



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

CLEANE GOMES MOREIRA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTRUTURAL E
BIOLÓGICA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia villosa* BENTH

FORTALEZA

2017

CLEANE GOMES MOREIRA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTRUTURAL E
BIOLÓGICA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia villosa* BENTH

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Profa. Dra Kyria Santiago do Nascimento

Co-orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

FORTALEZA

2017

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)

- M837p Moreira, Cleane.
Purificação, caracterização físico-química, estrutural e biológica de uma lectina de semente de Canavalia villosa BENTH / Cleane Moreira. – 2017.
85 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Lectina. 2. Canavalia villosa. 3. hipemocicepção. 4. atividade pró-inflamatória. 5. anti-câncer. I. Título.
CDD 660.6
-

CLEANE GOMES MOREIRA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ESTRUTURAL E
BIOLÓGICA DE UMA LECTINA DE SEMENTES DE *Canavalia villosa* BENTH

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jorge Luis Almeida Correia (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras (Examinador)
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

Profa. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha (Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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

Aos meus pais Antônio e Adelina,

Ao meu irmão Aurélio; e irmãs, Eliane,

Cristina, Francisca, Cristiane,

Aos meus sobrinhos Laryce, Kelvyn, Breno,

Erick, Aline, Clodomiro, Ezequias, Nicole e

Heloísa

A meu marido Lineker.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida, pela força e coragem que tenho para enfrentar os obstáculos e adversidades. Sem fé, sem acreditar, eu não teria chegado a lugar algum.

Aos professores Dra. Kyria Santiago do Nascimento e ao Dr. Benildo Sousa Cavada pelas orientações, pela confiança, por acreditarem no meu potencial, por me permitirem trabalhar no BioMol, pelos ensinamentos e amizade. Sou muito grata por tudo!

Aos professores Dr. João Batista Cajazeiras e Dr. Jorge Luis Almeida Correia por aceitarem compor a banca, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

A professora Dra. Cíntia Renata Costa Rocha e ao professor Dr. Francisco Nascimento Pereira Júnior por aceitarem compor a banca, pelas contribuições e colaboração.

A professora Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy e laboratório LAFFIN pela contribuição na realização das atividades biológicas.

Ao Professor Dr. Rodrigo Bainy Leal e laboratório de Neuroquímica pela contribuição na realização de atividade biológica em glioma.

A Cláudia Figueiredo Lóssio pela importante participação no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, por estar sempre pronta a ajudar, pela amizade. Obrigada por tudo.

Aos amigos Ivanice, Simoni, Gleiciane, Mayara Torquato, Clareane, André, vocês são presentes que o doutorado me deu. Obrigada pelos ensinamentos, crescimento, dedicação e amizade.

Aos amigos Mayara Queiroz, Vanir, Vinícius, obrigada por serem sempre tão solícitos, por ajudarem a todos, por compartilhar os conhecimentos, pela dedicação de vocês ao laboratório e pela amizade.

A Fátima Morgana por toda a paciência e dedicação, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

A todos os integrantes e amigos do BioMol, Hadson, Neto, Alfa, obrigado por estarem sempre prontos a ajudar e por toda a dedicação; Adolph, William, David, Larissa, Ronniery, Messias, Marliane, Ariany, a todos do BioMol, obrigada pela amizade e por tudo. Vocês são todos muito importantes para mim.

A minha família pela força e sentimentos bons que tenho sempre que estou perto de vocês. Ao meu irmão Antônio Aurélio, por sua dedicação, exemplo, conversas e ensinamentos. Obrigada por tudo maninho. Aos meus pais Antônio e Adelina, por terem me criado com tanta dificuldade e mesmo assim, terem me dado tanto: educação, respeito, moral,

caráter, dignidade e amor. Obrigada pela minha vida. As minhas irmãs por serem tão incríveis, por sempre me apoiarem, por todo o amor, pela convivência, pelos ensinamentos, pela proteção e por terem me dado os melhores presentes: meus sobrinhos. Aos meus sobrinhos por serem luz na minha vida. Por me mostrarem um amor tão puro e maravilhoso. Amo muito todos vocês.

Ao meu marido, Lineker Costa Passos por todo o amor, paciência, amizade, dedicação, pelos planos e sonhos que compartilhamos, pelo crescimento, mudanças e aprendizado que temos um ao lado do outro; pela felicidade que tenho em estar ao seu lado. Obrigada por estar na minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro durante o meu período de doutoramento.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Com importantes propriedades de ligação a carboidratos, lectinas são proteínas capazes de decifrar o glicocódigo e, como tal, podem ser utilizadas em bioensaios que envolvem, por exemplo, a comunicação célula-célula e sinalização celular, bem como o direcionamento de proteínas. Neste estudo, uma nova lectina específica a manose foi isolada de sementes de *Canavalia villosa* por um único passo de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex® G-50. SDS-PAGE mostrou que a lectina é composta de três bandas e a análise por espectrometria de massas indicou que a lectina de *C. villosa* possui três cadeias (α , β e γ) com massas de 25.647, 12.966 e 12.685 Da, respectivamente, similar ao perfil de lectinas ConA-like específicas a manose. A análise em eletroforese bidimensional mostrou a presença de cinco isoformas e ponto isoelétrico em torno de pH 5,0. A lectina aglutinou fortemente eritrócitos de coelho nativos e tratados com enzimas proteolíticas e foi inibida por D-manose e α -metil-D-manosídeo. A atividade hemaglutinante da Cvill é máxima nos pH 5,0 a 7,0, e estável até a temperatura de 70 °C. A sequência parcial da lectina foi obtida por MS-MALDI TOF/TOF com cobertura de aproximadamente 41% da sequência. A proteína foi cristalizada pelo método de difusão de vapor na presença do ligante α -metil-D-manosídeo. Essa lectina mostrou alta toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp., induziu edema de pata e hipernocicepção em ratos com participação do sítio de ligação a carboidratos e mostrou efeitos citotóxicos em células de glioma da linhagem C6 com uma potente atividade na redução da viabilidade celular e alteração na morfologia celular.

Palavras-chave: Lectina, *Canavalia villosa*, espectrometria de massas, cristalografia de raios X, toxicidade, hipernocicepção, atividade pró-inflamatória, anti-câncer.

ABSTRACT

Presenting important carbohydrate binding properties, lectins are proteins able to decipher the glycode, and as such, they can be used in bioassays involving, for example, cell-cell communication and cell signaling, as well as protein targeting. In this study, a new mannose-specific lectin from *Canavalia villosa* seeds (Cvill) was isolated by a single affinity chromatography step in a Sephadex® G-50 column. SDS-PAGE showed the lectin to be composed of three bands, and similar to the other lectins of the subtribe Diocleinae, analysis by mass spectrometry indicated that the lectin *C. villosa* has three chains (α , β and γ) with masses of 25,647; 12,966 and 12,685 Da, respectively, similarly to the profile of ConA-like lectins specific to mannose. A two-dimensional electrophoresis analysis showed the presence of five isoforms and isoelectric point around pH 5.0. The lectin strongly agglutinated rabbit erythrocytes native and treated with proteolytic enzymes, and presented sugar specificity to α -methyl-D-mannoside and D-mannose, in addition to high stability within a broad range of pH (pH 5,0 a 7,0) and temperature (up to 70 °C). Partial sequence of the protein was obtained by MS-MALDI TOF/TOF covering approximately 41% of the sequence. The protein was crystallized by vapor diffusion method in the presence of α -methyl-D-mannoside. The lectin also showed average toxicity against artemia nauplii and induced paw edema and hypernociception in mice with the participation of the carbohydrate binding site. In tests on C6 lineage of *Rattus norvegicus* glioma cells, Cvill showed ability to reduce viability and changes in morphology in the cells tested.

Keywords: Lectin, *Canavalia villosa*, mass spectrometry, X-ray crystallography, toxicity, hypernociception, pro-inflammatory activity, anticancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Classificação estrutural de lectinas de plantas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.....	22
Figura 2 -	Representação de um monômero de lectina de leguminosa.....	23
Figura 3 -	Modificações pós-traducionais durante a biossíntese da Concanavalina A (ConA).....	26
Figura 4 -	<i>C. villosa</i> . A) folhas, caule e flor. B) folhas e fruto.....	27
Figura 5 -	Esquema espectrômetro de massas.....	28
Figura 6 -	Fonte de ionização MALDI.....	29
Figura 7 -	Fonte de ionização ESI.....	30
Figura 8 -	Tipos de espectrometria de massas em tandem.....	31
Figura 9 -	Diagrama de fases para a cristalização de macromoléculas.....	33
Figura 10 -	Métodos de cristalização que utilizam a técnica de difusão de vapor.....	34
Figura 11 -	Evolução da inflamação aguda. Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.....	37
Figura 12 -	Emigração de leucócitos para o local da injúria. Etapas de rolamento, adesão e transmigração.....	39
Figura 13 -	Náuplio de <i>Artemia</i> sp.....	42
Figura 14 -	Cromatograma e caracterização eletroforética de Cvill.....	56
Figura 15 -	Cromatografia de exclusão por tamanho de Cvill.....	57
Figura 16 -	Efeitos do pH e temperatura na atividade hemaglutinante de Cvill. (A) ensaio de estabilidade de pH. (B) ensaio de termoestabilidade...	58
Figura 17 -	Eletroforese bidimensional de Cvill. (A) Pontos (spots) da banda α , com cinco isoformas marcadas em vermelho. (B) Visão tridimensional das isoformas no gel.....	60
Figura 18 -	Espectro MS/MS do peptídeo de Cvill.....	61
Figura 19 -	Alinhamento da sequência de aminoácidos de <i>C. villosa</i> (Cvill) com lectinas de Diocleinae.....	62
Figura 20 -	Cristais de Cvill.....	64
Figura 21 -	Efeito citotóxico de Cvill em diferentes concentrações contra <i>Artemia</i> sp.....	65

