



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

CLÁUDIA FIGUEIRÊDO LÓSSIO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA LACTOSE-
ESPECÍFICA COM AÇÃO PRO-INFLAMATÓRIA
DE SEMENTES DE *Dioclea reflexa***

FORTALEZA

2016

CLÁUDIA FIGUEIRÊDO LÓSSIO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA LACTOSE-
ESPECÍFICA COM AÇÃO PRO-INFLAMATÓRIA
DE SEMENTES DE *Dioclea reflexa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento.

Co-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)

L889p Lóssio, Cláudia Figueirêdo.
Purificação e caracterização parcial de uma lectina lactose-específica com ação pro-inflamatória de sementes de *Dioclea reflexa* / Cláudia Figueirêdo Lóssio. – 2016.
58 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: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

1. Lectina. 2. Lactose. 3. Inflamação. I. Título.

CDD 660.6

CLÁUDIA FIGUEIRÊDO LÓSSIO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE UMA LECTINA LACTOSE-
ESPECÍFICA COM AÇÃO PRO-INFLAMATÓRIA
DE SEMENTES DE *Dioclea reflexa*

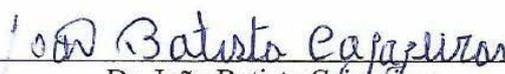
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 17/02/2016 .

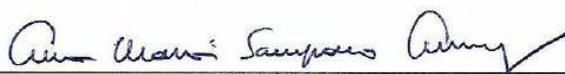
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dr. João Batista Cajazeiras
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico esse trabalho à minha família por todo o suporte e incentivo que sempre me foi dado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e saúde.

A minha família, pelo apoio, suporte, incentivo e amor.

A Prof^a. Dr^a. Kyria Santiago do Nascimento, pela orientação desde a iniciação científica, por todo o aprendizado que me proporcionou, pelos conselhos e pela paciência meu muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada, pela atenção que tem com todos os alunos sob sua orientação, pelo conhecimento que passa, pelo apoio e palavras de suporte que sempre me incentivaram a melhorar.

A prof^a Dr^a. Ana Maria Sampaio Assreuy, pela colaboração neste trabalho e aprendizado que me proporcionou com isso.

Ao Dr. João Batista Cajazeiras por aceitar fazer parte da banca e por estar sempre disponível a ajudar e tirar dúvidas.

Aos demais professores, bolsistas de pós-doc, técnicos e colaboradores do Biomol-Lab pelo conhecimento e experiência que me passaram.

A todos os meus colegas de laboratório da proteômica, biologia molecular e química de proteínas, pela ajuda indispensável, companhia, esclarecimento de dúvidas e colaboração sem os quais esse trabalho não teria sido desenvolvido, em especial aos colegas Ronniery, Jorge, Mayara Queiroz, Vanir, Vinicius, Clareane, Gleiciane, Cleane, Mayara Torquato, André, Ivanice, Simoni, Larissa e Cecília.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante essa valiosa etapa.

A Universidade Federal do Ceará, aos administradores e servidores dessa instituição.

A agência FUNCAP pelo fomento da pesquisa no que concerne a sua infraestrutura e desenvolvimento.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho e conclusão do meu mestrado.

“If you can’t fly, then run, if you can’t run, then walk, if you can’t walk, then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Lectinas com afinidade de ligação a lactose isoladas de sementes de espécies vegetais filogeneticamente próximas da sub-tribo Diocleinae apresentam diferentes características quando comparadas à outras lectinas extensivamente estudadas com afinidade de ligação a glicose-manose. Nesse estudo, uma nova lectina específica a lactose extraída a partir de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL II) foi isolada por dois passos cromatográficos em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lactose. A SDS-PAGE revelou uma lectina como uma banda única em torno de 29 kDa, diferindo do perfil já conhecido de lectinas ConA-like específicas a glicose/manose. A sequência parcial da lectina foi obtida por espectrometria de massa com fonte ionizadora eletrospray cobrindo cerca de 30% da sequência total da proteína. DrfL II apresentou especificidade à α -lactose e alta estabilidade a um vasto intervalo de pH. DrfL II mostrou ausência de toxicidade contra *Artemia nauplii* e induziu inflamação aguda (edema de pata e hipernocicepção) em camundongos com a participação do domínio da lectina e óxido nítrico. Visto que poucas informações têm sido publicadas a respeito de lectinas lactose específicas de Diocleinae, se faz necessário, portanto, que o estudo seja continuado visando a determinação completa da estrutura primária e tridimensional da lectina, para comparação com os dados existentes de lectinas ConA-like e lactose específicas.

Palavras-chave: Lectina. *Dioclea reflexa*. Inflamação

ABSTRACT

Lectins with lactose binding specificity isolated from seeds of phylogenetically close plant species of Diocleinae sub-tribe present different characteristics when compared to the extensively studied mannose/glucose-specific lectins. In this study, a new lactose-specific lectin from *Dioclea reflexa* seeds (DrfL II) was isolated by a two-step chromatography in Sephadex® G-50 and lactose-Sepharose columns. The SDS-PAGE showed that the pure lectin is composed of a single band, slightly lower than 30 kDa, presenting a different profile from ConA-like mannose/glucose specific lectins. Partial sequence of the protein was obtained by electrospray ionization mass spectrometry covering 30% of the total sequence. DrfL II presented sugar specificity to α -lactose, and high stability at wide range of pH. DrfL II showed no toxicity against *Artemia nauplii* and induced acute inflammation (paw edema and hypernociception) in mice with the participation of the lectin domain and nitric oxide. Thus, it is important to further determine the complete sequence and tridimensional structure of this new type of lactose-binding lectin in order to be able to compare it with mannose/glucose lectins and their biotechnological applications.

Keywords: Lectin. *Dioclea reflexa*. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Permutação circular durante a biossíntese de ConA.....	21
Figura 2 – Classificação das lectinas.....	22
Figura 3 – Perfil cromatográfico da DrfL II em coluna de afinidade de Sepharose- lactose.....	39
Figura 4 – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.....	41
Figura 5 – Peptídeos de DrfL II.....	43
Figura 6 – Características físico-químicas da DrfL II.....	43
Figura7 – Efeito inflamatório da DrfL II.....	46
Figura8 – Efeito hipernociceptivo da DrfL II.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Inibição da atividade hemaglutinante da DrfL II por carboidratos.....	38
Tabela 2 – Purificação da lectina lactose específica de sementes de <i>D. reflexa</i>	40
Tabela 3 – Sequência dos peptídeos de DrfL II.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A280	Absorbância lida a 280 nm
AUC	Área sob a curva
BSA	Albumina Sérica Bovina
CABO	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEL II	Lectina II de <i>Canavalia ensiformis</i>
CHAPS	3-Dimetil-3-trihidroxidimetiltetraciclo
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CMI	Concentração mínima inibitória
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CRL II	Lectina II de <i>Cymbosema roseum</i>
DDA	Aquisição direta de dados
DGL	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>
DGL II	Lectina II de <i>Dioclea grandiflora</i>
DLL II	Lectina II de <i>Dioclea lehmani</i>
DrfL I	Lectina I de <i>Dioclea reflexa</i>
DrfL II	Lectina II de <i>Dioclea reflexa</i>
DTT	Ditiotreitol
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GFP	Fibrinopeptídeo B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
i.v.	Injeção intravenosa
IAA	Iodoacetamida
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
kDa	kiloDalton
kV	Quilovolt
L-NAME	nitro-L-arginina metil éster
m/z	Relação massa carga

MALDI	Ionização por dessorção a laser assistida por matriz
MnCl ₂	Cloreto de Magnésio
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em <i>tandem</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
NF-κβ	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
P1	Primeiro pico da cromatografia
P2	Segundo pico da cromatografia
PDB	Banco do Dados de Proteínas
PMF	Impressão Digital de Peptídeos
proConA	Prolectina glicosilada de <i>C. ensiformis</i>
s.c.	Injeção subcutânea
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N-tetrametiletlenodiamina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U.H.	Unidade de hemaglutinação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Definição de lectinas	16
2.2	Fonte de lectinas	18
2.2.1	<i>Lectinas de leguminosas</i>	18
2.2.2	<i>Lectinas de Diocleinae</i>	19
2.3	Classificação das lectinas	21
2.4	Determinação da estrutura primária por espectrometria de massas	23
2.5	Efeitos de lectinas na inflamação	25
2.6	Aplicações biotecnológicas de lectinas	26
3	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo Geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Reagentes	30
4.2	Materiais biológicos	30
4.2.1	<i>Eritrócitos</i>	30
4.3.2	<i>Animais</i>	31
4.2.3.1	<i>Náuplios de Artemia sp.</i>	31
4.2.3.2	<i>Camundongos</i>	31
4.3	Isolamento e purificação da lectina DrfL II	31
4.4	Dosagens de proteínas solúveis totais e de proteína específica	32
4.5	Teste de hemaglutinação da DrfL II	32
4.6	Determinação do açúcar específico da lectina	33
4.7	Determinação do grau de pureza e peso molecular aparente de DrfL II por SDS-PAGE	33
4.8	Determinação do ponto isoelétrico e presença de isoformas da lectina DrfL II por eletroforese bidimensional	34
4.9	Digestão de peptídeos da DrfL II	34
4.10	Sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa em tandem	35
4.11	Efeito da temperatura e pH sobre a atividade hemaglutinante da DrfL II ..	35

4.12	Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante da lectina.....	36
4.13	Teste de toxicidade da DrfL II em náuplios de <i>Artemia sp</i>	36
4.14	Avaliação da atividade edematogênica e hipernociceptiva da DrfL II em camundongos.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas que apresentam pelo menos um domínio não-catalítico capaz de se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (Van Damme *et al.*, 2011). Essas proteínas são ubíquas e vastamente distribuídas em plantas, animais e microorganismos (Sharon e Lis, 2003), sendo amplamente estudadas e caracterizadas, especialmente lectinas de plantas, devido à sua abundância na natureza e sua característica distinta de se ligar a carboidratos.

A família das plantas leguminosas enquadra o maior grupo de lectinas de plantas caracterizadas atualmente, apresentando grande variedade de especificidade a açúcares dentro desse grupo, mas propriedades físico-químicas frequentemente homólogas, como suas estruturas tridimensionais e significativo número de aminoácidos invariáveis em suas sequências (Sharon e Lis, 2003). A subtribo Diocleinae, da conhecida Concanavalia A contém um grupo de lectinas intensamente investigado devido às suas potenciais aplicabilidades no uso biomédico, incluindo decifração de glicocódigos de carboidratos nas células (Gabiús *et al.*, 2011), indução de apoptose (Barbosa *et al.*, 2001), vasodilatação (Assreuy *et al.*, 2009; Bezerra *et al.*, 2013) e efeitos moduladores da inflamação aguda (Assreuy *et al.*, 1997).

Algumas espécies de Diocleinae, como *Cymbosema roseum* (Rocha *et al.*, 2009), *Canavalia ensiformis*, *Dioclea grandiflora* (Melgarejo *et al.*, 2005) e *Dioclea lehmanni* (Pérez *et al.*, 1998), apresentam duas lectinas diferentes em suas sementes, uma exibindo a esperada especificidade a glicose-manose e outra nova lectina presente em suas sementes exibindo especificidade a lactose. Essas lectinas específicas a lactose, denominadas tipo II por Melgarejo e colaboradores (2005), apresentam diferentes características das lectinas específicas a glicose-manose, como diferentes sequências de aminoácidos e estruturas quaternárias distintas (Rocha *et al.*, 2009), somado a variante especificidade a açúcar. A presença de duas lectinas distintas já foi demonstrada anteriormente não somente em sementes de Diocleinae, mas também em sementes de *Ricinus communis* (Nicolson *et al.*, 1974), *Vicia cracca* (Baumann *et al.*, 1979), *Sambucus nigra* (Kaku *et al.*, 1990) e *Dolichos lablab* (Latha *et al.*, 2006), por exemplo.

As lectinas da subtribo Diocleinae estudadas até agora apresentam alto grau de similaridades estruturais e de propriedades físico-químicas, mas diferem em seus efeitos biológicos, como por exemplo exercendo ações anti- ou pro-inflamatórias dependendo da via de administração utilizada. Quando administrados por rota sistêmica, elas exercem atividade

anti-inflamatórias (Assreuy *et al.*, 2000), enquanto que a administração local dessas lectinas resulta em um efeito pró-inflamatório (Figueiredo *et al.*, 2009; Rocha *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrado por esse grupo de pesquisa o efeito inflamatório dose-dependente da lectina DrfL I, específica a manose, purificada de sementes de *Dioclea reflexa* (Pinto-Junior *et al.*, 2015). No presente estudo nós reportamos a purificação, a parcial caracterização e o efeito inflamatório de uma nova lectina específica a lactose de sementes de *D. reflexa* em modelos de edema de pata de camundongos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esse trabalho será iniciado com uma breve revisão do que já foi publicado sobre a classe dessas biomoléculas visando fornecer um esclarecimento a respeito de sua definição e classificação taxonômica bem como as técnicas que são amplamente utilizadas para seu isolamento e caracterização físico-química.

2.1 Definição de lectinas

Lectinas são moléculas amplamente distribuídas na natureza, presentes em diversos seres vivos, existindo relatos de sua presença em microrganismos como fungos e bactérias, plantas e animais e até mesmo vírus. Sua descoberta se deu no século 19, como proteínas com a capacidade de aglutinar eritrócitos e nomeadas, inicialmente, aglutininas. O interesse por essas proteínas tem crescido à medida que suas aplicações biotecnológicas são desenvolvidas, com a identificação e caracterização de novas lectinas aumentando desde a década de 70 (Sharon e Lis, 2004).

