



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

**MAYARA TORQUATO LIMA DA SILVA**

**DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA PRIMÁRIA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR**  
**DOS EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE UMA LECTINA DE *Canavalia bonariensis***  
**LINDL**

**FORTALEZA**  
**2015**

**MAYARA TORQUATO LIMA DA SILVA**

**DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA PRIMÁRIA E AVALIAÇÃO PRELIMINAR  
DOS EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE UMA LECTINA DE *Canavalia bonariensis*  
LINDL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará em 2015, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

**FORTALEZA**

**2015**

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)

---

- S581 Silva, Mayara Torquato Lima da.  
Determinação da estrutura primária e avaliação preliminar dos efeitos inflamatórios de uma lectina de *Canavalia bonariensis* lindl / Mayara Torquato Lima da Silva. – 2015.  
62 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2015.  
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. *Canavalia bonariensis*. 2. Lectina. 3. Diocleinae. 4. Filogenia . 5. efeito endematogênico. I. Título.  
CDD 660.6
-

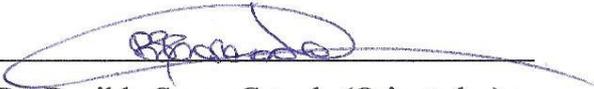
MAYARA TORQUATO LIMA DA SILVA

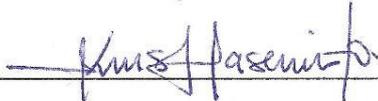
**DETERMINAÇÃO DE ESTRUTURA PRIMÁRIA E AVALIAÇÃO  
PRELIMINAR DOS EFEITOS INFLAMATÓRIOS DE UMA LECTINA DE  
*Canavalia bonariensis* LINDL**

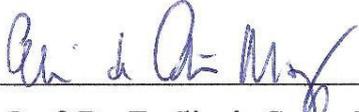
Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará em 2015, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: 10/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

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

  
Prof.ª Dr.ª Kyria Santiago do Nascimento (Co-orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
Prof. Dr. Emílio de Castro Miguel  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
Prof. Dr. Jorge Luis Martins  
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Aos meus pais, Lino e Joseleuda, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus objetivos, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido força, saúde e coragem para a realização deste trabalho, agradeço por todas as vitórias e pelas situações de aprendizado nos momentos adversos.

À meu orientador Prof. Benildo Cavada, por toda confiança depositada em mim e por toda orientação e ensinamentos repassados durante todos esses anos.

À minha co-orientadora, Profa. Kyria Santiago, por toda ajuda, paciência e disponibilidade nos momentos de maior necessidade

Aos professores Jorge Martins e Emílio Miguel, pela disponibilidade de terem aceitado prontamente o convite de participar desta banca de dissertação

Aos professores Celso Nagano e Ana Maria Assreuy, pela fundamental colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos conquistados nas Pós-graduação de Biotecnologia de Recursos Naturais, por toda ajuda e companheirismo, em especial a Cleane, Ivanice e Simone, que estiverão presentes desde os primeiros momentos, tornando o dia-a-dia sempre agradável.

À todos os professores e funcionários da Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

À todos os amigos do BioMol-Group Júlia, Sâmia, Renata, Suzete, Luciana, Ivanice, Simoni, Cleane, Clareane, Cláudia, Gleiciane, Larissa, Davi, Rômulo, Daniel, Ronniery, Júnior, Jorge, Batista, Bruno Lopes, Ana Cláudia, Thaíz, Mayara Queiroz, Vanir, Vinícius e Alfa. Durante esses anos vocês sempre estiveram presentes nos momentos de trabalho e de descontração, por isso obrigada por todos os ensinamentos e pelos bons momentos.

À minha mãe Joseleuda, meu pai Lino e meu irmão João Marcello, por serem os verdadeiros pilares que sustentam toda a minha caminhada e que sempre dão apoio incondicional a todas as minhas decisões .

Ao meu namorado Júnior Queiroz, por toda amizade, carinho, incentivo e ajuda que foram fundamentais para a conclusão de mais essa etapa da minha vida.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Finalmente, a todos os demais que contribuíram para a realização deste trabalho os meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

“Não tenha medo de dar o seu melhor naquilo que parecem ser pequenas tarefas. De cada vez que conquista uma, fica mais forte. Se faz os pequenos trabalhos bem, os grandes tendem a cuidar-se de si mesmo.”

Dale Carnegie

## RESUMO

Lectinas são (glico) proteínas que se ligam de maneira específica e reversível a carboidratos. Essas proteínas, em particular as de origem vegetal, são consideradas importantes ferramentas nos estudos de glicobiologia. *Canavalia bonariensis* Lindl é uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, sub-tribo Diocleinae e nativa da região sul do país. Neste trabalho foi realizado a análise da sequência primária da CaBo (Lectina de *Canavalia bonariensis*), bem como avaliação preliminar dos efeitos pró-inflamatórios da lectina. A purificação da CaBo foi realizada por meio de cromatografia líquida e o processo foi monitorado por SDS-PAGE e atividade hemaglutinante. Se observou que a lectina purificada é caracterizada por um perfil eletroforético composto por uma banda superior de aproximadamente 25 kDa e duas bandas inferiores de massa molecular aparente de aproximadamente 14 e 12 kDa. CaBo foi testada quanto à termoestabilidade da sua atividade hemaglutinante após incubação por 1 hora em diferentes temperaturas perdendo atividade somente a 80°C após 1 hora. Quanto à estabilidade em diferentes pH, ela manteve-se estável em uma faixa de pH entre 7,0 e 9,0. A atividade da CaBo também foi afetada após diluição seriada na presença do agente quelante EDTA e foi recuperada significativamente após adição de CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub>, mostrando-se dependente de cátions metálicos bivalentes. A análise por espectrometria de massas indicou que a CaBo possui uma cadeia  $\alpha$  de massa 25512 Da e duas subunidades (cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ ) de massa 12999 Da e 12537 Da, respectivamente. A sequência primária da lectina foi determinada por associação das técnicas de espectrometria de massas sequencial e biologia molecular, pela tradução do cDNA do gene isolado da lectina. A CaBo apresentou alta similaridade sequencial com lectinas da mesma subtribo e a avaliação filogenética indicou que a proteína deva ser a mais primitiva dentre as lectinas do mesmo gênero. A CaBo apresentou atividade inflamatória no modelo de edema de pata de rato, sendo necessário realização testes complementares a fim de elucidar o efeito biológico da lectina.

**Palavras-chave:** *Canavalia bonariensis*; Lectina; Diocleinae; Filogenia; Efeito edematogênico.

## ABSTRACT

Lectins are (glycol) proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates. These proteins, in particular those from plant, are important tools in glicobiochemistry and glycobiology. *Canavalia bonariensis* Lindl is a species of Leguminosae family, Papilionoideae subfamily, tribe Phaseoleae, subtribe Diocleinae, native of the southern region of the country. In this work was realized the analysis of the primary sequence of CaBo (*Canavalia bonariensis* lectin) and preliminary evaluation of the pro-inflammatory effects of the lectin. The purification of CaBo was realized through affinity chromatographic and the process was monitored by SDS-PAGE and hemagglutinating activity. It was observed that the purified lectin is characterized by an electrophoretic profile that consists of a higher band with approximately 29 kDa, and two bottom bands with apparent molecular mass of 14 and 12 kDa. CaBo was tested for the thermostability of their hemagglutinating activity after incubation for one hour at different temperatures, losing activity only at 80° C after one hour. Regarding its stability at different pH, CaBo was stable in a pH range between 7.0 and 9.0. The CaBo activity was also affected after serial dilution in the presence of the chelating agent EDTA and it was recovered significantly after addition of CaCl<sub>2</sub> and MnCl<sub>2</sub>, proving to be dependent of divalent metal cations. The analysis by mass spectrometry indicated that CaBo has an  $\alpha$  chain with molecular mass of 25512 kDa and and two subunits ( $\beta$  and  $\gamma$  chains) with molecular mass of 12999 Da and 12537 Da, respectively. The primary sequence of the lectin was determined by a combination of tandem mass spectrometry and molecular biology, by the translation of cDNA isolated from the lectin's gene. CaBo presented high sequential similarity with lectins from the same subtribe and the phylogenetic evaluation indicated that the protein must be the most primitive among lectins from the same gender. CaBo showed inflammatory activity in the rat paw edema model, and it is necessary to realize others test in order to elucidate the biological effect of the lectin.

**Keywords:** *Canavalia bonariensis*; Lectin; Diocleinae; Phylogeny; Edematogenic Effect

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- BSA:** Albumina Sérica Bovina
- CaBo:** Lectina de *Canavalia bonariensis*
- CGL:** Lectina de *Canavalia gladiata*
- ConA:** Lectina de *Canavalia ensiformes*
- Cbol:** Lectina de *Canavalia boliviana*
- ConBr:** Lectina de *Canavalia brasiliensis*
- ConGr:** Lectina de *Canavalia graniflora*
- CPL:** Lectina de *Camptosema pedicellatum*
- CFL:** Lectina de *Cratylia floribunda*
- ConM:** Lectina de *Canavalia maritima*
- CTAB:** Brometo de cetiltrimetilamonio
- Da:** Dalton
- DDA:** Análise Direta de Dados
- DvirL:** Lectina de *Dioclea virgata*
- DVL:** Lectina de *Dioclea violacea*
- DRL:** Lectina de *Dioclea rostrata*
- DguiL:** Lectina de *Dioclea guianensis*
- DSL:** Lectina de *Dioclea sclerocarpa*
- EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetraácido
- ESI:** Ionização por Eletrospray
- EPM:** Erro padrão da média
- FT-ICR:** Transformada de Fourier- Ressonância Ciclotrônica Iônica
- GalNAc:** N-Acetylgalactosamina
- MS:** Espectrometria de Massas
- MS/MS:** Espectrometria de massas sequencial
- m/z:** Relação massa/carga
- PCR:** Reação de polimerização em cadeia
- PHA:** Lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*
- PPL2:** Lectina 2 de *Parkia platycephala*
- RIPs:** Proteínas inativadoras de ribossomos
- SDS:** Dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poli(acrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio

**TOF:** Tempo de Voo

**TxLCI:** Lectina do bulbo de tulipa

**U.H.:** Unidade Hemaglutinante

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biossíntese da Concanavalina A (ConA) -----	23
Figura 2 -	Vasodilatação durante a inflamação aguda -----	30
Figura 3 -	<i>Canavalia bonariensis</i> Lindl -----	32
Figura 4 -	Eletroforese SDS-PAGE da CaBo -----	44
Figura 5 -	Espectro de massa MALDI-ToF/MS da CaBo -----	45
Figura 6 -	Sequenciamento <i>de novo</i> do peptídeo T9 -----	47
Figura 7 -	Eletroforese em gel de agarose 1%: Extração do DNA genômico da <i>C. bonariensis</i> -----	48
Figura 8 -	Eletroforese em gel de agarose 1%: PCR do DNA genômico da <i>C.</i> <i>bonariensis</i> -----	48
Figura 9 -	Eletroforese em gel de agarose 1%: PCR <i>Colony</i> para confirmação dos clones de interesse -----	49
Figura 10 -	Sequência da cadeia alfa da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i> -----	50
Figura 11 -	Alinhamento das sequências de aminoácidos das lectinas de Diocleinae -----	51
Figura 12 -	Árvore filogenética exibindo as relações evolutivas entre as lectinas de Diocleinae -----	53
Figura 13 -	CaBo induz edema de pata em camundongos -----	54

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Tabela de purificação da CaBo -----	43
Tabela 2 -	Massa molecular e sequência dos peptídeos da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i> oriundos das digestões com tripsina e quimitripsina -----	47
Tabela 3 -	Similaridade entre a CaBo e demais lectinas da tribo Diocleinae -----	52

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> -----	17
2	<b>REVISÃO DE BIBLIOGRÁFICA</b> -----	19
2.1	<b>Lectinas: breve histórico e definição</b> -----	19
2.2	<b>Lectinas de plantas</b> -----	21
2.3	<b>Lectinas de leguminosas</b> -----	22
2.4	<b>Lectinas de Diocleinae</b> -----	24
2.5	<b>Aplicações biotecnológicas das lectinas vegetais</b> -----	25
2.6	<b>Ferramentas utilizadas para a caracterização estrutural de lectinas</b> -----	26
2.6.1	<i>Fundamentos de espectrometria de massas aplicados a estudos com proteínas</i> -----	26
2.6.2	<i>Biologia molecular como ferramenta para o estudo estrutural de lectinas de leguminosas</i> -----	28
2.7	<b>Aspectos gerais da inflamação e formação de edema</b> -----	29
2.7.1	<i>Atividades inflamatórias de lectinas vegetais</i> -----	30
2.8	<b><i>Canavalia bonariensis</i> Lindl.</b> -----	31
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> -----	33
3.1	<b>Purificação da lectina de sementes de <i>Canavalia bonariensis</i> Lindl</b> -----	33
3.1.1	<i>Preparo da Farinha</i> -----	33
3.1.2	<i>Extração de proteínas das sementes</i> -----	33
3.1.3	<i>Atividade hemaglutinante</i> -----	33
3.1.4	<b>3.1.4 Atividade Hemaglutinante Específica da CaBo</b> -----	34
3.1.5	<i>Cromatografia de Afinidade em Matriz de Sephadex G-50</i> -----	34
3.2	<b>Caracterização físico-química da lectina de sementes de <i>C. bonariensis</i></b> ----	35
3.2.1	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da CaBo</i> -----	35
3.2.2	<i>Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da CaBo</i> -----	35
3.2.3	<i>Efeito do agente quelante (EDTA) sobre a atividade hemaglutinante da CaBo</i> -----	36
3.2.4	<i>Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da CaBo</i> -----	36
3.2.5	<i>Determinação da massa molecular intacta da CaBo por espectrometria de massas</i> -----	36
3.2.6	<i>Digestão in gel e sequenciamento dos peptídeos da CaBo por espectrometria</i> 37	37

	<i>de massas</i> -----	
<b>3.3</b>	<b>Clonagem molecular da lectina da <i>Canavalia bonariensis</i></b> -----	<b>38</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Extração de DNA genômico</i></b> -----	<b>38</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Amplificação do gene codificador da lectina</i></b> -----	<b>39</b>
<b>3.3.3</b>	<b><i>Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T-easy</i></b> -----	<b>39</b>
<b>3.3.4</b>	<b><i>Transformação bacteriana</i></b> -----	<b>40</b>
<b>3.3.5</b>	<b><i>Purificação dos plasmídeos recombinantes e confirmação da transformação</i></b>	<b>40</b>
<b>3.3.6</b>	<b><i>Análise da sequência do fragmento</i></b> -----	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Análise filogenética da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i></b> -----	<b>41</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação do efeito edematogênico da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i></b> ----	<b>42</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Modelo Edema de Pata</i></b> -----	<b>42</b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>Análise estatística</i></b> -----	<b>42</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> -----	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Purificação da lectina de sementes de <i>Canavalia bonariensis</i> e análise físico-química</b> -----	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Determinação da massa molecular e sequenciamento proteico da CaBo por espectrometria de massas</b> -----	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Clonagem molecular da CaBo</b> -----	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação do efeito edematogênico da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i></b> ---	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> -----	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos centenas de lectinas já foram estudadas e caracterizadas nos mais diversos aspectos. Essas proteínas têm a capacidade de se ligar reversível e especificamente a carboidratos e estão presentes em variados fenômenos bioquímicos que acontecem dentro e fora das células. As características próprias das lectinas fazem com que elas tenham funções específicas e propriedades biológicas distintas e ainda possam ser utilizadas como ferramentas moleculares nas investigações de diversas características celulares.