Figura 22 -	Inibição do efeito tóxico de Cvill contra <i>Artemia</i> sp.....	66
Figura 23 -	Cvill induz o edema da pata e a hipernocicepção em camundongos..	67
Figura 24 -	Concentração e viabilidade linhagem C6 tratada com Cvill após 24h.....	68
Figura 25 -	Análise morfológica da linhagem C6 tratada com Cvill por 24h.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade hemaglutinante do extrato total e lectina pura de <i>Canavalia villosa</i>	55
Tabela 2 -	Purificação da lectina de <i>Canavalia villosa</i>	56
Tabela 3 -	Inibição da hemaglutinação da lectina de <i>Canavalia villosa</i>	57
Tabela 4 -	Sequência parcial da lectina de <i>Canavalia villosa</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å: Angstrom

AUC: Área sob a curva

BSA: Albumina Sérica Bovina

CE: Concentração Efetiva

CFL: Lectina de *Cratylia floribunda*

CGL: Lectina de *Canavalia gladiata*

CHAPS: (3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate)

CID: Dissociação induzida por colisão

CL50: Concentração Letal Mediana

CMI: Concentração mínima inibitória

ConA: Lectina de *Canavalia ensiformes*

ConBr: Lectina de *Canavalia brasiliensis*

ConGF: Lectina de *Canavalia grandiflora*

ConV: Lectin de *Canavalia virosa*

CoxyL: Lectina de *Canavalia oxyphylla*

CTL: Lectina de *Centrolobium tomentosum*

CvL: Lectina de *Cliona varians*

Da e kDa: Dálon e kilodálon

DGL: Lectina de *Dioclea grandiflora*

DlyL: Lectina de *Dioclea lasiophylla*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DRC: Domínio de reconhecimento de carboidratos

DrfL: Lectina de *Dioclea reflexa*

DSL: Lectina de *Dioclea sclerocarpa*

DTT: Ditiotreitól

DvirL: Lectina de *Dioclea violacea*

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ESI: Ionização por eletrospray

FRIL: Lectina de *Dolichos lablab*

FT-ICR: Ressonância ciclométrica de íons com transformada de Fourier

GalNAc: N-Acetilgalactosamina

HEPES: Ácido 4- (2-hidroxiethyl) -1-piperazinoetanossulfônico)

HGA: Aglutinina de *Holothuria grisea*

HGL: Lectina de *Holothuria grisea*

IPG: Immobiline DryStrip gels

LMW: Marcador de baixo peso molecular

m/z: Relação massa sobre carga

mA: Miliampere

MALDI: Ionização/dessorção a laser assistida por matriz

MS: Espectrometria de massas

MTT: Sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

Nm: Nanômetros

NO: Óxido nítrico

PAF: Fator de agregação plaquetária

PAS: Reagente ácido periódico de Schiff

PDB: Protein Data Bank

pH: Logarítmo negativo da concentração de íons de hidrogênio

PHA: Lectina de *Phaseolus vulgaris*

PNA: Aglutinina de amendoim

RIP: Proteína inativadora de ribossomos

s.c.: Subcutânea

SBA: Lectina de soja

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil sulfato de sódio

TEMED: N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina

TFA: Ácido trifluoroacético

TOF: Analisador por tempo de voo

TxLC-I: Lectina do bulbo da tulipa

UH: Unidade de hemaglutinação

UV: Ultravioleta

V e Vh: Volts e Volt hora

VML: Lectina de *Vatairea macrocarpa*

W: Whatts

w:v: Peso:volume

WGA: Lectina do gérmen de trigo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 Lectinas	19
3.1.1 Histórico e definição	19
3.1.2 Classificação de lectinas vegetais	21
3.1.3 Lectinas de leguminosas.....	22
3.1.3.1 Características estruturais de lectinas de leguminosas	23
3.1.3.2 Lectinas de Diocleinae	24
3.2 <i>Canavalia villosa</i>	26
3.3 Espectrometria de massas.....	27
3.4 Cristalização de proteínas.....	32
3.5 Processo inflamatório.....	36
3.6 Nocicepção.....	39
3.7 <i>Artemia</i> como modelo de citotoxicidade.....	41
3.8 Câncer	43
3.8.1 <i>Glioma</i>	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Purificação da lectina de sementes de <i>Canavalia villosa</i>	45
4.1.1 Extração proteica.....	45
4.1.2 Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex-G50	45
4.1.3 Cromatografia de exclusão molecular	45
4.1.4 Dosagem de proteínas solúveis	46
4.1.5 Ensaio da atividade hemaglutinante e cálculo da atividade hemaglutinante específica	46
4.1.6 Especificidade por carboidratos	46
4.1.7 Eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS	47
4.2 Caracterização físico-química da lectina de <i>Canavalia villosa</i>	48
4.2.1 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante	48
4.2.2 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante	48
4.2.3 Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante	48
4.2.4 Análise da presença de carboidratos estruturais	48

4.2.5 Eleroforese bidimensional.....	49
4.3 Análise de massa intacta e sequência de cvill por espectrometria de massas	49
4.3.1 Determinação da massa molecular de Cvill	49
4.3.2 Digestão “in gel” e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas	50
4.4 Resolução da estrutura tridimensional de Cvill por cristalografia de raios X.....	51
4.4.1 Cristalização da Cvill.....	51
4.4.2 Coleta de dados	51
4.5 Efeitos de Cvill na análise da toxicidade contra <i>Artemia</i> sp., atividade inflamatória, antinociceptiva e em células de glioma.....	52
4.5.1 Toxicidade contra <i>Artemia</i>	52
4.5.1.1 Determinação do CL50	52
4.5.2 Avaliação do efeito inflamatório através do modelo edema de pata	52
4.5.3 Antinocicepção	53
4.5.4 Viabilidade celular da linhagem C6 expostas a Cvill	53
4.5.5 Análise dos efeitos na morfologia das células da linhagem C6 após tratamento com Cvill	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Purificação da lectina de sementes de <i>Canavalia villosa</i>	55
5.2 Caracterização físico-química de Cvill	57
5.3 Massa intacta e sequência primária de Cvill	60
5.3.1 Determinação da massa de Cvill.....	60
5.3.2 Sequenciamento de Cvill	60
5.4 Cristalização da Cvill	63
5.5 Efeitos de Cvill na análise da toxicidade contra <i>Artemia</i> sp., atividade inflamatória, antinociceptiva e em células de glioma.....	65
5.5.1 Ensaio de toxicidade em <i>Artemia</i> sp.	65
5.5.2 Indução de edema de pata e hipernocicepção em rato	66
5.5.3 Efeitos de Cvill na morfologia e viabilidade em células de glioma da linhagem C6.....	68
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são uma classe estrutural diversa de proteínas, possuindo como característica comum a capacidade de se ligar especificamente e reversivelmente a carboidratos e, eventualmente, aglutinar células (SHARON; LIS, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2016).

O padrão de glicosilação de proteínas celulares é influenciado por várias alterações fisiológicas, como a ocorrência de uma doença (GABIUS *et al.*, 2004; KELLY *et al.*, 2007) e a população de glicofomas alteradas de uma dada glicoproteína pode ser utilizada para o diagnóstico da doença responsável pela própria alteração (AMBROSI *et al.*, 2005; KELLY *et al.*, 2007). Portanto, as lectinas funcionam como marcadores únicos de reconhecimento de células para carboidratos e enquanto os açúcares são capazes de transportar a informação biológica, as lectinas são capazes de decifrar seu código (o glicocódigo), assim, elas são "decifradoras" (GEMEINER *et al.*, 2009).

Lectinas possuem aplicações em biotecnologia, podem ser usadas para diagnóstico médico (MISLOVIČOVÁ *et al.*, 2009) e são o principal material na fabricação de ferramentas como microarrays, biosensores, biomarcadores e suportes para cromatografia de afinidade (DAN *et al.*, 2015). São também importantes ferramentas para a caracterização de glicanos em células (SOUSA *et al.*, 2015) e atuam como agentes anti-insetos e antimicrobianos (HAMID *et al.*, 2013).

As lectinas de leguminosas são as mais caracterizadas, apresentando semelhança estrutural, mas diversidade na especificidade de ligação de carboidratos e atividades biológicas (CAVADA *et al.*, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Algumas lectinas de Diocleinae foram avaliadas em relação a resposta inflamatória, apresentando efeitos pró-inflamatórios, com aplicação por via local. Por exemplo, as lectinas de *C. oxyphylla*, *D. reflexa* e *C. virosa* (SANTIAGO *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015; OSTERNE *et al.*, 2017) mostraram ação pró-inflamatória. Outras mostraram resposta anti-inflamatória, quando aplicadas por via sistêmica, como as lectinas de *D. violacea*, *D. guianensis*, *D. virgata* e *Cratylia floribunda* (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999) apresentaram ação anti-inflamatória.

Muitas lectinas de leguminosas tiveram suas atividades de nocicepção determinadas, entre elas, na subtribo Diocleinae muitas apresentaram efeitos antinociceptivos *Canavalia brasiliensis* (PIRES *et al.*, 2013); *D. virgata* (DELATORRE *et al.*, 2011); *C. boliviana* (FIGUEIREDO *et al.*, 2009); *C. maritima*, *C. grandiflora*, *D. guianensis* e *D.*

violacea (HOLANDA *et al.*, 2009). Foi observado também efeito hipernociceptivo em *D. lasiophylla* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b).

A toxicidade de diversas lectinas de leguminosas foi analisada utilizando o teste de artemia (ARRUDA *et al.*, 2013; PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013; OSTERNE *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2014; BARI *et al.*, 2013; PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2015), o qual é um ensaio bem estabelecido para determinar a toxicidade de moléculas bioativas.

Muitas lectinas de leguminosas foram analisadas em relação a ação contra células cancerígenas. As lectinas de *C. virosa* (ConV), *Glycine max* (SBA), ConA, ConBr, lectina de *Viscum*, WGA apresentaram atividade indutora de autofagia e apoptose, levando assim a morte de células malignas de diferentes tipos de câncer, como hepatocarcinoma, melanoma, leucemia e glioma (OSTERNE *et al.*, 2017; FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2007; MO; LIM, 2005; DE MEJIA; BRADFORD; HASLER, 2003; BANTEL *et al.*, 1999).

