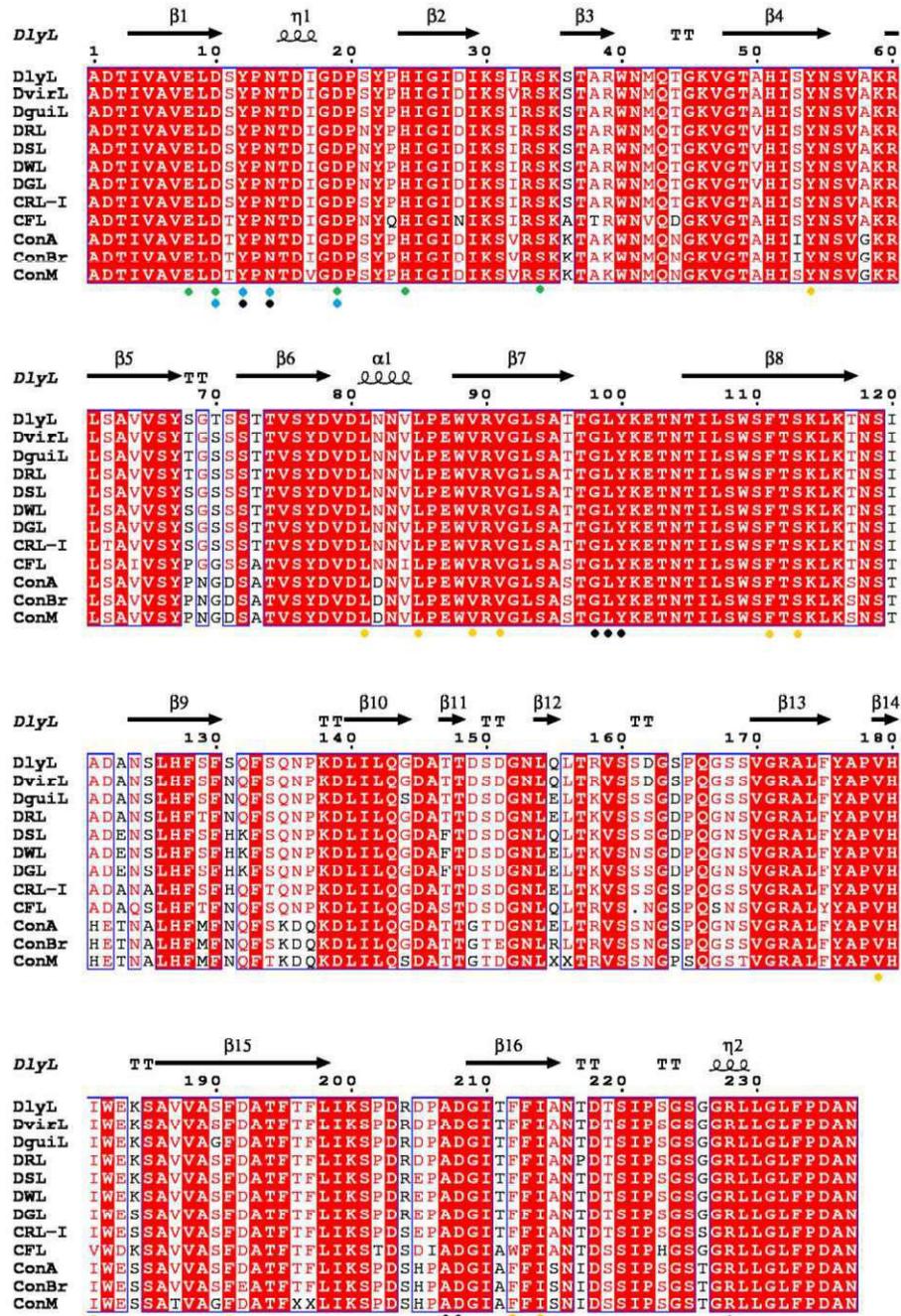


Fonte: elaborado pelo autor. A) Alinhamento da estrutura primária do precursor de DlyL, obtido por dedução de sequência de DNA, com a sequência de aminoácidos de DlyL madura, obtida por MS/MS. Em vermelho indica o peptídeo sinal, em amarelo uma região interna e em verde região C-terminal, todas clivadas durante o processamento por permutação circular. B) Estrutura primária de DlyL madura, obtida por MS/MS e DNA.

A DlyL possui alta similaridade, em relação a estrutura primária, com outras lectinas da subtribo Diocleinae (FIGURA 18). A sequência de DlyL apresentou 98% de similaridade com a lectina de *Dioclea virgata* (DvirL, UniProt P58907.2), 96% com a lectina de *D. guianensis* (DguiL, UniProt P81637.1), 95% com a lectina de *D. rostrata* (DRL, UniProt

P58908.2), 95% com a lectina de *D. sclerocarpa* (DSL, UniProt PB3EW32.1), 94% com a lectina de *D. wilsoni* (DWL, UniProt P86624.1), 94% com a lectina de *D. grandiflora* (DGL, UniProt P08902.2), 95% com a lectina de *Cymbosema roseum* (CRL-I, Uniprot P81517.1), 86% com a lectina de *Cratylia floribunda* (CFL, UniProt P81517.1), e 84% com as lectinas de *Canavalia ensiformes* (ConA, UniProt P81461.1), *Canavalia brasiliensis* (ConBr, UniProt P55915.1) e *Canavalia maritima* (ConM, UniProt P81364.1).

Figura 18 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) com lectinas da subtribo *Diocleinae*.



Fonte: elaborado pelo autor. Alinhamento da sequência de aminoácidos de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) com lectinas da subtribo Diocleinae usando o programa ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). DvirL (UniProt P58907.2), DguiL (UniProt P81637.1), DRL (UniProt P58908.2), DSL (UniProt PB3EW32.1), DWL (UniProt P86624.1), DGL (UniProt P08902.2), CRL-I (UniProt P81517.1), CFL (UniProt P81517.1), ConA (UniProt P81461.1), ConBr (UniProt P55915.1) e ConM (UniProt P81364.1). Os círculos em verde correspondem aos resíduos referentes ao sítio de ligação ao Mn^{2+} , os azuis ao sítio de ligação ao Ca^{2+} , os amarelos ao sítio hidrofóbico e os pretos ao sítio de reconhecimento a carboidrato.

O alinhamento das sequências mostrou que cerca de 157 resíduos de aminoácidos são conservados em todas as lectinas da subtribo Diocleinae alinhadas, em torno de 66,24% dos resíduos, 93 resíduos na cadeia- β (39,24%) e 64 resíduos na cadeia- γ (27%).

Entre os resíduos conservados estão os aminoácidos envolvidos no sítio de reconhecimento a carboidratos (Tyr₁₂, Asn₁₄, Gly₉₈, Leu₉₉, Tyr₁₀₀, Ala₂₀₇, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈), sítio de ligação a metais (íon Mn^{2+} : Glu₈, Asp₁₀, Asp₁₉ e His₂₄; íon Ca^{2+} : Asp₁₀, Tyr₁₂, Asn₁₄ e Asp₁₉), indiretamente, moléculas de água fazem ligações entre o Ca^{2+} e os resíduos Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈, como também, entre o Mn^{2+} e o resíduo Ser₃₄, o que torna esses resíduos constituintes deste sítio e que também são conservados. Os resíduos da cavidade hidrofóbica também são conservados (Tyr₅₄, Leu₈₁, Leu₈₅, Val₈₉, Val₉₁, Phe₁₁₁, Ser₁₁₃, Val₁₇₉, Ile₁₈₁, Phe₁₉₁, Phe₂₁₂ e Ile₂₁₄), exceto na lectina de *Cratylia floribunda* (CFL), que possui uma Valina na posição 181 e um Triptofano na posição 212 (CAVADA *et al.*, 2001; BARROSO-NETO *et al.*, 2016). Todos os aminoácidos referentes a esses domínios estão conservados em DlyL.

Outro fato importante é o equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH dessas lectinas. A forma tetramérica é capaz de se ligar com maior afinidade à receptores da membrana de células podendo desencadear uma série de processos de transdução de sinal. A orientação dos resíduos de aminoácidos no sítio de reconhecimento a carboidrato e a oligomerização pH dependente, são os principais motivos das diferenças encontradas em atividades biológicas de lectinas de Diocleinae (SANZ-APARICIO, 1997; WAH, 2001).

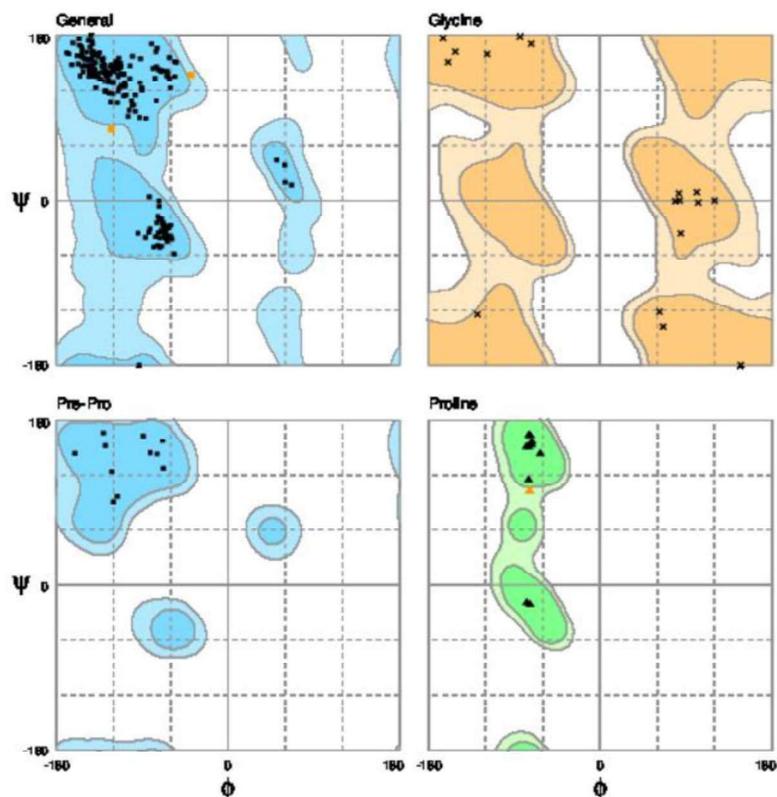
A análise estrutural de lectinas de *Dioclea guianensis* e *Dioclea grandiflora*, indicaram que a substituição da histidina na posição 131 por asparagina reduz drasticamente os contatos interdímicos e desordena a alça antes os resíduos 117 e 123, que na forma ordenada estabiliza a associação tetramérica independente de pH, propriedade encontrada na lectina isolada de *Dioclea grandiflora* (WAH, 2001). DlyL possui uma Serina na posição 131, diferindo de todas as outras lectinas da subtribo alinhadas que possuem Asparagina ou

Histidina, o que deve ser avaliado com análise da estrutura tridimensional de DlyL nativa posteriormente (WAH, 2001).

4.3 Estrutura terciária de DlyL

A análise de validação da estrutura modelada foi realizada pelo programa SaliLab *Model Evaluation Server* e demonstrou que o modelo está com valores de $z\text{-DOPE} = -1.87$ e $GA341 = 1.0$, valores se encontram em um padrão ideal para modelagem. A análise realizada pelo *Verify_3D* informou que 100% dos resíduos de aminoácidos da estrutura primária estão correlacionando com a estrutura terciária, todos estavam na conformação correta, com escore acima de 0.2. A análise estrutural através do *WINCOOT* relatou que modelo não possui problemas de geometria e nem de rotâmeros (cadeias laterais de aminoácidos). A qualidade estereoquímica do modelo foi avaliada, baseada nas torções psi (ψ) e phi (ϕ) das ligações do carbono- α , através do gráfico de Ramachandran, informando que 99.15% dos resíduos de aminoácidos se encontram em regiões favoráveis, 0.85% em regiões parcialmente permitidas e nenhum resíduo em regiões não permitidas (FIGURA 19). Todos os parâmetros avaliados concluem que a modelagem de DlyL por homologia foi um sucesso.