Atualmente, estas proteínas têm mostrado aplicabilidades em diversas áreas científicas, que vão da medicina à agricultura, tendo em vista suas propriedades tais como, atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2007; OHIZUMI *et al.*, 2009, BENETEAU *et al.*, 2010), atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (FREIRE *et al.* 2003, BENJAMIN *et al.*, 1997, ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 2005), efeito vasodilatador em anéis de aorta (ASSEREUY *et al.*, 2009), e indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), entre outros. Assim, muitas destas proteínas são consideradas ferramentas básicas para áreas como a biotecnologia.

Apesar das lectinas vegetais apresentarem estruturas primárias bem conservadas e similaridade nas suas propriedades físico-químicas, também apresentam variabilidade quanto às várias propriedades/funções biológicas que podem desempenhar. Dessa forma, cada lectina pode ter sua potencialidade de aplicação, o que justifica que cada uma delas, por mais semelhante que possa parecer com outra lectina, mereça ser estudada isoladamente. A capacidade das lectinas de reconhecimento de carboidratos e glicoconjugados foi sendo conservada durante o tempo e o estudo filogenético dessas proteínas baseado nas suas estruturas primárias, permite acompanhar a inferência do processo evolutivo nessas espécies.

As lectinas de leguminosas, em especial as da subtribo Diocleinae são proteínas altamente similares, mas que apresentam diferenças na potência e eficácia das suas atividades biológicas (DELATORRE *et al.*, 2006). Desse modo, a detecção, o isolamento, a caracterização físico-química, biológica e estrutural de novas lectinas são importantes visto que novas e diferentes aplicabilidades podem ser encontradas para essas biomoléculas.

Assim, em busca de alcançar melhor compreensão destas proteínas e novas moléculas com aplicações biotecnológicas, o objetivo deste trabalho foi de purificar uma nova lectina presente em sementes de *Canavalia bonariensis* LINDL, realizar um estudo físico-

químico e estrutural e avaliar de modo preliminar os efeitos inflamatórios da proteína em modelo de edema de pata em camundongos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lectinas: breve histórico e definição.

A primeira descrição de lectinas ocorreu em 1888 por Peter Hermann Stillmark em sua tese de doutorado, analisando a toxicidade de extratos de mamona, *Ricinus communis*. A comunidade científica já havia identificado uma fração altamente tóxica extraída das sementes da mamona e Stillmark foi o primeiro a relatar a existência de uma proteína que era responsável por essa toxicidade e que era capaz de aglutinar eritrócitos, e a nomeou de Ricina. Esse estudo foi um marco para a bioquímica vegetal. Posteriormente, Hellin relatou que o jequiriti, *Abrus precatorius*, também era tóxico e possuía a mesma capacidade, nomeando a nova hemaglutinina de Abrina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Alguns anos mais tarde em 1890, Ehrlich, decidiu trabalhar com Ricina e Abrina no lugar de bactérias tóxicas em modelos de antígenos para estudos em imunologia. A utilização destas biomoléculas levou Ehrlich à descoberta dos princípios fundamentais da imunologia, quer seja o desvendamento da reação antígeno/anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral da mãe para seus descendentes. (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919 a primeira lectina de planta foi isolada por James B. Sumner na Universidade Cornell (Ithaca, Nova York) a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* e foi denominada de ConA. Duas décadas depois, Sumner e Howell (1936) relataram que a ConA aglutinava tanto células, como eritrócitos e leveduras como também precipitava glicogênio em solução. Eles também mostraram a inibição da atividade hemaglutinante da ConA por sacarose, demonstrando pela primeira vez a especificidade de lectinas por açúcares, sugerindo que poderia haver uma interação entre essas proteínas e carboidratos presentes na superfície celular (SHARON; LIS, 2004).

A habilidade das lectinas em reconhecer e aglutinar eritrócitos específicos foi então investigada por Boyd e Shapleigh (1954), que propuseram o termo “Lectina” (do latim "legere" significa escolher ou selecionar) e a primeira definição como sendo proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam polissacarídeos e glicoproteínas (SHARON; LIS, 2004). Esse termo foi então generalizado por Sharon e Lis (1972) para abranger todas as aglutininas açúcar-específicas e de origem não imune, independente da sua fonte ou da sua especificidade. As lectinas são também referidas na literatura como aglutininas ou fitoaglutininas.

As contribuições incorporadas por Stilmark marcaram o início do centenário da identificação de lectinas, e do estudo de purificação, caracterização, propriedades biológicas e funções biotecnológicas dessas aglutininas. Até o início dos anos 60, não se sabia muito sobre as lectinas. A presença das hemaglutininas já havia sido reportada em vários organismos, principalmente plantas, mas poucas haviam sido isoladas. A grande descoberta da década ocorreu quando Nowell (1960) descobriu que a PHA, lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*, era mitogênica para linfócitos e provou que a estimulação mitogênica era um resultado da ligação entre a lectina e o açúcar da superfície do linfócito, sendo a primeira demonstração do papel biológico dos carboidratos presente na superfície das células.

Com o avanço do conhecimento, surgiu a necessidade de uma melhor compreensão sobre os aspectos estruturais de lectinas e iniciaram-se as investigações a nível molecular. Em 1972, Edelman *et al.* estabeleceram a sequência primária de ConA (MORGAN; WATKINS, 2000). No mesmo ano, o grupo Edelman e de maneira independente Karl Hardman com Clinton Ainsworth, resolveram a estrutura tridimensional da ConA por cristalografia de raios X (EDELMAN *et al.*, 1972; HARDMAN *et al.*, 1972). Durante as duas últimas décadas, as estruturas primárias e tridimensionais de centenas de lectinas foram, e ainda vêm sendo, estabelecidas (SINGH, SARATHI, 2012). Ao mesmo tempo, também têm sido demonstradas várias funções das lectinas como moléculas de reconhecimento célula-molécula e interações célula-célula em uma variedade de sistemas biológicos (SHARON; LIS, 2004).

Após a publicação de vários estudos estruturais e funcionais de várias lectinas, Peumans e Van Damme (1995) propuseram a definição mais atual e umas das mais aceitas pela comunidade científica. De acordo com essa definição, as lectinas são uma classe de proteínas de origem não imune caracterizadas pela sua capacidade em interagir de maneira específica e reversível com mono ou oligossacarídeos. Esta definição não se detém a características de lectinas como hemaglutinação de células ou precipitação de glicoconjugados, mas sim no tipo de ligação entre a lectina e seu ligante (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

## 2.2 Lectinas de plantas

As lectinas são proteínas amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em vírus, bactérias, animais, algas e em sua grande maioria isoladas a partir de plantas. As lectinas vegetais podem ser encontradas em frutos, folhas, caules e sementes, onde nestas é possível encontrar a maior concentração dessas proteínas, podendo chegar até 10% do peso total da mesma (VAN DAMME; PEUMANS, 1990).

As lectinas vegetais são consideradas um grupo heterogêneo de proteínas por serem diferentes entre si no que diz respeito às propriedades bioquímicas e físico-químicas, relação evolucionária, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998), o que torna laboriosa a tarefa de classificá-las considerando todos os aspectos que as descrevem simultaneamente.

Van Damme *et al.* (1998) subdividiu as lectinas vegetais em quatro classes principais de acordo com a sua estrutura e seu sítio de ligação a carboidratos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As **merolectinas** são proteínas que consistem exclusivamente de um único domínio de ligação a carboidrato. Devido seu caráter monovalente, não possuem capacidade de oligomerização e assim são incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. A heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que se liga à quitina, é um exemplo de uma típica merolectina (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As **hololectinas** possuem mais de um sítio de ligação a carboidratos sendo esses muito idênticos ou semelhantes e assim são capazes de precipitar células ou aglutinar glicoconjugados. As hololectinas comportam-se como verdadeiras aglutininas e compreendem a maioria das lectinas de plantas já estudadas. São exemplos típicos de hololectinas aquelas encontradas em sementes de plantas pertencentes à subtribo Diocleinae, tais como as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora* e *Cratylia floribunda* (CAVADA *et al.*, 2001).

As **quimerolectinas** possuem, além do sítio de ligação a carboidrato, um outro domínio de ligação que pode ter uma atividade catalítica bem definida, ou atividade biológica e que age independentemente dos domínios de carboidratos ligantes. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. O principal exemplo dessa classe de lectinas são as proteínas inativadoras de ribossomos (RIP tipo 2), que tem como representante a Ricina (toxina da mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina e

um domínio para a inativação de ribossomo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Uma outra lectina que também possui características de uma quimerolectina é a PPL-2, uma lectina isolada de sementes de *Parkia platycephala* que possui, além do sítio ligante a carboidrato, um sítio catalítico com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

As **superlectinas** consistem de no mínimo dois domínios de ligação para carboidratos, no entanto, reconhecem açúcares estruturalmente distintos. Um exemplo é a lectina do bulbo de tulipa (TxLCI) que é formada por dois domínios de ligação a carboidrato, que reconhecem Manose e GalNAc, respectivamente (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Van Damme *et al.*, (1998) também propuseram uma classificação das lectinas baseado em relações sorológicas e/ou semelhanças de sequências, bem como nas suas relações evolutivas. De acordo com esse sistema, as lectinas foram subdivididas em setes famílias, sendo elas: lectinas de leguminosas; lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose; lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos; proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIP tipo 2); lectinas relacionadas a jacalina; lectinas do floema de Curcubitaceae e lectinas de Amaranthaceae. Examinaremos adiante as particularidades das lectinas de leguminosas, as quais merecem tópico a parte.

### 2.3 Lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas correspondem à família de lectinas de plantas mais estudada. Essas aglutininas representaram um papel importante no desenvolvimento do estudo das lectinas devido a sua abundância nas sementes, além de terem, em sua maioria, um processo simples de purificação. Por exibir uma vasta variedade de especificidade por açúcares, essas lectinas podem ajudar a resolver questões de como proteínas se ligam a carboidratos (SHARON; LIS, 1990).

Lectinas de leguminosas compartilham alto grau de similaridade sequencial e estrutural e apresentam-se preferencialmente na forma de homodímero ou homotetrâmero. Apesar da alta homologia entre si, apresentam grande variabilidade quanto à especificidade por carboidratos, sendo, portanto um modelo perfeito para estudos estruturais de proteínas. Possuem entre 25 e 30 kDa sendo composta por uma cadeia de aproximadamente 250 aminoácidos e geralmente se associam como dímeros ou tetrâmeros com subunidade iguais ou diferentes (CAVADA *et al.*, 1998). As pequenas variações sequências e no arranjo tridimensional dessas proteínas podem significar em mudanças significativas na atividade

biológica das lectinas. (CAVADA *et al.*, 2001). A conservação estrutural das lectinas de leguminosas demonstra que as mesmas estão evolutivamente relacionadas, podendo ser relacionadas como proteínas homólogas que surgiram a partir de um único ancestral comum. Contudo, a principal distinção destas lectinas está relacionada à afinidade por açúcares, existindo grupos com especificidade de ligação a glicose/manose, a N-acetilglicosamina, N-acetil-galactosamina, L-fucose e ácido siálico (MOREIRA *et al.*, 1991).

Quanto à sua biossíntese, essas proteínas são sintetizadas no retículo endoplasmático na forma de pré-pro-lectinas, sendo compostas por um peptídeo sinal (20 a 30 resíduos de aminoácidos) na região N-terminal, duas cadeias peptídicas ( $\beta$  e  $\gamma$ ), uma cadeia intermediária que será glicosilada no RE e um peptídeo sinal na região C-terminal. Após a clivagem do peptídeo sinal na região N-terminal, a pré-pro-proteína passa por um novo processamento no complexo de Golgi, onde uma endopeptidase é responsável pela remoção do peptídeo sinal na região C-terminal e da cadeia intermediária, tornando-se deglicosilada e funcionalmente ativa. As cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  são então religadas em uma posição invertida em relação ao precursor (FIGURA 1) (CARRINGTON *et al.*, 1985).