Um entendimento detalhado sobre as estruturas dessas proteínas se faz necessário, para tentar desvendar mecanismo de ação, especificidade, comportamento do domínio de reconhecimento a carboidrato (DRC), entre outros. Muitos estudos têm sido realizados a fim de desvendar a sequência primária e resolver a estrutura tridimensional dessas proteínas. Para esse fim, técnicas como espectrometria de massas vem sendo utilizada na tentativa de desvendar as sequências primárias; e cristalografia de proteínas aliada a análises computacionais, bem como um conjunto de informações como a própria sequência primária da proteína em estudo, banco de dados de sequência primária e de estruturas, são utilizadas em conjunto para elucidar a estrutura tridimensional da proteína de interesse e obter o modelo mais adequado (BEZERRA *et al.*, 2007, 2011; BARROSO-NETO *et al.*, 2014, 2016; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a, b; OSTERNE *et al.*, 2017). Desta forma, informações sobre um grupo de lectinas relacionadas ajuda na resolução da estrutura de uma outra lectina relacionada a este grupo que não tenha a estrutura ainda resolvida.

Assim, cada lectina estudada é uma nova descoberta e oportunidade de aplicação biológica e caracterizar essas biomoléculas é uma forma de ampliar o conhecimento de sequência, comportamento tridimensional da lectina, entendimento nos processos de sinalização e reconhecimento de moléculas. Mesmo que apresentem semelhança em afinidade por carboidrato e sequência de aminoácidos, podem diferir quanto às várias propriedades biológicas. E por mais semelhante que possa parecer cada lectina merece ser estudada isoladamente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo purificar uma lectina de sementes de *Canavalia villosa*, caracterizá-la físico-quimicamente, determinar sua estrutura e avaliar suas propriedades biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar uma lectina presente em sementes de *Canavalia villosa*;
- Determinar a especificidade da lectina por açúcares através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante;
- Determinar a massa aparente da lectina por SDS-PAGE;
- Determinar o ponto isoelétrico e presença de isoformas de Cvill através de eletroforese bidimensional;
- Caracterizar a lectina Cvill quanto a estabilidade a variação de pH e de temperatura e verificar a interferência de cátions divalentes;
- Determinar a massa intacta de Cvill por espectrometria de massas;
- Determinar a estrutura primária de Cvill e analisá-la quanto à similaridade entre outras lectinas;
- Cristalizar a lectina Cvill pelo método de difusão de vapor;
- Difratar o cristal de Cvill e obter o conjunto de padrões de difração;
- Resolver e refinar a estrutura Cvill;
- Avaliar a toxicidade da lectina contra náuplios de *Artemia* sp.;
- Determinar atividade inflamatória de Cvill em modelo de edema de patas;
- Determinar a atividade nociceptiva de Cvill em ratos utilizando o método de von Frey;
- Avaliar a toxicidade e efeitos morfológicos de Cvill em células de câncer da linhagem C6.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Lectinas

3.1.1 Histórico e definição

Os primeiros vestígios de lectina foram observados nos cristais de Charcot-Leyden com a forma pura da lectina animal galectina-10 em 1853 e 1872. A primeira atividade de lectina animal foi provavelmente observada em cobras. Em 1886, Mitchell e Reichert descreveram estudos de hemaglutinação com veneno de cobra (porém não utilizando o termo hemaglutinação). Em 1902, Flexner e Noguchi, publicaram um estudo detalhado de aglutinação e lise de eritrócitos e leucócitos por uma variedade de venenos de cobra. (KILPATRICK, 2002).

Em 1935 e 1944 foram relatadas aglutininas de duas espécies de enguias (*Anguilla japonica* e *Anguilla anguilla*, respectivamente) específicas para eritrócitos de sangue tipo O (SHARON; LIS, 2003). Essas aglutininas de enguias foram de importância crucial no estabelecimento da fucose como estrutura imunodominante no grupo sanguíneo O. Assim, estudos bioquímicos em aglutininas de enguias claramente indicaram sua natureza não imune. A primeira lectina animal específica ao grupo sanguíneo A foi encontrada em uma espécie de *Saxidomus* em 1960s, seguido de outras espécies relatadas como caracol (*Helix pomatia*) e espécies relacionadas. As primeiras lectinas de origem animal anti-B foram encontradas em várias espécies da família das trutas e salmões (KILPATRICK, 2002).

A primeira ocorrência de hemaglutininas em plantas foi reportada em 1888, quando Hermann Stillmark misturou extrato da semente tóxica de mamona (*Ricinus communis*) com sangue e observou a aglutinação de eritrócitos. Porém a ricina é na verdade uma mistura de moléculas tóxica de ricina e aglutininas não tóxicas (SHARON; LIS, 2003). Pouco tempo depois, H. Hellin descobriu a aglutinina “abrina” no extrato tóxico de sementes de jequiriti (*Abrus precatorius*). Na última década do séc. XIX, Paul Ehrlich utilizou ricina e abrina para estudos da especificidade da resposta imune (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Em 1900, Karl Landsteiner descobriu os grupos sanguíneos humanos A, B e O. Juntamente com Raubitschek, demonstraram em 1908 que a atividade de hemaglutinação relativa dos extratos de sementes variava dependendo da espécie animal do qual provinha o sangue (SHARON; LIS, 2003).

Em 1919, James B. Sumner isolou uma proteína de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) por precipitação com sal, cristalizou e obteve a primeira proteína pura, a qual foi nomeada concanavalina A. Em 1936, juntamente com S. F. Howell observou que a concanavalina A aglutinava eritrócitos e leveduras, precipitava soluções com glicogênio e sua hemaglutinação era inibida por sacarose. Assim, logo sugeriram tratar-se de reação entre proteína de planta com carboidrato de superfície dos eritrócitos (SHARON; LIS, 2003, 2004).

No final dos anos 1940's, Willian C. Boyd, R. M. Reguera e, independentemente, Karl O. Renkonen, relataram que para os antígenos do grupo sanguíneo humano, haviam aglutininas específicas extraídas de determinadas sementes. Ao estudar extratos de plantas de diversas famílias e gêneros eles observaram que o feijão de lima (*Phaseolus limensis* ou *lunatus*) aglutinava eritrócitos humano tipo A; e que ervilha-asparago (*Lotus tetragonolobus*) era específico pelo tipo O. Em 1951, George W. G. Bird, observou forte especificidade das sementes de *Dolichos biflorus* em distinguir entre subgrupos sanguíneos tipo A₁ e A₂. Em 1975, Olavi Mäkelä estudou extratos de sementes de 743 espécies e 165 gêneros de leguminosas. Observou que apenas uma lectina de *Griffonia simplicifolia* exibiu especificidade quase exclusiva ao tipo B, os outros não eram tão seletivos. Nesse período também foi descoberta por Bird a aglutinina de amendoim (PNA) que é específica para antígeno T (SHARON; LIS, 2003).

Em 1960 uma descoberta revolucionária em que Peter C. Nowell observou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) é mitogênica, ou seja, ela estimula os linfócitos a sofrerem mitose. Teve um grande impacto nos estudos de imunologia, pois até então os linfócitos eram considerados células que não poderiam se dividir nem se diferenciar mais (SHARON; LIS, 2003, 2004).

A capacidade dessas aglutininas distinguírem entre os tipos sanguíneos levou Boyd e Elizabeth Shapley (1954) a nomeá-las lectinas, do Latim, *legere*, que selecionam ou escolhem. Lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos sem, no entanto, alterar suas estruturas químicas (SHARON; LIS, 2003; PEUMANS; VAN DAMME, 1995, KOCOUREK; HOUREJSI, 1983).

3.1.2 Classificação de lectinas vegetais

Lectinas vegetais apresentam aspectos diversos como estrutura molecular, propriedades bioquímicas e especificidade de ligação a carboidratos, sendo consideradas como grupo complexo e heterogêneo de proteínas. Uma subdivisão em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas foi proposta por Peumans e Van Damme (1995), e superlectinas, proposta por Van Damme e colaboradores (1998). Essa classificação de lectinas vegetais teve como base a estrutura geral de lectinas maduras em relação ao processamento pós-traducional.

Merolectinas consistem em um único domínio de ligação a carboidrato, portanto são monovalentes então não podem precipitar glicoconjugados e células. Heveína, uma lectina isolada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) que se liga à quitina é um exemplo desta divisão de lectinas (VAN PARIJS *et al.*, 1991) (Figura 1).

Hololectinas possuem pelo menos dois domínios idênticos de ligação a carboidratos similares. A maioria das lectinas vegetais pertence a esta divisão de lectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995) (Figura 1).