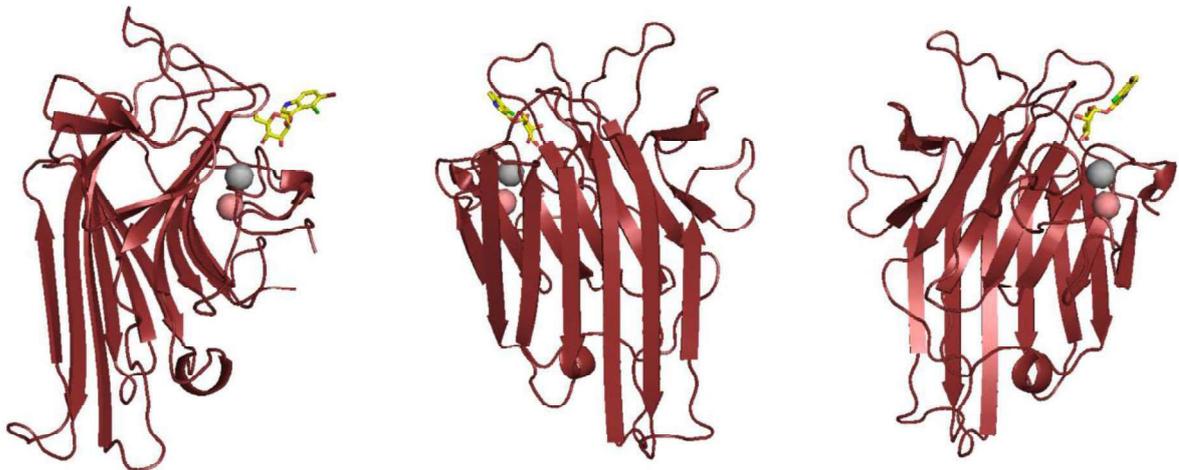
Figura 19 - Gráfico de Ramachandran das coordenadas da DlyL.



Fonte: elaborado pelo autor. Nos gráficos as regiões em azul, verde e laranja, escuro e claro, representam regiões permitidas e generosamente permitidas de ocupação por resíduos discriminados em cada gráfico, respectivamente.

A estrutura geral do monômero de DlyL complexado com X-Man (FIGURA 20) foi modelada por homologia estrutural e apresentou o motivo *jellyroll* ou β -Sanduiche. DlyL possui 237 resíduos de aminoácidos, um sítio de ligação a metais, com um íon de cálcio e um íon de manganês, e um sítio de reconhecimento a carboidratos por monômero. Padrão estrutural encontrado também em outras lectinas da subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2001), como as lectinas de *Dioclea sclerocarpa* (BARROSO-NETO *et al.*, 2016), *Dioclea virgata* (NOBREGA *et al.*, 2012), *Cymbosema roseum* (ROCHA *et al.*, 2015) e *Canavalia grandiflora* (BARROSO-NETO *et al.*, 2014).

Figura 20 - Representação do monômero de DlyL complexado com X-Man, por modelagem estrutural.

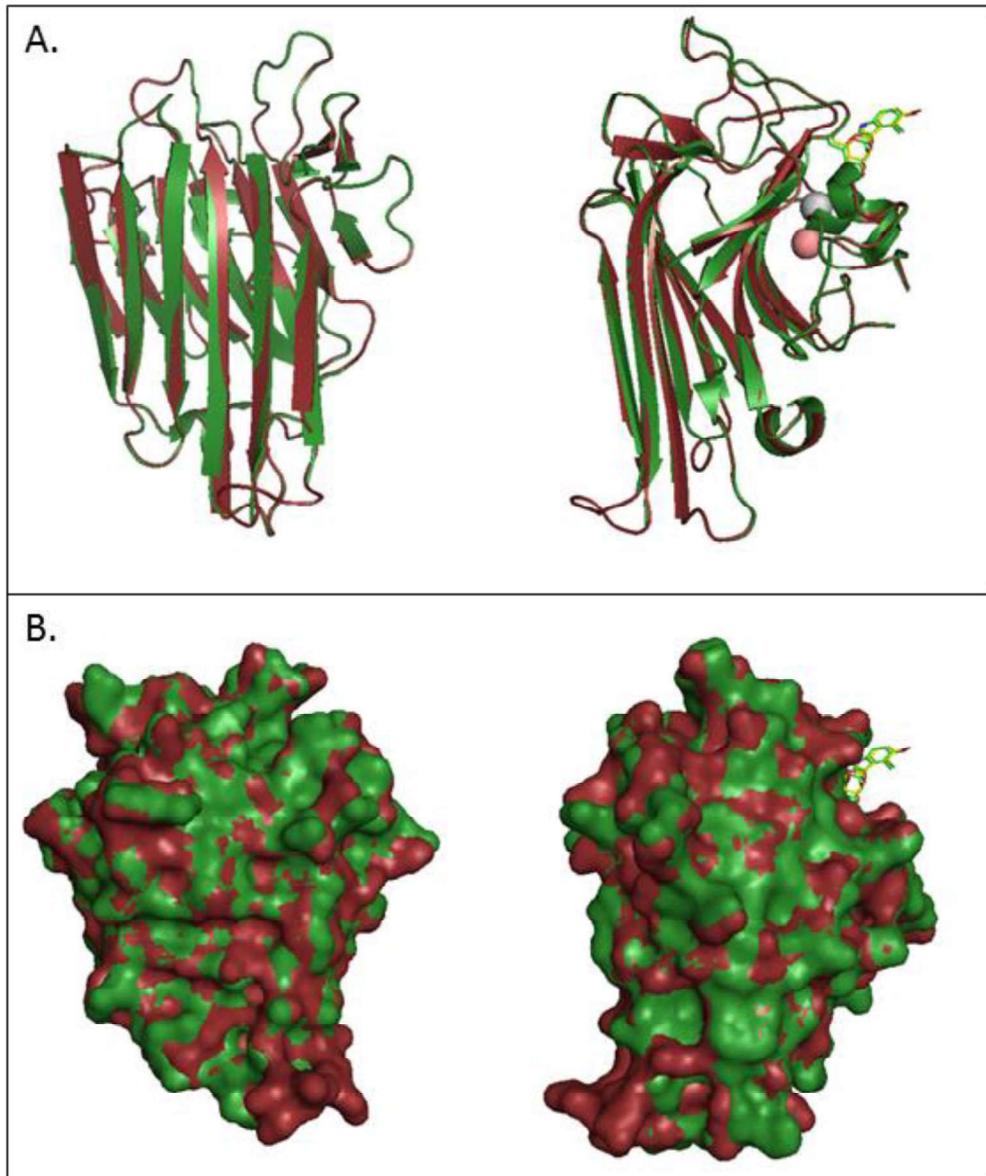


Fonte: elaborado pelo autor. Estrutura do monômero de DlyL, com vista lateral (esquerda), frontal (meio) e traseira (direita). Em vermelho corresponde a parte protéica, a esfera rosa corresponde ao íon de Mn^{2+} , esfera cinza ao íon de Ca^{2+} e em amarelo o X-Man.

A sobreposição do modelo de DlyL com a estrutura cristalográfica da lectina de *Dioclea virgata* (DvirL, PDB 3RS6) (FIGURA 21A), proteína com maior homologia de estrutura primária (98%), demonstra que as folhas- β de DlyL seguem a mesma orientação estrutural de outras lectinas do gênero *Dioclea* (NOBREGA *et al.*, 2012; BARROSO-NETO *et al.*, 2016; PEREIRA-JUNIOR, 2014). Apesar disso, a análise de superfície das duas estruturas sobrepostas sugere que as folhas- β de DlyL estão mais contidas para o centro da

molécula, de modo geral, visto que muitos aminoácidos de DvirL estão mais expostos e cobrindo superfície em uma área maior (FIGURA 21B).

Figura 21 - Sobreposição das estruturas de DlyL-DvirL.



Fonte: elaborado pela autor. A) Sobreposição estrutural das lectinas DlyL, em vermelho e DvirL (PDB 3RS6), em verde, em vista frontal (esquerda) e lateral (direita). B) Análise de superfície da sobreposição de DlyL (vermelho) e DvirL (verde), em vista frontal (esquerda) e lateral direita (direita).

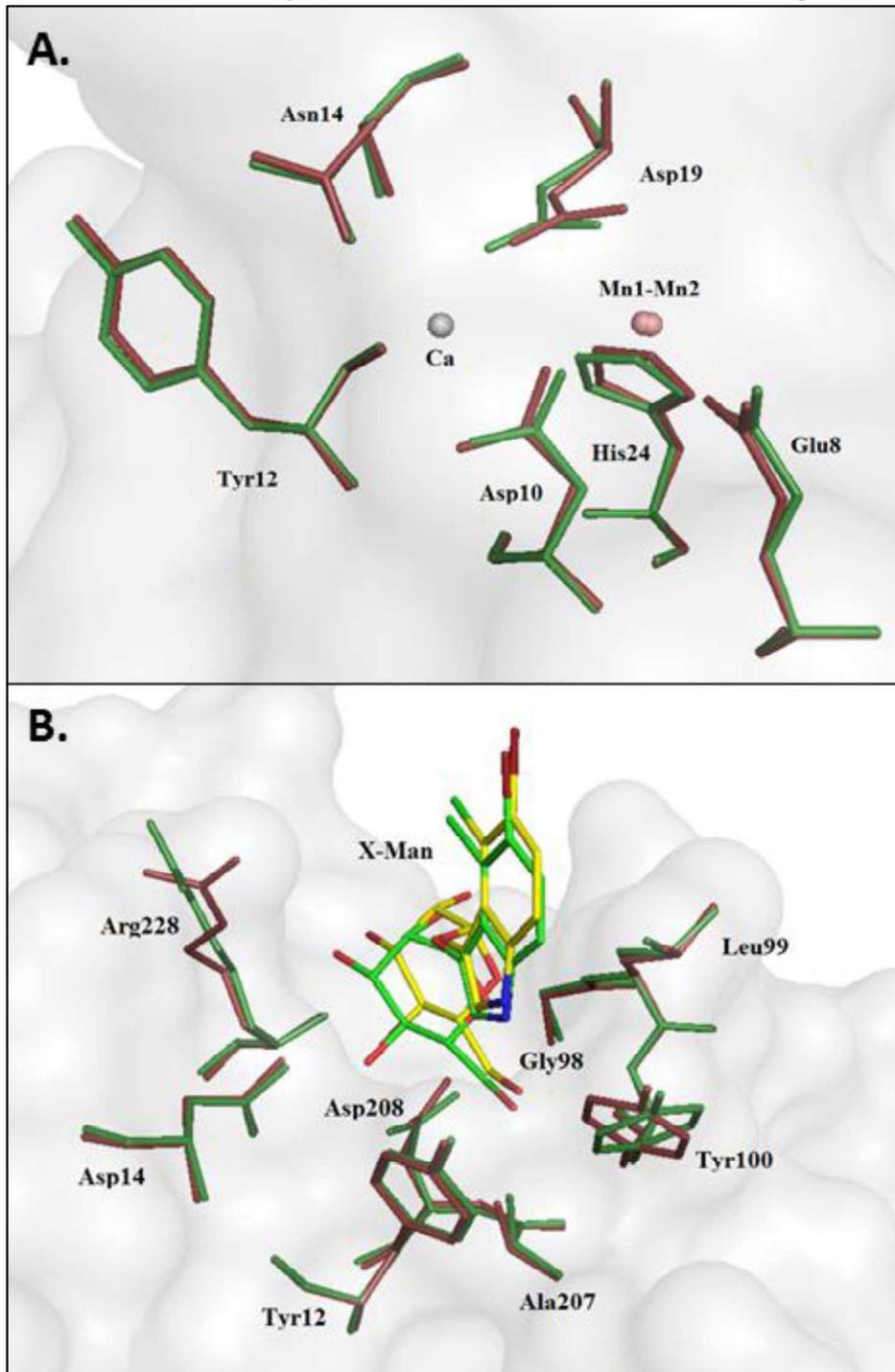
O modelo de DlyL possui um sítio de ligação a metal e de reconhecimento a carboidratos contendo resíduos conservados, e são semelhantes aos presentes nas outras lectinas de leguminosas que fazem a coordenação dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} (DELATORRE *et al.*, 2007; NOBREGA *et al.*, 2012; BARROSO-NETO *et al.*, 2016; PEREIRA-JUNIOR, 2014).