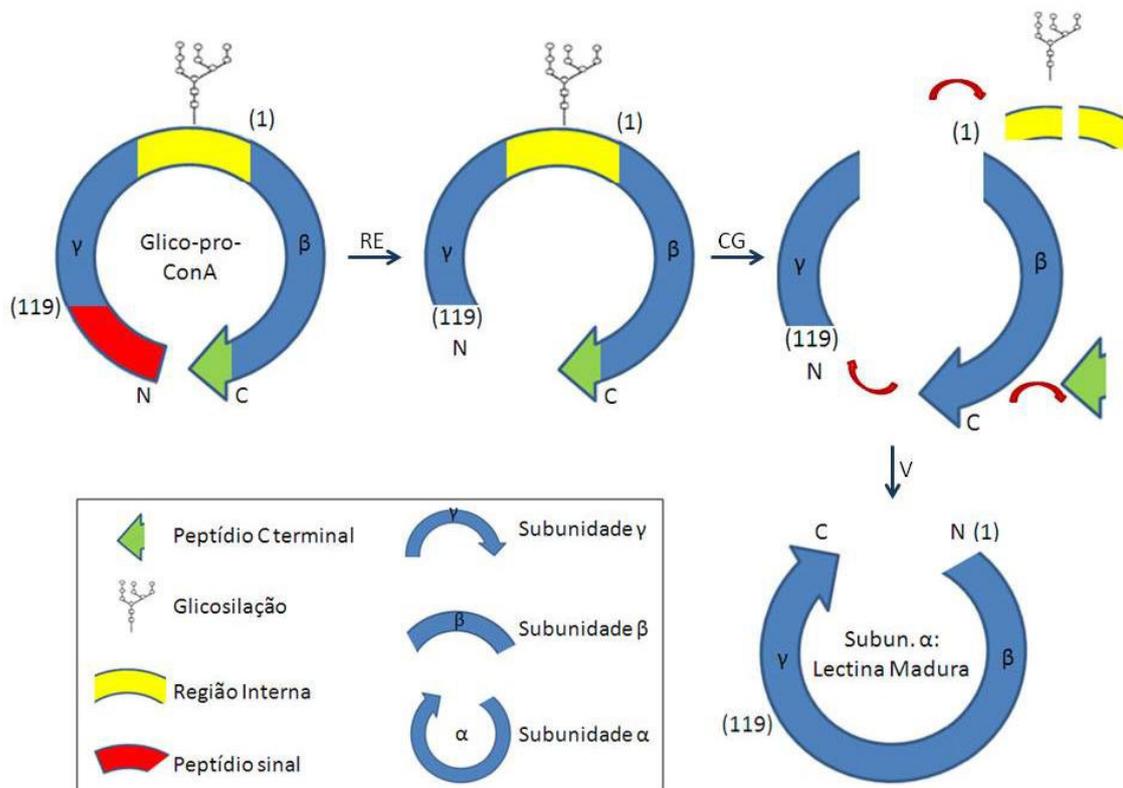


Figura 1 –Biossíntese da Concanavalina A (ConA).

Fonte: Adaptado de CARRINGTON, 1985. Sumário dos eventos de processamento convertendo a pro-concanavalina A glicosilada (pré-pro-conA) em lectina madura. Extremidades amino e carboxi terminal da lectina madura estão indicados por N e C, respectivamente, e o número em parênteses refere-se a resíduos da concanavalina A madura. Durante o processamento na planta, a pro-proteína glicosilada inativa é deglicosilada resultando no surgimento da atividade de ligação a carboidrato. A ação de uma endopeptidase que cliva o nonapeptídeo carboxiterminal e o espaçador da deglicosilação está mostrado em verde e amarelo, respectivamente. Resíduos 118 e 119 são ligados enzimaticamente. *Splicing* então resulta em uma transposição do arranjo linear dos domínios protéicos  $\gamma$  e  $\beta$ . RE: retículo endoplasmático, CG: complexo de golgi, V: vacúolo.

Além do domínio de reconhecimento à carboidrato, as lectinas de leguminosas geralmente requerem cátions divalentes em sítios ligantes a metal. Cada subunidade possui um íon  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , que são essenciais para a atividade de ligação a carboidrato da lectina, sendo que os aminoácidos envolvidos na ligação desses íons são conservados (VAN DAMME *et al.*, 1998). Essas aglutininas podem ainda exibir oligomerização dependente de pH. A proporção entre proteínas no estado dimérico e tetramérico pode ser alterada de acordo com o pH do meio (CALVETE *et al.*, 1999; NAGANO *et al.*, 2008). Essa mudança de conformação dímero/tetrâmero dependente de pH pode influenciar diretamente nas atividades da proteína.

Na família das leguminosas, a subfamília Papilonoideae representa o subgrupo com a maior quantidade de lectinas estudadas (aproximadamente 99%), seguido pela subfamília Cesalpinoideae (aproximadamente 0,9%) e a subfamília Mimosoideae (aproximadamente 0,1%).

Dentro da subfamília Papilionoidea, a tribo Phaseoleae concentra o maior número de estudos sobre lectinas, especialmente aquelas isoladas de plantas da subtribo Diocleinae. As lectinas de Diocleinae são aquelas purificadas principalmente dos gêneros Canavalia, Dioclea, Cratylia, Cymbosema, Cleobulia e Camptosema e são comumente conhecidas como ConA-like devido às semelhanças físico-químicas e estrutural com a lectina de *Canavalia ensiformis*, ConA.

## 2.4 Lectinas de Diocleinae

Lectinas da subtribo Diocleinae correspondem a um grupo de lectinas relacionadas dentro das lectinas de leguminosas. Pequenas diferenças nas estruturas primárias e terciárias dessas aglutininas refletem em diferenças na orientação dos sítios de reconhecimento à carboidrato e assim contribuem para as diferentes atividades biológicas exibidas pelas lectinas de Diocleinae (CAVADA *et al.*, 1994). Tais propriedades fazem com

que estas lectinas sejam valiosas ferramentas biomédicas, e, como tal, a análise de caracterização e sequência de diferentes lectinas que pertencem a esta subtribo estão em curso (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013).

As lectinas de Diocleinae que exibem equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE *et al.*, 1999) e as diferenças entre resíduos de aminoácidos das sequências influenciam nas diferentes conformações oligoméricas que as proteínas podem assumir em diferentes condições de pH. As lectinas de *D. rostrata*, *D. virgata* e *Cratylia floribunda* apresentam tendência a formar dímeros em pH baixo e tetrâmeros em  $\text{pH} \geq 7$ . Já as lectinas de *C. brasiliensis* e *C. bonariensis* possuem equilíbrios entre as formas dímero/tetrâmero mesmo em pH elevado (CALVETE *et al.*, 1999).

## 2.5 Aplicações biotecnológicas das lectinas vegetais

Nos últimos anos foi alcançado um grande progresso nos estudos de atividade/função das lectinas e na importância dessas proteínas nos diversos processos biológicos. A importância das lectinas como ferramentas biotecnológicas foi estabelecida envolvendo a sua aplicação biológica (TEIXEIRA *et al.*, 2012). Essas proteínas apresentam-se como ferramentas indispensáveis para a pesquisa nos mais diversos segmentos científicos (agricultura, medicina, biotecnologia, dentre outros), devido à diversidade de eventos biológicos que são desencadeados em função da interação proteína/carboidrato. O interesse crescente pelo processo de purificação e caracterização dessas biomoléculas deve-se principalmente ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza (MENDES *et al.*, 2011).

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas vegetais, tais como proteção contra patógenos e insetos, transporte e armazenamento de carboidratos, reconhecimento celular (dentro da célula, entre células ou entre organismos), proteínas de reserva ou reguladores de crescimento (PUSZTAI, 1991). Alguns experimentos indicam que as lectinas vegetais são proteínas de defesa contra animais herbívoros e ainda que possuem função na simbiose entre as bactérias fixadoras de nitrogênio (*Rhizobium* spp.) e as raízes de leguminosas (CAVADA *et al.*, 2001). Também se supõe que essas lectinas possam interagir com metabólitos secundários, servir como carreadoras de moléculas hidrofóbicas, como alguns hormônios vegetais, e podem também estarem envolvidas no processo de defesa da semente durante a fase de germinação (DELATORRE *et al.*, 2007).

Com relação às lectinas de Diocleinae, diferentes efeitos biológicos já foram associados a essas proteínas tais como liberação de histamina a partir de mastócitos peritoneais de ratos (FERREIRA *et al.*, 1996) e efeitos anti- e pro-edematogênico (ALENCAR *et al.*, 1998; ASSEURY *et al.*, 1997). Exemplos importantes advindos dessas propriedades vêm sendo descritas para lectinas extraídas das lectinas da subtribo Diocleinae.

## **2.6 Ferramentas utilizadas para a caracterização estrutural de lectinas**

Dentro do contexto analisado, se revela essencial analisar os instrumentos que conduzem a determinação da estrutura primária das proteínas, onde a partir desta se possibilita ao pesquisador prever a estrutura tridimensional da lectina e a maneira como a mesma interage com seu ligante específico, bem como realizar a comparação entre lectinas homólogas.

Isto posto, passaremos a analisar as principais técnicas utilizadas para a finalidade acima descrita, observando a relevância das ferramentas descritas na obtenção dos resultados deste trabalho, assim como seu impacto na comunidade científica.

### **2.6.1 Fundamentos de espectrometria de massas aplicados a estudos com proteínas**

Com a necessidade de alavancar a precisão e conseqüentemente, a qualidade dos resultados na caracterização estrutural de proteínas a espectrometria de massas foi sendo desenvolvida e adaptada, e atualmente se tornou uma técnica fundamental para obtenção de dados elementares, como massa molecular e estrutura primária de proteínas com a exatidão necessária para a expansão da produção científica na área.

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica microanalítica utilizada para obter informação do peso molecular e de características estruturais de amostras. É capaz de fornecer informação sobre a composição elementar de amostras, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, as proporções isotópicas de átomos em amostras e também permite fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação (MANN; AEBERSOLD, 2004).

Um espectrômetro de massas é um instrumento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados. Na fonte de íons, os componentes de uma amostra são convertidos em íons, pela ação de um agente ionizante, os íons positivos ou negativos são imediatamente acelerados em direção ao analisador de

massas. A função do analisador de massas é separar tais íons de acordo com a sua relação massa-carga ( $m/z$ ). A espectrometria de massas mostra-se como uma técnica bastante promissora para a proteômica, na identificação e sequenciamento de peptídeos e proteínas (CANTÚ *et al.*, 2008).

Durante a década de 1990 a espectrometria de massas passou a complementar a degradação de Edman na caracterização estrutural de proteínas. A Degradação de Edman é uma técnica que requer uma quantidade substancial de proteína em um elevado grau de pureza (STEEN; MANN, 2003). Além disso, o método desenvolvido por Peter Edman necessita que haja resíduos amino-terminal livres para que ocorra a reação de Edman, assim, normalmente havia falhas no sequenciamento da proteína ou por bloqueio do N-terminal (aminoácidos acetilados, fosforilados, entre outros), ou por falhas no processo de purificação da proteína.

Com o desenvolvimento e a introdução de técnicas amenas de ionização, como a eletronebulização (*ElectroSpray Ionization* ou ESI) (FENN *et al.*, 1989) e a dessorção a laser assistida por matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) (HILLENKAMP *et al.*, 1991), tornou-se possível analisar biomoléculas de vários tamanhos moleculares, incluindo peptídeos e proteínas e a análise de proteínas através de espectrometria de massas foi impulsionada.

Hoje é possível se obter dados estruturais detalhados (como a sequência de aminoácidos, modificações pós-traducionais, fosforilação, glicosilação) (STEEN; MANN, 2004). A disponibilidade de bancos de dados genômicos para várias espécies, junto com o desenvolvimento de *softwares* específicos tornou rotineira a identificação de proteínas em complexos biológicos, como células e organelas.

Para a análise proteômica são mais utilizadas duas fontes de ionização, são elas a ionização por ESI e a ionização a laser assistida por matriz MALDI (KARAS; HILLENKAMP, 1988), ambas as técnicas são capazes de ionizar, de maneira suave, preservando assim a estrutura polipeptídica, e converter as espécies a serem analisadas para a fase gasosa (FENN, 2002).

A fonte de ionização por MALDI é mais indicada para análise mais sensível de amostras, por exemplo, quando o analito está em baixa concentração e ainda é mais tolerante à contaminações externas. A fonte de íons MALDI baseia-se na absorção intensa da radiação laser por uma matriz, que é misturada em solução com quantidades muito pequenas da biomolécula de interesse, o analito (FERNANDÉZ-LIMA *et al.*, 2006). Neste tipo de ionização, a matriz absorve energia no comprimento de onda do laser e ocorre uma

transferência de prótons para o analito e os íons formados na fase gasosa são acelerados por um campo elétrico para o analisador (HOFFMAN *et al.*, 2007).

A ionização por Electrospray é um método de ionização brando, adequada para análise de moléculas termolábeis, como proteínas. A ionização ocorre pela nebulização de gotículas, nanolitros, de uma solução em um campo elétrico intenso, formando gotículas altamente carregadas. Quando o solvente evapora, formam-se íons moleculares de simples ou múltiplas cargas. Moléculas com vários sítios de ionização irão produzir um espectro de íons multicarregados (MORAES; LAGO, 2003). O ESI possui a capacidade para análise de moléculas de 100 até 1000000 Daltons.

Assim como há uma grande variedade de fontes de ionização, uma variedade de analisadores de massas foram desenvolvidos. Após a produção dos íons na fase gasosa, esses devem ser separados de acordo com suas massas. Cada analisador possui suas vantagens e limitações, e podem ser usados sozinhos ou combinados, dando origem a equipamentos classificados como híbridos. Quadrupolos, *ion-traps* (tridimensionais e lineares), *Time-of-Flight* (ToF), *Fourier-transform ion cyclotron resonance* (FT-ICR), *orbitrap* são exemplos de analisadores de massa (CANTÚ *et al.*, 2008).

Após a análise dos íons, um detector transforma os íons gerados em um sinal detectável, podendo então ser feita a interpretação dos dados (HOFFMAN *et al.*, 2007) que podem ser utilizados para identificação de proteínas proveniente de eletroforese bidimensional, comparação com banco de dados, determinação da massa molecular de proteínas intactas, determinação de sequência de aminoácidos, localização de pontes dissulfeto e informações sobre a estrutura tridimensional da proteína. Além da rapidez e relativa simplicidade de análise, outra vantagem desta técnica é a necessidade de pequenas quantidades de amostras para realização dos estudos biologia estrutural (SIMÕES, 2011).

Várias lectinas de leguminosas já tiveram suas sequências primárias determinadas por MS e depositadas em bancos de dados públicos, como por exemplo no *Protein Data Bank* (PDB) e *Uniprot Databank*, entre elas *Dioclea guianensis* CALVETE, *et al.*, 1999), *Dioclea guianensis* (CALVETE, *et al.*, 1999), *Dioclea rostrata* CALVETE, *et al.*, 1999), *Canavalia grandiflora* (SIMÕES, 2011) e *Erythrina velutina* (SIMÕES, 2011).