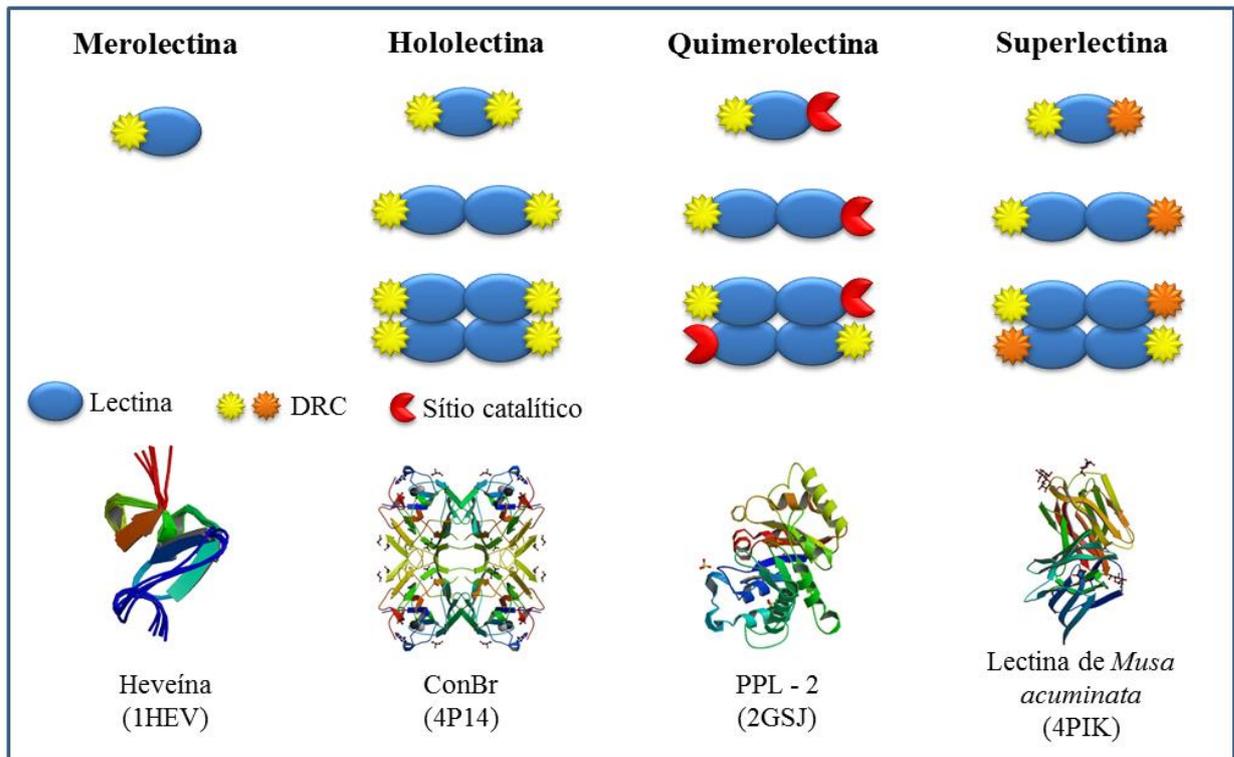
Quimerolectinas apresentam um ou mais domínios de ligação a carboidratos e outro domínio independente do domínio de ligação a carboidrato, com atividade enzimática, por exemplo (Figura 1). Dependendo do número de sítios de ligações a carboidrato, as quimerolectinas podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas. RIP tipo II possuem dois domínios de ligação a carboidratos comportando-se como hololectinas. Quitinases vegetais classe I possuem um único domínio de ligação a quitina e não precipitam glicoconjugados ou aglutinam células (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Superlectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, entretanto, ao contrário das hololectinas, os domínios de ligação a carboidratos reconhecem açúcares estruturalmente não relacionados (Figura 1). Como exemplo a lectina do bulbo da tulipa TxLC-I que consiste em domínios ligantes a manose e a GalNAc não relacionados (VAN DAMME *et al.*, 1996).

Em 1998, Van Damme e colaboradores classificaram lectinas vegetais de acordo com suas relações evolucionárias propostas com base nas relações sorológicas ou similaridades de sequência (ou ambos). Esta subdivisão inclui sete famílias de lectinas denominadas de Lectinas de Leguminosas; Lectinas de Monocotiledôneas Ligantes a Manose; Lectinas Ligantes a Quitina Contendo Domínios Heveínicos; Proteínas Inativadoras de

Ribossomos Tipo II (RIP tipo-2); Lectinas Relacionadas a Jacalina; Lectinas de Floema de Curcubitaceae e Lectinas de Amaranthaceae.

Figura 1 - Classificação estrutural de lectinas de plantas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.



Fonte: Adaptado de PEUMANS; VAN DAMME, 1998. Merolectina – Ex: Heveína (PDB: 1HEV); Hololectina – Ex: ConBr (PDB: 4P14); Quimerolectina – Ex: PPL - 2 (PDB: 2GSJ); Superlectina - Lectina de *Musa acuminata* (PDB: 4PIK).

3.1.3 Lectinas de leguminosas

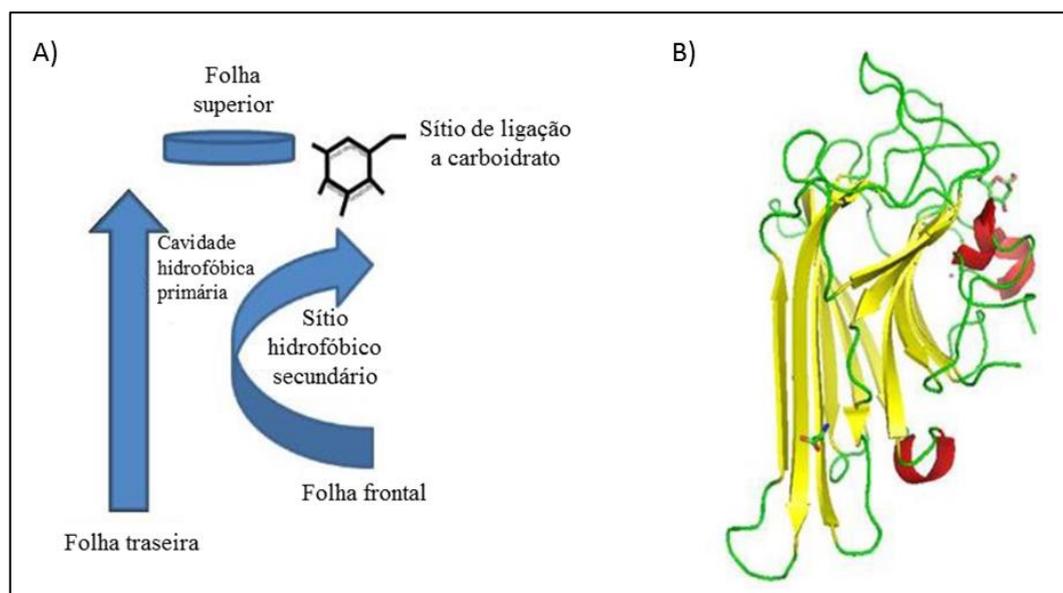
As leguminosas (Leguminosae ou Fabaceae) constituem uma família de plantas que apresenta sementes ricas em lectinas e que possuem relativa facilidade de purificação tornando essas proteínas alvo de muita atenção nos últimos anos. Um grande número de lectinas de leguminosas foram purificadas e caracterizadas (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2014; OSTERNE *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2014; BARI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2011, 2013; PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2012). Esse grupo de lectinas são bastante similares quanto as suas propriedades físico-químicas e estruturais, mas apesar da grande similaridade entre elas, as lectinas de leguminosas demonstram muitos resultados diferentes quando testadas em várias atividades biológicas (CAVADA *et al.*, 2001).

Essas lectinas são principalmente extraídas de sementes, constituindo de 1 a 10% do total de proteínas solúveis e além das sementes, são também encontradas em raízes, caule, folhas e frutos. A maioria dos tecidos contém uma única lectina, mas podem ser encontradas duas ou mais, mesmo com diferentes especificidades e propriedades diferentes. Ainda podem ser encontradas isoformas ou isolectinas que tem estrutura molecular similar, mas podem diferir quanto à especificidade ou propriedades físicas como carga elétrica (SHARON; LIS, 2003).

3.1.3.1 Características estruturais de lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas possuem alta similaridade de estruturas primária, secundária e terciária bem como quanto as suas características biofísicas. Com base nas estruturas resolvidas, cada subunidade é constituída de cerca de 60% de fitas-beta antiparalelas arranjadas em duas ou mais folhas beta interconectadas por voltas em um enovelamento conhecido como “ β -sanduíche”, “jellyroll” ou “lectin fold”. Esse motivo é composto de duas folhas- β dispostas paralelamente, uma anterior com seis fitas e uma dianteira com sete fitas, juntamente com uma pequena folha- β disposta sobre as outras duas. Todas conectadas por diversos loops de vários tamanhos (Figura 2) (LORIS *et al.*, 1998; WILLIAMS; WESTHEAD, 2002).

Figura 2 – Representação de um monômero de lectina de leguminosa.



Fonte: Adaptado de Benevides, 2011. A) esquema da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas. B) estrutura terciária do monômero da lectina de *Canavalia gladiata* complexada com α -metilmanosídeo e ácido aminobutírico (Abu) (ambos em verde) (PDB: 2D7F).

Lectinas de leguminosas são geralmente compostas de 2 ou 4 monômeros, iguais ou diferentes com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa, unidos por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Cada monômero apresenta um único sítio de ligação a carboidratos e um sítio de ligação a íons metálicos, podendo ainda apresentar um ou dois oligossacarídeos *N*-ligados (SHARON; LIS, 2003; BEZERRA *et al.*, 2013).

O domínio de reconhecimento a carboidratos (DRC) está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, formado pela folha- β frontal curva, ao lado dos sítios de ligação a metais e é formado por diversos loops com diferentes graus de variabilidade (SHARMA; SUROLIA, 1997). As conformações desses loops são determinadas pela presença na estrutura de íons de metais de transição, no caso o cálcio e o manganês, cuja ausência resulta em instabilidade local e na perda da capacidade de ligar-se a carboidratos (LORIS *et al.*, 2004).

O DRC das lectinas de leguminosas consiste em uma cavidade na superfície da molécula formada por quatro loops, nessa cavidade ocorre a interação da proteína com o açúcar que se dá por intermédio de pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbica (MORENO *et al.*, 2008). A especificidade das lectinas é, em parte, explicada por variações na composição e no tamanho de um dos quatro loops. Além disso, contatos adicionais entre o carboidrato e a superfície da proteína, que podem ocorrer diretamente ou por intermédio de moléculas de água, contribuem para a alta seletividade dessas proteínas (MANOJ; SUGUNA, 2001).

Além dos domínios de ligação a carboidratos, esse grupo de proteínas pode apresentar sítios específicos que reconhecem metabólitos secundários, fitohormônios e aminoácidos não proteicos, sendo que esses podem estar diretamente relacionados a mecanismos de defesa da planta contra a ação de patógenos, no processo de germinação da semente, dentre outros (DELATORRE *et al.*, 2007).