As lectinas são definidas como proteínas capazes de se ligar a mono- ou oligossacarídeos de forma altamente específica, não imune e reversível, sem ação catalítica em seu domínio de ligação a carboidrato. Elas geralmente são isoladas com base nas suas especificidades a carboidratos, estrutura molecular ou propriedades bioquímicas. (Peumans e Van Damme, 1995). Enzimas como glicosidases, de forma semelhante às lectinas, se ligam a carboidratos e podem causar hemaglutinação, mas causam alterações estruturais nessas moléculas, o que no caso das ligações reversíveis das lectinas não ocorre (Shannon *et al.*, 1981).

A capacidade das lectinas de hemaglutinar células como eritrócitos se deve ao fato delas serem moléculas que usualmente contêm dois ou mais sítios de ligação aos carboidratos, sendo di- ou polivalentes. Portanto, quando interagem com células, elas não somente se ligam aos seus carboidratos de membrana, mas atuam também na aglomeração dessas células, em um fenômeno chamado aglutinação celular (Lis e Sharon, 1998). Cada lectina se liga de forma específica a uma pequena quantidade de açúcares, geralmente encontrados nas membranas celulares na forma de glicoconjugados. Entre os sacarídeos mais frequentemente reconhecidos por essas proteínas podemos encontrar glicose, manose, fucose, galactose, N-acetil-D-galactosamina e N-acetil-D-glicosamina (Sharon e Lis, 2004).

Os carboidratos são conhecidos principalmente por suas funções estruturais e

energéticas, mas além dessas, a glicobiologia, ciência que estuda a estrutura, função e metabolismo de carboidratos, vem desvendando a capacidade dos açúcares armazenarem informação celulares e fisiológicas em suas estruturas. Um dos maiores motivos que hoje incentiva a pesquisa sobre lectinas está relacionado à sua capacidade única de "ler" as informações biológicas que são codificadas na estrutura tridimensional de açúcares, o glicocódigo (WIEDERSCHAIN, 2013).

Diferentemente de ácidos nucleicos e proteínas, que são polímeros lineares, monossacarídeos podem realizar diferentes ligações glicosídicas entre si formando cadeias ramificadas, aumentando significativamente o número de estruturas possíveis de serem construídas para uma mesma sequência de monossacarídeos. Essa complexidade na estrutura tridimensional dessas moléculas é incrementada ainda em função dos carbonos assimétricos existentes em cada unidade osídica que forma um dado carboidrato e, devido a isso, também é aumentada a possibilidade de codificar informação nessas estruturas. O armazenamento de informações em polissacarídeos através do glicocódigo é uma ferramenta amplamente utilizada pelas células em diversos processos celulares, como interação e adesão entre células, sinalização biológica, coagulação sanguínea, resposta imune, desenvolvimento de tecidos, recepção de hormônios, fertilização e embriogênese, dentre outros (Wiederschain, 2013).

A ideia de que lectina e carboidratos trabalham como marcadores do reconhecimento celular se originou do fato de ambas as classes de compostos serem comumente encontrados na superfície de células. Pequenas modificações em carboidratos de membranas podem estar relacionadas com vários fatores, incluindo padrões associados com doenças. A capacidade de lectinas reconhecer mudanças sutis na estrutura de oligossacarídeos é uma dos motivos que estimula a crescente pesquisa sobre lectinas (Ambrosi *et al.*, 2005).

As lectinas podem apresentar diferentes funções nos seus organismos de origem. Em animais, atuam principalmente interagindo com glicoconjugados endógenos (Van Damme *et al.*, 2004) no processo de reconhecimento celular, exibindo ainda várias atividades biológicas como citotoxicidade em células e organismos (Danguy *et al.*, 2002), indução de apoptose (Barbosa *et al.*, 2001), aglutinação de células e bactérias, propriedades anti-inflamatória e pró-inflamatória (Freire *et al.*, 2003; Assreuy *et al.*, 1997; Alencar *et al.*, 2005) e efeito vasodilatador (Assreuy *et al.*, 2009), entre outras.

Em vegetais, diferente do que geralmente ocorre com lectinas animais, a interação com carboidratos é geralmente direcionada para açúcares exógenos, por exemplo, atuando como moléculas de defesa, inseticida, reserva energética, no controle da homeostase e na simbiose de plantas com bactérias nitrificantes (Macedo *et al.*, 2007; Ohizumi *et al.*, 2009;

Peumans e Van Damme, 1995). As lectinas de plantas podem ser encontradas em diversos órgãos vegetais, mas usualmente são bem encontradas em sementes ou regiões relacionadas com estocagem. A concentração de lectinas nas sementes, no entanto, pode variar amplamente entre espécies diferentes ou mesmo dentro de uma mesma espécie em condições fisiológicas diferentes (Rudiger e Gabius, 2002). Dentro das células vegetais as lectinas podem ser localizadas em corpos proteicos (Chrispeels, 1984), citoplasma, núcleo (Damme, Van *et al.*, 2004) e espaço intracelular (Etzler *et al.*, 1984).

2.2 Fonte de lectinas

As lectinas de plantas foram por muito tempo o foco de interesse de muitos grupos de pesquisa devido à facilidade com que essas proteínas podiam ser purificadas em quantidades razoáveis mesmo no início do desenvolvimento da bioquímica de plantas. Como resultado, a sequência de aminoácidos de lectinas era resolvida com muito mais rapidez do que a sequência de qualquer outro grupo de proteínas de plantas (Van Damme *et al.*, 1998).

As lectinas de plantas são geralmente consideradas um grupo de proteínas complexo e heterogêneo devido às diferenças apresentadas nas estruturas moleculares, propriedades bioquímicas e especificidades a carboidratos. Com base em estudos de análise estrutural e clonagem molecular de genes de lectinas, foi possível a subdivisão das lectinas de plantas em subgrupos de proteínas relacionadas estruturalmente e evolutivamente. Dentre esses subgrupos, quatro merecem destaque, são eles as famílias de lectinas de leguminosas, lectinas ligantes de quitina, proteínas inativadoras de ribossomo do tipo dois e lectinas ligantes de manose de monocotiledôneas (Van Damme *et al.*, 1998).

A maioria dos estudos desenvolvidos com lectinas de plantas é feito com proteínas extraídas das sementes de leguminosas, com a quantidade total de lectina variando entre 10% do valor das proteínas totais (Loris, 2002).

2.2.1 Lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas não são somente a família mais conhecida de lectinas, como também tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da lectinologia como disciplina científica. Diversas lectinas de leguminosas já são ferramentas indispensáveis na pesquisa bioquímica e biomédica e as grandes descobertas na pesquisa de lectinas de plantas foram feitas com lectinas de leguminosas, como a primeira evidencia de que lectinas são

proteínas ligantes de carboidratos, feita pela observação da inibição da ConA, lectina da semente de *Canavalia ensiformis*, por cana de açúcar (Summer e Howell, 1936). Além disso, muito do trabalho pioneiro nas áreas de bioquímica, fisiologia e biologia molecular de lectinas foi desenvolvido com lectinas de leguminosas. Por exemplo, a ConA foi a primeira lectina de planta a ser purificada e ter suas estruturas primárias e terciárias resolvidas (Van Damme *et al.*, 1998).

Essas lectinas são geralmente constituídas por oligômeros proteicos de aproximadamente 30 kDa. A maioria dessas moléculas são constituídas de cerca de 250 resíduos de aminoácidos em uma única cadeia. Elas também são dependentes de cátions divalentes em sítios específicos de ligação a metais para executar sua atividade de ligação a carboidratos. Cada subunidade possui íons Mn^{2+} e Ca^{2+} associados a aminoácidos altamente conservados em todas as lectinas de legumes. Em adição aos sítios de ligação a carboidratos e íons metálicos, muitas lectinas de legumes apresentam bolsões hidrofóbicos para ancoragem de moléculas hidrofóbicas (Rudiger e Gabius, 2002).

Aproximadamente 20% dos resíduos de aminoácidos são invariáveis em lectinas de leguminosas, e mais outros 20% são similares. Os aminoácidos conservados envolvem aqueles relacionados com a interação com o sacarídeo ou com coordenação dos metais. A resolução de estruturas tridimensionais mostrou que as estruturas dessas lectinas são semelhantes, com cada subunidade composta largamente (cerca de 60%) por folhas beta conectadas por *loops* e pela ausência de α -hélices (Ambrosi *et al.*, 2005).

Muitas das lectinas de leguminosas são glicosiladas, apresentando um ou mais cadeias de glicanos geralmente ricos em manose ou de outros tipos mais complexos (Lis e Sharon, 1998). A lectina em seu estado nativo geralmente é composta por dois ou quatro protômeros unidos por interações não covalentes. É comum a ocorrência de lectinas de leguminosas heterotetraméricas, em que duas cadeias de polipeptídios diferentes se associam. Misturas de isoformas também são comuns em leguminosas. (Ambrosi *et al.*, 2005).

A especificidade a carboidratos das lectinas pode ser avaliada por experimentos de inibição da atividade hemaglutinante, em que diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicopeptídeos são testados. A ligação da lectina a sacarídeos também pode ser avaliada por métodos físico-químicos como termoforese, espectrofotometria, fluorimetria, e ressonância magnética nuclear. Por esses métodos, a constante de associação e outros parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação podem ser medidos, fornecendo, então, informações de alta relevância sobre a natureza dos sítios de ligação dessas proteínas. As constantes de ligação das lectinas de leguminosas apresentam valores na mesma ordem de grandeza que as constantes

de enzimas com seus substratos ou que os anticorpos com seus antígenos (Sharon e Lis, 1990).

2.2.2 Lectinas de Diocleinae

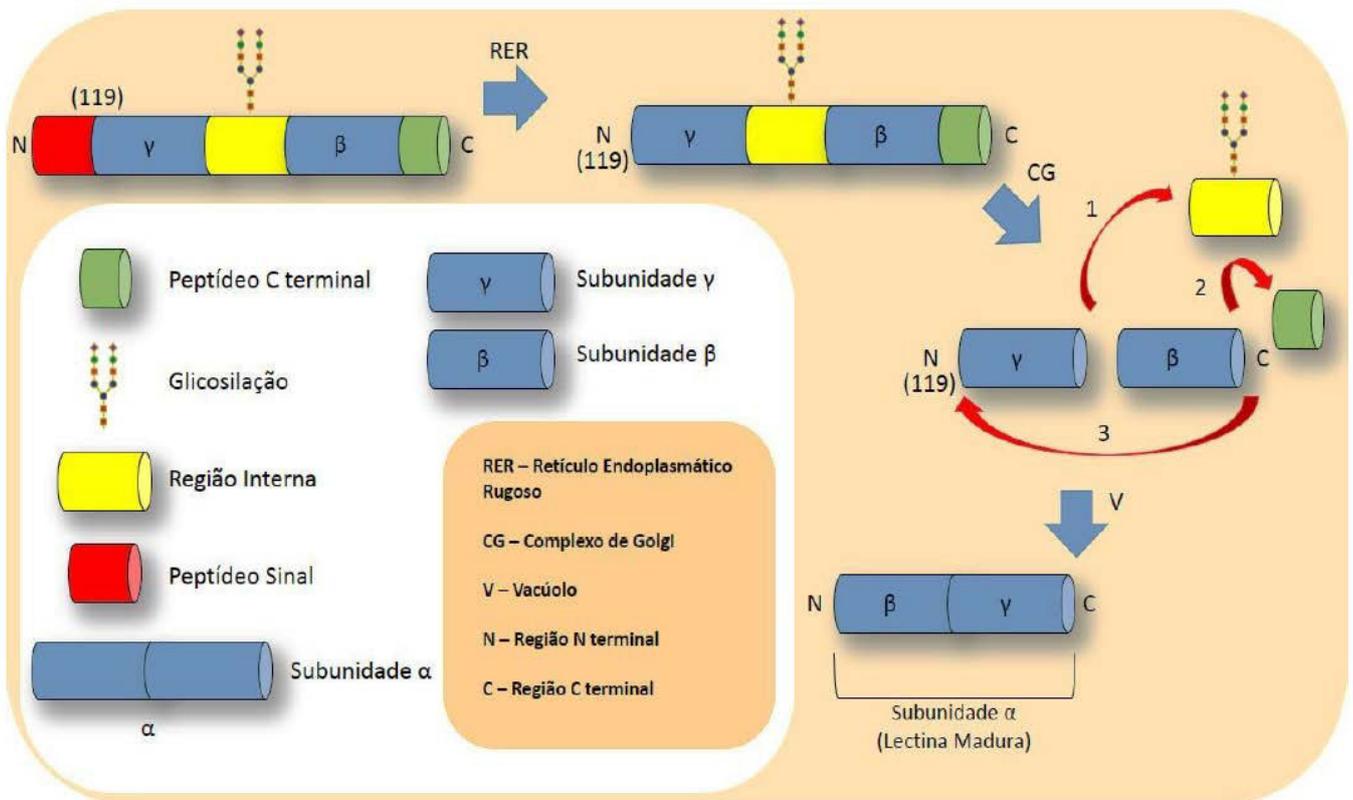
A subtribo Diocleinae é composta por 13 gêneros, dentre os quais três (*Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*) são mais amplamente conhecidas no que concerne o estudo de lectinas. A lectina de *Canavalia ensiformis*, ConA, foi a primeira lectina de Diocleinae a ser isolada e caracterizada estruturalmente, após ela, diversas lectinas de Diocleinae foram isoladas e caracterizadas, podendo ser citadas como exemplos as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, ConBr (Cavada e Moreira, 1984); *C. bonariensis*, CABO (Cavada *et al.*, 1996); *Dioclea grandiflora*, DGL (Moreira *et al.*, 1983); dentre outras. Todas as lectinas de Diocleinae estudadas até agora apresentam grandes similaridades físico-químicas e estruturais, geralmente apresentando estruturas multiméricas constituídas de monômeros idênticos com estruturas conformacionais frequentemente dependentes do pH. Todas são metaloproteínas requerendo íons divalentes para exibir atividade biológica (Cavada *et al.*, 2001).