### ***2.6.2 Biologia molecular como ferramenta para o estudo estrutural de lectinas de leguminosas***

Visto as dificuldades na análise e separação de proteínas devido a existência de isoformas, glicofomas e de repetições de domínios, a espectrometria de massas muitas vezes é vista como uma técnica complexa na determinação da sequência de aminoácidos de muitas lectinas. Sendo assim, as técnicas usuais de biologia molecular envolvendo clonagem de lectinas de leguminosas entram como técnicas complementares para a obtenção de estrutura primária dessas moléculas.

O processo de clonagem de lectinas vegetais pode iniciar-se a partir da obtenção do DNA genômico da planta, geralmente utilizando folhas como fonte de material. Após a extração, é realizado o isolamento e a multiplicação do fragmento de DNA de interesse, utilizando iniciadores ou *primers* específicos, quando se tem algum conhecimento prévio da sequência da proteína. Em geral a clonagem molecular compreende dois passos importantes:

- i) a ligação do fragmento de interesse, denominado de inserto, a um vetor de clonagem, a fim de se obter o DNA recombinante. Os vetores de clonagem mais utilizados normalmente são os plasmídeos de bactérias;
- ii) a molécula de DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira num processo chamado de transformação. Usa-se geralmente cepas de *Escherichia coli*. A célula transformada sofre vários ciclos de divisão celular produzindo uma colônia com milhares de cópias do DNA recombinante.

O sequenciamento do DNA é o método de análise dos clones positivos que se faz necessário para se obter a sequência completa, ou uma porção do gene alvo. Desde a década de 70 o método de Sanger é o mais utilizado para análise de sequência de DNA. Atualmente, com o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento automático, um aparelho de sequenciamento é capaz de sequenciar meio milhão de pares de base por dia (LEWIN, 1997; ZAHA *et al.*, 1996; STRYER, 1988). A sequência de aminoácidos é então traduzida a partir da sequência de nucleotídeos obtida.

## **2.7 Aspectos gerais da inflamação e formação de edema**

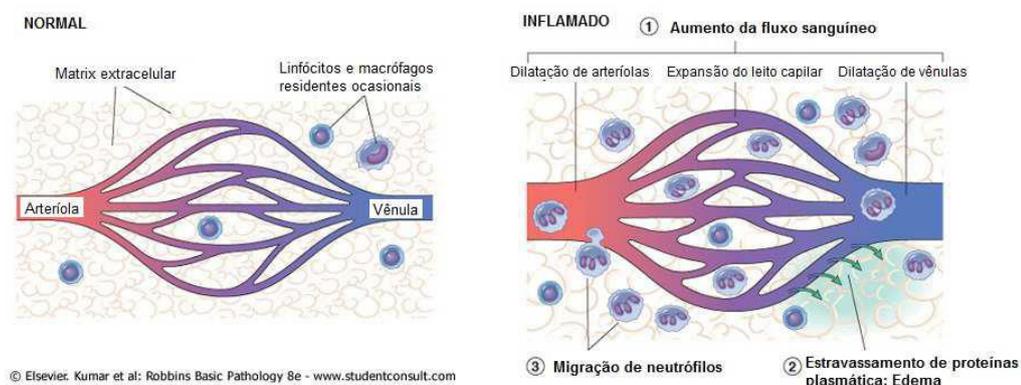
A inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo multimediado. Ela é uma resposta desencadeada por traumas, lesões teciduais e invasão por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microorganismos ou outros agentes irritantes e potenciar o reparo tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). O reconhecimento do agente/estímulo

lesivo desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória.

A resposta inflamatória aguda envolve fenômenos vasculares (vasodilatação e aumento da permeabilidade celular) e celulares (infiltração celular) decorrentes da liberação local de mediadores químicos formados e liberados concomitantemente ou sequencialmente no local da lesão. Os mediadores inflamatórios atuam nos vasos sanguíneos e células inflamatórias modulando os principais eventos relacionados a inflamação: vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor, como também febre e mal estar. Os mediadores da inflamação são classificados como de origem plasmática (advindo das cascatas das citocinas/quimiocinas, coagulação, fibrinólise e complemento) ou tecidual (aminas vasoativas, eicosanóides, enzimas lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e fatores de crescimento). (LANSEN & HENSON, 1993; SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

A vasodilatação é um fenômeno que corresponde a alterações no calibre vascular, que conduz a um aumento do fluxo sanguíneo, decorrente da ação de mediadores principalmente em arteríolas. O aumento da permeabilidade vascular se deve a ação de mediadores inflamatórios sobre as células endoteliais venulares, induzindo a contração das mesmas. Isto permite a passagem de proteínas plasmáticas para o interstício, as quais não seriam filtradas em condições fisiológicas. O aumento da permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, por consequência da vasodilatação, está comumente relacionado com o mecanismo da inflamação e a inibição da sua síntese fica atrelada a leva à inibição da inflamação por moléculas edematogênicas (FIGURA 2).

Figura 2 – Vasodilatação durante a inflamação aguda



### 2.7.1 Atividades inflamatórias de lectinas vegetais

As lectinas de Diocleinae são dotadas de atividade pro- ou anti-inflamatória, dependendo da via de administração utilizada, exemplo é a lectina de *Canavalia grandiflora* (ConGF), que quando administrada intravenosamente pode reduzir o edema causado por carragenana e quando administrado de forma subcutânea possui efeito edematogênico (NUNES *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2012).

Quando aplicadas sistemicamente, as lectinas de *Dioclea violacea*, *D. guianensis*, *D. virgata* e *Cratylia floribunda* inibem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina) e o edema de pata induzido por carragenina (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999) em ratos. As lectinas de *D. guianensis* e *D. violacea* previnem os parâmetros inflamatórios da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999) e a de *Canavalia grandiflora* a peritonite e o edema de pata induzidos por carragenina (NUNES *et al.*, 2009) em camundongos. Por via local, entretanto, as respostas observadas são estimulatórias, sendo o caso da ConBr, ConA, *C. grandiflora* e *Dioclea grandiflora* ao induzirem edema e/ou peritonite em ratos (FIGUEIREDO *et al.*, 2009a; BENTO *et al.*, 1993; BARROSO-NETO, 2010).

As lectinas do gênero *Canavalia* apresentam características comuns nas atividades biológicas, mas diferentes das apresentadas por outros gêneros de Diocleinae, fato relacionado a aminoácidos específicos que só aparecem em no gênero *Canavalia* e não nos gêneros *Dioclea* ou *Cratylia*. Porém, mesmo substituições semiconservativas de aminoácidos podem ser relevantes para diferenças na atividade biológica dentro de um mesmo gênero (PIRES, 2011).

### 2.8 *Canavalia bonariensis* Lindl.

Analisado o cenário que envolve o estudo das lectinas, as técnicas envolvidas em sua caracterização estrutural e seus possíveis efeitos biológicos, não buscando esgotar o tema, mas com o escopo de traçar uma visão geral da temática das lectinas, passamos então ao objeto principal de estudo deste trabalho científico, a lectina de *Canavalia bonariensis*.

A *Canavalia bonariensis* Lindl. é uma espécie vegetal nativa da região sul do Brasil, presente principalmente no Rio Grande do Sul (FIGURA 3). É pertencente á família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Papilionoideae e tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (DOU 02/08/1999) a *Canavalia bonariensis* é uma espécie nativa da região Sul do país e está em fase de extinção desde 1999.

Cavada *et. al.* (1996), purificaram uma lectina glicose/manose específica a partir de sementes de *Canavalia bonariensis*. Essa lectina apresentou o efeito de indução da migração de neutrófilos em ratos e camundongos, indicando uma possível atividade anti-inflamatória da proteína. Calvete *et. al.* (1999), também determinaram a sequência de aminoácidos da região do N-terminal da lectina de *Canavalia bonariensis*. A sequência parcial está depositada no Uniprot *datbank* e pode ser acessada através do código P58906.

Figura 3 - *Canavalia bonariensis* Lindl



Fonte: (A) e (B) adaptado de Google Imagens, 2013. (C) e (D) SILVA, 2013. (A) e (B) flores de *C. bonariensis*. (C) e (D) sementes de *C. bonariensis*.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Purificação da lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* Lindl**

##### **3.1.1 Preparo da Farinha**

As sementes de *Canavalia bonariensis* foram descascadas e trituradas em um moedor até obtenção da farinha. A farinha fina foi acondicionada em recipientes fechados a temperatura ambiente para posterior utilização.

##### **3.1.2 Extração de proteínas totais das sementes**

As proteínas solúveis foram extraídas da farinha em solução de NaCl 0,15 mol/L, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante por 4 h em temperatura ambiente. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000 x g, temperatura 4 °C, durante 20 min, obtendo-se assim o precipitado que foi descartado e um sobrenadante denominado de extrato total.

##### **3.1.3 Atividade hemaglutinante**

A atividade hemaglutinante foi utilizada para avaliar a atividade das frações resultantes antes e após o passo cromatográfico. Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em tubos de vidro a partir de uma adaptação do protocolo descrito por Moreira e Perrone (1977), como descrito a seguir: As amostras foram dispostas em duplas seriadas, em cada tubo foi adicionado 100 µL da solução tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 7,6 acrescido de NaCl 0,15 mol/L, foi adicionado 100 µL da amostra a ser avaliada sua atividade e em seguida foram realizadas diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8...). Para cada 100 µL de cada diluição foram acrescentados 100 µL de uma suspensão de hemácias de coelho e dos tipos sanguíneos A, B e O, a 2% em NaCl 0,15 mol/L, não-tratadas e tratadas com enzimas proteolíticas (papaína ou tripsina). O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 minutos e, após esse período, deixado em repouso à temperatura ambiente por mais 30 minutos. A presença ou não de hemaglutinação foi então detectada macroscopicamente. Os títulos de hemaglutinação foram medidos em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível a olho nu.

### ***3.1.4 Atividade Hemaglutinante Específica da CaBo***

Após a obtenção do título de hemaglutinação e da concentração de proteínas solúveis, a atividade específica para cada uma das frações foi calculada, com o objetivo de se monitorar avanços na concentração/purificação da lectina em estudo.

O cálculo foi feito pela divisão do título de hemaglutinação (UH/mL) pela concentração de proteínas solúveis (mgP/mL), cujo quociente foi expresso em (UH/mgP) (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína). A concentração de proteínas solúveis foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976). Esses resultados puderam ser comparados, levando à escolha da melhor fração purificada. A atividade hemaglutinante foi calculada a partir de diluições seriadas na base dois para determinação dos títulos de hemaglutinação. A purificação foi calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante específica do extrato total e aquela de cada passo de purificação subsequente.

### ***3.1.5 Cromatografia de Afinidade em Matriz de Sephadex G-50***

O extrato total foi submetido à cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex G-50. Esse extrato foi centrifugado a 10.000 x g, temperatura 4 °C, durante 20 minutos e, em seguida, 6 mL do sobrenadante, a uma concentração proteica de 8 mg/mL, foram aplicados em uma coluna de Sephadex G-50 (1,0 x 8,0 cm), previamente equilibrada com uma solução salina (NaCl 0,15 mol/L). A fração não retida foi eluída com NaCl 0,15 mol/L contendo MnCl<sub>2</sub> 0,005 mol/L e CaCl<sub>2</sub> 0,005 mol/L enquanto que a fração retida foi eluída com tampão glicina 0,1 mol/L pH 2,6 adicionado de NaCl 0,15 mol/L. Frações de cerca de 1,5 mL foram coletadas manualmente. As frações foram coletadas a um fluxo de 1 mL/min e as absorvâncias foram monitoradas por espectrofotometria em um comprimento de onda de 280 nm.

As frações obtidas foram exaustivamente dialisadas contra água destilada e, então, liofilizadas. A atividade hemaglutinante, o teor de proteínas solúveis e a atividade específica de todas as frações cromatográficas foram avaliados.

## **3.2 Caracterização físico-química da lectina de sementes de *C. bonariensis***

### **3.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da CaBo**

O monitoramento do processo de purificação e a estimativa da massa molecular aparente das subunidades da lectina purificada foram realizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), de acordo com o protocolo estabelecido por Laemmli (1970) com algumas alterações.

O gel de separação ou corrida (*main gel*) foi montado a uma concentração de 12,5% preparado em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,8, contendo SDS 1%, TEMED 0,04% e persulfato de amônio 0,1%. O gel superior ou de aplicação (*Stacking gel*) foi preparado usando acrilamida/bisacrilamida 4% em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 6,8, SDS 1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%.

O extrato protéico total e as amostras liofilizadas oriundas dos dois passos cromatográficos foram solubilizadas a uma concentração de 4 mg/mL em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 mol/L pH 6,8, 10% de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol e 1% de SDS. Foram aplicados 40 µg da proteína em cada poço.

A corrida eletroforética foi realizada em sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad; Milão, Itália) com a voltagem variando até 150 V, potência até 10 W e amperagem constante de 25 mA. O tampão de corrida utilizado continha Tris 0,025 mol/L, Glicina 0,192 mol/L e SDS 0,1% pH 8,8. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: BSA (66 kDa) e ConBr (25, 14 e 12 kDa). O gel foi corado em Coomassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v). A retirada do excesso do corante (descoramento) foi feita com solução descorante contendo 40% de metanol e 20% de ácido acético.

### **3.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante da CaBo**

Alíquotas da CaBo, a uma concentração de 1 mg/mL foram separadas em tubos de microcentrífuga, diluídas em solução de NaCl 0,15 mol/L, centrifugadas e o sobrenadante resultante foi utilizado para determinar a termoestabilidade da lectina. Em seguida, cada amostra foi submetida a diferentes temperaturas variando de 40 °C a 80 °C por 60 minutos.

Após o término, foi avaliada a atividade hemaglutinante da CaBo com todas as amostras. Cada amostra foi testada em duplicata.

### ***3.2.3 Efeito do agente quelante (EDTA) sobre a atividade hemaglutinante da CaBo***

A avaliação da dependência da atividade hemaglutinante da CaBo por diferentes cátions divalentes foi analisada. Para tal fim, uma alíquota da lectina (1 mg/mL) foi solubilizada em NaCl 0,15 mol/L e dialisada contra soluções de EDTA 0,05 mol/L contendo NaCl 0,15 mol/L por 48 horas, seguida pela diálise exaustiva contra NaCl 0,15 mol/L por mais 24 horas para retirada do excesso de EDTA. Após isto, a atividade hemaglutinante foi testada pela adição de 100 µL de soluções de NaCl 0,15 mol/L contendo CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, separadamente, a uma concentração de 0,01 mol/L em tubos de ensaio, onde em seguida foram feitas diluições seriadas em duplicata a partir da adição de 100 µL da lectina (1 mg/mL), acrescentadas 100 µL de eritrócitos tripsinizados de coelho a 2% em cada tubo e levadas a incubação por 1 hora.