3.1.3.2 Lectinas de Diocleinae

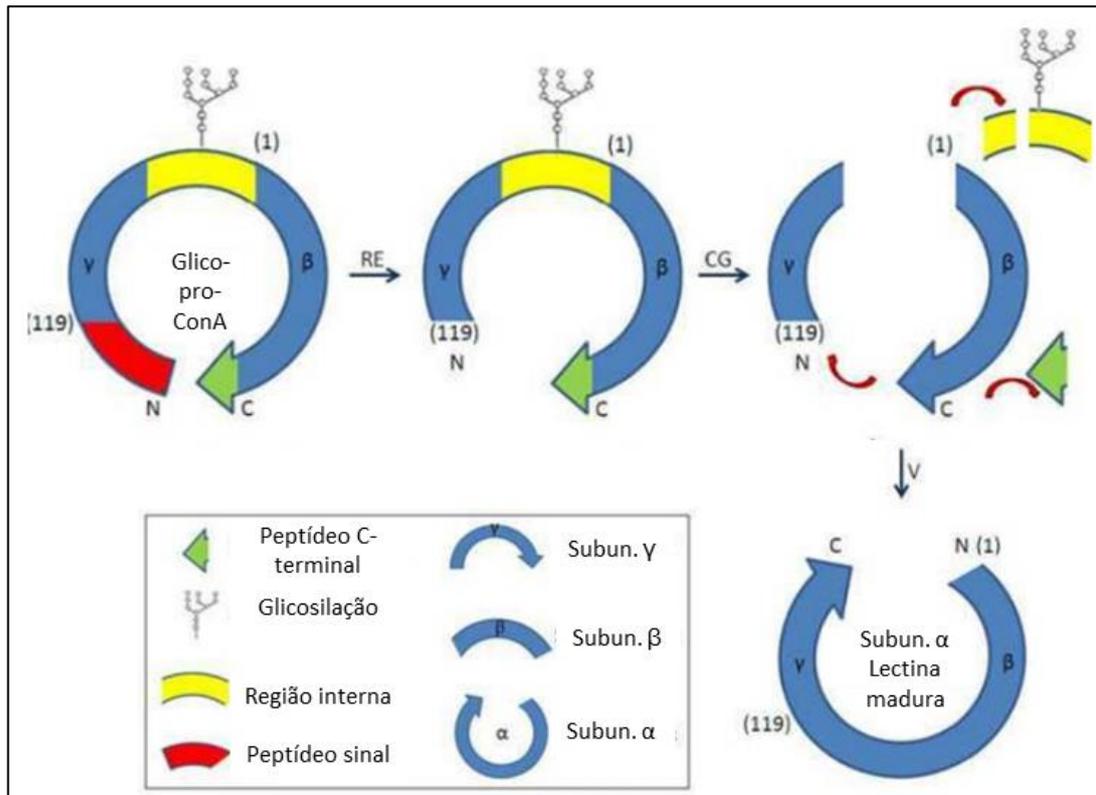
Lectinas do tipo ConA-like extraídas de plantas da subtribo Diocleinae apresentam, via de regra, especificidade por manose/glicose e carboidratos relacionados. Muitas possuem suas estruturas cristalográficas resolvidas, como ConBr (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997), ConGF (BARROSO-NETO *et al.*, 2014), CGL (BEZERRA *et al.*, 2007), DSL (BARROSO-NETO *et al.*, 2016), DrfL (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a), ConV (OSTERNE *et al.*, 2017) dentre outras. Essas lectinas apresentam elevado grau de similaridade, mas apesar disso a substituição de alguns aminoácidos pode alterar a posição de alguns resíduos-chave, o

que confere a estas lectinas a capacidade de desempenhar um vasto espectro de atividades biológicas (OSTERNE, 2016).

Lectinas de Diocleinae sofrem processamento pós-traducional do tipo permutação circular em que a lectina é produzida na forma de pré-pro-lectina. Estruturalmente elas possuem um peptídeo sinal de 20 a 30 resíduos de aminoácidos da região N-terminal, duas cadeias peptídicas (β e γ), uma cadeia intermediária glicosilada (no retículo endoplasmático-RE) e um peptídeo sinal na região C-terminal. Após a clivagem do peptídeo sinal localizado na região N-terminal, a pré-pro-proteína passa por um novo processamento proteolítico 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 β e γ são então religadas em uma posição invertida em relação ao precursor, formando a cadeia α (Figura 3). Esse processamento apresenta rendimento parcial e as cadeias β e γ estão sempre presentes no preparo dessas lectinas. Portanto, quando a lectina é analisada por SDS-PAGE, são observadas três bandas polipeptídicas. Acredita-se que a maioria das lectinas da subtribo Diocleinae sofrem o mesmo processamento (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; OSTERNE, 2016). Apesar disso, estudos de sequências destas proteínas tem mostrado que esse processo não ocorre em algumas dessas lectinas, o que pode explicar as diferenças de afinidade apresentadas por proteínas isoladas de uma mesma semente (PEREZ; HERNANDEZ; MORA, 1991). A determinação da estrutura primária e a resolução da estrutura tridimensional têm sido utilizadas como forma de entendimento desta diferença na especificidade de proteínas isoladas de espécimes da mesma tribo e para obter informação acerca de sua origem evolutiva (OSTERNE *et al.*, 2016).

Lectinas extraídas de espécies da subtribo Diocleinae, exibem uma oligomerização dependente de pH, onde a proporção entre proteínas no estado dimérico e tetramérico pode ser alterada de acordo com pH da solução (CALVETE *et al.*, 1999; NAGANO *et al.*, 2008). A alteração desse equilíbrio dímero/tetrâmero dependente de pH pode influenciar diretamente nas atividades biológicas dessas lectinas, pelo fato dessas proteínas serem capazes de se ligar aos receptores glicoconjugados da superfície das membranas com uma maior afinidade quando na forma tetramérica (DELATORRE *et al.*, 2006).

Figura 3 – Modificações pós-traducionais durante a biossíntese da Concanavalina A (ConA).



Fonte: Adaptado de CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985. RE: retículo endoplasmático, CG: complexo de golgi, V: vacúolo.

3.2 *Canavalia villosa*

Classificação taxonômica:

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Fabales

Família: Fabaceae

Subfamília: Faboideae

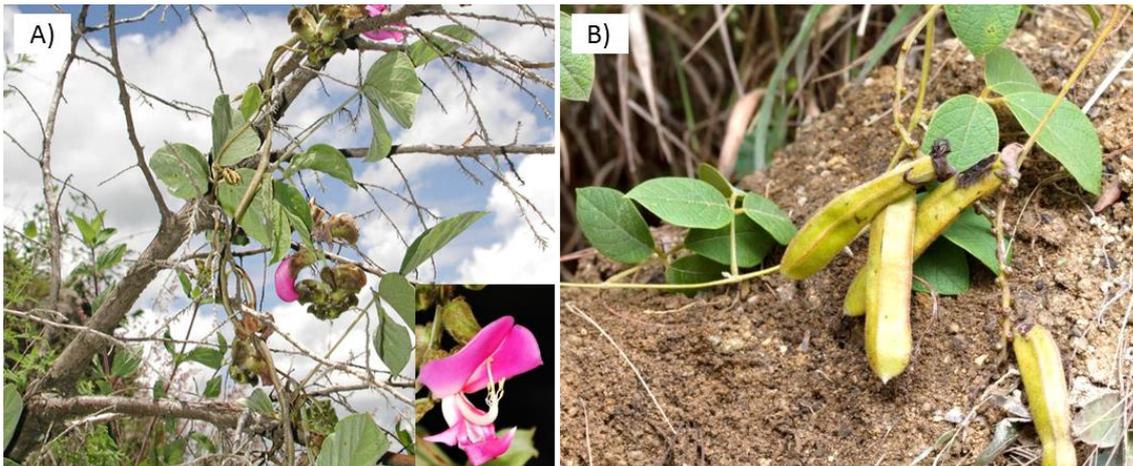
Gênero: *Canavalia*

Espécie: *Canavalia villosa*

Canavalia villosa é uma planta da subtribo Diocleinae (família Leguminosae). Conhecida popularmente como "Gallinilla", "Cuchillo", "Ojo de venado". São comuns em

matagais na América Central e distribuição do México ao Panamá (SCHEMBERA, 2004). No Panamá, a maioria das coletas foi feita em áreas de montanha (WOODSON *et al.*, 2007). É uma planta herbácea e trepadeira, floresce anualmente, mais comumente no verão e outono (Figura 4). Está inserida entre as plantas utilizadas como alimentos humanos na América do Norte, Central e do Sul e no Caribe (KERMATH; BENNETT; PULSIPHER, 2014).

Figura 4 – *C. villosa*. A) folhas, caule e flor. B) folhas e fruto.



Fonte: Disponível em <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/canavalia-villosa/fichas/pagina1.htm> e <http://www.tropicos.org/Image/100208163>. Acesso em 05/04/2017.

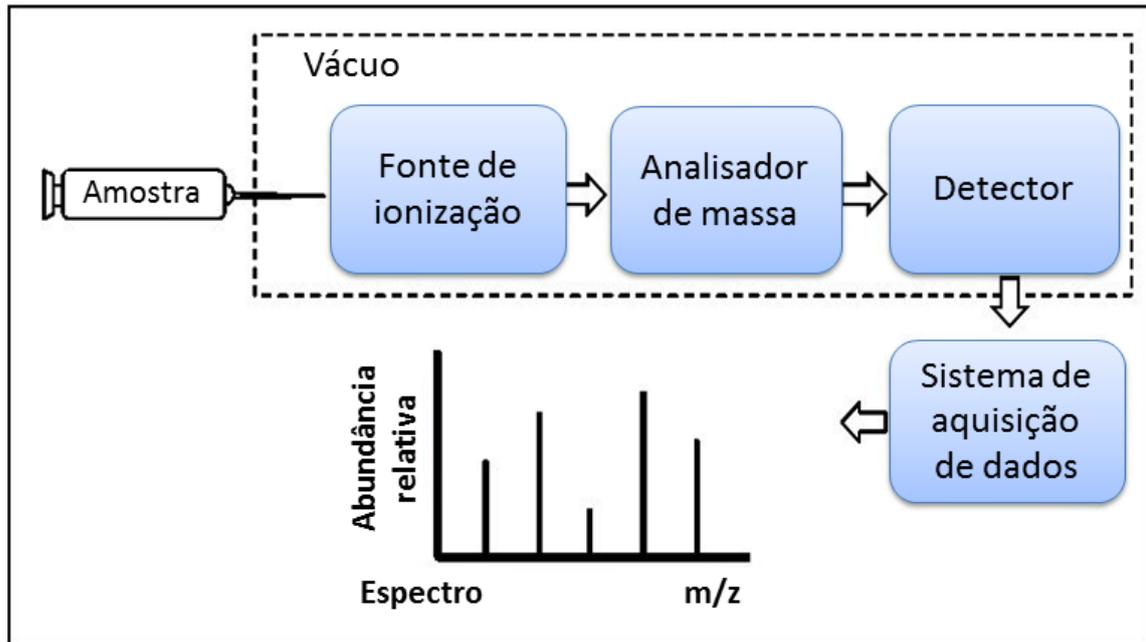
3.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massa (MS) tem sido amplamente utilizada para analisar amostras biológicas e evoluiu para uma ferramenta indispensável para pesquisas proteômicas (HAN; ASLANIAN; YATES, 2008). Permite a determinação precisa da massa molecular de peptídeos e proteínas e também a determinação de suas sequências, especialmente quando usada com técnicas de massa em tandem. De fato, a fragmentação de peptídeos e proteínas dá informação de sequência que pode ser utilizada para a identificação de proteínas, sequenciamento de novo, identificação e localização de modificações pós-traducionais ou outras modificações covalentes (AEBERSOLD; MANN, 2003; STANDING, 2003; SECHI; ODA, 2003; JENSEN, 2004).