O sítio de ligação a metal presente na estrutura monomérica situa-se na proximidade do CRD e a ligação aos íons favorecem interações que auxiliam na estabilização do sítio de ligação a carboidratos. Neste caso o Mn^{2+} é coordenado pelos resíduos Glu₈, Asp₁₀, Asp₁₉ e His₂₄, e o Ca^{2+} é coordenado pelos resíduos Asp₁₀, Tyr₁₂, Asn₁₄ e Asp₁₉. Os metais atuam estabilizando a ligação peptídica ente os resíduos Ala₂₀₇-Asp₂₀₈, para que permaneça estável na configuração *cis*, que é necessário para que o sítio de ligação a carboidrato interaja com seu ligante, pois orienta o posicionamento dos resíduos Asn₁₄ e Arg₂₂₈. Os dois sítios e todo o mecanismo citado, foi observado e descrito em diversas estruturas de lectinas do gênero *Dioclea* e *Canavalia*, como as lectinas de *Dioclea sclerocarpa* (BARROSO-NETO *et al.*, 2016), de *Dioclea reflexa* (PEREIRA-JUNIOR, 2014), de *Canavalia grandiflora* (BARROSO-NETO *et al.*, 2014) e *Dioclea virgata* (NOBREGA *et al.*, 2012).

Para verificação da orientação dos aminoácidos contidos no sitio de ligação a metais e no sitio de reconhecimento a carboidratos, as regiões dos dois sítios foram analisadas através da sobreposição do modelo de DlyL e a estrutura de DvirL (PDB 3RS6) (FIGURA 22A-B). Foi obtido um RMSD geral de 0.075, os aminoácidos que constituem ambos os sítios são conservados em termos de composição e posicionamento, mas não todos em termos de conformação. Analisando os resíduos sobrepostos do sitio de ligação a metais, podemos observar que os resíduos Tyr₁₂ e Asn₁₄, de ambas estruturas, permanecem na mesma conformação, não alterando o posicionamento do íon cálcio. Porém os resíduos Glu₈, Asp₁₀, Asp₁₉ e His₂₄, não estão totalmente alinhados, mostrando que há diferenças de conformação nos resíduos de DlyL em comparação com DvirL, que faz com que o íon manganês sofra um deslocamento para esquerda em DlyL (Mn1) em relação ao mesmo íon em DvirL (Mn2) (FIGURA 22A).

Em relação ao sitio de reconhecimento a carboidrato, os resíduos Tyr₁₂, Asn₁₄, Gly₉₈, Leu₉₉ e Ala₂₀₇, estão alinhados ou não tiveram mudanças conformacionais significativas na sobreposição de DlyL-DvirL, ao contrário dos resíduos Tyr₁₀₀, Asp₂₀₈ e Arg₂₂₈, que há diferenças conformacionais, o que gera um posicionamento diferencial do X-Man dentro do sitio em DlyL (FIGURA 22B).

Figura 22 - Demonstração do sitio de ligação a metais e sitio de reconhecimento da sobreposição DlyL-DvirL.



Fonte: elaborado pelo autor. A) Demonstração dos aminoácidos do sitio de ligação a metais da sobreposição do modelo de DlyL, em vermelho, com a estrutura cristalográfica de DvirL (PDB 3RS6), em verde escuro. A esfera cinza corresponde ao Ca^{2+} , de ambas as estruturas, e a esfera rosa corresponde ao Mn^{2+} , Mn1 corresponde ao modelo de DlyL e Mn2 ao da estrutura de DvirL. B) Demonstração dos aminoácidos do sitio de reconhecimento a carboidratos da sobreposição do modelo de DlyL, em vermelho, com a estrutura cristalográfica de DvirL (PDB 3RS6), em verde escuro. A estrutura química em amarelo corresponde ao X-Man do modelo de DlyL, e em verde claro, o X-Man da estrutura de DvirL.

Portanto, diferenças no posicionamento dos resíduos podem significar interação diferenciada com ligantes, incluindo diferença na ligação a receptores celulares, contribuindo para explicar como proteínas tão homólogas apresentam atividades biológicas diferentes (SANZ-APARICIO, 1997; WAH, 2001; BARROSO-NETO, 2010; PEREIRA-JUNIOR, 2014). Todas as análises realizadas foram baseadas em estrutura modelada de DlyL, apesar da modelagem ter obtido ótimos resultados de validação, a estrutura foi montada com base em várias estruturas encontradas no PDB. Portanto, as análises devem ser confirmadas por métodos de resolução de estrutura a partir da proteína nativa, como por exemplo, a cristalografia de Raios-X.

4.4 Efeito vasorelaxante de DlyL

Fenilefrina induziu contrações tônicas estáveis de $0,36 \pm 0,13$ g em preparações de anéis aórticos possuindo endotélio intacto ($n = 8$) e de $0,68 \pm 0,11$ g em aqueles que o endotélio foi removido mecanicamente ($n = 6$). Em preparações com endotélio preservado, DlyL ($IC_{50} = 9,8 \pm 0,9$ $\mu\text{g/mL}$) produziu relaxamento em 10, 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$, de $42\% \pm 5,3$; $89,7\% \pm 5,5$ e $126,1 \pm 11,9\%$, respectivamente. Em contraste, em preparações de endotélio desnudo, a adição cumulativa de DlyL não foi capaz de induzir o efeito relaxante (FIGURA 23A-C). Além disso, a L-NAME e ODQ bloqueou completamente o efeito de lectina, enquanto que a associação de DlyL (30 $\mu\text{g/mL}$) com glicose, seu açúcar específico, reduziu o relaxamento lectina em 40,9%.

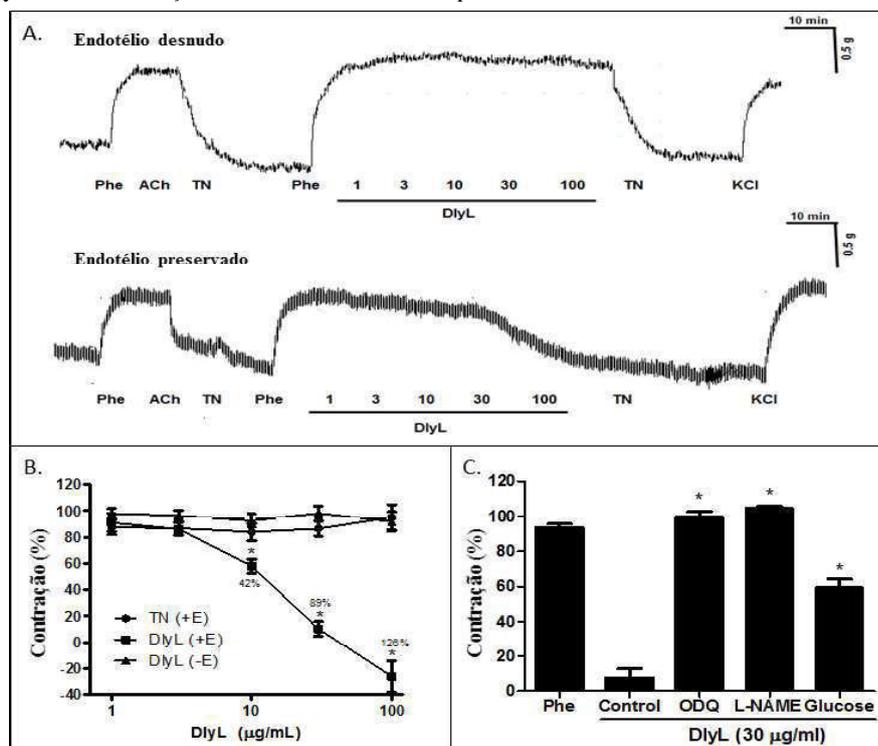
Oxido nítrico (NO) é o principal mediador da relaxação dependente do endotélio em músculos lisos vasculares (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) e parece ser o fator relaxante derivado de endotélio (EDRF) de óxido nítrico responsável pelo efeito da lectina. De fato, os nossos resultados demonstraram que L-NAME e ODQ bloqueiam o efeito vasorelaxante de DlyL. Após a sua síntese pela NOS (Oxido nítrico sintase), NO difunde-se para células musculares lisas adjacentes e atua através da ativação da guanilato ciclase solúvel, aumentando assim a concentração de GMPc intracelular e promover o relaxamento (BAUER; SOTNIKOVA, 2010). Assim, o papel do óxido nítrico pode ser determinante se as respostas relaxantes são reduzidas na presença de um inibidor de sintase de óxido nítrico (HOGAN *et al.*, 2005) ou por inibição da NOS por vários análogos de L-arginina, por exemplo, o L-NAME (MONCADA; HIGGS, 1993). A fim de verificar a participação da enzima e a via NO/GMPc, incubamos as preparações com L-NAME, e um inibidor não-seletivo da NOS, o

ODQ, um inibidor da guanilato sintase sensível a NO (GARTHWAITE *et al.*, 1995). Ambos os inibidores bloquearam o efeito relaxante DlyL, confirmando a participação NO.

A literatura tem mostrado que outras lectinas da subtribo Diocleinae apresentam efeitos relaxantes em aorta de ratos pré-contraídas com fenilefrina via NO e o domínio de lectina, tanto no gênero *Dioclea*, como as lectinas de *Dioclea rostrata* (DRL; BEZERRA *et al.*, 2013), de *Dioclea virgata* (DvirL; NÓBREGA *et al.*, 2012), de *Dioclea violacea* (DVL; BEZERRA *et al.*, 2013) e de *Dioclea sclerocarpa* (DSL; BARROSO-NETO *et al.*, 2016), como também do gênero *Canavalia*, como as lectinas de *Canavalia marítima*, *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia grandiflora* e *Canavalia virosa* (GADELHA *et al.*, 2005; ASSREUY *et al.*, 2009; BARROSO-NETO *et al.*, 2014; OSTERNE *et al.*, 2014).

Comparativamente, DlyL apresentou um maior efeito vasorelaxante do que outras lectinas do gênero *Dioclea*, com 126,1% de relaxação (100 µg/mL), contra 96% de DRL, 70% de DvirL, 43% de DVL e 36% de DSL, na mesma concentração. Em nosso estudo o relaxamento induzido por DlyL ocorreu através do domínio de lectina, uma vez que a associação com a glicose foi capaz de reverter esse efeito. Em conclusão, a lectina manose/glucose específica de *Dioclea lasiophylla* relaxa aorta endotelizada de ratos, por meio do NO e sitio de reconhecimento a carboidrato.