Todas as lectinas de Diocleinae são conhecidas por compartilhar especificidade primária aos carboidratos D-manose e D-glicose (Moreira *et al.*, 1991). Algumas Diocleinae, no entanto, como *Dioclea lehmanni* (Pérez, 1998), *Dioclea grandiflora* e *Canavalia ensiformis* (Melgarejo *et al.*, 2005) mostram a presença de uma segunda lectina em suas sementes. Além da já esperada lectina específica a glicose-manose, essas espécies apresentam outra lectina diferente da primeira, com uma especificidade a carboidrato também diversa, geralmente ligante a lactose.

A biossíntese e o processamento de lectinas pertencentes às espécies da subtribo Diocleinae é bastante peculiar e foi primeiramente descrito para a ConA (Bowles *et al.*, 1986). A ConA é sintetizada como uma pré-proteína glicosilada, inativa e com um peptídeo sinal composto em torno de 30 aminoácidos que tem como função direcionar a pré-proteína ao retículo endoplasmático. Uma vez nessa organela, essa pré-proteína é convertida por meio de uma cotranslação (remoção de seu peptídeo sinal), a uma prolectina glicosilada (proConA), mas ainda inativa (Figura 1). O oligossacarídeo ancorado à porção central da proConA, por sua vez, tem por finalidade direcionar a proConA ao complexo de Golgi, onde ela sofrerá clivagens da porção C-terminal de nove aminoácidos e do peptídeo intermediário glicosilado. Os peptídeos resultantes são as cadeias β e γ , que são em seguida transpostos e religados em uma ordem inversa, e o processamento é finalizado pela remoção de um tetrapeptídeo do N-

terminal do produto, formando a cadeia α madura. Esse processamento pós traducional foi denominado permutação circular, sendo também possível de ser encontrado em outros grupos de proteínas. O significado biológico desse processamento complexo ainda não é completamente entendido, provavelmente ele está relacionado à não interação da pré-proteína com carboidratos indesejados do reticulo endoplasmático, local de sua síntese (Van Damme *et al.*, 1998).

Figura 1. Permutação circular durante a biossíntese de ConA



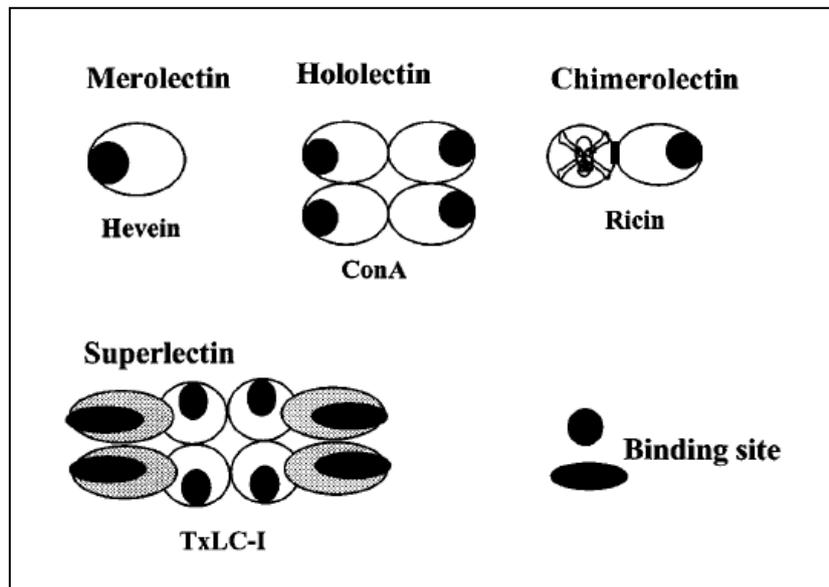
Fonte: Santiago e colaboradores (2014). Processamento pós traducional das lectinas de Diocleinae.

2.3 Classificação das lectinas

Apesar de serem consideradas um grupo de proteínas bastante heterogêneas por estarem amplamente distribuídas na natureza em diversos seres vivos, todas as lectinas apresentam uma característica bem definida que as diferem de outras classes de proteínas, que é a sua capacidade de reconhecer carboidratos e se ligarem a eles de maneira específica e reversível. Devido a isso, além da classificação já vista que subdivide as lectinas em suas famílias relacionadas evolutivamente, existe uma classificação das lectinas baseadas nas suas

diferentes propriedades de aglutinação e/ou precipitação de glicoconjugados. Essa classificação se baseia na estrutura madura de lectinas. Dessa forma, foi sugerido uma nova subdivisão das lectinas em quatro classes: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 2) (Peumans e Van Damme, 1995).

Figura 2. Classificação das lectinas



Fonte: Van Damme e colaboradores (1998). Representação esquemática das quatro classes de lectinas baseadas em suas estruturas maduras

As merolectinas consistem de proteínas que possuem somente um sítio de ligação a carboidrato em suas estruturas, devido a isso, elas são denominadas monovalentes e, portanto, não podem aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (Cavada *et al.*, 2001). Como exemplo de merolectinas é possível se citar a lectina ligante a quitina da seringueira *Hevea brasiliensis* (Parijs *et al.*, 1991).

Hololectinas são constituídas somente de sítios de ligação a carboidratos, mas, diferente das merolectinas, essa classe contém mais de um sítio, pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos idênticos ou estruturalmente muito semelhantes. Hololectinas são, portanto, proteínas di- ou multivalentes e são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas estudadas pertence a essa classe.

As quimerolectinas são proteínas fusionadas consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidratos ligados em arranjo com outro domínio com uma diferente função.

Este domínio pode ter uma função enzimática ou qualquer outra atividade biológica que deve obrigatoriamente atuar independente do sítio de ligação à carboidrato. Dependendo ainda da quantidade de sítios de ligação a açúcar, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas (Cavada *et al.*, 2001).

Superlectinas obrigatoriamente são lectinas compostas de pelo menos dois domínios de ligação a carboidrato, contudo, diferente das hololectinas, os domínios de ligação a carboidrato das superlectinas reconhecem açúcares estruturalmente diferentes (Cavada *et al.*, 2001). Alguns autores consideram as superlectinas como quimerolectinas compostas de domínios ligantes a carboidratos diferentes, como exemplo é possível citar a lectina de tulipa que tem domínios ligantes a GalNAc e manose (Van Damme *et al.*, 1996).

2.4 Determinação da estrutura primária por espectrometria de massa

A espectrometria de massa em química de proteínas é uma técnica bastante sensível que mede a razão carga massa de biomoléculas ionizadas em fase gasosa gerando dados que podem ser utilizados para fazer a identificação de proteínas através do uso de ferramentas de bioinformática. Essa técnica se utiliza da digestão enzimática de proteínas em peptídeos através do uso de enzimas proteolíticas como a tripsina, que gera fragmentos com extremidades conhecidas (Palzkill, 2002). Juntamente com a degradação de Edman, a espectrometria de massa é uma das principais técnicas utilizadas para se obter a sequência de aminoácidos de uma proteína.

O espectrometro de massa é um aparelho dividido em fonte ionizadora, responsável pela formação de íons e vaporização dos peptídeos; os analisadores de massa, que individualizam os íons de acordo com as relações carga massa (m/z) e os detectores de íons, que aponta o valor da carga massa dos mesmos e converte os sinais recebidos em dados brutos para um computador. Além desses, o espectrometro de massa também possui uma unidade de processamento de dados, para análise do grande volume de informação gerado pelo procedimento (Hoffman e Stroobant 2007).

Para a análise de proteínas, existem dois tipos de fontes ionizadores disponíveis no mercado, são eles MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) e eletrospray. A fonte ionizadora MALDI é utilizada para ionizar peptídeos oriundos de proteínas separadas em gel. Nela a amostra proteica é disposta em estado sólido sobre a placa de MALDI. Para isso, os peptídeos são solubilizados em matriz ácida ou básica, como por exemplo o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico e aplicados sobre a placa, a qual um laser é incidido. A matriz

absorve a energia do laser e então libera um próton, no caso de matrizes ácidas, que é captado pelo peptídeo que se ioniza, evapora e passa ao analisador (Kaufmann, 1995).

Quando os peptídeos são separados por cromatografia de alta eficiência, utiliza-se a fonte Eletrospray como ionizador. O processo se inicia ao se formarem pequenas gotículas carregadas de solução de peptídeos seguida pela vaporização dessas gotículas, gerando peptídeos isolados multicarregados no estado gasoso. A formação dessas gotículas ocorre quando a solução de analito passa por capilar submetido a um alto potencial elétrico, que causa uma tensão de cargas na solução liberando as gotículas carregadas. Essas gotículas então sofrem a evaporação de seu solvente, aumentando assim a densidade de cargas em suas superfícies, tornando-as instáveis e resultando na liberação dos peptídeos ionizados no estado gasoso, que então passam para o analisador do espectrômetro (Stewart, 1999).

Após ionização, a massa dos peptídeos é determinada pelos analisadores de massa. Em estudos de proteínas utiliza-se os analisadores do tipo quadrupolo e tempo de voo. O analisador quadrupolo consiste de quatro hastes paralelas com polaridades opostas e oscilantes de voltagens. Essas voltagens oscilantes geram um campo elétrico que faz com que os íons orbitem dentro do analisador de forma dependente de sua relação carga-massa, dessa forma há a separação entre os íons na chegada ao detector. O analisador de tempo de voo se baseia no princípio da medida do tempo que os íons, acelerados por um campo elétrico constante, levam para alcançar o detector, logo, seu tempo de voo. Os íons partem todos de um mesmo ponto e suas velocidades estão relacionadas com suas relações carga-massa, tornando possível assim definir a massa de cada íon (Ahmed, 2008).

Os analisadores em um espectrômetro de massa podem ser montados de maneira solo, com somente um analisador ou de maneira híbrida, com tipos diferentes de analisadores acoplados entre si. Equipamentos híbridos permitem experimentos de sequenciamento de polímeros, por permitirem análises em *tandem* (Cantu *et al.*, 2008).

A partir da informação contida em bancos de dados é possível identificar com grande confiabilidade uma proteína com uma pequena informação de sua sequência. Também é possível sequenciar uma proteína desconhecida, através de softwares de sequenciamento manual.

Durante a identificação de peptídeos por espectrometria de massa para análise de proteínas, dois tipos de informação são gerados. O primeiro diz respeito a determinação do valor da massa intacta do peptídeo previamente digerido por enzimas proteolíticas. Com esses valores é possível se fazer a identificação de proteínas por *peptide mass fingerprinting* (PMS), porém peptídeos diferentes podem ter a mesma massa, sendo esse método de identificação

não muito preciso (Mann *et al.*, 1993). O segundo consiste na continuação da análise dos peptídeos após a obtenção da massa intacta, fragmentando esses peptídeos e sequenciando-os através do sequenciamento *de novo*, que apresenta resultados mais exatos que o primeiro. Ambas as técnicas geram dados que serão interpretados por algoritmos dos bancos de dados ou pelos softwares de sequenciamento e identificação das proteínas (Hoffman e Stroobant, 2007).

2.5 Efeitos de lectinas na inflamação

A inflamação é um fenômeno que é deflagrado durante severas perturbações da homeostase como infecções, injúrias, exposições a contaminantes e é ativada por receptores do sistema imune inato, que reconhecem patógenos ou células danificadas. Nos vertebrados, a cascata inflamatória é uma rede complexa de eventos imunológicos, fisiológicos e comportamentais que são coordenados por moléculas conhecidas como mediadores inflamatórios, como as citocinas (Ashley *et al.*, 2012).

No seu nível mais básico, a inflamação é um processo destruidor do tecido que envolve o recrutamento de produtos derivados do sangue como proteínas do plasma, fluido, leucócitos no sentido do tecido lesado. Essa migração é facilitada por alterações nos vasos do local, o que leva à vasodilatação, aumento da permeabilidade e aumento do fluxo de sangue. A inflamação é um fenômeno altamente conservado e parece ser uma importante primeira linha de defesa tanto de organismos invertebrados quanto vertebrados (Kumar *et al.*, 2010).

A exposição a partículas irritantes ou moléculas exógenas ao sistema, como as lectinas ativa a inflamação. As funções primárias da inflamação são destruir ou isolar a fonte de inflamação, remover o tecido danificado e por fim restaurar a homeostase do tecido. (Aller *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2013).

A dor é um dos sinais clássicos de processos inflamatórios em que a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum. Essa sensibilização causa hiperalgesia ou alodinia em humanos, fenômeno que envolve a percepção de dor. Os termos nocicepção e hipernocicepção são comumente usados para descrever comportamento induzido por estimulação mecânica e aumento da sensibilidade do nociceptor, respectivamente. Citocinas pro- e anti-inflamatórias são pequenas moléculas proteicas endógenas liberadas por células locais, cujo balanço media a intensidade da resposta inflamatória. O estímulo inflamatório estimula a liberação de cascatas de citocinas características que ativam a

liberação final de mediadores responsáveis pela dor relacionada à inflamação (Verri *et al.*, 2006).