Essa técnica é capaz de determinar a relação entre massa e carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa (AEBERSOLD; MANN, 2003). O espectrômetro de massas é um equipamento constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas, um detector e um sistema de aquisição de dados (Figura 5) (CANTÚ *et al.*, 2008).

As fontes de ionização utilizadas em MS para análises proteômicas são ESI (Eletrospray) (FENN *et al.*, 1990) e MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – ionização/desorção a laser assistida por matriz) (KARAS; HILLENKAMP, 1988) que ionizam de maneira suave, preservando a estrutura polipeptídica e transferem as espécies a serem analisadas para a fase gasosa (CANTÚ *et al.*, 2008).

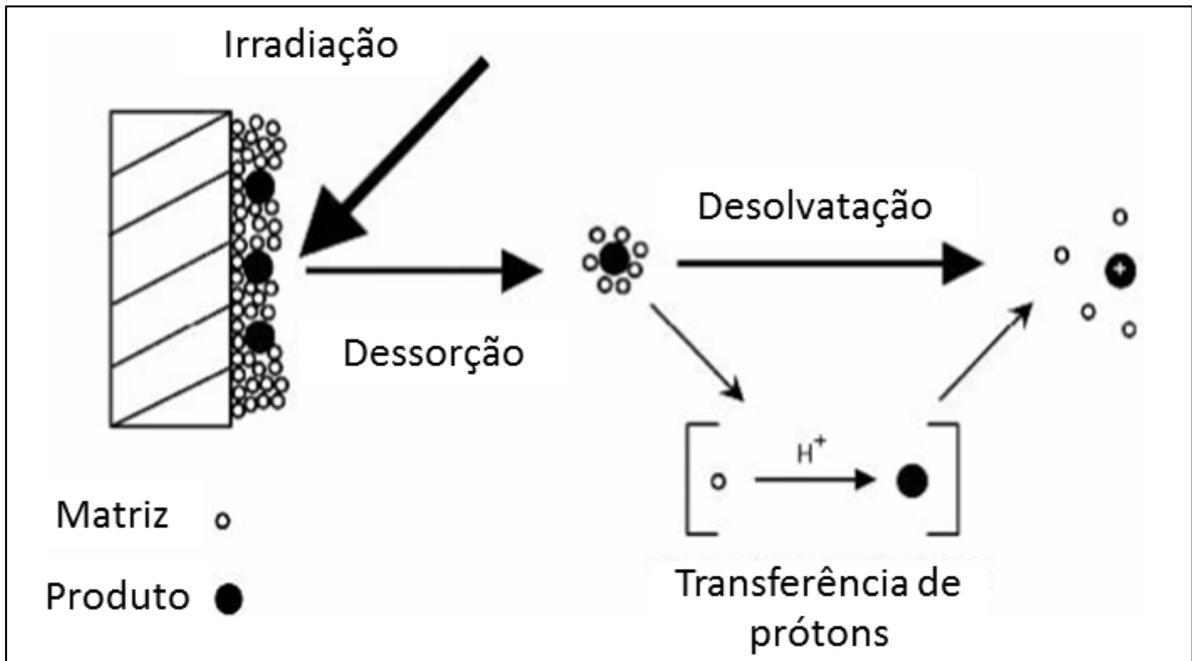
Figura 5 – Esquema espectrômetro de massas



Fonte: Adaptado de: MOURINO-ALVAREZ; LABORDE; BARDERAS (2013).

MALDI é realizado em duas etapas. Primeiro a amostra é dissolvida numa matriz de moléculas orgânicas com forte absorção no comprimento de onda do laser. Esta mistura é seca antes da análise resultando em uma “solução sólida” de cristais de matriz dopados com analitos. O segundo passo ocorre sob condição de vácuo e envolve a ablação de porções desta solução sólida por impulsos intensos de laser durante uma curta duração (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007). A irradiação pelo laser induz um aquecimento rápido dos cristais causando a sublimação localizada dos cristais da matriz, a ablação de uma porção da superfície do cristal e a expansão da matriz para a fase gasosa, arrastando o analito intacto na pluma da matriz em expansão (DREISEWERD, 2003). O mecanismo de formação de íons mais amplamente aceito envolve a transferência de prótons na fase sólida antes da desorção ou transferência de prótons em fase gasosa na pluma de expansão a partir de moléculas de matriz fotoionizadas. Os íons na fase gasosa são então acelerados por um campo eletrostático em direção ao analisador (Figura 6) (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Figura 6 – Fonte de ionização MALDI



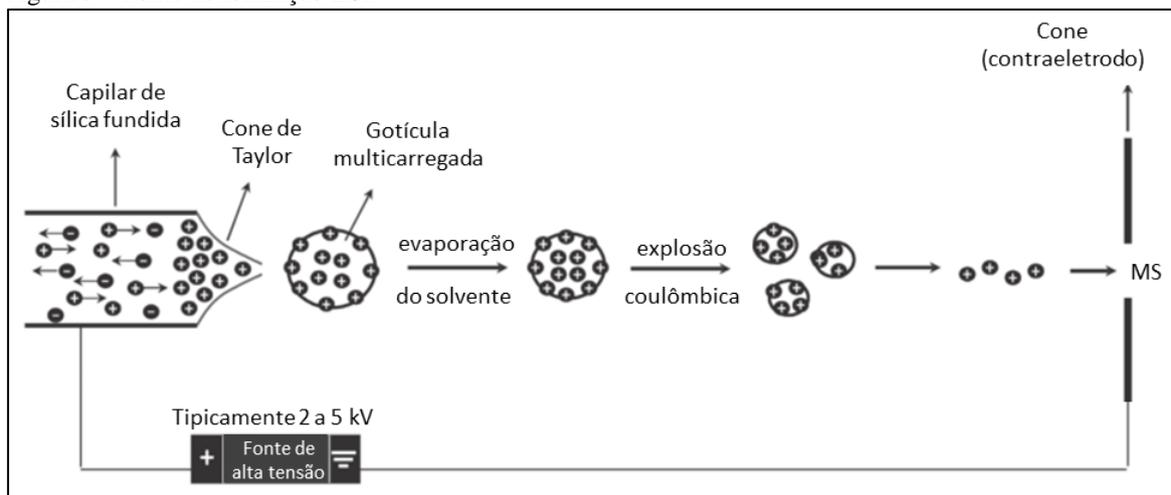
Fonte: Adaptado de DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007.

Em ESI um campo elétrico forte é aplicado a um líquido passando através de um tubo capilar com fluxo fraco (normalmente 1–10 $\mu\text{l}/\text{min}$). Este campo induz um acúmulo de carga na superfície líquida localizada na extremidade do capilar, que se quebra para formar gotículas altamente carregadas. A pulverização começa com uma "tensão inicial" que depende da tensão superficial do solvente. A uma baixa voltagem a gota aparece esférica, depois se alonga sob a pressão das cargas acumuladas na ponta no campo elétrico mais forte; Quando a tensão superficial é quebrada, a forma da gota muda para um "cone de Taylor" e o spray aparece. O solvente contido nas gotas evapora o que faz com que se encolham e a sua carga por unidade de volume aumente. Sob a influência de campo elétrico forte a deformação da gota ocorre. A gota se alonga sob a força resultante da acumulação de carga, de modo semelhante ao que ocorreu na ponta da sonda e, finalmente, produz um novo cone de Taylor. Esse processo ocorre até que ocorra a dessorção do íon (Figura 7) (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Uma vez que os íons da fase gasosa foram produzidos, eles precisam ser separados de acordo com suas massas, o que deve ser determinado. A propriedade física dos íons que é medida por um analisador de massa é sua relação massa-carga (m/z) em vez de sua massa sozinha. Portanto, para os íons com carga múltipla os valores m/z aparente são fracionados das suas massas reais. Como há uma grande variedade de fontes, vários tipos de analisadores de massa foram desenvolvidos (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007), tais

como, quadrupolos, ion-traps (tridimensionais e lineares), time-of-flight (TOF), Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR), orbitrap, entre outros, podem ser utilizados de acordo com os requerimentos do experimento (CANTÚ *et al.*, 2008). A separação de íons de acordo com sua relação massa/carga pode ser baseada em princípios diferentes – Ex: m/z - estabilidade da trajetória (quadrupolo); velocidade – tempo de voo (TOF); m/z – frequência de ressonância (ion trap, FT-ICR). A maioria das diferenças básicas entre os vários tipos comuns de analisadores de massa está na maneira pela qual tais campos são usados para conseguir a separação. Todos os analisadores de massa utilizam campos elétricos e magnéticos estáticos ou dinâmicos que podem ser isolados ou combinados. (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007), formando os equipamentos classificados como híbridos, utilizando as vantagens de cada analisador (CANTÚ *et al.*, 2008).

Figura 7 – Fonte de ionização ESI



Fonte: Adaptado de CANTÚ *et al.*, 2008.