Figura 23 - DlyL induz relaxação em aorta endotelizada pré-contraída com fenilefrina via NO.

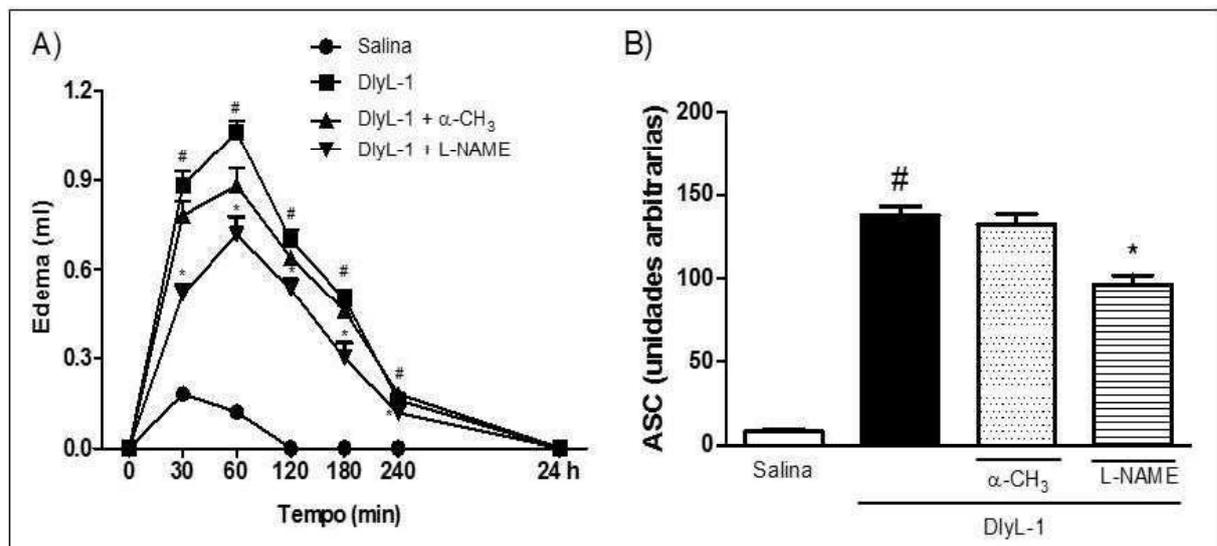


Fonte: elaborado pelo autor. A) traços típicos que mostram o efeito DlyL na aorta com endotélio desnudo ou preservado; B) Os dados comparando as respostas de DlyL em comparação com grupo controle (TN) em aorta com endotélio e desnuda; C) O papel da via do óxido nítrico e domínio de lectina no efeito relaxante do DlyL. Percentagem de Média \pm S.E.M. (n = 4 - 6); p < 0,05 em comparação com Phe (*); para DlyL (#). TN: lavagem com solução Tyrode. (E +): endotélio preservado; (E-): endotélio desnudo.

4.5 Efeito inflamatório e hipernociceptivo de DlyL

DlyL (200 μ g/pata; s.c.) induziu em ratas edema de pata que se iniciou aos 30 minutos, com efeito máximo aos 60 minutos (1,06 \pm 0,08 mL) em relação aos animais controle injetados com salina (0,12 \pm 0,04 mL) (FIGURA 24A). O edema perdurou até a quarta hora, desaparecendo na 24^o h de avaliação. A administração de α -CH₃ (0,1 M) associado a DlyL não alterou o efeito edematogênico da lectina. Por outro lado, o pré-tratamento com L-NAME inibiu o efeito edematogênico da lectina em 29% (DlyL: 137 \pm 5,3 vs. L-NAME: 96,5 \pm 5,5) (FIGURA 24B).

Figura 24 - DlyL induz edema de pata de curta duração

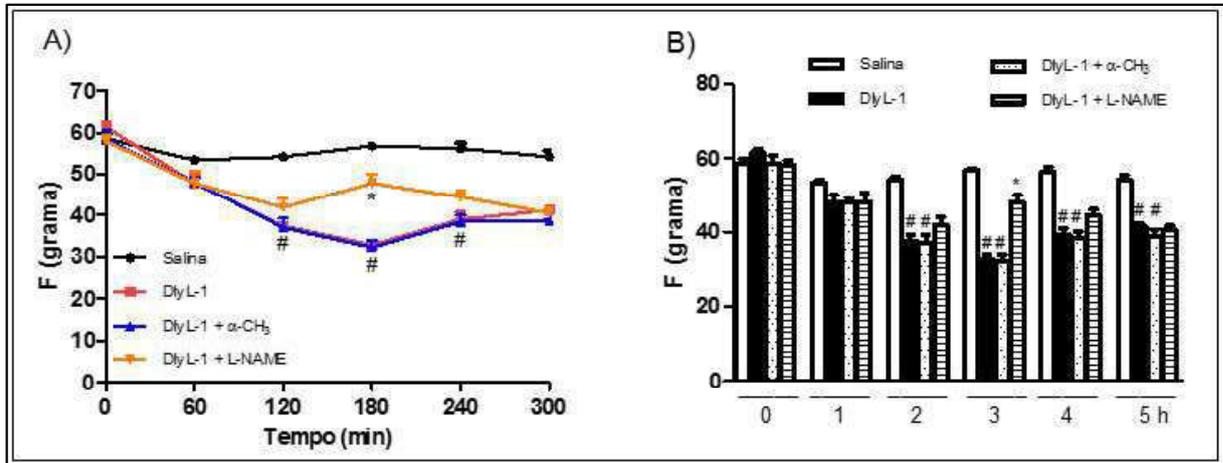


Fonte: elaborado pelo autor. DlyL foi administrada sozinha (200 μ g/pata; s.c.) ou previamente incubada com α -CH₃ (0,1 M). L-NAME (30 mg/kg; i.v. foi administrado 30 minutos antes da lectina. O grupo controle recebeu salina (0,9%). O edema foi avaliado antes (tempo zero) e após o estímulo e expresso como a variação do deslocamento volume das patas em mL: A) ou área sob a curva – ASC; B). Média \pm E.P.M (n=6/grupo). ANOVA e pós teste de Bonferroni. #p<0,05 vs. Salina; *p<0,05 vs. DlyL.

DlyL (200 μ g/pata; s.c.) aumentou a resposta de retirada das patas frente ao estímulo mecânico aplicado em gramas (g, teste de von Frey) a partir da segunda hora de avaliação, com efeito máximo na terceira hora (32,8 \pm 0,96 g vs. Salina: 56,8 \pm 0,6 g). A administração de α -CH₃ (0,1 M) associado à DlyL não alterou o efeito nociceptivo da lectina.

Entretanto, o pré-tratamento com L-NAME inibiu a resposta hipernociceptiva da lectina na terceira hora avaliada (DlyL: $32,8 \pm 0,96$ g vs. L-NAME: $47,8 \pm 2,1$ g) (FIGURA 25A-B).

Figura 25 - DlyL induz hipernocicepção plantar.



Fonte: elaborado pelo autor. DlyL (200 μ g/pata; s.c.) foi administrada sozinha ou previamente incubada (37°C; 60 min) com α -CH₃ (0,1 M). L-NAME (30 mg/kg; i.v.) foi administrado 30 min antes da lectina. O grupo controle recebeu salina (0,9%). A hipernocicepção foi avaliada pela resposta de retirada da pata frente ao aumento da pressão (g). A) ou área sob a curva – ASC; B). Média \pm E.P.M (n=6/grupo). ANOVA e pós teste de Bonferroni. #p<0,05 vs. Salina; *p<0,05 vs. DlyL

Os resultados desse estudo demonstram que DlyL apresenta atividade edematogênica em ratas, de curta duração, semelhante a DvirL (DELATORRE *et al.*, 2011), que possui pico de edema em 1h, e diferente das demais lectinas do gênero Dioclea, que possuem pico de edema entre 4-5h (RANGEL *et al.*, 2012; PEREIRA-JUNIOR, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016). DlyL demonstrou também atividade nociceptiva em fase mais tardia, na terceira hora após administração da lectina. Ambas atividades permaneceram inalteradas pela associação da lectina ao açúcar ligante α -CH₃, que parecem não estar relacionadas ao sítio de reconhecimento a carboidrato. Outra hipótese seria que os glicoconjugados contendo manosídeos, estão envolvidos no efeito inflamatório de DlyL, visto que os N-glicanos principais envolvidos no reconhecimento molecular das células são os esqueletos de *high-mansoses* e carboidratos complexos, o que pode explicar uma forte interação de DlyL com esses glicanos, esta não sendo inibida por α -CH₃ (MITOMA *et al.*, 2007).

Este efeito contrasta com o de outras lectinas isoladas de plantas da subtribo Diocleinae como a lectina *Dioclea rostrata* (FIGUEIREDO *et al.*, 2009), a de *Dioclea wilsonii* (RANGEL *et al.*, 2012) e de *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016), cujo efeito edematogênico foi inibido pelo açúcar ligante.

O edema é um dos sinais clínicos da inflamação e está relacionado com o extravasamento de fluido rico em proteínas do compartimento intravascular para o interstício em função do aumento da permeabilidade vascular de capilares e vênulas resultante da liberação de substâncias vasoativas como histamina, bradicinina, substância P, prostaglandinas, óxido nítrico (NO), produtos da ativação da cascata do complemento e da coagulação no local inflamado (ALLER *et al.*, 2007). O NO é produzido a partir da combinação da L-arginina e do oxigênio molecular pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), expressa em três isoformas: neuronal (nNOS), indutiva (iNOS) e endotelial (eNOS). A nNOS e eNOS são constitutivamente expressas e a iNOS pode ser induzida durante eventos imunológicos e inflamatórios em resposta a diferentes estímulos (ALDERTON *et al.*, 2001). A atividade edematogênica da DlyL foi revertida parcialmente pelo inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase L-NAME, sugerindo que o NO possa ser um dos mediadores que participam dessa atividade. Outras lectinas isoladas dos gêneros *Dioclea* (FIGUEIREDO *et al.*, 2009; RANGEL *et al.*, 2012; ASSREUY *et al.*, 2009; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016) e *Canavalia* também estimulam a produção de NO *in vivo* (KESHERWANI; SODHI, 2007; SANTIAGO *et al.*, 2014) e *in vitro* (ASSREUY *et al.*, 2009).