### ***3.2.4 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da CaBo***

A CaBo foi solubilizada em NaCl 0,15 mol/L (1 mg/mL) e foram feitas diluições seriadas contra diferentes soluções tampão com pH variando de 4,0 a 10,0 contendo NaCl 0,15 mol/L. Os seguintes tampões foram utilizados: acetato de sódio 0,1 mol/L pH 4,0 e 5,0, citrato de sódio 0,1 mol/L pH 6,0, fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,0, Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,0, glicina-NaOH pH 9,0 e 10,0.

### ***3.2.5 Determinação da massa molecular intacta da CaBo por espectrometria de massas***

A massa molecular da CaBo foi determinada através da técnica de espectrometria de massa com ionização por MALDI e análise por tempo de voo (TOF) utilizando um instrumento híbrido (Autoflex Speed, Bruker Daltonics, USA). Para tal, a proteína foi solubilizada em uma solução contendo 50% de acetonitrila e 0,3% de TFA, a uma concentração final de aproximadamente 1 pmol de proteína. Foi utilizada a matriz ácido  $\alpha$ -4-ciano-hidroxicinâmico a 10 mg/mL solubilizada em 50% ACN e 0,3% TFA. A proporção matriz/analito para a análise foi 3:1. O instrumento operou com voltagem de 20 kV com refletor em modo linear e com análise de proteínas na faixa de 10.000 a 100.000 Da. Os

espectros adquiridos foram processados com software Compass™ 1.3 usando o algoritmo SNAP para a anotação de pico monoisotópico.

### ***3.2.6 Digestão in gel e sequenciamento dos peptídeos da CaBo por espectrometria de massas***

A digestão e extração dos peptídeos seguiram o protocolo descrito em Shevchenko *et al.* (2007). A CaBo foi aplicada em um gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). As bandas referentes à proteína foram retiradas do gel e recortadas com auxílio de uma ponteira plástica. O gel de eletroforese contendo a proteína de interesse foi descorado em uma solução de 50% de acetonitrila contendo 0,1 mol/L de bicarbonato de amônio, desidratado em 100% de acetonitrila e seco em *Speedvac* (LabConco). O gel foi então reidratado em uma solução de 0,05 mol/L de bicarbonato de amônio contendo a enzima tripsina (Promega) na proporção de 1:50 (p/p; enzima:substrato). A reação de digestão permaneceu *overnight* a 37 °C, sendo parada com a adição de ácido fórmico a 5%.

Os peptídeos oriundos da digestão foram extraídos do gel utilizando uma solução de 5% de ácido fórmico em 50% de acetonitrila sob agitação durante 15 minutos. Este procedimento foi repetido por 3 vezes, o sobrenadante contendo os peptídeos extraídos foram unidos e concentrados em *Speedvac* e o volume foi ajustado para 25 µL com ácido fórmico 0,1%. Estes peptídeos foram injetados em um sistema nanoacquit (Waters Corp.) conectado a uma fonte de nanoeletrospray do espectrômetro de massas (SYNAPT HDMS – Waters Corp.). A amostra foi aplicada em uma coluna de fase reversa C18 (75 µM x 100 µM) e eluída em um gradiente de acetonitrila de 10% a 85% contendo 0,1% de ácido fórmico.

O espectrômetro de massas operou em modo positivo, com a temperatura da fonte de 90 °C e a voltagem do capilar de 3.0 kV. Os experimentos de LC-MS/MS foram realizados de acordo com a função DDA (*Data Dependet Aquisition* – Aquisição Dependente de Dados) os íons precursores com carga entre  $[M+H]^{+2}$  e  $[M+H]^{+3}$  foram selecionados para análise de MS/MS sendo fragmentados através de CID (*Collision Induced Decomposition* – Dissociação induzida por colisão). Os dados foram coletados, processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp.) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp.). Os peptídeos comuns a outras proteínas foram identificados por buscas em banco de dados utilizando ferramenta de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos nos programas ProteinLynx 2.4 (Waters Corp.) e MASCOT (Matrix Science). Para os demais peptídeos, as sequências

foram determinadas através da interpretação manual dos espectros de fragmentação (sequenciamento *De Novo*).

### 3.3 Clonagem molecular da lectina da *Canavalia bonariensis*

#### 3.3.1 Extração de DNA genômico

O ácido desoxirribonucleico (DNA genômico) foi isolado a partir de folhas frescas da planta, utilizando-se o método baseado no detergente brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB), descrito por Doyle & Doyle (1987), modificado.

As folhas congeladas foram maceradas com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O macerado (aproximadamente 0,8 g) foi transferido para um tubo de fundo cônico de 15 mL contendo 8 mL de tampão de extração CTAB (Tris 100 mM pH 8,0; CTAB 2%; NaCl 1,4 mol/L; EDTA 0,02 mol/L; 2- mercaptoetanol 0,2% v/v) contendo de 1% de PVP (polivinilpirrolidona) (0,08 gramas, p/v) pré-aquecido a 60°C, o qual permaneceu em incubação por 1 hora a 60 °C, sendo homogeneizado a cada 10 minutos. A emulsão foi centrifugada por 20 minutos a 10.000 x g e a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo falcon onde foi adicionado 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v), que permaneceu em agitação suave por 5 minutos. A emulsão foi novamente centrifugada. Após a centrifugação a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo de fundo cônico e foi adicionada a esta 0,3 volumes de isopropanol. O tubo foi invertido gentilmente e incubado no freezer -20 °C por 30 minutos.

A mistura foi centrifugada para a precipitação do DNA genômico por 10 minutos, a 10.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70%. O DNA foi recolhido e transferido para um microtubo e foi realizada outra centrifugação por 10 minutos, a 10.000 x g e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto à temperatura ambiente até total evaporação do álcool. O DNA isolado foi ressuspensionado em 50 µL de água ultrapura estéril e estocado em geladeira a 4 °C.

O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (EtBr) para análise de sua integridade. A corrida eletroforética foi submetida a uma voltagem constante de 100 V, e o gel submerso em tampão de corrida TBE (Tris-Borato 0,09 mol/L, pH 8,8, contendo EDTA 0,002 mol/L). O DNA será visualizado através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador.

O DNA genômico foi quantificado pelo NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences) a partir da absorbância a 260 nm e contendo a razão A260/A280 entre 1,8 e 2,2.

### 3.3.2 Amplificação do gene codificador da lectina

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em um microtubo 0,2 mL estéril *Axygen Scientific Inc.* (Union City – CA, EUA), usando 1 unidade da enzima Taq High Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific). Como iniciadores foram utilizados os *primers* DG3'β e DG5'γ juntamente com o tampão da Taq HF DNA polymerase e Cloreto de Magnésio (ambos fornecido pelo kit) mais o DNA genômico da planta e dNTP Mix. A reação de amplificação ocorreu no termociclador *Eppendorf MaxyGene gradient*, programado para um passo inicial de desnaturação (5 min a 94 °C), seguido por 45 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a uma temperatura de 50°C (anelamento) e 1 minuto a 72 °C (extensão). No último ciclo, foi realizado uma última fase de extensão prolongada (72 °C por 7 min). Após a reação de PCR o termociclador foi programado a incubar as amostras a 4 °C. Os produtos das reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% na presença de um marcador de DNA.

### 3.3.3 Ligação do produto de amplificação ao vetor pGEM-T-easy

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

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

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

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

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

### **3.3.4 Transformação bacteriana**

O produto da reação de ligação foi submetido a uma transformação bacteriana, por choque térmico, com a cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*.

A transformação foi realizada em 200 uL de CaCl<sub>2</sub> 0,2 mol/L contendo uma colônia de *E. coli* DH5 $\alpha$ , crescida em meio LB ágar, e o produto da reação de ligação. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos seguido de banho maria a 42 °C por 90 segundos e novamente em banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico as células foram transferidas para um tubo falcon contendo 800 uL de meio SOC (2% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 0,05 % de NaCl, 0,0025 mol/L de KCl, 0,01 mol/L de MgCl<sub>2</sub> e 0,02 mol/L de glicose) pré-aquecido a 37 °C e foram incubadas por 1 hora a 37 °C com agitação de 200 rpm. Com o auxílio da alça de Drigalsk foram incorporadas 200 uL das células transformadas com o produto da reação de ligação em placas de petri contendo meio SOB (2% de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 0,05 % de NaCl, 0,0025 mol/L de KCl e 0,01 mol/L de MgCl<sub>2</sub>) ágar, ampicilina 100 ug/mL, IPTG 0,5 mM e X-Gal 40  $\mu$ g/mL, sendo incubadas por 16 horas a 37 °C. Colônias brancas foram consideradas transformadas conforme o método de seleção LacZ do vetor pGEM-T-*easy*.

### **3.3.5 Purificação dos plasmídeos recombinantes e confirmação da transformação**

Colônias brancas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , obtidas a partir da etapa de transformação bacteriana, foram submetidas a extração do DNA plasmidial de acordo com o AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen biosciences) com algumas modificações.

As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio LB broth contendo ampicilina 100  $\mu$ g/uL e incubadas por 16 horas a 37°C com agitação de 200 rpm.

A cultura foi centrifugada a 4.000  $\times$  g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Ao precipitado de células foram adicionados 250  $\mu$ L do tampão S1 (tampão de equilíbrio) e as células foram resuspendidas com um agitador. Em seguida, foram adicionados 250  $\mu$ L do tampão S2 (tampão de lise) e a mistura foi invertida cuidadosamente. Na mistura

foi adicionados 350  $\mu$ L do tampão S3 (tampão de neutralização), novamente invertido cuidadosamente e centrifugado a 12.000  $\times g$  por 10 minutos e a 4°C.

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

### **3.3.6 Análise da sequência do fragmento**

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

As *contigs* formadas foram traduzidas em aminoácidos pelo programa Translate a DNA Sequence (<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/translate/>) e as sequências de aminoácidos foram comparadas com os dados obtidos por espectrometria de massas sequencial.

### **3.4 Análise filogenética da lectina de *Canavalia bonariensis***

Sequências de aminoácidos de lectinas da subtribo Diocleinae (*Canavalia ensiformis*, *C. brasiliensis*, *C. maritima*, *C. gladiata*, *C. grandiflora*, *C. boliviana*, *C. lineata*, *C. virosa*, *Camptosema pedicellatum*, *Cratyliia floribunda*, *Dioclea violacea*, *D. guianensis*, *D. sclerocarpa*, *D. lehmannii*, *D. rostrata* e *D. virgata*) obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) foram utilizadas para a construção das árvores filogenéticas, juntamente com sequências de *Canavalia bonariensis*, obtida neste trabalho por meio de técnicas de espectrometria de massas e biologia molecular. O alinhamento entre as sequências foi realizado por meio do software Jalview 2.8.1, sendo posteriormente submetidas ao teste do modelo via programa MEGA6. A reconstrução filogenética envolvendo o método de máxima verossimilhança foi feita ainda com o auxílio do MEGA6, utilizando o teste de *Bootstrap* como medida de suporte com adição aleatória de 500 repetições, para verificar a

consistência e confiança nas topologias. As análises filogenéticas por Inferência Bayesiana foram realizadas a partir da utilização dos programas BEAUTi e BEAST 1.8, utilizando duas corridas independentes com 1.000.000 de gerações e amostragem a cada 100 gerações, com parâmetro *Gamma* (G) e proporção de sítios invariáveis (I). Como grupo externo na análise foi utilizada a sequênciade *Bowringia mildbraedii*, escolhido por meio de buscas de similaridade nos bancos de dados de lectinas da família Leguminosae.

### **3.5 Avaliação do efeito edematogênico da lectina de *Canavalia bonariensis***

#### **3.5.1 Modelo Edema de Pata**

Camundongos Swiss (25-30 g, n = 8) foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 h a 25 °C, com água e comida *ad libitum*. Protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UECE (CEUA N° 10130208-8/40), seguindo o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório da Academia Nacional de Ciências (8ª Edição, 2011).

O edema da pata foi induzido por injeção subcutânea (s.c.) de CaBo (0,1, 1,0 e 10 mg/kg; 0,5 ml/g massa corporal) na pata posterior dos camundongos e comparados com os animais controle que receberam solução salina estéril (NaCl 0,9%). O edema da pata foi mensurado imediatamente antes da injeção de estímulos inflamatórios (tempo zero) e em intervalos de tempo selecionados (1-96 h) por hidropletismometria. Os dados foram calculados como a variação do volume da pata (mL) ou a área sob a curva do curso-tempo (ASC, em unidades arbitrárias) em relação ao tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995).

#### **3.5.2 – Análise estatística**

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

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Purificação da lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* e análise físico-química

A partir do extrato total da *C. bonariensis* foi purificada através de um único passo cromatográfico uma lectina denominada CaBo, conforme protocolo já estabelecido por Cavada (1996). O rendimento total foi de aproximadamente 5 mg da proteína a partir de 1 g de semente. A lectina aglutinou preferencialmente eritrócitos de coelho tratado com a enzima tripsina e a integridade da proteína foi acompanhada através de atividade hemaglutinate. A etapa de purificação resultou na lectina purificada com grau de pureza de 8,45 vezes em relação ao extrato total (TABELA 1).

Tabela 1 – Tabela de purificação da CaBo

Fração	Proteínas <sup>(a)</sup>	U.H <sup>(b)</sup>	A.H.E <sup>(c)</sup>	Fator de Purificação <sup>(d)</sup>
	(mg/mL)		(U.H./mgP)	
Extrato	0,066	32	484,84	1
PII	0,5	2048	4096	8,45

Fonte: Elaborado pelo autor.

a) Concentração de proteínas solúveis (mg/mL);

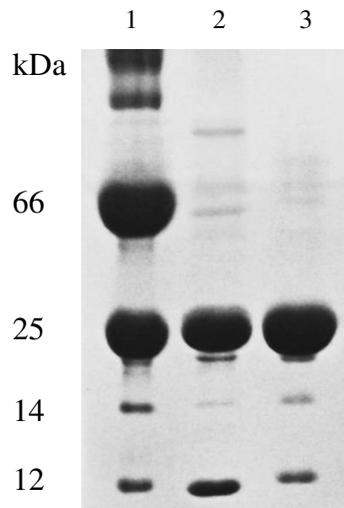
b) Atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina, expressa em termos de Unidade Hemaglutinante (U.H./mL);

c) Atividade Hemaglutinante Específica calculada como a relação entre a atividade hemaglutinante e a concentração de proteínas;

d) Fator de Purificação, calculado como a relação entre a atividade hemaglutinante específica da lectina e do extrato total.