Os analisadores de massa podem ser combinados em sequência (tandem), a fim de aumentar a versatilidade. Os instrumentos híbridos triplo-quadrupolo, TOF-quadrupolo, ion trap-FT-ICR, permitem obter um espectro de massa resultante da decomposição de um íon selecionado no primeiro analisador (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

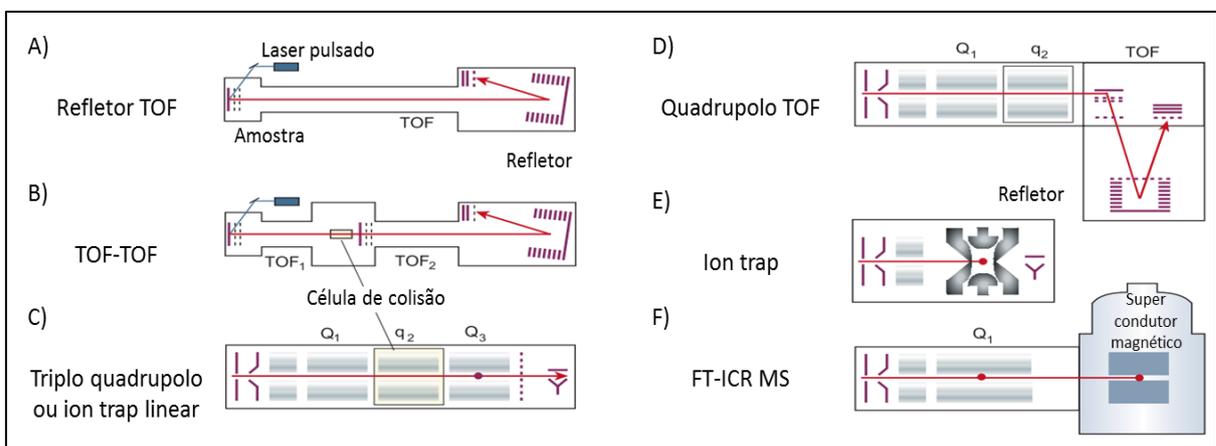
O analisador quadrupolo é um dispositivo que utiliza a estabilidade das trajetórias em campos elétricos oscilantes para separar íons de acordo com suas relações m/z . São formados por quatro hastes perfeitamente paralelas e os íons serão separados ao entrarem no espaço entre as hastes onde serão submetidos a campo elétrico e variação de voltagem nas hastes (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007). Essa variação permite selecionar íons m/z de interesse. Apenas os íons em uma faixa m/z selecionada podem passar pelo quadrupolo, os que estiverem fora dessa faixa ficarão presos no quadrupolo.

O analisador TOF separa íons, após sua aceleração inicial por um campo elétrico, de acordo com suas velocidades quando eles derivam em uma região de campo livre que é chamado de tubo de voo. Os íons são expulsos da fonte por dessorção a laser. São acelerados para o tubo de voo por uma diferença de potencial aplicada. Todos os íons adquirem a mesma energia cinética, os íons caracterizados pela distribuição de suas massas apresentam uma distribuição de suas velocidades. Ao sair da região de aceleração, eles entram em uma região livre de campo onde são separados de acordo com suas velocidades até alcançar o detector na outra extremidade do tubo de voo. A utilização de refletor eletrostático (reflectron) é uma maneira de melhorar a resolução de massa. Ele cria um campo retardador que atua como um espelho de íons, desviando os íons e enviando-os de volta através do tubo de voo (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Os íons passam através do analisador de massa e são então detectados e transformados num sinal utilizável por um detector. Os detectores são capazes de gerar a partir dos íons incidentes uma corrente elétrica que é proporcional à sua abundância para cada m/z (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

Espectrometria de massas em tandem (Figura 8), abreviada MS/MS, é um método envolvendo pelo menos dois estágios de análise de massa. O primeiro analisador é utilizado para isolar o íon precursor, o qual sofre fragmentação ativada ou espontânea para produzir produtos iônicos e fragmentos neutros. Um segundo analisa os produtos iônicos (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007). MALDI é geralmente acoplado ao analisador TOF que mede massa de peptídeos intactos, enquanto ESI é principalmente acoplado a ion trap e triplo quadrupolo e usado para gerar espectros de fragmentos de íons (espectro induzido por colisão – CID) de íons precursores selecionados (AEBERSOLD; MANN, 2003).

Figura 8 – Tipos de espectrometria de massas em tandem.



Fonte: Adaptado de AEBERSOLD; MANN, 2003.

A sequência primária e massa intacta de muitas lectinas de leguminosas foram elucidadas utilizando espectrometria de massas. Dentre elas alguns exemplos são: ConGF (BARROSO-NETO *et al.*, 2014); CoxyL (SANTIAGO *et al.*, 2014); DvirL (DELATORRE *et al.*, 2011); DSL (CORREIA *et al.*, 2011). Sequência primária de ConV (OSTERNE *et al.*, 2017). Em relação a análise de massa intacta ConV (OSTERNE *et al.*, 2014); DrfL (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2015); DlyL (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013), entre outras lectinas.

3.4 Cristalização de proteínas

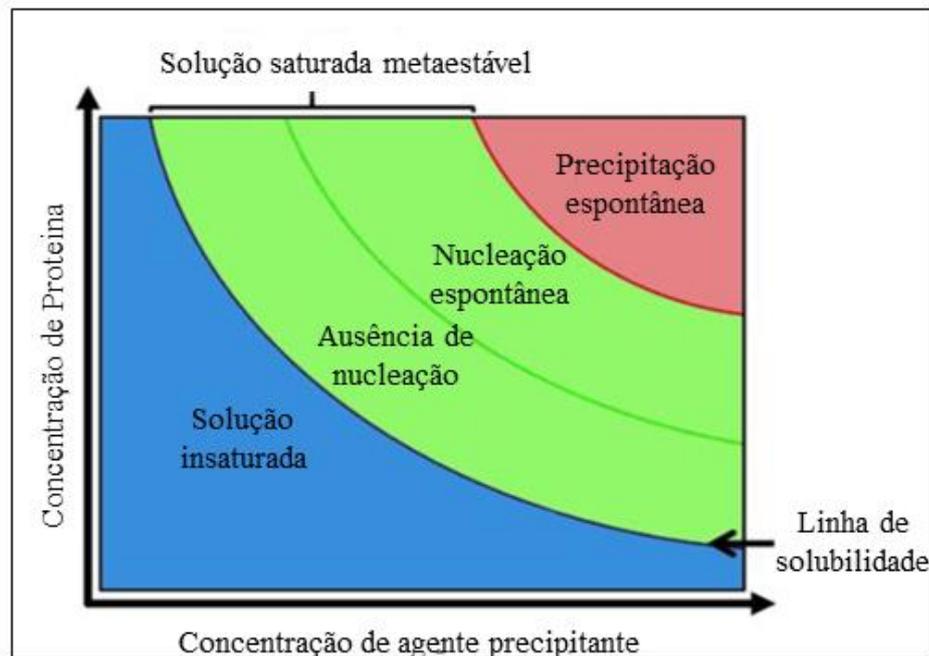
A cristalografia de raios X estuda a estrutura molecular e cristalina e as propriedades relacionadas a essa estrutura. As informações obtidas nesses estudos são fundamentais para aplicação e desenvolvimento em bioinformática que muitas vezes requer o conhecimento tridimensional detalhado da macromolécula em estudo. Essa informação geralmente é obtida a partir de estruturas depositadas em bases de dados públicos, onde podem ser acessadas livremente, dentre os quais se destaca o PDB (Protein Data Bank) (VERLI, 2014).

A determinação da estrutura tridimensional da macromolécula necessita de cristais adequados para os experimentos de difração de raios X. Para a produção de cristais é necessário gerar um certo grau de saturação. No limite de solubilidade ou ponto de equilíbrio, a quantidade de moléculas de proteínas entrando na solução é a mesma quantidade das moléculas saindo da solução. A concentração de proteínas abaixo desse limite constitui solução insaturada; se estiver acima do limite a solução será saturada de proteínas. Cristais podem crescer apenas se a solução está acima desse limite. Diminuir a solubilidade é o meio mais efetivo de criar a supersaturação. Esse processo pode ser conseguido por diferentes abordagens incluindo: alterar o pH do meio, alterar a temperatura, concentração de proteína, etc. Essa estratégia baseia-se num fenômeno de equilíbrio reversível que ocorre em três estágios: nucleação, crescimento e cessação do crescimento (MCPHERSON; GAVIRA, 2014; MCPHERSON, 1990; OSTERNE, 2016).

O processo de cristalização pode ser ilustrado pelo diagrama de fases, que relaciona as concentrações de proteína e precipitante. Esse diagrama é dividido em uma região de instauração/saturação e uma região de supersaturação. A região de supersaturação, por sua vez, é dividida nas regiões: metaestável, nucleação e precipitação. Na região de nucleação poderá ocorrer a formação de núcleos cristalinos, mas não ocorrerá crescimento dos

cristais; na região metaestável tanto a nucleação quanto o crescimento poderão ocorrer e na região de precipitação o mais provável é que não ocorra nucleação e/ou crescimento de cristais, nessa região a proteína provavelmente precipitará. Para a cristalização espera-se que o experimento inicie na zona de nucleação e, com o avanço do processo, passe para a região metaestável permitindo o processo de nucleação e de crescimento do cristal (Figura 9) (MCPHERSON; GAVIRA, 2014; OSTERNE, 2016).