O NO, além de promover vasodilatação estimula a produção de prostaglandinas (SALVEMINI *et al.*, 1993), que estão envolvidas na gênese da dor, reduzindo o limiar de ativação dos nociceptores (FERREIRA, 1993), levando a um estado de hipernocicepção ou hiperalgesia (MILLAN, 1999). Observou-se que o efeito nociceptivo elicitado pela DlyL foi revertido parcialmente na terceira hora pelo L-NAME. Esse resultado indica que o mecanismo utilizado pela lectina em induzir nocicepção envolva a produção de prostaglandina a partir da síntese de NO, o que explicaria também a resposta nociceptiva tardia em comparação ao surgimento da resposta edematogênica.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados podemos concluir que uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) teve sua estrutura primária completamente sequenciada por MS/MS e sequenciamento de DNA. DlyL apresentou grande similaridade com outras lectinas de espécies da mesma subtribo, possuindo aminoácidos de domínios importantes conservados. DlyL teve sua estrutura tridimensional determinada pela técnica de modelagem por homologia, que mostrou ser uma técnica eficiente para estudos estruturais de proteínas. A estrutura terciária da lectina apresentou mesmo padrão conformacional de outras lectinas do gênero *Dioclea*. Os sítios de ligação a metais e de reconhecimento apresentaram a mesma composição e posicionamento de aminoácidos de outras lectinas do mesmo gênero, porém possuiu diferenças conformacionais em alguns resíduos, que devem ser avaliados por métodos que analisem a estrutura da proteína nativa. DlyL apresentou efeito relaxante em músculo liso de aortas endotelizadas de rato, apresentou também atividade inflamatória no modelo de edema de pata e efeito hipernociceptivo associado a dor inflamatória determinado por teste de Von Frey. Todas as respostas avaliadas mostraram a participação do óxido nítrico no efeito causado pela lectina, e no caso da atividade vasorelaxante, e esses sugerem a participação do sítio lectínico.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V. Patologia: bases patológicas das doenças. 8ªed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.
- ABBOTT, K.L.; PIERCE, J. M. Lectin-based glycoproteomic techniques for the enrichment and identification of potential biomarkers. **Methods Enzymol**, v. 76, p. 461-480, 2010.
- ABRANTES, V.E.F.; ROCHA, B.A.M.; NÓBREGA, R.B.; SILVA-FILHO, J.C.; TEIXEIRA, C.S.; CAVADA, B.S.; GADELHA, C.A.A.; FERREIRA, S.H.; FIGUEIREDO, J.G.; SANTI-GADELHA, T.; DELATORRE, P. Molecular Modeling of Lectin-Like Protein from *Acacia farnesiana* Reveals a Possible Anti-Inflammatory Mechanism in Carrageenan-Induced Inflammation. **BioMed Research International**, 2013.
- ADAMS, M.D.; CELNIKER, S.E.; HOLT, R.A.; EVANS, C.A.; GOCCAYNE, J.D.; AMANATIDES, P.G. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, v. 287(5461), p. 2185-95, 2000.
- ADEREM, A.; SMITH, K.D. A. Systems approach to dissecting immunity and Inflammation. **Semin. Immunol.**, v.16, p. 55-67, 2004.
- ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J**. v. 357, p. 593–615. 2001.
- ALESSI, D.; MACDOUGALL, L.K.; SOLA, M.M.; IKEBE, M.; COHEN, P. The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. **Eur J Biochem**. v. 210, p. 1023-1035.1992.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Med Hypotheses**, v. 68, p. 202-209, 2007.
- ALMEIDA, A. C.; SILVA, H. C.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; CAJAZEIRAS, J. B.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Purification and Partial Characterization of a New Mannose/Glucose-Specific Lectin from *Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth Seeds Exhibiting Low Toxicity on Artemia sp. **International Journal of Indigenous Medicinal Plants**, v. 47, p. 1567-1577, 2014.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, São Paulo, v. 1000, p. 40-56, 2004.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEM, T.L.; SCHARFFER, A.A.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ALVES, A.C.; VASCONCELOS, M.A.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; LOSSIO, C.F.; BRINGEL, P.H.S.F.; CASTRO, R.R.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; SOUZA, L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 588, p. 33-40, 2015.

ARAÚJO-FILHO, J.H.; VASCONCELOS, I.M.; MARTINS-MIRANDA, A.S.; GONDIM, D.M.; OLIVEIRA, J.T. A cona-like lectin from *Dioclea guianensis* benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, conm and cona. **J Agric Food Chem.** v. 58 (7), p. 4090-4096, 2010.

ASSREUY, A.M., FONTENELE, A.R., PIRES, A.F., FERNANDES, D.C., RODRIGUES N.V.F.C., BEZERRA, E.H.S., MOURA, T.R., DO NASCIMENTO, K.S., CAVADA, B.S. Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.**, v. 380, p. 509–521, 2009.

ASSREUY, A.M., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G.J., DE SOUZA, M.L., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.** v. 6(3), p. 201-10, 1997.

ATALAH, B.A.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E.J.M. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects, **Plant Science**, v. 221–222, p. 21-28, 2014.

BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A. Conformation, protein-carbohydrate interactions and novel subunit association in the refined peanut lectin-lactose complex. **J.Mol.Biol.** v. 259, p. 281-196. 1996.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; 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. Behavior, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the Diocleinae Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96 (5), p. 673-678, 2001.

BARI, A. Lectinas De Sementes De *Parkia Panurensis* E De *Parkia Biglobosa*: Estudos Físico-Químicos E Estruturais. 82 f. **Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais)** - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

BARROSO G.M.; PEIXOTO A.L.; COSTA C.G.; ICHASSO C.L.F.; GUIMARÃES E.F.; LIMA H.C. Sistemática das Angiospermas do Brasil. v.2. Viçosa, **Imprensa Universitária**. 1991.

BARROSO-NETO, I.L. Resolução da estrutura de uma lectina de sementes de *Canavalia grandiflora* Benth com efeitos sobre mecanismos inflamatórios. **Dissertação de Mestrado (Bioquímica)**, Universidade Federal do Ceará, 2010.

BARROSO-NETO, I.L.; DELATORRE, P.; TEIXEIRA, C.S.; CORREIA, J.L.A.; CAJAZEIRAS, J.B.; PEREIRA, R.I.; NASCIMENTO, K.S.; LARANJEIRA, E.P.P.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; ROCHA, B.A.M.; CAVADA, B.S. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of Dioclea lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 464-470, 2016.

BARROSO-NETO, I.L.; SIMÕES, R.C.; ROCHA, B.A.M.; BEZERRA, M.J.B.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; OSTERNE, V.J.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; PEREIRA, M.G.; PIRES, A.F.; SAMPAIO, A.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 543, p. 31-39, 2014.

BAUER, V.; SOTNÍKOVÁ, R. Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. **Gen. Physiol. Biophys.** v. 29(4), p. 319 -340, 2010.

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

BENETEAU, J.; RENARD, D.; MARCHÉ, L.; DOUVILLE, E.; LAVENANT, L.; RAHBÉ, Y.; DUPONT, D.; VILAINE, F.; DINANT, S. Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.** v. 153(3), p. 1345-61, 2010.

BENEVIDES, R. G.; GANNE, G.; SIMOES, R. C.; SCHUBERT, V.; NIEMIETZ, M.; UNVERZAGT, C.; CHAZALET, V.; BRETON, C.; VARROT, A.; CAVADA, B. S.; IMBERTY, A. A Lectin from *Platypodium elegans* with Unusual Specificity and Affinity for Asymmetric Complex N-Glycans, **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 26352-26364, 2012.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, Baltimore, v. 353, p. 1610–15, 1999.

BEZERRA, G.A.; VIERTLMAYR, R.; MOURA, T.R.; DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., NASCIMENTO, K. S.; FIGUEIREDO, J.G.; BEZERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; SIMÕES, R.C.; NAGANO, C.S.; ALENCAR, N.M.N.; GRUBER, K.; CAVADA, B. S. Structural Studies of an Anti-Inflammatory Lectin from *Canavalia boliviana* Seeds in Complex with Dimannosides. **Wlodawer A, ed. PLoS ONE**, v. 9(5), e97015, 2014.

BEZERRA, M.J.B; RODRIGUES, N.V.F.C.; PIRES, A.F.; BEZERRA, G.A.; NOBRE, C.B.; ALENCAR, K.L.L.; SOARES, P.M.G.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; MARTINS, J.L.; GRUBER, K.; SAMPAIO, A.H.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S; CAVADA, B.S. Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45(4), p. 807-815, 2013.

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

BITENCOURT, F.S.; FIGUEIREDO, J.G.; MOTA, M.R.L.; BEZERRA, C.C.R.; SILVESTRE, P.P.; VALE, M.R.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; NAGANO, C.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.L.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding

- agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 377(2), p. 139-148, 2008.
- BONNEIL, E.; YOUNG, N.M.; LIS, H.; SHARON, N.; THIBAUT, P. Probing genetic variation and glycoform distribution in lectins of the *Erythrina* genus by mass spectrometry. **Arch Biochem Biophys**, v. 426, p.241–9. 2004.
- BOUCKAERT, J.; DEWALLEF, Y.; POORTMANS, F.; WYNS, L.; LORIS, R. Structural dissection of the conformational pathways of de-and re-metallization of concanavalin A. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 19778-19787, 2000.
- BOUCKAERT, J.; LORIS, R.; POORTMANS, F.; WYNS, L. Crystallographic of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution. **Protein Struct. Funct. Genet.** v. 23, p. 510-524. 1995.
- BOWIE, J.U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science** v. 253(5016), p. 164-170, 1991.
- BOWLES, D.J.; MARCUS, S.E.; PAPPIN, D.J.C.; FINDLAY, J.B.C.; ELIOPOULOS, E.; MAYCOX, P.R.; BURGESS, J. Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. **Journal of Cell Biology**, v. 102, p. 1284-1297, 1986.
- BOWLES, D.J.; PAPPIN, D. J. Traffic and assembly of concanavalin A. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, p. 60-64, 1988.
- BRINDA, K.V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science**. v. 13, p. 1735-1749, 2006.
- C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**. v. 282(5396), p. 2012-8, 1998.
- 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**, v. 425, p. 286-292, 1998.
- CANTU, M.D.; CARRILHO, E.; WULFF, N.A.; PALMA, M.S. Sequenciamento De Peptídeos Usando Espectrometria De Massas: Um Guia Prático. **Quim Nova**, v. 31(3), p. 669-675. 2008.

CARNEIRO, P.S. Análise Da Expressão Diferencial Dos Genes Envolvidos Na Resposta Inflamatória Aguda E Crônica E Sua Influência Na Carcinogênese Química Cutânea Em Camundongos Geneticamente Seleccionados Para Alta Ou Baixa Reatividade Inflamatória Aguda. 166 f. **Tese de doutorado** - Imunologia - Universidade de São Paulo, 2009.

CARNEIRO, R.F.; MELO, A.A.; ALMEIDA, A.S.; MOURA, R.M.; CHAVES, R.P.; SOUSA, B.L.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, S.S.; LIMA, J.P.M.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. H-3, a new lectin from the marine sponge *Haliclona caerulea*: Purification and mass spectrometric characterization, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45(12), p. 2864-2873, 2013.

CARNEIRO, R.F.; TEIXEIRA, C.S.; MELO, A.A.; ALMEIDA, A.S.; CAVADA, B.S.; SOUSA, O.V.; ROCHA, B.A.M.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H. l-rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: Amino acid sequence and molecular modeling, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 180-188, 2015.

CARVALHO, M.H.C.; NIGRO, D.; LEMOS, V.S.; TOSTES, R.C.A.; FORTES, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rer Bras Hipertens**, v. 8(1), 2001.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectins matter in biological activity? Lessons from and potencial biotechnological uses of Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and peptide Science**. v. 2, p. 133-135, 2001.

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

CAVADA, B.S.; MORENO, F.B.B.; ROCHA, B.A.M.; AZEVEDO-JUNIOR, W.F.; CASTELLÓN, R.E.R.; GOERSCH, G.V.; NAGANO, C.S.; SOUZA, E.P.; NASCIMENTO, K.S.; RADIS-BAPTISTA, G.; DELATORRE, P.; LEROY, Y.; TOYAMA, M.H.; PINTO, V.P.T.; SAMPAIO, A.H.; BARETTINO, D.; DEBRAY, H.; CALVETE, J.; SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal**, v. 273, p. 3962–3974, 2006.

CHEN, X.J.; CARROLL, J.A.; BEAVIS, R.C. Near-UV-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. **J Am Soc Mass Spectrom.**, v. 9 (9), p. 885-91. 1998.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, H.C.; JARDIM, I.C.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**, v. 31(3), p. 623-636, 2008.