Dentro do grupo das lectinas vegetais, é possível observar respostas pró- ou anti-inflamatórias dependendo da via de administração dessas lectinas, se sistêmica ou local (Assreuy *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2011). Dentro da subtribo Diocleinae, é possível se observar algumas lectinas como as de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea* e *D. grandiflora* que são estimulatórias do processo inflamatório de maneira acentuada ativando o influxo de leucócitos para o sítio de injeção (Barbosa *et al.*, 2001).

2.6 Aplicações biotecnológicas de lectinas

Os carboidratos complexos que recobrem as superfícies das células conferem a elas características únicas àquele tipo celular, tecido ou órgão. Esses sacarídeos componentes da membrana plasmática são também chamados de glicanos e o conjunto deles com as proteínas de membrana, glicocalix. Eles são constituídos de monossacarídeos simples organizados em polímeros, podendo se conjugar com outros tipos de carboidratos ou gliconjugados.

Dentre as funções conhecidas do glicocálix podemos citar a coesão celular, a proteção da célula contra choques físicos e contra a ação de microorganismos. Além desses, os oligossacarídeos do glicocalix também exercem função de reconhecimento molecular, muitas vezes envolvendo lectinas como receptores (Varki, 1993; Dennis *et al.*, 1999).

As lectinas podem atuar na detecção, isolamento e caracterização de oligossacarídeos, assim como na tipagem sanguínea e na identificação de gliconjugados, especialmente glicoproteínas. Dessa forma, elas podem ser utilizadas na identificação de certas condições patológicas associadas à alteração do padrão de glicosilação da membrana plasmática de células. Considerando isso, a comunidade científica atualmente enxerga as lectinas como moléculas de interesse biotecnológico, devido a suas atividades biológicas promissoras e serem de fácil purificação, o que permitiu nos últimos anos um crescente número de lectinas caracterizadas (Peumans e Damme, Van, 1995).

O processo de glicosilação é a modificação pós traducional de proteínas que mais ocorre em todos os tipos de organismos vivos. Essa adição de glicanos às cadeias polipeptídicas influencia diversos processos funcionais das células, dentre eles processos de endereçamento, degradação e controle de proteínas, localização celular, dentre outros (ARNOLD *et al.*, 2007). Além disso, a glicosilação pode ocorrer em glicoproteínas que terão

ter funções em processos celulares estruturais, de sinalização e reconhecimento (DENNIS *et al.*, 1999), além de muitas vezes conferir estabilidade estrutural. Foi demonstrado que anormalidades no padrão de glicosilação, principalmente de glicoproteínas relacionados com fenômenos de diferenciação e maturação, frequentemente acompanham condições fisiológicas anormais como o câncer (MODY *et al.*, 1995; KAUR *et al.*, 2006). Devido a isso, a busca por lectinas capazes de identificar e se ligar a esses carboidratos característicos de doenças tem recebido atualmente muita atenção, por elas serem capazes de elucidar o papel desses glicanos no desenvolvimento dessas patologias (DENNIS *et al.*, 1999). Lectinas vegetais, inclusive, já têm sido utilizadas como insumos no reconhecimento tumoral e para a diferenciação entre tumores malignos e benignos (SUJATHA *et al.*, 2009).

As lectinas, portanto, são vistas atualmente como importantes elementos para a pesquisa em diversas áreas, e sua utilização vem aumentando principalmente nas áreas de imunologia, farmacologia, bioquímica, e biologia celular. Elas também têm o potencial de desencadear diferentes atividades biológicas em células de animais, por exemplo, aglutinação, estimulação mitogênica, redistribuição de componentes de superfície celular, modificação da atividade de enzimas de membrana, atividade bactericida e imunomodulação (LI *et al.*, 2008; KAUR *et al.*, 2006), entre outros. Também já foi proposta a utilização das lectinas para combater tumores malignos através da indução de apoptose predominantemente através de vias dependentes de caspases (LIU *et al.*, 2009). Outros exemplos de utilização de lectinas vegetais na detecção e tratamento de câncer inclui a triagem de tecidos renais em busca de tumores (Kabir, 1998) a diferenciação entre tumores malignos e a hiperplasia benigna da próstata (Basu *et al.*, 2003), a identificação de células mamárias em diferenciação maligna (Beltrão *et al.*, 1998) e detecção de tecidos inflamados e associados à neoplasia (Brinck *et al.*, 1998).

Algumas lectinas específicas a D-glicose ou a N-acetil-D-glicosamina já demonstraram ação inibitória sob a proliferação do HIV e da replicação do vírus em células hospedeiras (Molchanova *et al.*, 2007), outras atuaram evitando a infecção entre leucócitos contaminados e sadios (Balzarini, 2006), além de também inibirem a atividade da transcriptase reversa (Li *et al.*, 2008).

Além de aplicações nas áreas da saúde, as lectinas de plantas também mostram potenciais funcionalidades nas áreas agrícola e de alimentos, atuando contra células bacterianas (Gaidamashvli e Van Staden, 2002), protozoários (Moura *et al.*, 2006), contra fungos (Freire *et al.*, 2002) e como potencial inseticida contra uma variedade de espécies (Kaur *et al.*, 2006).

Algumas lectinas também já podem ser encontradas no comércio como insumos biotecnológicos com fins de pesquisa como a ricina, que apresenta ação citotóxica contra células de animais e é amplamente utilizada como padrão em testes de toxicidade e em uma menor escala, a ConA. A Quiagen oferece como um de seus produtos comerciais lectinas imobilizadas em colunas para pesquisas de glicoproteômica, a Sigma comercializa lectinas vegetais e de algas liofilizadas, a Aethlon Medical comercializa um filtro a base de lectinas para reduzir a carga viral de pacientes em hemodiálise, infectados com Hepatite C (Tullis *et al.*, 2009), o que mostra o potencial dessas lectinas atuarem como insumos biotecnológicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Purificar, caracterizar e avaliar o efeito inflamatório da lectina específica a lactose DrfL II e compará-la com lectinas específicas a lactose já caracterizadas.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar a segunda lectina presente em extrato de sementes de *Dioclea reflexa*, previamente identificada por testes de hemaglutinação, utilizando métodos de cromatografia;
- Testar a lectina isolada quanto sua atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho;
- Testar a ação inibitória de diferentes açúcares sobre a atividade hemaglutinante da lectina;
- Determinar o grau de pureza e a massa aparente por SDS-PAGE;
- Caracterizar a lectina acerca da sua estabilidade em diferentes pHs e temperaturas;
- Analisar a atividade da lectina quanto à dependência de íons divalentes;
- Determinar a sequência parcial da lectina por espectrometria de massa;
- Determinar a citotoxicidade da lectina em náuplios de *Artemia* sp.;
- Determinar os efeitos edematogênico e hipernociceptivo da lectina em modelo de edema de patas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

Acrilamida, N',N'-metilenobisacrilamida, albumina sérica bovina (BSA) Coomassie brilliant blue (G-250), tetrametiletilenodiamina (TEMED) e os carboidratos utilizados nos ensaios de inibição foram obtidos da empresa Sigma (St. Louis, MO). Dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol foram adquiridos junto à empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). As colunas de afinidade Sephadex G-50 e Lactose-Sepharose foram compradas da GE Healthcare (Little Chalfont, UK). Todos os demais reagentes utilizados foram de qualidade analítica.

4.2 Materiais Biológicos

4.2.1 Eritrócitos

Eritrócitos em concentração final de 2% foram obtidos a partir da lavagem de sangue de coelho em NaCl 150 mM. Alíquotas de 2mL de sangue foram obtidas por corte na veia marginal esquerda da orelha de coelhos com bisturi e coletadas em tubos heparinizados. As alíquotas foram cuidadosamente homogeneizadas e centrifugadas a 200 x g por 10 min a 25 °C, tendo o sobrenadante (plasma) descartado em seguida. Às células precipitadas (eritrócitos) foram adicionadas 10 mL de NaCl 150 mM, homogeneizando-se e centrifugando-se novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. Todo o procedimento foi repetido 4 vezes, até que se obtivesse um sobrenadante límpido. A partir dos eritrócitos, foi preparado uma solução de hemácias a 2% com NaCl 150 mM, sendo denominada eritrócitos nativos. Os eritrócitos tratados com tripsina foram preparados a partir da adição de solução de tripsina na concentração 0,1 mg/mL em solução de hemácia a 2%. Esta solução foi deixada a 4 °C com homogeneização ocasional durante 1 hora. Posteriormente, a solução de hemácias foi submetida à lavagem (descrito anteriormente) para remoção de tripsina e seus produtos de lise, sendo a solução final denominada eritrócitos tripsinizados. O preparo de eritrócitos papainizados foi realizado de maneira semelhante com mudança da enzima tripsina por papaína. A suspensão final de cada eritrócito nativo e tratado foi acondicionada a 4 °C até posterior utilização. Todos os ensaios de hemaglutinação foram realizados utilizando-se

eritrócitos oriundos de apenas um coelho saudável, mantido no Biotério da Universidade Federal do Ceará com água e ração *ad libitum*.

4.2.2 Animais

4.2.3.1 Náuplios de Artemia sp.

Náuplios de *Artemia sp* foram obtidos pela incubação de 20 mg de cistos em 200 mL de água do mar artificial à 28 °C sob constante aeração e iluminação artificial durante 48 h. Nenhuma fonte de alimentação foi adicionada ao recipiente do ensaio durante o período de eclosão.

4.2.3.2 Camundongos

Camundongos machos da raça Swiss pesando em torno de 20-25 g foram acomodados em gaiolas padrão em ambiente com clima controlado em torno de 22-16 °C e mantendo um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro. Os animais foram alimentados com ração padrão e foi fornecida água *ad libitum*. Foi permitida a aclimatação dos animais por um período mínimo de uma semana. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de experimentação animal da Universidade Estadual do Ceará (n° 10130208-8/40).

4.3 Isolamento e purificação da lectina DrfL II

As sementes de *D. reflexa* tiveram suas cascas retiradas e foram moídas em um moedor de café (Cadence MDR301 Monovolt), se utilizando de pulsos de trituração para evitar aquecimento da amostra, até a obtenção de uma farinha fina. A extração das proteínas totais foi realizada pela agitação constante da farinha em solução de extração contendo 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ e 5 mM de MnCl₂ [1:10 (p:v)] por 4 h a 25 °C. O extrato foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min a 4 °C e seu sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman™. O filtrado foi coletado e submetido à cromatografia de afinidade em Sephadex® G-50, em coluna previamente equilibrada com a solução de extração. A amostra foi mantida em contato com a coluna por um período de 4 h, que foi em seguida lavada com a mesma solução que foi usada para equilibrar a coluna. Esse material não retido na coluna (P1) foi submetido a uma segunda cromatografia em coluna de Lactose-Sepharose, equilibrada com

150 mM NaCl. Após a eluição com NaCl a 150 mM do pico não retido, a lectina foi eluída com 100 mM de lactose contendo NaCl 150 mM. A lectina foi coletada, dialisada contra água destilada, liofilizada e denominada DrfL II. Todos os passos cromatográficos foram monitorados a 280 nm.

4.4 Dosagens de proteínas solúveis totais e determinação de proteína específica

A estimativa do teor de proteínas solúveis totais foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976), usando albumina sérica bovina na construção da curva padrão (5 a 50 µg/µL). Uma alíquota de 100 µL da amostra do extrato bruto e dos picos cromatográficos foi misturada em vortex com 2,5 mL do reagente de Bradford e deixado em repouso por 10 min a temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de luz visível (VIS LBK Novaspec, Pharmacia) a 595 nm e a dosagem de proteínas foi obtida após a inserção dos valores de absorbância obtidos na curva padrão pré-determinada. O resultados foram definidos como mg/mL.

A atividade hemaglutinante específica foi determinada pela razão entre o título de hemaglutinação (U.H./mL) e o valor resultante da dosagem das proteínas solúveis (mg/mL), sendo expressa em U.H./mg (Unidade de hemaglutinação por miligrama da lectina). A atividade hemaglutinante específica permite acompanhar o grau de purificação da lectina de interesse à medida que cada passo do protocolo é realizado (Pereira-Junior *et al.*, 2012).

4.5 Teste de hemaglutinação da DrfL II

O ensaio para determinar a atividade hemaglutinante específica da lectina foi realizado em duplicata diluindo-se a lectina com NaCl 150 mM em serie por dez poços em uma placa de microtitulação. A cada poço foi adicionado um volume equivalente de suspensão de eritrócitos de coelho à 2% nas condições nativas, e tratadas com tripsina e papaína (Moreira e Perrone, 1967). A placa foi encubada a 37 °C por 30 min e a atividade hemaglutinante foi determinada após a placa retornar à temperatura ambiente.

A Unidade de Hemaglutinação (U.H.) foi utilizada para medir os títulos de hemaglutinação, ela foi determinada utilizando-se o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação no poço.

A atividade hemaglutinante específica foi determinada pela razão entre o título de hemaglutinação (H.U./mL) e o valor da dosagem das proteínas solúveis (mg/mL), sendo

expressa em U.H./mg (Unidade de hemaglutinação por miligrama da lectina). A atividade hemaglutinante específica permite acompanhar o grau de purificação da lectina de interesse à medida que cada passo do protocolo é realizado.