O perfil da proteína foi monitorado por eletroforese em gel de acrilamida na presença de SDS. A proteína é composta por uma cadeia alfa madura de aproximadamente 25 kDa e duas outras subunidades beta e gama de aproximadamente 12 e 13 kDa, estrutura similar encontrada em outras lectinas da subtribo Diocleinae (FIGURA 4), o que sugere que a CaBo sofra o mesmo processamento pós-traducional descrito por Carrington *et al.*, (1985), conforme as demais lectinas do gênero.

Figura 4 – SDS-PAGE da CaBo



Fonte: Elaborada pelo autor. 1 - Marcador molecular: BSA (66 kDa), ConBr (25, 14 e 12 kDa) 2- Lectina de *Canavalia bonariensis* (CaBo), 3- Lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr).

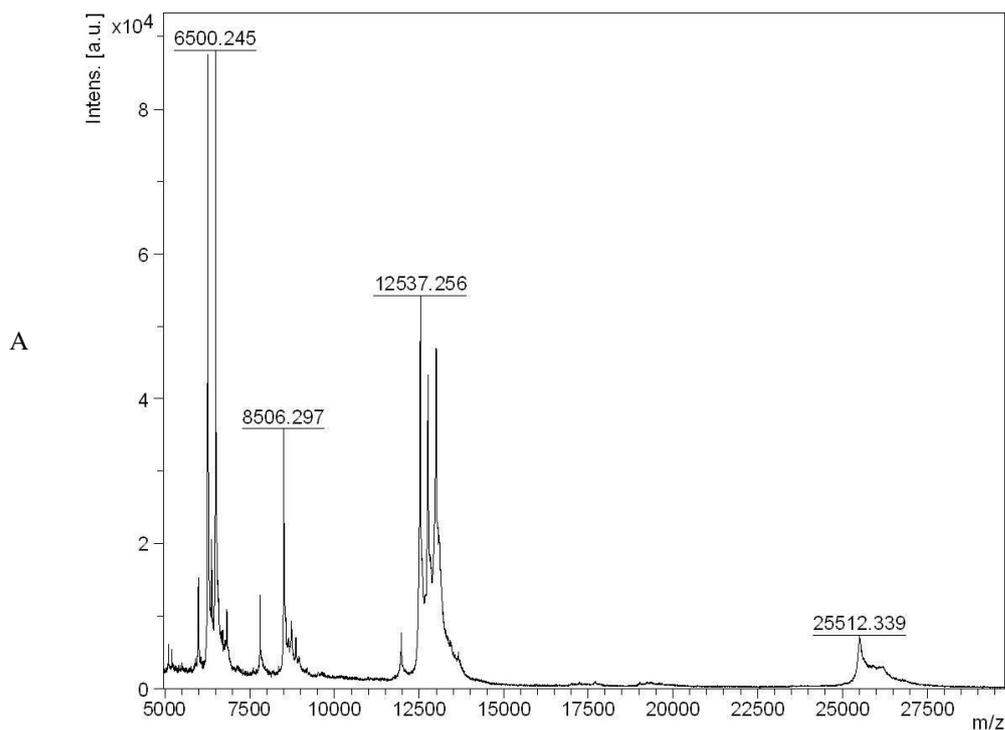
Foram realizados ensaios de atividade hemaglutinante com a CaBo em variadas condições de temperatura e pH. A lectina mostrou que é estável em temperaturas que podem variar entre 30 até 70 °C por uma hora e também em faixas de entre 7,0 e 9,0. Em condições mais extremas do meio a CaBo perdeu sua atividade devido a perda da sua estrutura tridimensional. Segundo Claverie *et al.*, (1978), a reação de associação dímero/tetrâmero da ConA (lectina de *Canavalia ensiformis*) é governada pelo estado de ionização da cadeia lateral da histidina presente em cada subunidade (His51 ou His121). Essa organização estrutural regula a atividade da proteína.

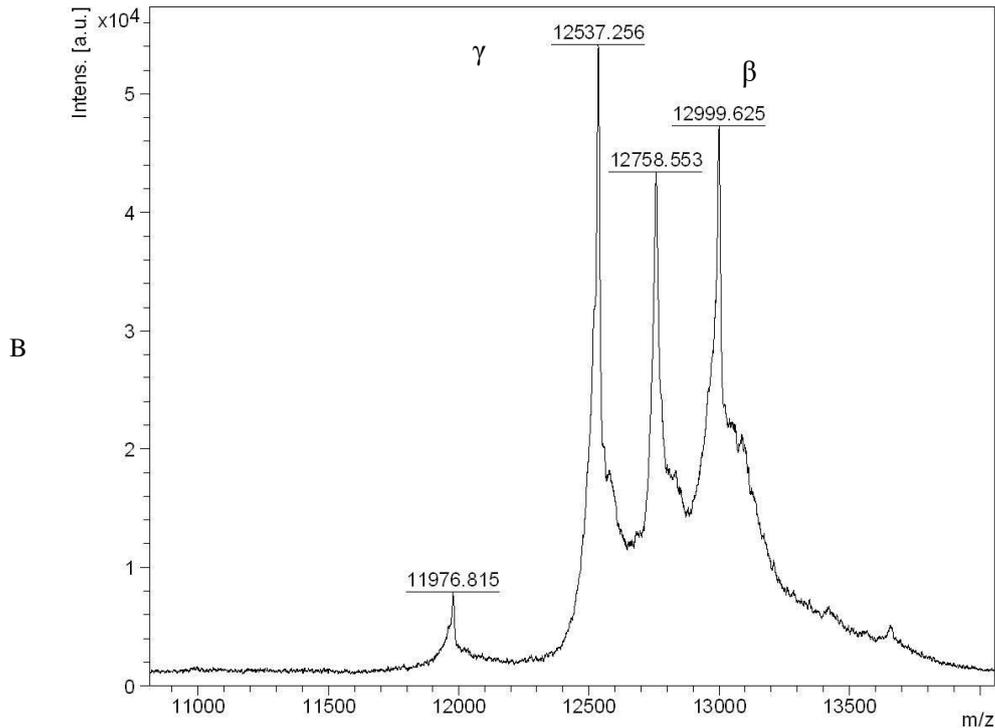
Também foi verificado que a CaBo é uma proteína metal-dependente. A lectina perdeu significativamente sua capacidade de aglutinar eritrócitos após diálise contra solução de EDTA 0,05 mol/L. O EDTA atua formando um complexo com os metais ligados a estrutura da proteína. Os cátions divalentes, preferencialmente  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , se ligam a sítios específicos da proteína e ajudam a estabilizar sua estrutura e na sua ausência ocorre perda da capacidade de ligação da lectina a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

## 4.2 Determinação da massa molecular e sequenciamento proteico da CaBo por espectrometria de massas.

A massa molecular da CaBo foi confirmada com maior precisão utilizando espectrometria de massa MALDI – ToF/MS. Os dados foram processados utilizando o software Compass™ 1.3 e o resultado mostrou a presença de um íons de 25512, 339 Da correspondendo a cadeia  $\alpha$  madura da lectina e outros íons de 12999,625 Da e 12537,256 Da corresponde aos fragmentos  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente (FIGURA 5), valores próximos aos observados anteriormente por SDS-PAGE e que confirmam o padrão estrutural existente nas lectinas de Diocleinae como a *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia maritima* (CML).

Figura 5 – Espectro de massa MALDI-ToF/MS da CaBo.





Fonte: Elaborado pelo autor. Espectro de massa/carga mostrando em (A) a massa média média da CaBo e em seu estados mono emulticarrecados. Em (B) ampliação de região do espectro referente as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  e a cadeia  $\alpha$  duplamente carregada.

No espectro de massa MALDI – ToF/MS da CaBo foi possível também observar íons referentes a cadeia  $\alpha$  em estados multicarregado, os íons de 12758,553 Da, 8506,297 Da e 6500,245 Da correspondem à cadeia  $\alpha$  com 2, 3 e 4 cargas respectivamente.

Para o sequenciamento dos aminoácidos da CaBo, a proteína foi digerida com as enzimas tripsina e quimiotripsina. O conjunto de peptídeos oriundos das digestões foram aplicados ao espectrômetro de massa e os dados coletados foram processados e analisados utilizando o programa MassLynx v4.1 (Waters Corp) e ProteinLynx v2.4 (Waters Corp). Alguns peptídeos foram identificados através de busca em banco de dados do NCBI e SwissProt utilizando ferramentas de pesquisa por padrão de fragmentação dos peptídeos (PMF). Os demais peptídeos foram sequenciados por interpretação manual dos espectros de fregmentação conforme ilustrado na figura 6 a interpretação manual do peptídeo T3. Na tabela 2 estão apresentados o conjunto de peptídeos da CaBo obtidos por MS/MS.

**Tabela 2** – Massa molecular e sequência dos peptídeos da lectina de *Canavalia bonariensis* oriundos das digestões com tripsina e quimiotripsina

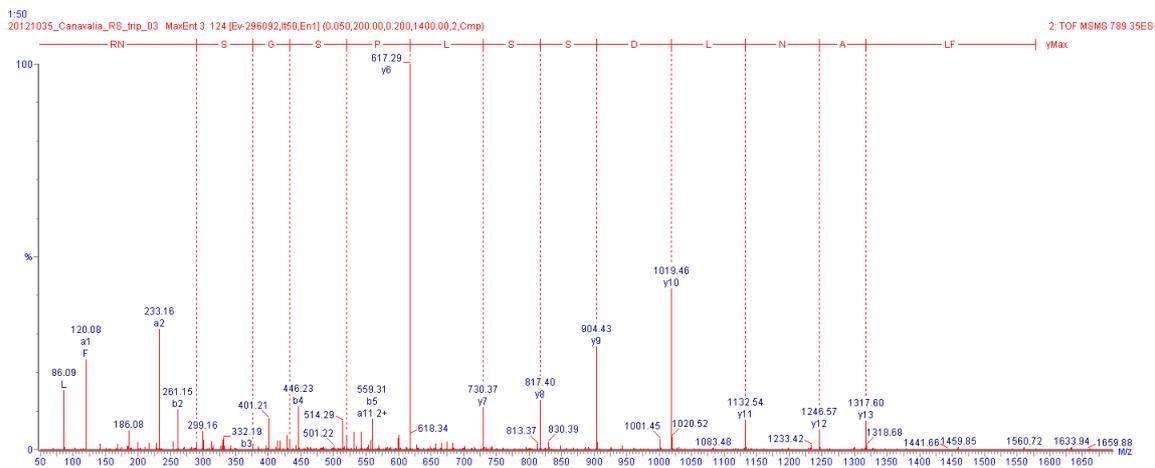
Peptídeo	Massa Molecular (Da)		Sequência	Diferença de Massa	
	Observada	Calculada			
Tripsina	T1*	3268,5137	3268,4137	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIK	-0,1
	T2	876,3876	876,3912	WNMQNGK	0,00
	T3	1358,6589	1358,6942	VGTAHLNYSVVGK	0,04
	T4*	2603,2490	2603,1590	VGLSAT TGLYKETNTILSWSFTSK	-0,09
	T5	2098,7690	2098,970	SNSTADANALHFTFNQFSK	0,20
	T6*	2101,9438	2102,0438	DLILQGDATTGTDGNLELTR	0,10
	T7	1344,6146	1344,6382	VSSNGSPQGNSVGR	0,02
	T8	814,3575	814,3861	SFDATFK	0,03
	T9	1576,6931	1576,7845	FLANLDSSLPSGSNR	0,09
Quimiotripsina	Q1	2088,1315	2088,0412	SYDVDLDNVLPWVRVGL	0,09
	Q2	2037,9014	2038,0014	SFTSKLKSNSTADANALHF	0,10

Elaborada pelo autor.

\* Peptídeos identificados através de busca em bancos de dados. Os demais peptídeos foram sequenciados por espectrometria de massas sequencial.

Não foi possível obter cobertura total da sequência da CaBo por meio da espectrometria de massas mesmo com a utilização de diferentes enzimas proteolíticas (tripsina e quimiotripsina) para a fragmentação dos peptídeos. Dessa forma a sequência completa da lectina foi obtida através da tradução da sequência de cDNA de clones transformados do gene isolado da lectina.

**Figura 6** – Sequenciamento *de novo* do peptídeo T9.

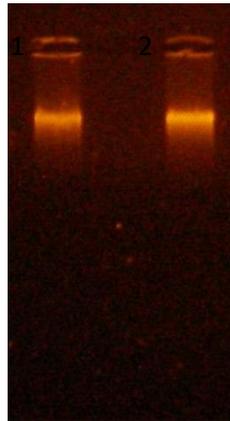


Fonte: Elaborado pelo autor. Espectro de MS/MS de um íon duplamente carregado com  $m/z$  789,35 cuja série de íons-y foi utilizada para determinação da sequência de aminoácidos.

### 4.3 Clonagem molecular da CaBo

A extração do DNA genômico da *Canavalia bonariensis* foi feita a partir de 0,8 g das folhas frescas congeladas e maceradas. A extração pelo método CTAB feita em duplicata resultou em duas soluções contendo 555,5 ng/  $\mu$ L e 602,0 ng/ $\mu$ L de DNA. A eletroforese em gel de agarose mostra a integridade do DNA genômico obtido após a preparação (FIGURA 7).

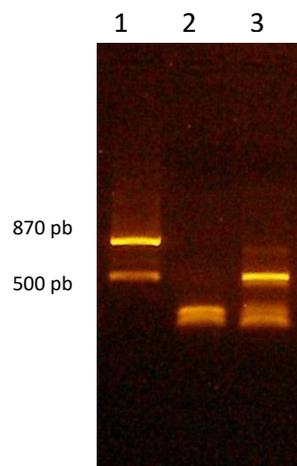
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1%: Extração do DNA genômico da *C. bonariensis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Poços 1 e 2 - DNA da *Canavalia bonariensis*.