CHOI, S.H.; LYU, S.Y.; PARK, W.B. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. **Arch. Pharm. Res.**, v. 27, p. 68-76. 2004.

CHRISPEELS, M.J.; HARTL, P.M.; STURM, A.; FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261(22), p. 10021-10024, 1986.

COELHO, M.B. Estudo da atividade inseticida e pro-inflamatória da lectina isolada de sementes de *Annona coriacea* Mart. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

CORIOLOANO, M.C.; MELO, C.M.; SILVA F.O.; SCHIRATO, G.V.; PORTO, C.S.; SANTOS, P.J.; CORREIA, M.T.; PORTO, A.L.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.; COELHO, L.C. *Parkia pendula* seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 172(5), p. 2682-93, 2014.

CORREIA, J.L.A.; NASCIMENTO, A.S.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; GONDIM, A.C.S.; PEREIRA, R.I.; SOUSA, B.L.; SILVA, A.L.C.; GARCIA, W.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S; *et al.* Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules**, v. 16, p. 9077–9089, 2011.

COSTA, R.M.P.B.; VAZ, A.F.M.; OLIVA, M.L.V.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochem.** v. 45, p. 526- 533, 2010.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis & Rheumatism.** v. 36, p. 147–157, 1993.

DEANE, C.M.; BLUNDELL, T. Protein comparative modelling and drug discovery. In : Wermuth, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. London : **Elsevier Academic Press**, p. 445-458, 2003.

DELATORRE, P. Lectinas de leguminosas: novos enfoques estruturais para velhas moléculas. **Tese de Doutorado** apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 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.**, v. 62, p. 166–168, 2006.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SOUZA, E.P.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA, G.A.; MORENO, F.B.M.B.; FREITAS, B.T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO-JUNIOR, W.F.; CAVADA, B.S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct Biol.**, v. 7(52), 2007.

DELATORRE, P.; SILVA-FILHO, J.C.; ROCHA, B.A.M.; SANTI-GADELHA, T.; NÓBREGA, R.B.; GADELHA, C.A.A.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**, v. 95(9), p. 1697-1703, 2013.

DENNIS, J.W.; GRANOVSKY, M.; WARREN, C.E. Protein glycosylation in development and disease. **BioEssay**, v. 21, p. 412–421. 1999.

DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. **J. Cell. Biol.**, v. 120, p. 545-556, 1993.

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

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

- DRAY, A.; BESSON, M. J.; DICKENSON, A. Peripheral mediators of pain in: The pharmacology of pain. **Springer-Verlag**, Berlin, v. 130, p. 21-41, 1997.
- DREISEWERD, K. The Desorption Process in MALDI. **Chem Rev**, v. 103, p. 395. 2003.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J.; WANG, J.L. The covalent and threedimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 69(9), p. 2580-2594, 1972.
- EL-AASSAR, M.R.; HAFEZ, E.E.; EL-DEEB, N.M.; FOUUDA, M.M.G. Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 88-94, 2014.
- ELGAVISH, S.; SANAN, B. Lectin-Carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **TIBS**. v. 22, p. 462-467, 1997.
- ERAMIAN, D.; ESWAR, N.; SHEN, M.Y.; SALI, A. How well can the accuracy of comparative protein structure models be predicted? **Protein Sci** v. 17, p. 1881-1893, 2008.
- ESCHENBURG, S.; KRAUSPENHAAR, R.; MIKHAILOV, A.; STOEVA, S.; BETZEL, C.; VOELTER, W. Primary Structure and Molecular Modeling of Mistletoe Lectin I from *Viscum album*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247(2), p. 367-372, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. **Accuracy assessment. Genome Research** v. 8, p. 175-185, 1998.
- FAYE, L.; CHRISPPEELS, M.J. Transport and processing of the glycosylated precursor of concanavalin A in jack bean. **Planta**, v. 170, p. 217-224, 1987.
- FELDSTED, R.; EGORIN, M.; LEAVITT, R.; BAUCHUR, N. Recombination of subunits of *Phaseolus vulgaris* isolectins. **J Biol Chem**, v. 252, p. 2967-2971. 1977.
- FENG, J.; ITO, M.; NISHIKAWA, M.; OKINAKA, T.; ISAKA, N.; HARTSHORNE, D.J.; NAKANO, T. Dephosphorylation of distinct sites on the 20KDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. **FEBS**. v. 448, p. 101-104, 1999.

FENN, J.B. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: How It All Began. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 13(3), 2002.

FERREIRA, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs*, v. 46, p. 1, 1993.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; BESERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E.H.S.; MOTA, M.R.L.; ASSREUY, A.M.S.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380(5), p. 407-414, 2009.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; CUNHA, T.M.; LUZ, P.B.; NASCIMENTO, K.S.; MOTA, M.R.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; ALENCAR, N.M. Agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis* J. Agardh reduces inflammatory hypernociception: involvement of nitric oxide. **Pharmacol Biochem Behav.**, Fortaleza, v. 96(4), p. 371-7, 2010.

FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; MOTA, M.R.; SILVESTRE, P.P.; AGUIAR, C.N.; BENEVIDES, R.G.; NASCIMENTO, K.S. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, p. 736–744. 2009.

FIGUEIREDO, J.G.; DA SILVEIRA BITENCOURT, F.; BESERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E.H.; MOTA, M.R.; ASSREUY, A.M.; DE QUEIROZ CUNHA, F.; CAVADA, B.S.; DE ALENCAR, N.M. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 380(5), p. 407-14, 2009.

FLEISCHMANN, R.D.; ADAMS, M.D.; WHITE, O.; CLAYTON, R.A.; KIRKNESS, E.F.; KERLAVAGE, A.R.; BULT, C.J.; TOMB, J.F.; DOUGHERTY, B.A.; MERRICK, J.M.; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. **Science**, v. 269(5223), p. 496-512, 1995.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Activation of leukotriene production in granulocytes: effects on cell activation. **Immunol. Ser.**, v. 57, p. 87-106, 1992.

FUJIMOTO, Y.K.; GREEN, D.F. Carbohydrate recognition by the antiviral lectin cyanovirin-N. **Journal of the American Chemical Society**. v. 134(48), p. 19639-19651, 2012.

FUQUA, J. L.; HAMORSKY, K.; KHALSA, G.; MATOBA, N.; PALMER, K. E. Bulk production of the antiviral lectin griffithsin. **Plant Biotechnol Jounal**, v. 13, p. 1160–1168, 2015.

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

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res.Bull**, Budapest, v. 48, p. 129-141, 1999.

GABIUS, H.J. Animal lectins. **Eur. J. Biochem**. v. 243; p. 543–76, 1997.

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

GABOR, F.; BOGNER, E., WEISSENBOECK, A., WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** v. 56, p. 459-480, 2004.

GADELHA, C.A.; MORENO, F.B.; SANTI-GADELHA, T.; CAJAZEIRAS, J.B.; ROCHA, B.A.; ASSREUY, A.M.; LIMA MOTA, M.R.; PINTO, N.V.; PASSOS MEIRELES, A.V.; BORGES, J.C.; FREITAS, B.T.; CANDURI, F.; SOUZA, E.P.; DELATORRE, P.; CRIDDLE, D.N.; DE AZEVEDO, W.F.; CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J Struct Biol**, v. 152(3), p.185-94, 2005.

GALEGO DEL SOL, F.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J. The First Crystal Structure of a Mimosoideae Lectin Reveals a Novel Quaternary Arrangement of a Widespread Domain. **J Mol Biol**, v. 353, p. 574–583. 2005

GARTHWAITE, J.; SOUTHAM, E.; BOULTON, C. L.; NIELSEN, E. B.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol**. v. 48, p. 184–188, 1995.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In: Walker JM editor. **The Proteomics Protocols Handbook Totowa: Humana Press**, p. 571-607, 2009.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev.**, v. 3, p. 104-416, 2004.

GLICK, G. D.; TOOGOOD, P. L.; WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J.; KNOWLES, J. R. Ligand recognition by Influenza virus. The binding of bivalents sialosides. **The J. Biochem. Chem.**, v. 266(35), p. 23660-23669, 1991.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**. v. 274(5287), p. 563-7, 1996.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M., OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, 1980.

GRAHAMSTOWN, M; VAN STADEN, J. Lectin-like proteins from South African plant species used in traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 68(1), p. 36-40, 2002.

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. **In preparation**, 2004.

GUZMÁN-PARTIDA, A.M.; ROBLES-BURGUEÑO, M.R.; ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, I. Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins, **Biochimie**, v. 86(4–5), 2004

HAMELRYCK, T.W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Properties and structure of the legume lectin family. **Trends Glycosc Glyc**, v. 10, p. 349-404. 1998.

- HANKINS, C.N.; KINDINGER, J.I.; SHANNON, J.M. The lectins of *Sophora japonica*. II. Purification, properties, and N-terminal amino acid sequences of five lectins from bark **Plant Physiol.**, v. 86, p. 67–70, 1988.
- HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, v. 11, p. 4910-4919, 1972.
- HERMAN, E.M.; SHANNON, L.M.; CHRISPPEELS, M.J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, v. 165, p. 23-29, 1985.
- HILLENKAMP, F.; KARAS, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical chemistry**, v. 63(24), p. 1193 - 1293, 1991.
- HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. Mass spectrometry: principles and applications. **Wiley-Interscience**, v. 502, 2007.
- HOGAN, M.; O'MALLEY, K. D.; HEALY, J.; O'BRIEN, S.; BUND, J. S.; Implication for repetitive application of acetylcholine in the determination of the mechanisms of endothelium-dependent relaxation. **Vasc. Pharmacol.** v. 43, p. 227–233, 2005.
- HOLANDA, F.R.; COELHO-DE-SOUSA, A.N.; ASSREUY, A.M.; LEAL-CARDOSO, J.H., PIRES, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, C.S.; CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F. Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein Pept Lett.** v. 16(9), p. 1088-92, 2009.
- HÖLTJE, H.D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. In: Molecular Modeling: Basic Principles and Applications. **Weinheim: Wiley-VCH**, p. 87-143, 2003.
- IMBERTY, A., WIMMEROVA, M., MITCHELL, E.P., GILBOA-GARBER, N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan recognition. **Microbes Infect.** v. 6, p. 222-229, 2004.
- JACQUES, A.V.; RIEGER, D.K.; MAESTRI, M.; LOPES, M.W.; PERES, T.V.; GONÇALVES, F.M.; PEDRO, D.Z.; TASCA, C.I.; LÓPEZ, M.G.; EGEA, J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; LEAL, R.B. Lectin from *Canavalia brasiliensis*

(ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 836-842, 2013.

JIANG S.Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectins superfamily in higher plants. **BMC Evol Biol**, v. 79. 2010.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, San Francisco, v. 413, p. 203-210, 2001.

KANADE, S.R.; RAO, D.H.; HEGDE, R.N.; GOWDA, L.R. The unique enzymatic function of field bean (*Dolichos lablab*) D-galactose specific lectin: a polyphenol oxidase. **Glycoconjugate Journal**, v. 26(5), p. 535-545, 2009.

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

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**. v. 56, p. 53-58, 2001.

KEITEL, T.; SIMON, O.; BORRIS, R.; HAINEMANN, U. Synthesis of 4-methylumbelliferyl- β -d-glucan oligosaccharides as specific chromophoric substrates of (1-3), (1-4)- β -d-glucan 4-glucanohydrolases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90 p. 5287-5291, 1993.