4.6 Determinação do açúcar específico da lectina

A especificidade a açúcar da lectina presente no pico não retido da primeira cromatografia foi avaliada considerando-se a possibilidade de diferentes açúcares se ligarem à lectina e, portanto, inibirem sua atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelhos. (Ramos *et al.*, 1996). Diluições seriadas em Tris-HCl 100 mM contendo NaCl 15 mM dos açúcares D-glicose, D-galactose, L-ramnose, D-ribose, D-manose, α -lactose, α -metil-manosídeo, L-fucose, desoxirribose e inosina foram realizadas em duplicata iniciando-se da concentração de 100 mM. Em seguida, a lectina foi adicionada na concentração de 4 U.H. A placa foi incubada a 37 °C por 30 min e após resfriamento da placa à temperatura ambiente, foi adicionada separadamente as suspensões de eritrócitos a 2% nas condições nativas, e tratadas com tripsina e papaína. A placa foi novamente incubada a 37 °C por 30 min em estufa e a inibição da atividade hemaglutinante foi aferida após 30 minutos da remoção da placa da estufa. Os resultados da inibição foram expressos como a concentração mínima inibitória de açúcar (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) capaz de inibir a hemaglutinação de eritrócitos de coelho. O ensaio de inibição foi realizado de acordo com o descrito por Ramos e colaboradores (1996) com adaptações.

4.7 Determinação do grau de pureza e peso molecular aparente de DrfL II por SDS-PAGE

A homogeneidade e o peso molecular aparente da amostra foram monitorados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) como descrito por Laemmli (1970) usando o sistema de eletroforese MiniProtein II (Bio-Rad; Milão, Itália). O experimento foi conduzido usando um gel de separação preparado com poliacrilamida na concentração de 12,5% e um gel de empilhamento de 4%. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra Tris 62,5 mM pH 6,8 contendo 2% de SDS e 12,5% de glicerol, seguidas de aquecimento a 100 °C por 5 min. Foi adicionado β -mercaptoetanol na concentração de 2% à amostra para se avaliar a proteína quanto a presença de ligações dissulfeto. A eletroforese

foi conduzida sob corrente constante de 25 mA por gel durante 60 min em tampão de corrida contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%. Os géis obtidos foram corados com Azul de Coomassie coloidal G-250 e com reagente de Schiff. Os marcadores moleculares utilizados no experimento foram fosforilase b (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

4.8 Determinação do ponto isoelétrico e presença de isoformas da lectina DrfL II por eletroforese bidimensional

A eletroforese bidimensional foi conduzida de acordo com protocolo descrito por Shagger e Jagow (1987) para determinação do PI da proteína pura. DrfL II foi preparada utilizando-se o kit 2D Clean up (Ge Healthcare) e focalizada em fitas Immobiline DryStrip pH 3-10 (GE Healthcare). Tampão de equilíbrio contendo 6M de uréia, SDS a 2%, 0,375 M de Tris-HCl pH 8,8 e glicerol a 20% foi preparado, adicionado de ditioneitol (DTT) a 2% no momento do uso e deixado em agitação com a fita focalizada por 15 min. Em seguida, a fita foi lavada com água mili-Q e novamente deixada em agitação por 15 minutos em solução de equilíbrio contendo iodoacetamida (IAA) a 2,5%. A corrida de segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida a 12,5%, o gel foi fixado em solução (40% de etanol e 10% ácido acético) e corado com Azul de Coomassie G-250. Os marcadores moleculares utilizados foram os mesmos da SDS-PAGE. O peso molecular aparente e o pI foram calculados usando o software Imagemaster 7.0 (Ge Healthcare).

4.9 Digestão de peptídeos da DrfL II

Visando a obtenção da sequência da lectina, a digestão para sequenciamento foi realizada a partir da amostra em gel da SDS-PAGE, de acordo com Shevchenko *et al.* (2006). A banda correspondente à DrfL II foi excisada do gel, descorada em bicarbonato de amônio 100 mM em acetonitrila [1:1 (v:v)] e desidratada com acetonitrila pura. Soluções de tripsina e quimiotripsina (Promega, Madison, WI, USA) em bicarbonato de amônio 50 mM foram utilizadas para a clivagem proteolítica na proporção de 1 de enzima para 50 de amostra. A enzima permaneceu em contato com a amostra por um período de 12 h a 37 °C e teve sua ação parada pela adição de ácido fórmico a 2%. Os peptídeos resultantes da digestão foram extraídos em ácido fórmico 5% em acetonitrila [1:2 (v:v)] e secos em SpeedVac. Antes de sua análise no espectrômetro, os peptídeos foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1%.

4.10 Sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massa em tandem

Os peptídeos derivados da digestão em gel foram injetados em um NanoAcquity (Waters Corp) conectado à uma fonte de ionização eletrospray (SYNAPT HDMS –Waters Corp.). O espectrômetro foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP). A amostra foi aplicada a uma coluna C18 de fase reversa (75 µm x 100 mm) e eluída com um gradiente linear de acetonitrila (10-85%) contendo ácido fórmico a 0.1% a 600 µL/min. O espectrômetro de massa operou em modo positivo com fonte à temperatura de 90 °C e voltagem de 3.0 kV no capilar. Os experimentos de LC MS/MS usaram função de Aquisição Direta de Dados (Direct Data Acquisition, DDA) e os íons com carga ente +2 e +4 foram selecionados para a análise de MS/MS. Os íons foram fragmentados através de Decomposição Induzida por Colisão (Collision Induced Decomposition, CID) usando argônio como gás de colisão. O dado bruto obtido foi processado e analisado pelos software MassLynx v4.1 e ProteinLynx v4.2 (Waters Corp). Os peptídeos com sequencia em comum com outras proteínas foram identificados pelo algoritmo MASCOT (Matrix Science). As sequências não identificadas foram determinadas manualmente por interpretação do espectro CID usando a ferramenta PepSeq do software Mass Linx 4.0 (Waters).

De posse da sequência parcial obtida, foram realizadas buscas por proteínas com similaridades na sequência primária depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) usando programas de alinhamento com banco de dados não redundante como o BLAST.

4.11 Efeito da temperatura e pH sobre a atividade hemaglutinante da DrfL II

Para a análise da estabilidade da lectina em diferentes temperaturas, DrfL II foi incubada em banho seco na concentração de 0,062 mg/mL (concentração equivalente a 4 U.H.) na presença de NaCl 150 mM em temperaturas variando entre 30 e 100 °C (com incrementos de 10 °C) por 60 minutos. As amostras foram esfriadas à temperatura ambiente antes da atividade hemaglutinante ser aferida quanto à sua manutenção ou não (Pereira-Junior *et al.*, 2012).

A lectina foi testada quanto à sua estabilidade em diversos pH's através de testes de atividade hemaglutinante. DrfL II foi solubilizada à concentração de 0,062 mg/mL em diferentes tampões com pH variando de 4,0 até 10,0 (respectivamente acetato de sódio 0,1 M

pH 4,0 e pH 5,0; citrato de sódio 0,1 M pH 6,0; Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 e pH 8,0; e glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0 e pH 10,0) todos contendo NaCl 150 mM. A atividade hemaglutinante em seguida foi medida para a amostra em contato com os diferentes tampões (Pereira-Junior *et al.*, 2012).

4.12 Efeito de íons divalentes na atividade hemaglutinante da lectina

Para investigar a dependência de cátions divalentes para a atividade da lectina, seguiu-se protocolo como descrito por Pereira-Junior e colaboradores (2012) e DrfL II, na concentração de 0,062 mg/mL foi solubilizada em NaCl 150 mM e demetalizada por diálise contra solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 100 mM contendo NaCl 150 mM por 24 h. Em seguida, o excesso de EDTA foi removido via diálise em NaCl 150 mM. Cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+} nas concentrações de 5 mM) foram adicionados e a atividade hemaglutinante foi analisada para as amostras desprovida de metais e as amostras adicionadas de metais.

4.13 Teste de toxicidade da DrfL II em náuplios de *Artemia sp*

A toxicidade da DrfL II contra artemia foi analisada, preparando soluções da lectina nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; e 100,0 $\mu\text{g/mL}$ em água do mar artificial. As soluções foram adicionadas em placas Linbro de 24 poços em triplicatas, cada poço contendo dez naupli de artemia previamente eclodidos em água do mar artificial a 28 °C sob constante aeração. Os controles negativos continham apenas *Artemia sp.* e água do mar. Após um período de 24 h, o número de indivíduos mortos foi contado e os valores de LC₅₀ foram calculados de acordo com Finney (1971).

4.14 Avaliação da atividade edematogênica e hipernociceptiva da DrfL II em camundongos

O edema de pata foi induzido por injeção intraplantar subcutânea de DrfL II (0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg) e medido por pletismômetro (Panlab LE-7500) nos tempos antes da indução (tempo zero), a 30 min e de 1-48 h após. Animais controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Edema foi calculado como o aumento no volume da pata subtraído do volume aferido no tempo zero e expresso em mL e área sob curva (AUC) (Landucci *et al.*, 1995).

O efeito hipernociceptivo da DrfL II (10 mg/kg) foi avaliado no teste de pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico) acoplado a um transdutor (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e adaptado com uma ponta de polipropileno de 0,5 mm². Para esse teste, os animais foram posicionados em caixas de acrílico transparente com plataformas elevadas de tela metálica para permitir acesso à superfície ventral de patas traseiras de 15 a 30 min antes da avaliação. A ponta foi colocada em contato com a pata com gradual aumento de pressão até observada reação de hipernocicepção (retirada da pata) em resposta a seis aplicações. A intensidade da pressão foi registrada automaticamente. A avaliação foi realizada no tempo zero e 1, 2 e 3 h após a administração da DrfL II.

Em ambos os modelos (edema de pata e Von Frey), éster de metil N-(G)-nitro-L-arginina (L-NAME; 25 mg/kg intravenoso, i.v.) ou talidomida (1 mg/kg intraperitoneal, i.p.) foi injetada 30 min antes da administração da DrfL II. Para a avaliação do envolvimento do sítio ativo da lectina, DrfL II (10 mg/ml) foi incubada a 37 °C por 30 min com 100 mM de lactose (açúcar ligante da lectina) antes da injeção.

A apresentação dos resultados foi feita como média ± erro padrão da média (EPM). Os resultados também foram analisados por análise de variância ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados positivos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pico retido do extrato proteico das sementes de *Dioclea reflexa*, quando submetido à cromatografia de afinidade em Sepharose-lactose apresentou forte atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina e papaína (4.096 U.H./mL) e uma menor, mas ainda considerável hemaglutinação de eritrócitos de coelho não tratados com enzimas proteolíticas (256 U.H./mL), indicando a presença de uma segunda lectina (DrfL II).

A inibição da atividade hemaglutinante da DrfL II por carboidratos mostrou que a lectina DrfL II é específica para α -lactose, apresentando uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 25 mM desse açúcar (Tabela 1), não mostrando, no entanto, inibição significativa por nenhum outro dos carboidratos testados. Essa especificidade a açúcar exibe semelhança à da lectina DLL II, isolada a partir de sementes de *Dioclea lehmani*, com uma CIM de 92 mM (Perez, 1998) e à da lectina CRL II, de *Cymbosema roseum*, com uma CIM de 2,34 mM (Rocha *et al.*, 2009), ambas lactose específicas. DrfL II, no entanto, se contrasta com os resultados obtidos da primeira lectina isolada das mesmas sementes de *D. reflexa*, DrfL I, que é específica à glicose/manose e não à lactose.

Tabela 1 – Inibição da atividade hemaglutinante da DrfL II por carboidratos

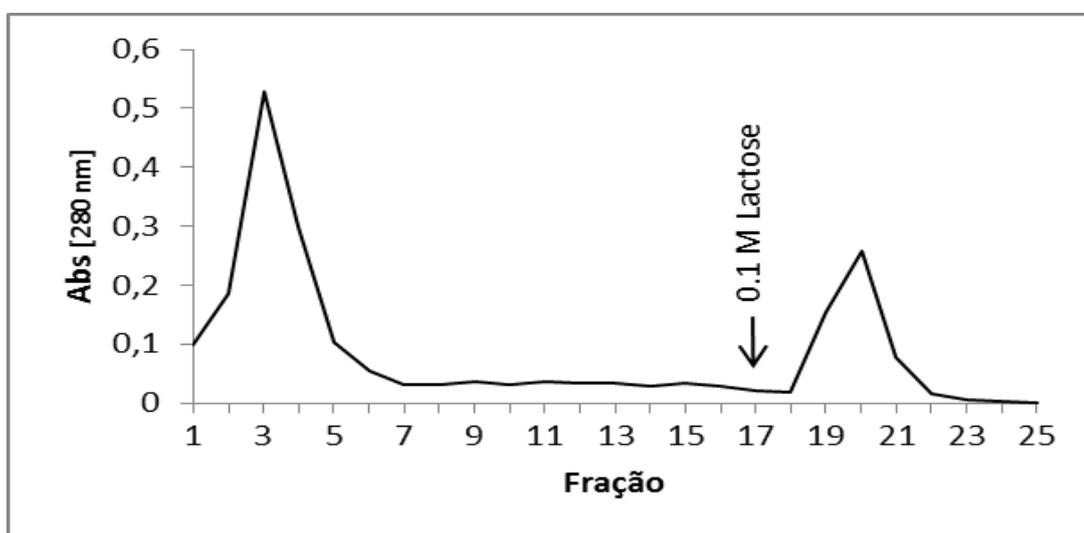
Carboidratos	MIC ¹ (mM)
D-glicose	NI
D-manose	NI
D-galactose	NI
D-ribose	NI
D-rhamnose	NI
α -metil-D-manosídeo	NI
α -lactose	25
L-fucose	NI
Desoxirribose	NI
Inosina	NI

¹Minima concentração Inibitória. ²Açúcar não inibitório a uma concentração de 100 mM

A lectina DrfL II pura foi, então, obtida a partir de dois passos cromatográficos, o primeiro em Sephadex G-50 e o segundo em coluna de Sepharose-lactose. O pico não retido (P1) da Sephadex G-50 foi eluído da coluna com NaCl 150 mM contendo MnCl₂ 5 mM e

CaCl₂ 5 mM e antes de ser submetido a segunda cromatografia, foi dialisado contra água destilada para retirada de sais e liofilizado visando diminuir o volume do material a ser aplicado em outra etapa cromatográfica. O material em pó obtido foi ressuscitado em NaCl 150 mM contendo MnCl₂ 5 mM e CaCl₂ 5 mM na concentração de 1 mg/mL, centrifugado (spin) e o sobrenadante foi submetido à segunda cromatografia em Sepharose-lactose (Figura 3). O pico não retido foi eluído com NaCl 150 mM contendo MnCl₂ 5 mM e CaCl₂ 5 mM e a lectina DrfL II pura foi eluída em seguida com solução de 100 mM de lactose contendo NaCl 150 mM.