A amplificação do DNA foi realizada através de uma reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram utilizadas a amostra 2 do DNA genômico da *C. bonariensis*, juntamente com os iniciadores DG3' $\alpha$  e DG5' $\gamma$ . Após a reação a amostra foi revelada em gel de agarose 1% e o resultado mostrou a amplificação de um fragmento de interesse (FIGURA 8).

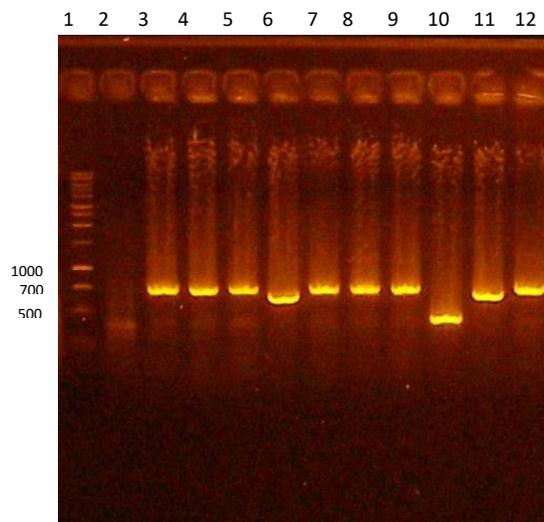
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1%: PCR do DNA genômico da *C. bonariensis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Poço 1: marcador 870 pb e 500 pb; poço 2: controle negativo; poço 3: PCR do gene da *C. bonariensis*.

A quantificação das amostras usadas na PCR mostrou 875,0 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA no controle negativo e 977,5 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA da *C. bonariensis*, totalizando então 102,5 ng/  $\mu\text{L}$  de DNA como produto de PCR. Esse produto contendo o fragmento de DNA de interesse foi utilizado para a reação de ligação e clonagem no vetor pGEM-T-*easy* e depois transformado em células de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ . A confirmação dos clones foi feita através de PCR *Colony* (FIGURA 9). 10 clones foram utilizados na reação e um total de 7 clones (poços 3, 4, 5, 7,8,9,10) do fragmento foram selecionados para serem sequenciados.

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1%: PCR *Colony* para confirmação dos clones de interesse.

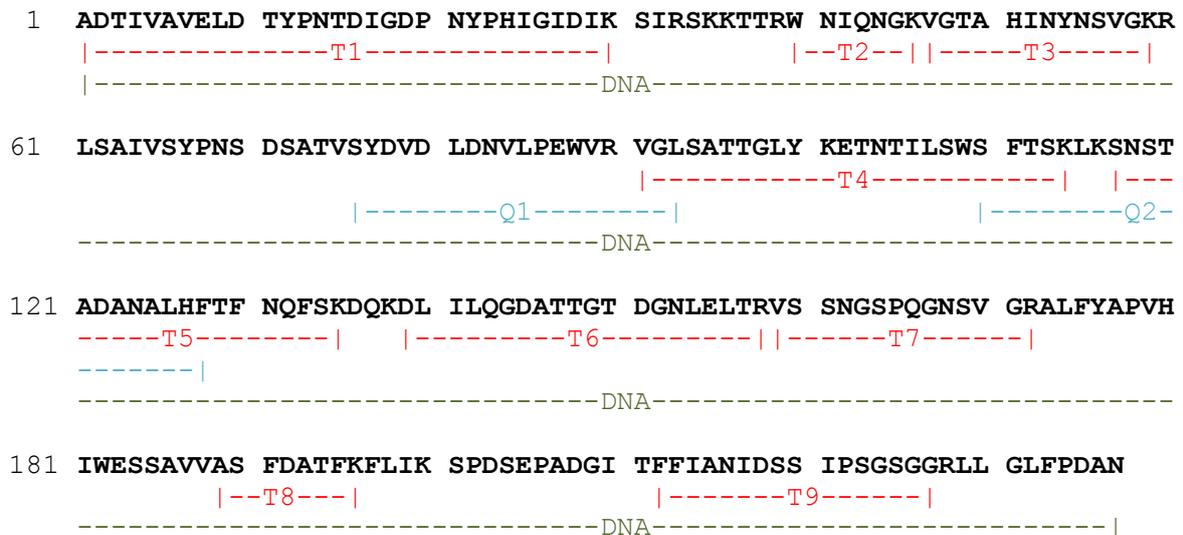


Fonte: Elaborado pelo autor. 1: Marcador 1 kilobase; 2: Controle negativo; 3-12: Clones transformados.

Os fragmentos selecionados foram sequenciados e traduzidos, revelando uma sequência de 267 aminoácidos, que confirmaram os peptídeos obtidos por espectrometria de massas.

Com a integração dos peptídeos obtidos por espectrometria de massas e a sequência obtida por tradução do cDNA da CaBo foi possível obter a estrutura primária completa da lectina (FIGURA 10).

Figura 10 – Sequência da cadeia alfa da lectina de *Canavalia bonariensis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. Mapa dos pepetídeos obtidos por digestão com tripsina (T) e quimiotripsina (Q) e sequência dos aminoácidos traduzidos das contigs do DNA.

A sequência do N-terminal da CaBo obtida por Calvete *et. al* (1999), foi confrontada com a sequência obtida neste trabalho. Ambas apresentaram identidade de 100 % até o aminoácido na posição 25. A sequência primária completa da CaBo será depositada no banco de dados “UniProt Knowledge Base” e o seu número de acesso, quando disponível, estará disponível para consulta no NCBI.

A massa teórica calculada da CaBo e das suas subunidades estão de acordo com as massas determinadas experimentalmente por MALDI-ToF/MS ( $\alpha = 25512$ ;  $\beta = 12998$ ;  $\gamma = 12534$ ).

Comparando a lectina de *Canavalia bonariensis* (CaBo) com demais lectinas de Diocleinae verifica-se uma alta similaridade entre a estrutura primária dessas proteínas, principalmente aquelas do gênero *Canavalia* (FIGURA 11). Essa conservação de resíduos é característica das lectinas de Diocleinae.

Figura 11 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das lectinas de Diocleinae

```

Canavalia_brasiliensis  ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Canavalia_boliviana    ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Canavalia_ensifomis    ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Canavalia_maritima     ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Canavalia_gladiata     ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Canavalia_grandiflora  ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Canavalia_bonariensi   ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Camptosema_pedicellatum ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Cratylia_floribunda   ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTA 50
Dioclea_violacea      ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTA 50
Dioclea_virgata       ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTA 50
Dioclea_sclerocarpa   ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTV 50
Dioclea_rostrata      ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTV 50
Dioclea_guianensis    ADTIVAVELDSYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKSTARWNMQTKGVGTA 50
*****:*****.* ****:***:***  :***.* **.*.

Canavalia_brasiliensis  HIIYNSVGKRLSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLY 100
Canavalia_boliviana    HIIYNSVGKRLSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSATTGLY 100
Canavalia_ensifomis    HIIYNSVDKRLSAVVSYPNADSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLY 100
Canavalia_maritima     HIIYNSVGKRLSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLY 100
Canavalia_gladiata     HIIYNSVGKRLSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLY 100
Canavalia_grandiflora  HIIYNSVGKRLSAVVSYPNADSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSATTGLY 100
Canavalia_bonariensis  HIIYNSVGKRLSAIVSYPNDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSATTGLY 100
Camptosema_pedicellatum HIIYNSVAKRLSAIVSYPGSSSATVSYDVDLNNILPEWVRVGLSASTGVY 100
Cratylia_floribunda   HIIYNSVAKRLSAIVSYPGSSSATVSYDVDLNNILPEWVRVGLSASTGLY 100
Dioclea_violacea      HIIYNSVAKRLSAVVSYPGSSSTTVSYDVDLNNVLPWVRVGLSATTGLY 100
Dioclea_virgata       HIIYNSVAKRLSAVVSYPGSSSTTVSYDVDLNNVLPWVRVGLSATTGLY 100
Dioclea_sclerocarpa   HIIYNSVAKRLSAVVSYPGSSSTTVSYDVDLNNVLPWVRVGLSATTGLY 100
Dioclea_rostrata      HIIYNSVAKRLSAVVSYPGSSSTTVSYDVDLNNVLPWVRVGLSATTGLY 100
Dioclea_guianensis    HIIYNSVAKRLSAVVSYPGSSSTTVSYDVDLNNVLPWVRVGLSATTGLY 100
** *** *****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.

Canavalia_brasiliensis  KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGT 150
Canavalia_boliviana    KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGR 150
Canavalia_ensifomis    KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGT 150
Canavalia_maritima     KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGT 150
Canavalia_gladiata     KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGT 150
Canavalia_grandiflora  KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFTFNQFTKDQKDLILQGDATTDS 150
Canavalia_bonariensis  KETNTILSWSFTSKLKSNSHETNALHFTFNQFSKDQKDLILQGDATTGT 150
Camptosema_pedicellatum KETNTILSWSFTSKLKTNSTADAQSLHFTFNQFSQSPKDLILQGDASTDS 150
Cratylia_floribunda   KETNTILSWSFTSKLKTNSTADAQSLHFTFNQFSQSPKDLILQGDASTDS 150
Dioclea_violacea      KETNTILSWSFTSKLKTNSIADANSLHFSFNQFSQSPKDLILQGDATTDS 150
Dioclea_virgata       KETNTILSWSFTSKLKTNSIADANSLHFSFNQFSQSPKDLILQGDATTDS 150
Dioclea_sclerocarpa   KETNTILSWSFTSKLKTNSIADANSLHFSFNQFSQSPKDLILQGDATTDS 150
Dioclea_rostrata      KETNTILSWSFTSKLKTNSIADANSLHFSFNQFSQSPKDLILQGDATTDS 150
Dioclea_guianensis    KETNTILSWSFTSKLKTNSIADANSLHFSFNQFSQSPKDLILQSDATTDS 150
*****:*****.* : :*** *::*:.. *****.* **.*.

Canavalia_brasiliensis  EGNLRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWESSAVVASFEATFTFLIK 200
Canavalia_boliviana    DGNLRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWESSAVVAGFEATFTFLIK 200
Canavalia_ensifomis    DGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWESSAVVASFEATFTFLIK 200
Canavalia_maritima     DGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWESSAVVASFDATFTFLIK 200
Canavalia_gladiata     DGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVHIWESSAVVASFDATFTFLIK 200
Canavalia_grandiflora  DGNLQLTRVSSDGTPOGNSVGRALFYAPVHIWESSAVVASFDATFTFLIK 200
Canavalia_bonariensis  DGNLELTRVSSNGSPQGNSVGRALFYAPVHIWESSAVVASFDATFKFLIK 200
Camptosema_pedicellatum DGNLQLTRVS-NGSPQNSVGRALFYAPVHVWDKSAVVASFDATFTFLIK 199
Cratylia_floribunda   DGNLQLTRVS-NGSPQNSVGRALFYAPVHVWDKSAVVASFDATFTFLIK 199
Dioclea_violacea      DGNLQLTRVSSDGPQGSSVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATFTFLIK 200
Dioclea_virgata       DGNLQLTRVSSDGPQGSSVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATFTFLIK 200
Dioclea_sclerocarpa   DGNLQLTKVSSSDPQGNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATFTFLIK 200
Dioclea_rostrata      DGNLELTRVSSSDPQGNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATFTFLIK 200
Dioclea_guianensis    DGNLELTRVSSSDPQGNVGRALFYAPVHIWEKSAVVASFDATFTFLIK 200
.***.**.* * **..*****.*****.*.*****.***.***.*

```

```

Canavalia_brasiliensis SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTRLLGLFPDAN 237
Canavalia_boliviana SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTRLLGLFPDAN 237
Canavalia_ensifomis SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTRLLGLFPDAN 237
Canavalia_maritima SSDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTRLLGLFPDAN 237
Canavalia_gladiata SPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTRLLGLFPDAN 237
Canavalia_grandiflora SPDSPADGITFFISNMDSTIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Canavalia_bonariensis SPDEPADGITFFIANIDSSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Camptosema_pedicellatum SPDSPADGIAFFIANTDSSIPHGSGRLLGLFPDAN 236
Cratylia_floribunda STDSDIADGIAFFIANTDSSIPHGSGRLLGLFPDAN 236
Dioclea_violacea SPDRPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Dioclea_virgata SPDRPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Dioclea_sclerocarpa SPDRPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Dioclea_rostrata SPDRPADGITFFIANPDTIPSGSGRLLGLFPDAN 237
Dioclea_guianensis SPDRPADGITFFIANTDTSIPSGSGRLLGLFPDAN 237
* . * . *****:***:* *::** ** *****

```

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Similaridade entre a estrutura primária da CaBo e demais lectinas da tribo Diocleinae.

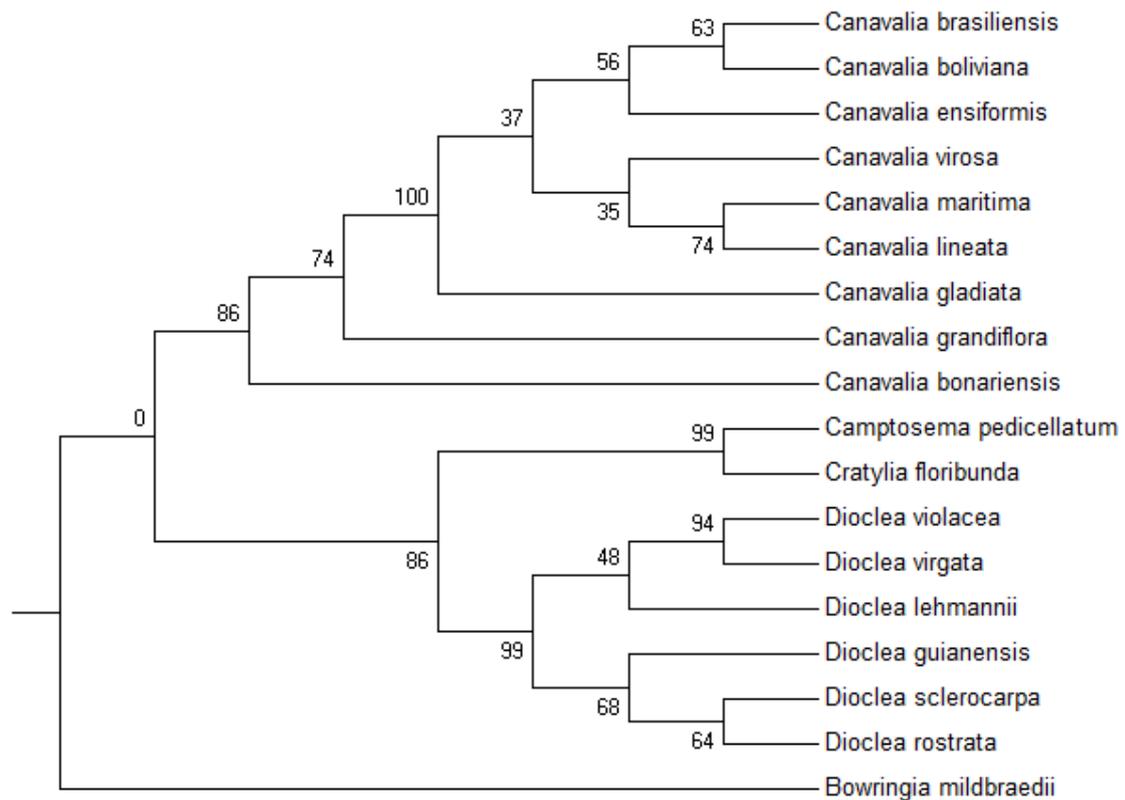
Lectina	Escore (%)
ConA	91,14
ConBr	90,72
ConGr	90,72
CGL	92,41
Cbol	90,72
ConM	91,56
CPL	85,59
CFL	85,17
DvirL	86,08
DVL	86,08
DRL	86,92
DguiL	85,65
DSL	84,81

Fonte: Elaborada pelo autor.