KESHERWANI, V; SODHI, A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin concanavalin A phytohemagglutinin and wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 16, p. 294–305, 2007.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1572(2–3), p. 187-197, 2002.

KLAFKE, G.B.; MOREIRA, G.M.S.G.; MONTE, L.G.; PEREIRA, J.L.; BRANDOLT, T.M.; XAVIER, M.O.; SANTI-GADELHA, T.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L.D. Assessment of Plant Lectin Antifungal Potential Against Yeasts of Major Importance in Medical Mycology. **Mycopathologia**, v. 175, p. 147-151, 2013.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13(1), p.1-12., 2008.

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

KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. A note on the recent discussion on the definition of the term “lectin”. Lectins–Biology, Biochemistry, **Clinical Biochemistry**. v. 3, p. 3–6, 1983.

KOLBERG, J. Isolation and partial characterization of a mitogenic lectin from *Lathyrus odoratus* seeds. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C**, v. 86, p. 99–104, 1978.

KULLOLLI, M.; HANCOCK, W. S.; HINCAPIE, M. Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. **J. Sep. Science**, v. 31, p. 2733–2739, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran. Patologia – bases patológicas das doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 43-78, 2010.

LACKEY, J.A.; POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. TRIBE 19. PHASEOLEAE DC **Advances in Legume Systematics**. v. 1, p. 301–327, 1981.

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

LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 9, p. 674-682, 1997.

LANDER, E.S.; LINTON, L.M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M.C.; BALDWIN, J. et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409(6822), p. 860-921, 2001.

LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKE, H. Beobachtungen über Aamolyse und Aamagglutination. **Zbl.Bakt.I.Abt.Orig.**, v. 45, p. 600–607, 1907.

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-

induced rat paw edema by crotafotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2.

British Journal of Pharmacology, Londres, v. 114, p. 578-583, 1995.

LANOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front.*

Plant. Sci., v. 5, p. 1-16, 2014.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: WALL PD, MELZACK R, editor, **Textbook of pain**. 4 ed, Londres: Churchill Livingstone, p. 59-84, 1999.

LEWIS G.P.; SCHRIRE B.; MACKINDER B.; LOCK M. Legumes of the world. **Royal Botanical Gardens**, Kew. 2005.

LIU, B; LI, C.Y.; BIAN, H.J.; MIN, M.W.; CHEN, L.F.; BAO, J.K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Arch Biochem Biophys**. v. 482(1-2), p. 1-6. 2009.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Bioch Bioph Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Bioch Bioph 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, 1227. 2004.

LUSHER, T.F.; BARTON, M. Biology of the endothelium. **Clin Cardiol**. V. 20, p. 310, 1997.

MACEDO, M.L.R.; OLIVEIRA, C.F.R.; OLIVEIRA, C.T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v. 20, p. 2014-2033, 2015.

MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation. I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **J. Biophys. Biochem. Cytol**. v. 11, p. 571- 605, 1961.

- MAKHLOF, A.; FUJIMOTO, S.; TOZUKA, Y.; TAKEUCHI, H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of WGA-carbopol modified liposomes as carriers for oral peptide delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77(2), p. 216-24. 2010.
- MANN, K.; FARIAS, C.M.S.A.; GALLEGO DEL SOL, F.; SANTOS C.F.; GRANGEIRO T.B.; NAGANO C.S.; CAVADA B.S.; CALVETE J.J. The amino-acid sequence of the glucose/ mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin related domains. **Eur J Biochem**, v. 218, p. 4414–4422. 2001.
- MAXAM, A.M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 74(2), p. 560-4, 1977.
- MCWILLIAM, H.; LI, W.; ULUDAG, M.; SQUIZZATO, S.; PARK, Y.M.; BUSO, N.; COWLEY, A.P.; LOPEZ, R. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res.**, p. 597-600, 2013.
- MELZACK, R.; LOESER, J. D. Pain: an overview. **Pain**, Seattle, v. 353, p. 1607-1609, 1999.
- MEYER, A.; RYPNIEWSKI, W.; SZYMAŃSKI, M.; Voelter, W.; BARCISZEWSKI, J.; BETZEL, C. Structure of mistletoe lectin I from *Viscum album* in complex with the phytohormone zeatin, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1784(11), p. 1590-1595, 2008.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MITOMA, J.X.; BAO, B.; PETRYANIK, P.; SCHAERLI, J.; GAUGUET, S.; YU, H.; KAWASHIMA, H.; SAITO, K.; OHTSUBO, J.D.; MARTH, K.; KHOO, U.H.; VON ANDRIAN, J.B.; LOWE, M.F. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. **Nat. Immunol.** v. 8, p. 409-418, 2007.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.** v. 329, p. 2002–2012, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.** v. 43, p. 109-142. 1991.

MORAES, M.C.B.; LAGO, C.L. Espectrometria de Massas com ionização por “Electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**, v. 26(4), p. 556-563, 2003.

MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

MORENO, F.B.M.B.; OLIVEIRA, T.M.; MARTIL, D.E.; VIÇOTI, M.M.; BEZERRA, A.; ABREGO, J.R.B.; CAVADA, B.S.; AZEVEDO-JR; W.F. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology**. v. 161, p. 133–143, 2008.

MOTA, M.R.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.; SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.A.; OLIVEIRA, C.C.; BENEVIDES, R.G.; CAVADA, B.S.; ASSUREUY, A.M.S. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 374, p. 1–10, 2006.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Lab. Invest.** v. 82, p. 521-533, 2002.

NAGANO, C.S.; CALVETE, J.J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B.S.; SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependence dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochem. J.** v. 409, p. 417-28. 2008.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.; MOTA, M.L.; BITTENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R.B.; 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(6), p. 824-835, 2007.

NASCIMENTO, A.S.F.; GONDIM, A.C.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.A.; PIRES, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; SILVA, A.L.C.; NAGANO, C.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **J. Mol. Recognit.**, v. 25, p. 1099–1352, 2012.

NASCIMENTO-NETO, L.G.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, S.R.; SILVA, B.R.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; SILVA-JUNIOR, V.A.; PORTO, A.L.F.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H.; TEIXEIRA, E.H.; NAGANO, C.S. Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. *Mar. Drugs*, v. 10, p. 1936-1954, 2012.

NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; JUNIOR, S.K. A comparative study of available software for high accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Science*, v.15, p. 808-824, 2006.

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.; SOUSA, B.W.; ROCHA, M.L.; CORREIA, M.V.; SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. *Braz J Med Biol Res.*, Juazeiro do Norte, v. 40, p. 127-34, 2007.

NÓBREGA, R.B.; ROCHA, B.A.M.; GADELHA, C.A.A.; SANTI-GADELHA, T.; PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; DELATORRE, P. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. *Biochimie*. v. 94, p. 900–906, 2012.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F.M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends in Immunology*, v. 26(3), p. 157-165, 2005.

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*, v. 379(6), p. 609-616, 2009.

OAKLANDER, A.L. Chronic pain. *ACP Medicine*. p. 1-19, 2011.

OHIZUMI, Y.; GAIDAMASHVILI, M.; OHWADA, S.; MATSUDA, K.; KOMINAMI, J.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Agric Food Chem*. v. 57(7), p. 2896-902, 2009.

OHTSUBO, K.; JAMEY, D.M. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. **Cell**, v. 126(5), p. 855-867, 2006.

OSTERNE, V.J.S. Aspectos estruturais do reconhecimento de carboidratos por uma lectina manose-específica de sementes de *Dolichos lablab* com atividade pró-inflamatória e hipernociceptiva. **Monografia**, Universidade Federal do Ceará, 2013.

OSTERNE, V.J.S.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.A.; LEITÃO, C.C.F.; CARNEIRO, R.F.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; VASCONCELOS, M.A.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.; BRINGEL, P.H.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 172, p. 3342–3353, 2014.

PEREIRA JÚNIOR, F. N. Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* Hook F. 103 f. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

PEREIRA, C.A.; CORREA, A.D.; SANTOS, C.D.; ABREU, C.M.P.; SOUSA, R.V.; MAGALHAES, M.M. Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação parcial e toxicidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32(3), p. 900-907, 2008.

PEREIRA-JUNIOR, F.N.; SILVA, H.C.; FREITAS, B.T.; ROCHA, B.A.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; LEAL, R.B.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **J. Mol. Recognit.** v. 25(8), p. 443–449, 2012.

PETERSEN, T.N.; BRUNAK, S.; HEIJNE G.V.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J., BARRE, A., ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 491, p. 27-54, 2001.

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

PINHO, S.S.; REIS, C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, p. 540–555, 2015.

PINTO, N.V.; SANTOS, C.F.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PIRES A.F.; ASSREUY, A.M. Homologous Canavalia lectins elicit different patterns of antinociceptive responses. **Nat Prod Commun.** v. 8(11), p. 1621-4, 2013.

PINTO-JUNIOR, V.R. Purificação, caracterização parcial e imobilização de uma lectina extraída de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. **Monografia**, Universidade Federal do Ceará, 2013.

PINTO-JÚNIOR, V.R.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; CAJAZEIRAS, J.B.; VASCONCELOS, M.A.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, A.S.F.; MIGUEL, T.B.A.R.; MIGUEL, E.C.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, v. 18, p. 10857–10869, 2013.

PINTO-JUNIOR, V.R.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA, R.I.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.S.; MADEIRA, J.C.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity, **Journal of Molecular Recognition**, v. 29(2), 2016.

PIRES, A.F. Lectinas isoladas de sementes de Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae): modelo para estudos de relações estrutura/função de proteínas. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual do Ceará, 2011.

PRAKASHKUMAR R.; PUSHPANGADAN P.; VIJAYA KUMAR T. Search for lectins in seeds of tropical trees of Kerela. **India Biologia Plantarum**, v. 40, p. 155-58. 1998.

QADIR, S.; WANI, I.H.; RAFIQ, S.; GANIE, S.A.; MASOOD, A.; HAMID, R. Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 999-1006, 2013.

RAIKHEL, N. V.; LEE, H.-I.; BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 44, p. 591–615, 1993.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, Quebec, v. 12, p. 195-204, 2002.

RAMOS, M.V.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J.; GRANGEIRO, T.B.; DEBRAY, H. Characterization of the sugar-binding specificity of the toxic lectin isolated from *Abrus pulchellus* seeds. **Glycoconj J.** v. 18(5), p. 391–400, 2001.

RANGEL, T.B.; ROCHA, B.A.; BEZERRA, G.A.; ASSREUY, A.M.; PIRES, A.D.; DO NASCIMENTO, A.S.; BEZERRA, M.J. Crystal structure of a pro inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl. **Biochimie**, v. 94, p. 525–532. 2012.

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

RIEGER, D.K.; COSTA, A.P.; BUDNI, J.; MORETTI, M.; BARBOSA, S.G.R.; NASCIMENTO, KYRIA S.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.S.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 122, p. 53-60, 2014.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucl. Acids Res.** v. 42, p. 320-324, 2014.

ROCHA, B.A., DELATORRE, P., OLIVEIRA, T.M., BENEVIDES, R.G., PIRES, A.F., SOUSA, A.A., SOUZA, L.A., ASSREUY, A.M., DEBRAY, H., DE AZEVEDO, W.F., SAMPAIO, A.H., CAVADA, B.S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**. v. 93(5), p. 806-16, 2011.

ROCHA, B.A.M.; BARROSO-NETO, I.L.; TEIXEIRA, C.S.; SANTIAGO, M.Q.; PIRES, A.F.; SOUZA, L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; DELATORRE, P.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. CRLI induces vascular smooth muscle relaxation and

suggests a dual mechanism of eNOS activation by legume lectins via muscarinic receptors and shear stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 565, p. 32-39, 2015.