Figura 3. Perfil cromatográfico da DrfL II em coluna de afinidade de Sepharose-lactose



Cromatografia de afinidade em matriz de Sepharose-lactose. A cromatografia ocorreu a um fluxo de 1 ml/min, frações proteicas foram coletada em volume de 1 mL e monitoradas quanto ao conteúdo proteico por leitura de absorvância a 280 nm.

A segunda lectina purificada de *D. reflexa* apresentou um conteúdo proteico solúvel total de 0,003 mg/mL e uma atividade específica de 1.365.333,3 H.U./mg. Quando comparado esses valores com o conteúdo proteico solúvel (2,39 mg/mL) e a atividade específica (219.367,4 mg/mL) do extrato proteico bruto, é possível notar um aumento de 6,22 vezes do valor da atividade específica (Tabela 2), confirmando o aumento da concentração da lectina de interesse através dos passos de purificação. A atividade específica da lectina DrfL II também se mostrou maior que a da DrfL I, que apresentou um grau de pureza aumentado de 4,98 vezes (Pinto-Junior *et al.*, 2015) em relação ao do extrato bruto. O grau de pureza observado após as cromatografias de afinidade está em concordância com os observados em

outras lectinas lactose específicas como DGL II de *Dioclea grandiflora* e CEL II de *Canavalia esiformis*, com valores de 4,21 e 2,94 respectivamente (Melgarejo *et al.*, 2005) e DLL II com valores de 3,9 (Pérez *et al.*, 1998).

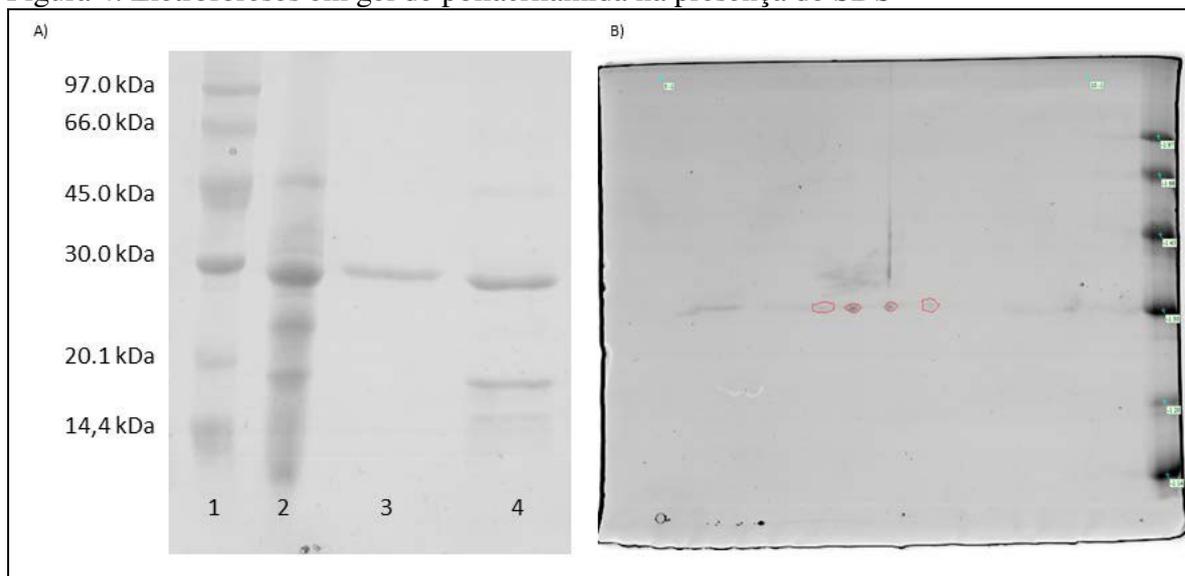
Tabela 2 – Purificação da lectina lactose específica de sementes de *D. reflexa*

Fração	^a Conteúdo total		^c Atividade	^d Purificação
	de proteínas (mg/ml)	^b U.H./mL	específica (U.H./mg)	
Extrato bruto	2,39	524.288	219.367,4	1
Sepharose-lactose (PII)	0,003	4.096	1.365.333,3	6,22

^aBradford, 1976; ^bUnidades de Hemaglutinação; ^cAtividade específica obtida a partir da razão entre os valores de unidades de hemaglutinação e o conteúdo de proteínas; ^dGrau de purificação da lectina dado pela razão entre os valores de atividade específica das frações Sepharose-lactose e extrato bruto

A figura 4A da SDS-PAGE na presença de 2-mercaptoetanol mostra o perfil eletroforético de ambas as lectinas das sementes de *D. reflexa*. DrfL II (raia 3) se caracteriza por apresentar somente uma banda de peso molecular aparente levemente abaixo de 30 kDa, diferente da DrfL I (raia 4), que apresenta um perfil composto por uma cadeia α (29-30 kDa), um fragmento β (16-18 kDa) e um fragmento γ (12-13 kDa) característicos de lectinas ConA like (Bowles *et al.*, 1986; Ceccatto *et al.*, 2002). Esse padrão de uma banda única em torno de 30 kDa já havia sido encontrado em outras lectinas lactose específicas e é similar ao apresentado nas lectinas CEL II e DGL II de *C. ensiformis* e *D. grandiflora* respectivamente, como descrito por Melgarejo *et al.*, (2005) e designado lectinas tipo II.

Figura 4. Eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS



(A) SDS-PAGE 12,5% apresentando as etapas de purificação da lectina. Raia 1: Marcadores de massa molecular fosforilase b (97,0 kDa), albumina (66,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). Raia 2: Pico não retido da primeira cromatografia. Raia 3: Lectina DrfL II. Raia 4: Lectina DrfL I. (B) Gel de eletroforese bidimensional da DrfL II pura, mostrando a presença de quatro isoformas.

Devido à ausência de fragmentos β e γ , e à presença de uma banda com peso molecular similar à da cadeia α na DrfL II no gel de SDS-PAGE, é possível se sugerir que não ocorre o processamento pós traducional de permutação circular descrito por Carrington *et al.* (1985) comum das lectinas, em que um polipeptídeo inicial sofre rearrajos internos nos quais seus fragmentos β e γ , são transposicionados e religados. Os fragmentos β e γ observados em perfil eletroforeticos de lectinas que sofrem permutação circular são resultados da ineficiencia da religação de parte desses fragmentos para formar a cadeia α (Pérez *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2009). A banda com peso molecular aparente da cadeia α mostrada no gel pode ser, então, o polipeptídeo inicial, chamado de pré-proteína, sem processamento, resultado em uma lectina ativa com uma sequência de pré-proteína. O tipo de processamento pós-traducional que a DrfL II sofre ainda precisa ser analisado a fundo.

A eletroforese, na ausência de aquecimento, revelou uma banda em torno de 60 kDa, implicando que a lectina em seu estado nativo está provavelmente oligomerizada. O pI encontrado por eletroforese bidimensional foi levemente ácido, em torno do pH de 6,1 (Figura 4B), semelhante aos pIs das lectinas DGL II, CEL II (Melgarejo *et al.*, 2005) e DLL II (Pérez *et al.*, 1998) com presença de quatro isoformas. DrfL II foi corada pela reação do ácido periódico de Schiff, sugerindo que ela é uma glicoproteína, resultado esperado de uma

lectina que não sofre processamento pós traducional e, portanto, não perde a glicosilação da região interna presente na estrutura primária das pré-proteínas.

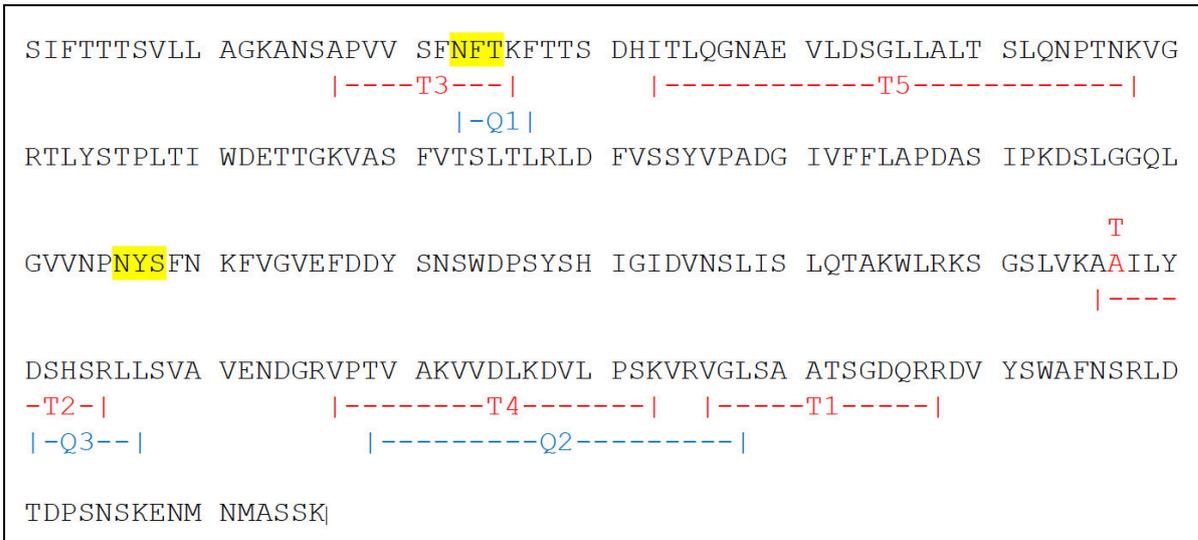
Como resultado da digestão com as enzimas proteolíticas tripsina e quimiotripsina foram obtidos cinco e três peptídeos, respectivamente. As sequências desses peptídeos foram obtidas por espectrometria de massa em tandem (Tabela 3). Todas os fragmentos oriundos de digestão com quimiotripsina se sobrepõem em algum ponto aos fragmentos da digestão trípica (Figura 5) resultando em 81 resíduos de aminoácidos sequenciados. A busca por sequências similares nos bancos de dados do NCBI apresentou a pré-proteína camptosemina de *Camptosema ellipticum* (Uniprot id C7ACD0), uma lectina também específica a lactose, com um resultado de 55% de identidade e um *e value* de $1e-05$ seguida pelo domínio beta da lectina de *Mendicago truncatula* (Uniprot id G7IXH3), com resultado de 52% de identidade e *e value* de $4e-04$. Os outros resultados de alinhamento encontrados por BLAST tiveram *e values* acima do desejado e foram desconsiderados. Adotando-se a camptosemina como template, os peptídeos da DrfL II obtidos por espectrometria de massa cobrem aproximadamente 30% da sequência total dessa proteína. A pouca quantidade de informação publicada sobre as sequências primárias de lectinas específicas a lactose (lectina do tipo II) prejudica a obtenção de melhores resultados de alinhamento de lectinas do tipo II entre si e a comparação destas com as do tipo I específicas a glicose/manose obtidas das mesmas sementes.

Tabela 3 – Sequência dos peptídeos de DrfL II

Peptídeo	Sequência
T1	VGLSAATSGDQRR
T2	A(AT)ILYDSHSR
T3	APVVSFNFTK
T4	VPTVAKVVDLKDVLPK
T5	ITLQGNAEVLDSGLLALTSLQNPTNK
Q1	NFTKF
Q2	TVAKVVDLKDVLPKVRGL
Q3	DSHSRL

Peptídeos trípticos (peptídeos T) e quimiotrípticos (peptídeos Q) sequenciados por espectrometria de massas em tandem.