A CaBo possui sequência proteica bastante conservada em relação às demais lectinas do mesmo gênero, apresentando similaridade de aproximadamente 91% com essas proteínas, mas ao longo da sua sequência surgem algumas modificações de resíduos de aminoácidos que são característicos das lectinas do gênero. Essas modificações (A121 e A123) sugerem que a lectina de *Canavalia bonariensis* seja a mais primitiva dentre as demais lectinas de *Canavalia* e tenha se originado de um ancestral comum que divergiu formando as lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Dioclea*, *Cratylia* e *Camptosema*. Esse resultado é mais

evidenciado na árvore filogenética formada a partir das sequências de aminoácidos das lectinas de Diocleinae (FIGURA 12).

Figura 12 – Arvore filogenética exibindo as relações evolutivas entre as lectinas de Diocleinae.



Fonte: Elaborada pelo autor. Os números entre os ramos indicam a confiança dos resultados em uma escala variando de 0-100. A lectina de *Bowringia mildbraedii* (BMA) foi utilizada como grupo externo.

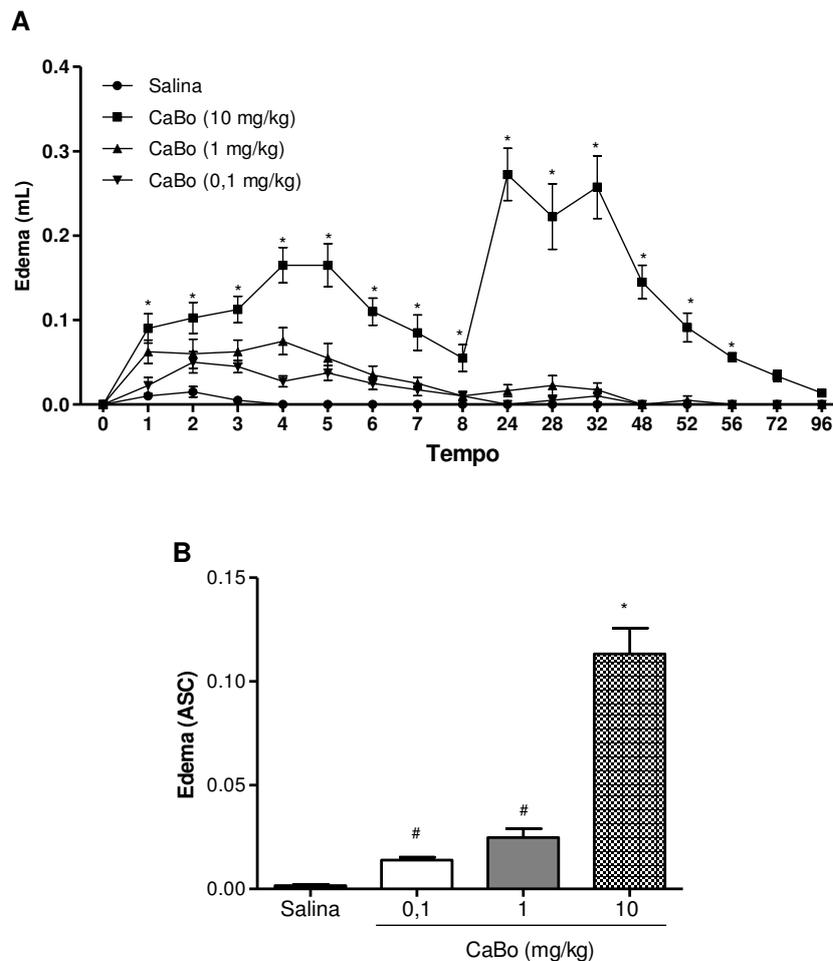
A análise filogenética demonstra a escala evolutiva entre as lectinas. A posição basal da *Canavalia bonariensis* na ramificação das *Canavalias* é considerado um indício de que esta lectina seja a mais primitiva entre as demais do mesmo gênero.

#### 4.4 Avaliação do efeito edematogênico da lectina de *Canavalia bonariensis*

A injeção subcutânea da CaBo induziu um edema de pata mostrando o efeito máximo na dose de 10 mg/kg. Nesta dose, o efeito edematogênico da CaBo começou em 1 h ( $0,09 \pm 0,01$  mL), atingiu um pico máximo após 24 h da injeção ( $0,27 \pm 0,03$  mL, comparado com a solução salina: 0 mL) e manteve-se significativa até 56<sup>a</sup> h ( $0,03 \pm 0,006$  mL; Fig. 13A, B). Estes dados demonstram que o processo inflamatório produzido pela lectina possui efeito tardio.

Outras lectinas do mesmo gênero já apresentaram efeito semelhante de indução de edemas em patas de camundongos, conforme descrito por Assreuy *et al.*, 2009, para as lectinas de *C. maritima*, *C. brasiliensis* e *C. gladiata*.

Figura 13. CaBo induz edema de pata em camundongos.



Fonte: Elaborada pelo autor. CaBo (0,1, 1, 10 mg/kg) ou salina estéril (0,1 mL/100 g de peso corporal) foram injetados s.c. nas patas posteriores de camundongos. O edema foi medido antes (tempo zero) e durante 1-96

horas depois e expressos como **(A)** aumento no volume da pata (mL) ou como **(B)** ASC. Média  $\pm$  E.P.M. (n = 8).

\*p<0,05 comparado com solução salina. #p<0,05 em relação CaBo (10 mg/kg).

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados temos que uma lectina de sementes de *Canavalia bonariensis* Lindl, denominada CaBo, foi purificada através de um protocolo reprodutível de alta eficiência. uma lectina glicose/manose específica a partir. A CaBo mostrou-se estável quando submetida a uma ampla variação de temperatura e pH, e teve sua hemaglutinante comprometida quando na presença de agente quelante, conforme o esperado para lectinas do mesmo tipo (lectinas conhecidas como *ConA-like*).

Novos resultados foram somados aos dados estruturais da CaBo. A proteína é composta de uma cadeia  $\alpha$  de 25512,339 Da e duas subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  de massa 12999,625 Da e 12537,256 Da, respectivamente. A sequência da lectina foi determinada e apresentou elevada similaridade com outras lectinas de Diocleinae, e quando foi realizada uma análise filogenética da CaBo mostrou-se mais primitiva em relação as lectinas isoladas do gênero *Canavalia*.

O trabalho também apresentou resultados relevantes com relação efeitos edematogênicos da lectina de *C. bonariensis*, indicando que esta molécula deva desencadear um processo inflamatório tardio.

Esses novos resultados devem ser somados aos estudos estruturais e funcionais de lectinas de Diocleinae e fornecem subsídios para a utilização de lectinas vegetais com ferramentas biotecnológicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, Fortaleza, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, V. B.; ALENCAR, N. M.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 1805–1814, 2005.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; de SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, p. 1-10, 1997.

ASSREUY, A. M. S.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, E. E. F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J Urol**, Fortaleza, v.161, n. 6, p. 1988- 93, 1999.

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

BARROSO-NETO, I.L. **Resolucao da estrutura de uma lectina de sementes de *Canavalia Grandiflora* BENTH. Com efeitos sobre mecanismos inflamatórios.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

BENETEAU, J.; RENARD, D. ; MARCHÉ, L.; DOUVILLE, E.; LAVENANT, L.; RAHBÉ, Y. ; DUPONT, D.; VILAINE, F.; DINANT, S. Binding properties of the N-

acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in Arabidopsis. **Plant Physiol.** v. 153(3), p. 1345-61, 2010.

BENJAMIN, C. F.; FIGUEIREDO, R. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 30, p. 873-881, 1997.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. **Analytical Biochemistry,** v. 72, p. 248-254. 1976.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; ROCHA, I. M. A.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1430, p. 367-375, 1999.

CANTU, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF., ARNO, N.; PALMA, M.S. Seqüenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova,** v.31, n.3, p. 669-675. 2008.

CARRINGTON, D. M., AUFFRET, A., HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of Concanavalin A. **Nature,** v. 313, n.3, p. 64-67, 1985.

CAVADA, B. S.; MOREIRA-SILVA, L. I. M.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; PINTO, V. P. T.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; GOMES, J. C.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. Purifications and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry.** v. 11, p. 74-80, 1996.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

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

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

CLAVERIE, J. M.; HUET, M. Sedimentation studies of the reversible dimer–tetramer transition kinetics of Concanavalin A. **Biochemistry** v.17, p. 236–241, 1978.

DELATORRE, P. **Lectinas de leguminosas: novos enfoques estruturais para velhas moléculas**. Tese (Doutorado em Bioquímica), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE, G. N.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. J., WANG, J.L. The covalent and threedimensional structure of Concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci USA**. v 69(9), p. 2580-2594, 1972.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FERNANDEZ-LIMA, F. A.; PONCIANO, C. R.; CHAER NASCIMENTO, M. A.; SILVEIRA, E. F. DA. Theoretical and Experimental Analysis of Ammonia Ionic Clusters Produced by <sup>252</sup>Cf Fragment Impact on an NH<sub>3</sub> Ice Target. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, n. 33, 2006.

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

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; MOTA, M. R.; SILVESTRE, P. P.; AGUIAR, C. N.; BENEVIDES, R. G.; NASCIMENTO, K. S.; DE MOURA, T. R.; DAL-SECCO, D.; ASSREUY, A. M.; CUNHA, F. Q.; VALE, M. R.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 736-744, 2009a.

FREIRE, M. G. M.; DESOUZA, I. A.; SILVA, A. C. M.; MACEDO, M. L. R.; LIMA, M. S.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**. v. 42 p. 275-280, 2003.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**. v 11, p. 4910-4919, 1972.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. **Analytical chemistry**, V. 63, N. 24, p. 1193 - 1293, 1991.

HOFFMANN, E.; STROOTBART, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3 Ed. West Sussex, England: Wiley-Interscience, p. 502, 2007.

KARAS, M.; GLÜCKMANN, M.; SCHÄFER, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 35, p. 1 –12, 2000.

LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.,; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; DE NUCCI, G. Inhibition of carragenin-induced rat paw oedema by crotopotin, a polypeptide complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. **Br J Pharmacol**, v.114, p. 578-583, 1995.

LANSEN, G. L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Rev. Immunol**, v.1, p.335-359, 1993.

LEWIN, B. **Genes VI**. Oxford University Press and Cell Press, 1997.

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

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. 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**. v. 146 p. 486-498, 2007.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34 n.5 São Paulo, 2011.

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

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

NAGANO, C. S.; CALVETE, J. J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B. S.; SANZ, L. Insights in to the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer Equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochemical Journal**, v. 409, p. 417 – 428, 2008.

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

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Rev. in Plant Science**, Leuven, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.. The role of lectins in plant defense. **Histochem, J.** v. 27, p. 253–271, 1995.

PINTO-JÚNIOR, V. R.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; CAJAZEIRAS, J. B.; VASCONCELOS, M. A.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, A. S. F.; MIGUEL, T. B. A. R.; MIGUEL, E. C. M.; SAMPAIO, A. H.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart.. **Molecules (Basel. Online)**, v. 18, p. 10857-10869, 2013.

PIRES, A.F. **Lectinas isoladas de sementes de Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae): modelo para estudos de relações estrutura/função de proteínas.** Tese (Doutorado em Biotecnologia - RENORBIO), Centro de Ciências Saúde, da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

PUSTZAI, A. **Plant Lectins.** Cambridge University Press. 1991.

SIMÕES, R. C. **Caracterização de lectinas de leguminosas por Espectrometria de Massa.** Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

SIMÕES, R. C.; ROCHA, B. A. M.; BEZERRA, M. J. B.; BARROSO-NETO, I. L.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; MATA MOURA, R.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C.

S.; DELATORRE, P.; FREITAS, P. A.; ASSREUY, A. M. S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. **RCM. Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 811-818, 2012.

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

SIQUEIRA, J. R.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação.: **Medsi** , p. 238, 2000.

SHARON, N. AND LIS, H. Legume Lectins – A large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3198-3208, 1990.

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**.14:53R–62R, 2004.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Pract. Res.Clin. Anaesthesiol.**, v.18, n.3, p. 385-405, 2004.

STRYER, L. **Biochemistry** . New York. W.H. Freeman and Company, 1988.

TEIXEIRA, E. H.; ARRUDA, F. V. S.; NASCIMENTO, K. S.; CARNEIRO V. A.; NAGANO, C. S.; SILVA, B. R.; SAMPAIO, A. L.; CAVADA, B. S. Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview. **Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. p. 533-558, 2012.

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

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, v.17, n.6, p.575-692, 1998.

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

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H. B.; SCHRANK, I. S.; RODRIGUES, J. J. S.; REGNER, L. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; RAUPP, R. M.; SILVA, S. C.; GAIESKY, V. L.V. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996.