RODRIGUES, J. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREF, R. Novel core (polyester) shell(polysaccharide) nanoparticles: protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release** v. 92, p. 103-112, 2003.

ROSSITER, H.; ALON, R.; KUPPER, T.S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Mol Med Today**. v. 3(5), p. 214-22, 1997.

ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A.; CAVADA, B. S. Single- and two-chain legume lectins as phylogenetic markers of speciation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 15(3), p. 341-348, 1987.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. Lectinologie: Geschichte, konzepte und pharmazeutische bedeutung. **Deutsche Apotheker Zeitung.**, v. 133(26), p. 15-36. 1993.

SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L.; SEIBERT, K.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90(15), p. 7240-7244, 1993.

SAMPIETRO, A.R.; ISLÃ, M.I.; QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, v. 160, p. 659-667, 2001.

SANGER, F.; COULSON, A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94(3), p. 441-8, 1975.

SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, C.A.; HUTCHISON, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v. 265(5596), p. 687-95, 1997.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiol Rev**. v. 89(2), p. 707-58, 2009.

SANTIAGO, M.Q. Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina extraída de sementes de *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Monografia**, Universidade Federal do Ceará, 2013.

SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.F.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; LOSSIO, C.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, H.C.; ARRUDA, F.V.S.; PEREIRA, L.P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **J. Mol. Recognit.** v. 27, p. 117–123, 2014.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.A.; ARAGÃO, K.S., OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; PIRES AF.; TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; ALENCAR, N.M.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 350(4), p. 1050-5, 2006.

SANTOS, A.F.; CAVADA, B.S.; ROCHA, B.A.; NASCIMENTO, K.S.; SANT'ANA, A.E. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresour Technol**, v. 101(2), p. 794-8. 2010.

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** v. 405, p. 114-118. 1997.

SARKAR, M.; WU, A. M.; KABAT, E. A. Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 209, p. 204–218, 1981.

SASTRY, M. V. K.; BANERJEE, P.; PATANJALI, S. R.; SWAMY, M. J.; SWARNALATHA, G. V.; SUROLIA, A. Analysis of the saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (b-D-Gal(1,3)DGalNAc). **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 11726–11733, 1986.

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacol. Rev.**, Nova Scotia v. 55(1), p. 1-20, 2003.

SHANNON, L.M., HANKINS, C.N., STROSBURG, A.D. Enzymatic phytohemagglutinins: Their relation to 'classic' legume phytohemagglutinins. **Lectins—Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. v. 1, p. 81–91, 1981.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J.Mol.Biol.** v. 267, p. 433-445, 1997.

SHARON, N. Lectins-carbohydrates complexes of plants and animals. Na atomic. **Trends Biochem Science**, v. 18, p. 221-6. 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, Jan., p. 74-80. 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Glycoproteins: structure and function. In: GABIUS, H-J.; GABIUS, S. (Eds.) Glycosciences: status and perspectives. **Weinheim: Chapman & Hall**, p. 133-162, 1997.

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

SHARON, N.; LIS, H. How proteins bind carbohydrates: lessons from legume lectins. **J Agric Food Chem.**, v. 23(22), p. 6586-91, 2002.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins, Chapman and Hall**. London. 126 p, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. The **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**. v. 18, p. 385-405, 2004.

SCHUSTER, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**. v. 5(1), p. 16-8, 2008.

SILVA, C.T.L. Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet). **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SILVA, H.C.; BARI, A.U.; ROCHA, B.A.; NASCIMENTO, K.S.; PONTE, E.L.; PIRES, A.F.; DELATORRE, P.; TEIXEIRA, E.H.; DEBRAY, H.; ASSREUY, A.M.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **J Mol Recognit.** v. 26(10), p. 470-8, 2013.

SILVA, H.C.; NAGANO, C.S.; SOUZA L.A.G.; NASCIMENTO, K.S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SAMPAIO, A.H.; ASSREUY, A.M.S.; PIRES, A.F.; DAMASCENO, L.E.A.; MARQUES-DOMINGOS, G.F.O.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, v. 47(12), p. 2347-2355, 2012.

SILVA, M.T.L. Caracterização físico-química e sequência parcial de uma lectina de *Canavalia bonariensis* Lindl. **Monografia**, Universidade Federal do Ceará, 2013.

SILVA, R.B.L. Endotélio: Um novo alvo terapêutico no tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista Médica Hospital Ana Costa**. 2006.

SILVA, V.B.; SILVA, C.H.T.P. Modelagem molecular de proteínas-alvo por homologia estrutural. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, p. 15-26, 2007.

SIMÕES, R.C. Caracterização de lectinas de leguminosas por Espectrometria de Massa. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Ceará, 2011.

SINGH, H.; SARATHI, S.P. Insight of Lectins- A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 3, 2012.

SINGH, S.S.; DEVI, S.K.; NG, T.B. Banana Lectin: A Brief Review. **Molecules**, v. 19, p. 18817-18827, 2014.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 17, p. 498–505. 2007.

SOUSA, B.L.; SILVA-FILHO, J.C.; KUMAR, P.; PEREIRA, R.I.; ŁYSKOWSKI, A.; ROCHA, B.A.M.; DELATORRE, P.; BEZERRA, G.A.; NAGANO, C.S.; GRUBER, K.; CAVADA, B.S. High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea*

macrocarpa and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins, **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 59, p. 103-110, 2015.

SOUZA, J.D.; SILVA, M.B.R.; ARGOLO, A.C.C.; NAPOLEÃO, T.H.; SÁ, R.A.; CORREIA, M.T.S.; PAIVA, P.M.G.; SILVA, M.D.C.; COELHO, L.C.B.B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65(5), p. 696-702, 2011.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 57, p. 827-872, 1995.

STUMP, M.J.; FLEMING, R.C.; GONG, W.H.; JABER, A.J.; JONES, J.J.; SURBER, C.W.; WILKINS, C.L. Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews** v. 37, p. 275–303, 2002.

SWANSON, M.D.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I.J.; MARKOVITZ, D.M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **J Biol Chem** v. 285, p. 8646–8655, 2010.

TAKASE, H., WATANABE, A., YOSHIKAWA, Y. KITAMI, M., SATO, R. Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 33, p. 789–800, 2009.

TEIXEIRA, C.S.; ASSREUY, A.M.S.; OSTERNE, V.J.S.; AMORIM, R.M.F.; BRIZENO, L.A.C.; DEBRAY, H.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; SAMPAIO, A.H.; ROCHA, B.A.M.; CAVADA, B.S. Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice, **Process Biochemistry**, v. 49(3), p. 529-534, 2014.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M.H.; CARNEIRO, V.A.; DE OLIVEIRA, T.M.; CUNHA, R.M.; HAVT, A.; MARTINS, J.L.; PINTO, V.P.; GONÇALVES, R.B.; CAVADA, B.S. *In vitro* inhibition of *Streptococci* binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **J Appl Microbiol.**, v. 101, p. 111-116, 2006.

VAN DAMME, E.J.; BARRE, A.; SMEETS, K.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W.J. The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDNA clones. **Plant Physiology**, v. 07(3), p. 833-843, 1995.

VAN DAMME, E.J.M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Cr Rev Plant Sci**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Hevein: An antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-264, 1991.

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

VANEGAS, H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. **Neuros. Letters.**, Caracas, v. 361, p. 225-228, 2004.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H.G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46(3), p. 295-309, 2004.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, Caracas, v. 46(3), p. 295-309. 2004.

VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. **Med Sci Monit**, v. 7, p. 1075-85. 2001.

VARELA, E.S.; LIMA, J.P.; GALDINO, A.S.; PINTO, L.D.A.S.; BEZERRA, W.M.; NUNES, E.P.; ALVES, M.A.; GRANGEIRO, T.B. Relationships in subtribe Diocleinae (*Leguminosae; Papilionoideae*) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65(1), p. 59-69. 2004.

- VARELA, P.F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMAO, M.J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminalplasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **J. Mol. Biol.** v. 274, p. 635-649, 1997.
- VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44(4), p. 385-403, 2004.
- VASCONCELOS, M.A.; ALVES, A.C.; CARNEIRO, R.F.; DIAS, A.H.S.; MARTINS, F.W.V.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.
- VASCONCELOS, M.A.; CUNHA, C.O.; ARRUDA, F.V.S.; CARNEIRO, V.A.; BASTOS, R.M.; MERCANTE, F.M.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; SANTOS, R.P.; TEIXEIRA, E.H. Effect of Leguminous Lectins on the Growth of *Rhizobium tropici* CIAT899. **Molecules**, v. 18, p. 5792-5803, 2013.
- VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. **Scand. J. Immunol.** v. 59, p. 25-33, 2004.
- VIEIRA, P.N.; SANTOS, C.F.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PIRES, A.F., *et al.* Homologous *Canavalia* lectins elicit different patterns of antinociceptive responses. **Natural product communications** v. 8(11), p.1621-4, 2013.
- VIJAVAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current opinion in structural biology.** v. 9, p. 707-714, 1999.
- WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol Rev**, v.52(3), p. 349-374, 2000.
- 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 *Dioclea guianensis* Seed Lectin. A Novel Manganese Binding Site and Structural Basis of Dimer-tetramer Association. **J.Mol.Biol.** v. 310, p. 885-894, 2001.

WALJUNO, K.; SCHOLMA, R.A.; BIENTEM, J.; MARIONO, A.; HAHN, A. M. Amino acid sequence of heveine. **Proc. Int. Rubber Conf.**, v. 2, p. 518-531, 1975.

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

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. **News Physiol Sci**, v. 15,(3), p. 107-113, 2000.

WATKINS, W.M.; MORGAN, W.T. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169(4307), p. 825-6, 1952.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. **Current Protocols in Bioinformatics, John Wiley & Sons, Inc.**, p. 5.6.1-5.6.32, 2014.

WEIS, W.I., DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, 65, 441-473, 1996.

WRIGHT, C. S.; HESTER, G. The 2.0 Å structure of a cross-linked complex between snowdrop lectin and a branched mannopentaose: evidence for two unique binding models. **Structure** v. 4, p. 1339-1352, 1996.

XU, X.; ZHANG, Z.; CHEN, Y.; YUAN, M.; YUAN, S.; BAO, J.K.. Antiviral and antitumor activities of the lectin extracted from *Aspidistra elatior*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 70(1-2), p. 7-13, 2016.

YAN, Q.; ZHU, L.; KUMAR, N.; JIANG, Z.; HUANG, L. Characterization of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, v. 122(3), p. 589-595, 2010.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C.C.W.; NG, T.B. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, p. 3791-3810, 2015.

YOUNG, N.M.; WATSON, D.C.; THIBAUT, P. Mass spectrometric analysis of genetic and post-translational heterogeneity in the lectins jacalin and *Maclura pomifera* agglutinin. **Glycoconj J**, v. 12, p. 135-141. 1995.

ZANETTI, G.D. Lectina dos rizomas de *Arundo donax* L.: purificação, caracterização, propriedades, imuno-histoquímica e separação das isoformas. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

ZENG, Z.; HINCAPIE, M.; PITTERI, S.J.; HANASH, S.; SCHALKWIJK, J.; HOGAN, J.M.; WANG, H.; HANCOCK, W.S. A Proteomics Platform Combining Depletion, Multi-lectin Affinity Chromatography (M-LAC) and Isoelectric Focusing to Study the Breast Cancer Proteome. **Analytical chemistry**. v. 83(12), p. 4845-4854, 2011.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 429(1-3). p. 23-37, 2001.