Figura 5. Peptídeos da DrfL II

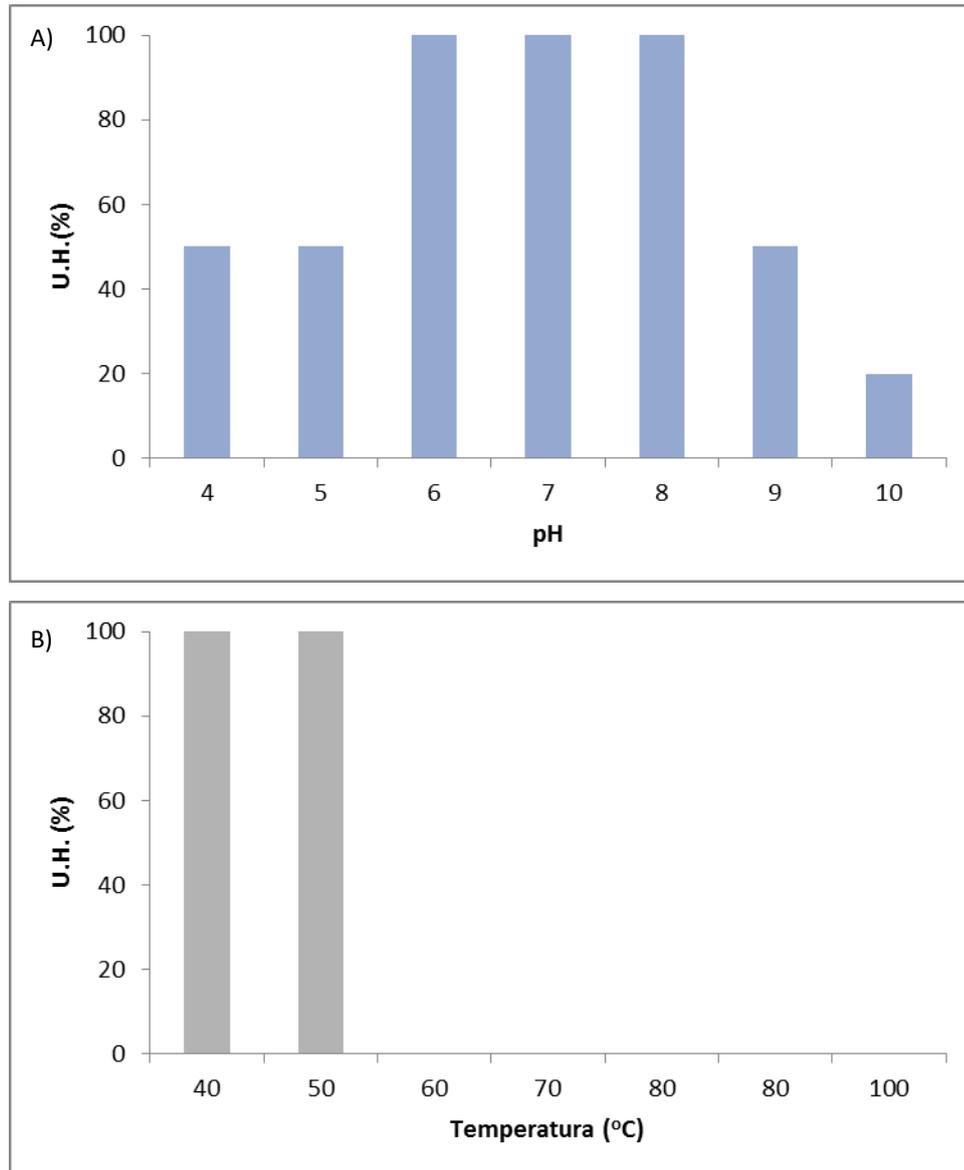


Sequência de aminoácidos dos peptídeos de DrfL II oriundos da digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q) usando a pré-proteína camptosemina como “template”.

Como resultado dos ensaios de caracterização físico-química, a lectina DrfL II manteve sua atividade hemaglutinante mesmo após ser incubada em um amplo intervalo de pH, tendo sua atividade ótima entre os pHs de 6 e 8, mas apresentando uma menor, porém ainda considerável atividade de 50% em pH ácido (4,0 e 5,0). Em meio básico, DrfL II perdeu 50% da sua atividade hemaglutinante ao atingir pH 9,0 seguida por um decréscimo de apenas 25% em pH 10,0 (Figura 6A). A DrfL II apresenta uma menor estabilidade a uma ampla variedades de pH do que a também específica a lactose camptosemina, que mantém sua estrutura, e consequentemente atividade, em intervalos de pH variando de 2 a 10, como descrito por Batista e colaboradores (2010) em ensaios de anisotropia de fluorescência polarizada.

Considerando o efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante, DrfL II exibiu baixa estabilidade em temperaturas acima de 60 °C (Figura 6B) expresso pelo rápido decrescimento de 100% da atividade hemaglutinante a essa temperatura, apresentando um comportamento similar ao da camptosemina, que se desnatura a temperaturas acima de 60 °C (Batista *et al.*, 2010). Os efeitos que variações do pH e temperatura causam na estabilidade da DrfL II são similares aos apresentados pela primeira lectina de *D. reflexa* (Pinto-Junior *et al.*, 2015).

Figura 6. Características físico-químicas da DrfL II.



Ensaio de atividade hemaglutinante de DrfL II contra sangue de coelho tripsinizado após tratamento em diferentes pHs (A) e temperaturas (B).

No que diz respeito à dependência de íons divalentes, DrfL II não apresentou diferença na atividade hemaglutinante após diálise contra EDTA, em desacordo com os resultados demonstrados pela DrfL I (Pinto-Junior *et al.*, 2015). Isso pode sugerir que essa nova lectina não seja cátion dependente, resultado que contrasta com o perfil da maioria das lectinas do gênero *Dioclea* (Cavada *et al.*, 2001), ou, mais provavelmente, que o tratamento com EDTA foi ineficaz na remoção total dos metais fortemente ligados à estrutura da lectina, como previamente sugerido por Santiago e colaboradores (2014) e Osterne e colaboradores (2014) para as lectinas de *Diocleinae Canavalia oxyphylla* e *Canavalia virosa*,

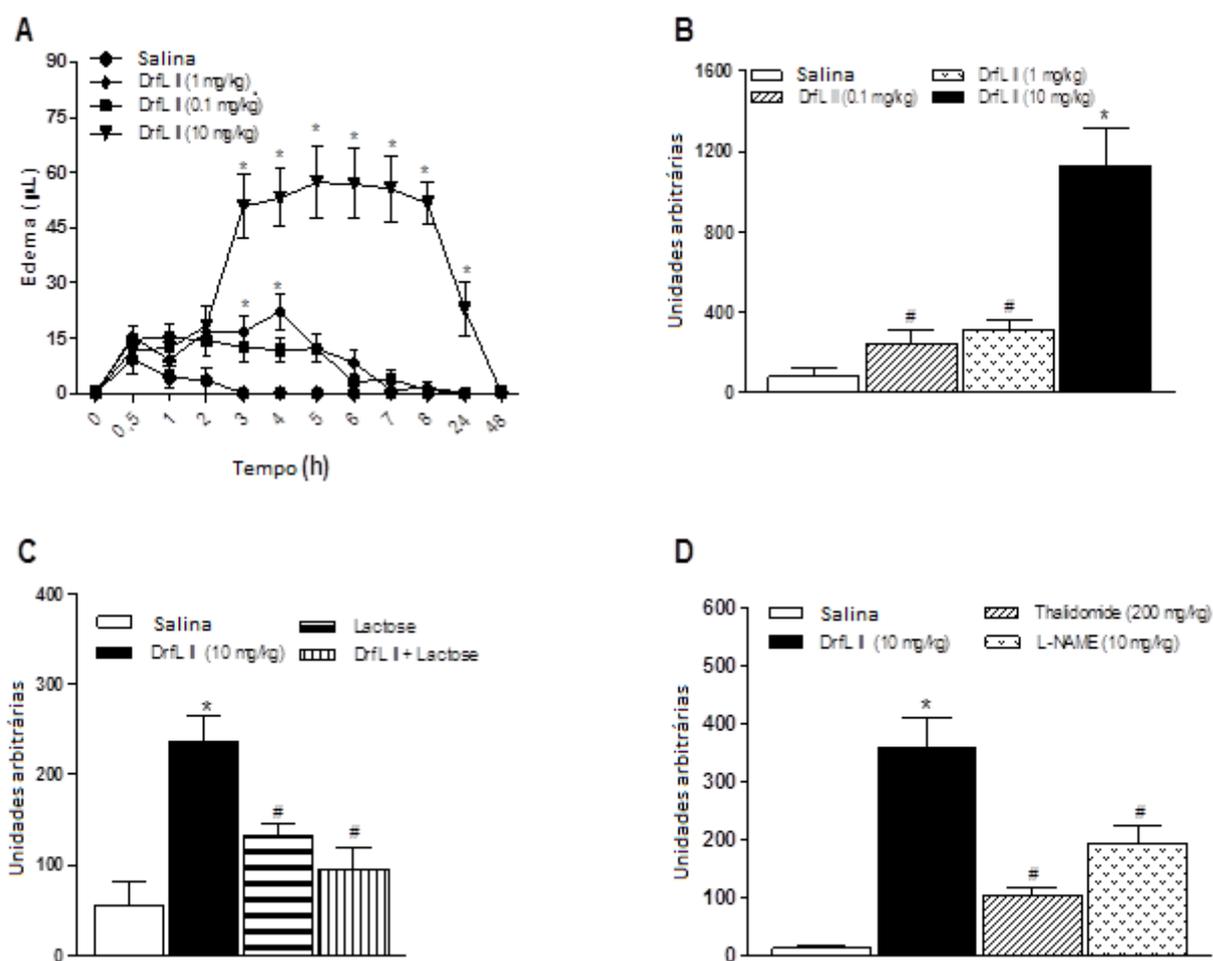
respectivamente. A dependência ou não de cátions em lectinas específicas a lactose da tribo Diocleinae pode ser esclarecida através da cristalografia dessas lectinas e análise quanto à presença das nuvens eletrônicas desses ligantes, como foi determinada a presença dos ligantes cálcio e magnésio na estrutura da CRL II (PDB id: 3A0K).

DrfL II se mostrou não tóxica à náuplios de artemia nas concentrações testadas, o que contrastou com o típico efeito tóxico de outras lectinas ConA-like (Arruda *et al.*, 2013), que usualmente apresentam efeitos tóxicos elevados com valores de LC_{50} entre 2,52 e 15,5 $\mu\text{g/mL}$. A caracterização da toxicidade utilizando-se *Artemia* sp. ainda não foi amplamente estudada em lectinas do gênero Dioclea específicas a lactose, sendo DrfL II a primeira a ter esse parâmetro determinado. Lectinas lactose específicas de outros gêneros, contudo, como a lectina de *Abrus pulchellus* (Ramos *et al.*, 1998) apresenta alta toxicidade notável, em contraste com os resultados da DrfL II. Os testes de toxicidade utilizando artemia são estabelecidos como um bom modelo na avaliação da toxicidade de diferentes substâncias, como efluentes industriais (Martins *et al.*, 2009), micotoxinas, anestésicos e toxinas de plantas, entre outros (dos Santos *et al.*, 2010).

Os testes de atividade edematogênica da DrfL II relevaram que a lectina nas concentrações de 1 mg/kg ($16,6 \pm 4,2 \mu\text{L}$) e 10 mg/kg ($50,6 \pm 8,8 \mu\text{L}$) induziram edema de pata, que foi iniciado três horas após a injeção da lectina, comparado com a injeção de solução salina ($0,0 \pm 0,0 \mu\text{L}$). O edema induzido por DrfL II a 1 mg/kg durou por um período de 4 h ($22,1 \pm 4,9 \mu\text{L}$), enquanto que o edema induzido a 10 mg/kg remanesceu significativo por um período de 24 h após a administração da lectina ($22,8 \pm 7,5$) (Figura 7A). A área sob a curva dose mostrou que o curso temporal do efeito edematogênico da DrfL II (10 mg/kg) foi aumentado de 14 vezes ($1127,0 \pm 188,7$ unidades arbitrárias) comparado à salina ($81,2 \pm 39,4$) (Figura 7B). Da mesma forma, o efeito edematogênico induzido por DrfL II (10 mg/kg) ($236,6 \pm 28,7$) foi inibido em 59% ($95,6 \pm 24,6$) após a incubação da lectina com seu açúcar ligante lactose na concentração de 100 mM (Figura 7C), demonstrando o reconhecimento da lactose pelos domínios da lectina e a modulação do efeito da DrfL II via domínio da lectina. Esses dados estão de acordo com os apresentados pela DrfL I, que manteve a duração de seu efeito edematogênico significativo por 9 h e foi inibida pelo seu açúcar ligante α -metil-manosídeo (Pinto-Junior *et al.*, 2015). Além disso, o efeito da DrfL II foi reduzido em 71% em animais que haviam sido previamente tratados com talidomida (inibidor do TNF- α) ou de 46% com L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) (Figura 7D), sugerindo a função moduladora de mediadores como o óxido nítrico e a citocina primária TNF- α , que têm sido associados com processos inflamatórios agudos. O TNF- α é responsável pelo aumento da expressão de

moléculas de adesão em células endoteliais e NO pela ativação do NF- κ B (fator nuclear kappa B), que leva à formação de diversos fatores pró-inflamatórios (Vieira *et al.*, 2009). A participação do NO no efeito inflamatório de lectinas de leguminosas tem sido demonstrado para lectinas específicas a glicose/manose (Assreuy *et al.*, 2009; Pinto-Junior *et al.*, 2015), mas para lectinas com especificidade de ligação à lactose, essa foi a primeira demonstração, indicando o subsequente efeito edematogênico dessa lectina.

Figura 7. Efeito inflamatório da DrfL II

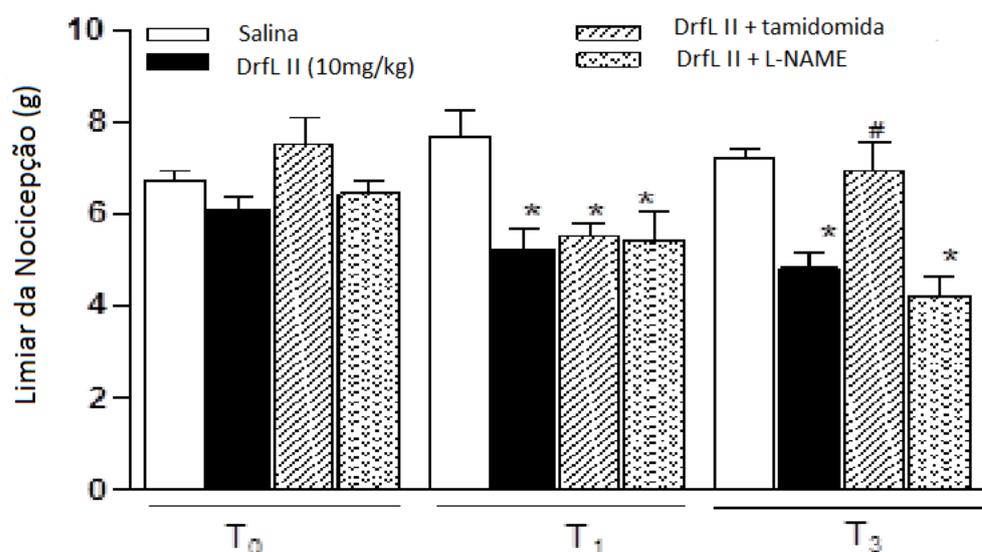


O edema de pata foi induzido pela DrfL II (0,1; 1,0 e 10,0 mg/kg; s.c.), medido antes (tempo zero) e a 0,5-48 h após estímulo e expresso como (A) variação do volume da pata (mL) ou (B) unidades arbitrárias; (C) DrfL II (10 mg/kg) sozinha ou associada com lactose; (D) DrfL II sozinha ou em animais previamente tratados com talidomida ou L-NAME. Média \pm Erro padrão da média. (n = 6-8). ANOVA e Bonferroni. *p < 0,05 comparado à salina; #p < 0,05 comparado à DrfL II (10 mg./kg).

Quanto à avaliação da atividade hipernociceptiva, foi demonstrado que DrfL II reduz o limiar de respostas nociceptivas de camundongos (hipernocicepção) em todos os tempos (T₀, T₁ e T₃) e que o pré-tratamento com talidomida (inibidor de TNF- α) aumentou em

30% o limiar de hipernocicepção somente no T₃ (Figura 8). Esses dados demonstram o envolvimento do TNF- α na resposta hipernociceptiva induzida pela DrfL II. TNF- α induz a produção de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β), que estimula a ativação da ciclooxigenase resultando em produção de prostanóides e hipernocicepção inflamatória (Cunha *et al.*, 1992).

Figura 8. Efeito hipernociceptivo da DrfL II



Fonte: elaborado pela autora. Camundongos foram previamente tratados com talidomida (200 mg/kg; s.c.), L-NAME (10 mg/kg, i.v.) ou salina (i.v.), 30 min antes da injeção interplantar da DrfL II (10 mg/kg, s.c.). A hipernocicepção foi avaliada pelo teste de von Fey antes (tempo zero) e 1-3 h (T₀, T₁ e T₃) após o estímulo. Média \pm Erro padrão da média. (n = 6-8). Testes ANOVA e Bonferroni. *p < 0,05 comparado à salina; #p < 0,05 comparado à DrfL II (10 mg./kg).

Esses resultados já haviam sido observados nas lectinas de *Canavalia maritima*, *Canavalia grandiflora*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea violacea* e *Cratylia floribunda* como descrito por Holanda e colaboradores (2009). Essas lectinas, todas da sub-tribo Diocleinae e específicas a glicose/manose, apresentaram redução da hipernocicepção quando administradas por via oral. Esse trabalho foi o primeiro a relatar a hipernocicepção em lectinas específicas a lactose. Moléculas com esse tipo de efeito podem ter aplicabilidades biotecnológicas como fármacos por elas induzirem a inflamação em uma área específica, aumentando o influxo de neutrófilos para a região e promovendo o tratamento da área afetada, principalmente se forem o caso de regiões de difícil acesso de neutrófilos.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi relatado originalmente o isolamento e a caracterização físico-química, estrutural e biológica de uma nova lectina lactose específica isolada de sementes de *Dioclea reflexa* (DrfL II) com similaridade a camptosemina. Demonstrou-se também pela primeira vez o efeito inflamatório e a toxicidade de uma lectina lactose específica, envolvendo o sítio de ligação a carboidratos e os mediadores inflamatórios NO e TNF- α .

Estudos estruturais serão realizados para finalizar a estrutura primária e tridimensional desta proteína para melhor compreender sua função nos modelos de inflamação.

REFERÊNCIAS

- AHMED, F. E. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. **Expert Rev Proteomics**, v. 5, n.6, p.841-864, 2008.
- ALENCAR, V. B. M. *et al.* Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 9, p. 1805–1814, 2005.
- ALLER, M.A; ARIAS J.L.; ARIAS J.I.; SANCHEZ-PATAN, F.; ARIAS J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202-209, 2007.
- AMBROSI, M. *et al.* Lectins : tools for the molecular understanding of the glycode. p. 1593–1608, 2005.
- ARNOLD, A. E. and ENGELBRECHT, B. M. J. Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. **Journal of Tropical Ecology**, v. 23, n. 03, p. 369-372, 2007.
- ARRUDA, F. V. S. *et al.* Toxicity and binding profile of lectins from the genus *Canavalia* on brine shrimp. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, n. 1, p. 120913143848009, 2012.
- ASSREUY, A. M. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201–210, 1997.
- ASSREUY, A. M. S. Atividade pró-inflamatória da espermedesina PSP-I/PSP-2 em ratos: mecanismo de ação e papel de células residentes. Diss. Universidade Federal de Ceará, 2000.
- ASSREUY, A. M. S. *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009.

BALZARINI, J. Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. **Antiviral research**, v. 71, n. 2, p. 237-247, 2006.

BARBOSA, T. *et al.* In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.

BASU, P S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 373-376, 2003.

BATISTA, Fernanda AH *et al.* Camptosemin, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. **European Biophysics Journal**, v. 39, n. 8, p. 1193-1205, 2010.

BAUMANN, C.; RUDIGER, H.; STROSBERG, A. D. A comparison of the two lectins from *Vicia cracca*. **FEBS letters**, v. 102, no. 2, p. 216-218, 1979.

BELTRÃO, E, I. C. *et al.* Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 125-134, 1998.

BEZERRA, M. J. B. *et al.* Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 4, p. 807-15, 2013.

BOWLES, D. J. *et al.* Posttranslational Processing of Concanavalin A precursors in Jackbean Cotyledons. **Journal of Cell Biology**, v. 102, n. April, p. 1284-1297, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRINCK, U. *et al.* Detection of inflammation-and neoplasia-associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. **Cells Tissues Organs**, v. 161, n. 1-4, p. 219-233, 1998.

CANTÚ, M. D. *et al.* Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Quim. Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-675, 2008.

CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A. E. H. D.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, n. 5997, p. 64-67, 1984.

CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, Characterization and Behavior during Germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113–120, 1984.

CAVADA, B. S. *et al.* Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. **Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry** (E. Van Driessche, P. Rougé, S. Beeckmans & TC Bøghansen, eds.). **Textop, Hellerup**, v. 11, p. 74-80, 1996.

CECCATTO, V. M. *et al.* Purification and partial characterization of a lectin from *Canavalia grandiflora* benth. seeds. **Protein and peptide letters**, v. 9, n. 1, p. 67-73, 2002.

CHRISPEELS, M. J. Bioynthesis, processing and transport of storage proteins and lectins in cotyledons of developing legume seeds. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 304, p. 309–322, 1984.

CUNHA, F. Q. *et al.* The pivotal role of tumour necrosis factor α in the development of inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, p. 285–293, 2002.

DENNIS, J. W., GRANOVSKY, M. and WARREN, C.E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects** v. 1473.1, p. 21-34, 1999.

DOS SANTOS, A. F. *et al.* Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource technology**, v. 101, n. 2, p. 794-798, 2010.

ETZLER, M. E. *et al.* Subcellular Localizations of Two *Dolichos biflorus* Lectins '. **Plant physiology**, v. 76, p. 871–878, 1984.

FIGUEIREDO, J. G.; *et al.* Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, no. 6, p. 736-744, 2009.

FINNEY, D. J. Probit analysis. 1952.

FREIRE, M. G. *et al.* Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 61-68, 2002.

FREIRE, M. G. M. *et al.* Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 275–280, 2003.

GABIUS, H. J. *et al.* From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011.

GAIDAMASHVILI, M.; VAN STADEN, J.; ELOFF, J. N. Lectin-like proteins from South African plants used in traditional medicine. **South African Journal of Botany**, v. 68, n. 1, p. 36-40, 2002.

HOFFMAN, E.; STROOBANT, V.; *Mass Spectrometry, Principles and Methods*, 3rd Edition, 2007.

HOLANDA, F. R. *et al.* Antinociceptive activity of lectins from Diocleinae seeds on acetic acid-induced writhing test in mice. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 9, p. 1088-1092, 2009.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.

KAKU, H.; PEUMANS, W. J.; GOLDSTEIN, I. J. Isolation and characterization of a second lectin (SNA-II) present in elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 277, no. 2, p. 255-262, 1990.

KAUFMANN, R.; Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) mass spectrometry: a novel analytical tool in molecular biology and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 41, p. 155 – 175, 1995.

KAUR, M. *et al.* A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. **BMB Reports**, v. 39, n. 4, p. 432-440, 2006.

KIM, Y.W.; WEST, X. Z.; BYSOVA, T.V. Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. **J. Mol. Med.** v.3, p. 323 - 328, 2013.

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

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

LANDUCCI, E. C. T. *et al.* Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 3, p. 578-583, 1995.

LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 2, p. 296-306, 2006.

LI, Y. R. *et al.* A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1780, n. 1, p. 51-57, 2008.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews** (Washington, DC, United States), v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998.

LIU, B *et al.* *Polygonatum cyrtoneuma* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS–p38–p53 pathway. **Cancer letters**, v. 275, n. 1, p. 54-60, 2009.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta** - General Subjects, v. 1572, n. 2-3, p. 198–208, 2002.

MACEDO, M. L. R. *et al.* Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology** - A Molecular and Integrative Physiology, v. 146, n. 4, p. 486–498, 2007.

MANN, M.; HØJRUP, P.; ROEPSTORFF, P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. **Biological Mass Spectrometry**, v. 22, n. 6, p. 338-345, June 1993.

MARTINS, R. *et al.* Ecotoxicological analysis of cashew nut industry effluents, specifically two of its major phenolic components, cardol and cardanol. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 3, p. 363-368, 2009.

MELGAREJO, L. M.; VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 3, p. 315–324, 2005.

MODY, I., and MACDONALD, J. F. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 356-359, 1995.

MOLCHANOVA, V. *et al.* A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 2, p. 184-193, 2007.

MOREIRA, R. De A.; PERRONE, J. C.. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, n. 5, p. 783-787, 1977.

MOREIRA, R. A. *et al.* Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, v. 158, p. 63–69, 1983.

MOREIRA, R. D. A *et al.* Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1991.

- MOURA, R. M. *et al.* CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania* promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 145, n. 4, p. 517-523, 2006.
- NICOLSON, G. L.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M. E. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry**, v. 13, n. 1, p. 196–204, 1974.
- OHIZUMI, Y. *et al.* Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2896–2902, 2009.
- OSTERNE, V. J. S. *et al.* Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342-3353, 2014.
- PALZKILL, T. Protein Identification and Analysis. **Proteomics**, Kluwer Academic Publishers, p. 5 – 22, 2002.
- PARIJS, J. VAN *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991.
- PEREIRA-JUNIOR, F. N. *et al.* Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 8, p. 443-449, 2012.
- PÉREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 843–853, 1998.
- PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. VAN. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.
- PINTO-JUNIOR, V. R. *et al.* Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, 2015.

RAMOS, M. V. *et al.* Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8, p. 193-199, 1996.

RAMOS, M. V. *et al.* Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 477-484, 1998.

ROCHA, B. A M. *et al.* Purification, characterization, and preliminary x-ray diffraction analysis of a lactose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.152.3, p. 383 - 393, 2009.

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

RUDIGER, H.; GABIUS, H.-J. Plant lectins : Occurrence , biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, p. 589–613, 2002.

SANTIAGO, Mayara Q. *et al.* Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 3, p. 117-123, 2014.

SHAGGER, H.; VAN JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SHANNON, L. M.; HANKINS, C. N. Enzymatic properties of phytohemagglutinins. **The Phytochemistry of Cell Recognition and Cell Surface Interactions**. Springer US, p. 93-114, 1981.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB journal** : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Springer Science & Business Media, 2003.

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

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

STEWART, I. I.; Electrospray mass spectrometry: a tool for elemental speciation. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, p. 1649 – 1695, 1999.

SUJATHA, M. S.; SASIDHAR, Y. U.; BALAJI, P. V. Energetics of galactose–and glucose–aromatic amino acid interactions: Implications for binding in galactose-specific proteins. **Protein Science**, v. 13, n. 9, p. 2502-2514, 2004.

SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. Hematin and the peroxidase of fig sap. **Enzymologia**, v. 1, p. 133, 1936.

TULLIS, R. H. *et al.* Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients. **Blood Purification**, v. 27, n. 1, p. 64-69, 2009.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant Lectins : A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Plant Sciences**, v. 17, n. June, p. 576–692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Cytoplasmic/nuclear plant lectins: A new story. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 10, p. 484–489, 2004.

VAN DAMME, E. J. *et al.* Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 236, n. 2, p. 419–27, 1996.

VAN DAMME, E. J.M. Lectins as tools to select for glycosylated proteins. **Gel-Free Proteomics**, p. 289-297, 2011.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology** v. 3, p. 97-130 1993.

VERRI, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116–138, 2006.

VIEIRA, S. M. *et al.* A crucial role for TNF- α in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 779-789, 2009.

WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. **Biochemistry**, v. 78, n. 7, p. 679–96, 2013.