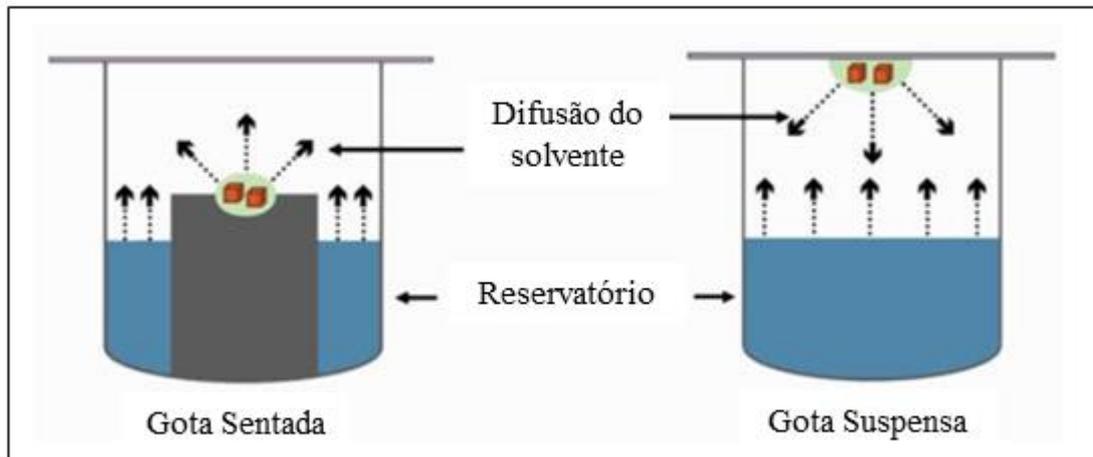
Figura 9 - Diagrama de fases para a cristalização de macromoléculas



Fonte: VERLI (2014).

O método mais utilizado para a cristalização de proteínas atualmente é o método de difusão de vapor que é baseado no equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor em sistema fechado. Uma gota contendo a proteína a ser cristalizada em tampão com o agente de cristalização e aditivos é equilibrada contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta do que na gota. A solução menos concentrada perde seu solvente volátil até que os potenciais químicos das duas soluções se igualem. Uma vez que o equilíbrio ocorre através da troca de vapor de água (da gota para o reservatório), o volume da gota diminui e há um aumento das concentrações de todos os constituintes da gota de cristalização o que permite o surgimento de uma condição de supersaturação (DESSAU; MORDIS, 2011; MCPHERSON; GAVIRA, 2014). Os métodos mais utilizados para cristalização de proteínas por difusão de vapor são gota suspensa e gota sentada (Figura 10).

Figura 10 - Métodos de cristalização que utilizam a técnica de difusão de vapor.



Fonte: VERLI (2014).

As soluções utilizadas para cristalização contêm agentes tamponantes (mantem o pH adequado da solução de cristalização), aditivos (facilitam e/ou otimizam o processo de cristalização) e precipitantes (reduzem a solubilidade da proteína). Essas soluções são produzidas e comercializadas na forma de kits de triagem sistemática por empresas especializadas (VERLI, 2014). Cada kit de triagem contém numerosas condições com diferentes tipos de agentes precipitantes, concentrações de precipitantes, tampões, pHs e sais. Uma vez que as condições iniciais foram encontradas, o próximo passo é otimizar as condições de cristalização para a obtenção de melhores cristais quanto ao tamanho e forma (WOOH *et al.*, 2003; JANCARIK; KIM, 1991).

Após a obtenção dos cristais, é realizada a difração por raios X. O fenômeno de difração depende da interação entre a radiação eletromagnética com a matéria do objeto e da dispersão dessa radiação ao incidir sobre este. O comprimento de onda típico dos raios-X é de 1,5 Å, a mesma ordem do comprimento de uma ligação covalente entre átomos. Para estes experimentos utiliza-se uma quantidade significativa de moléculas ($\sim 10^{15}$ moléculas) organizadas num padrão regular tridimensional que atua como amplificador do sinal, capaz de gerar feixes de radiação mensuráveis de alta intensidade. Por conseguinte, estruturas cristalinas são as mais adequadas para obtenção de dados de alta resolução em experimentos de difração de raios-X (VERLI, 2014).

O padrão de difração de proteínas é tridimensional e reflete tanto a simetria dos arranjos cristalinos quanto a organização da proteína na célula unitária, isto é, a unidade de repetição que constitui o cristal. Esses arranjos são definidos em termos de grupos espaciais e de unidades assimétricas. O conhecimento das amplitudes e das fases permite a reconstituição da densidade eletrônica do cristal. Quando um cristal é colocado em um feixe de raios X, a

densidade eletrônica de cada átomo do cristal interage com a radiação, dispersando-a em todas as direções do espaço. É a presença de uma rede cristalina que amplifica a radiação somente em determinadas direções, dando origem ao padrão de difração característico. O cristal é girado em torno de um eixo geralmente perpendicular ao feixe de raios X e os raios difratados são coletados em um detector capaz de gravar um grande número de pontos (spots) em um tempo de aquisição bem curto. Cada imagem corresponde a uma rotação de 0,2-1° grau e pode ser considerada uma "fatia" do espaço recíproco. A posição de uma reflexão contém as informações sobre a geometria do grupo espacial e da rede cristalina, enquanto que a intensidade I medida depende da distribuição da densidade eletrônica na unidade assimétrica. Logo no início do processo, após a obtenção de algumas imagens, através de programas que realizam indexação de imagens é possível determinar o grupo espacial, dimensões e orientação da célula unitária e estimar a mosaicidade, isso é necessário para definir a estratégia de coleta dos dados (SMYTH; MARTIN, 2000; WLODAWER *et al.*, 2013; OSTERNE, 2016).

No processo de difração as amplitudes de cada reflexão podem ser medidas, mas as fases correspondentes são perdidas durante o processo, ou seja, a informação angular é perdida. Isso é chamado de "problema da fase" (LI; HE; ZHANG, 2015; WLODAWER *et al.*, 2013). O método mais comum de faseamento é o de substituição molecular. O método baseia-se na disponibilidade das coordenadas atômicas da estrutura da proteína de interesse ou a de uma proteína homóloga, e na semelhança do padrão de difração da proteína de interesse com o padrão de difração da proteína homóloga. Na substituição molecular, medem-se as amplitudes de difração do cristal da proteína de interesse e "substituem-se" as fases desconhecidas pelas fases já calculadas a partir de uma estrutura previamente determinada. Utiliza informações de proteína homóloga em sequência, considerando que o enovelamento ocorra de forma similar (VERLI, 2014).

Os modelos estruturais construídos baseados em dados cristalográficos devem ser idealmente, modelos precisos. Para tanto, diversos métodos de refinamento são empregados. Uma estratégia comum de refinamento é o alinhamento correto entre o modelo estrutural e a densidade eletrônica. O acompanhamento da qualidade do modelo é analisado pelo Rfactor, que é um fator de correlação entre o modelo atual e o modelo real (MURSHDOV *et al.*, 2011). O último passo é a validação do modelo quanto aos parâmetros estruturais. Esses programas analisam as distâncias ideais entre as ligações, os ângulos de ligação, os ângulos diédricos e os contatos de van der Waals, usando para isso a comparação com proteínas modelos. Uma das saídas destes programas é o diagrama de Ramachandran, que afere as

medidas dos ângulos diédricos Φ e Ψ e é um bom indicador da qualidade do modelo (COOPER *et al.*, 2011; HOLLINGSWORTH; KARPLUS, 2011; WLODAWER *et al.*, 2013; OSTERNE, 2016)

Atualmente, diversas lectinas de leguminosas tiveram sua estrutura tridimensional resolvidas por cristalografia de raios X, entre alguns exemplos, ConGF (BARROSO-NETO *et al.*, 2014); VML (SOUSA *et al.*, 2015); DSL (BARROSO-NETO *et al.*, 2016); CTL (ALMEIDA *et al.*, 2016); ConV (OSTERNE *et al.*, 2017); DrfL (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2017a); DlyL (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2017b).

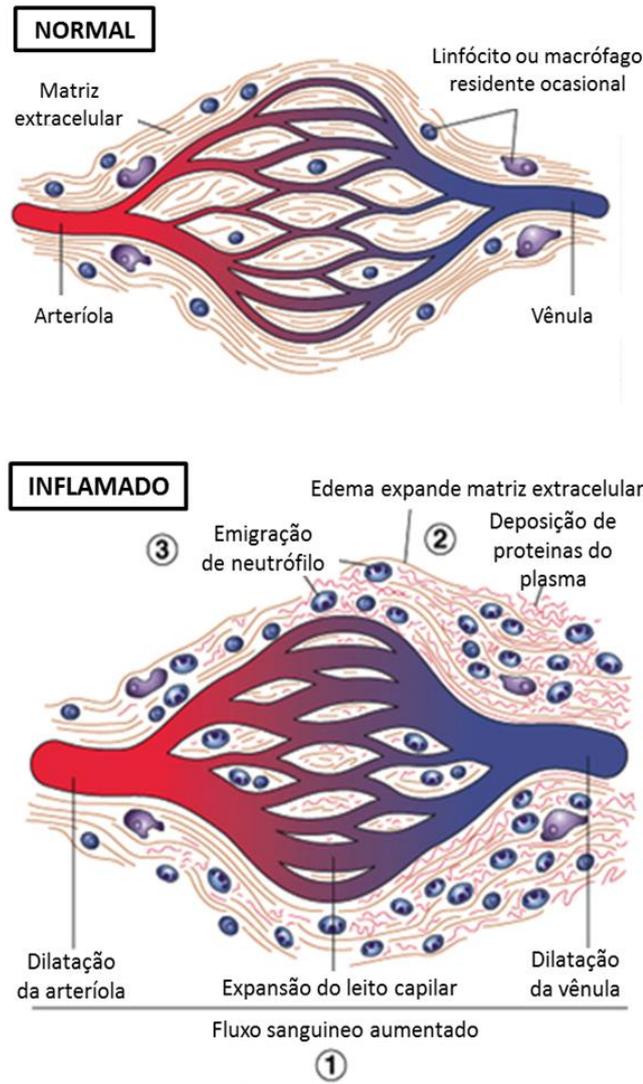
3.5 Processo inflamatório

A inflamação é uma resposta desencadeada por um trauma, infecção, lesão tecidual que tem por finalidade eliminar microrganismos ou outros agentes nocivos e para potencializar o reparo tecidual. Os sinais clínicos que caracterizam um processo inflamatório são: calor, tumor, rubor, dor e perda de função. A inflamação pode ser dividida em duas categorias principais - aguda e crônica - com base no tempo e características patológicas. A inflamação aguda é caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluidos e infiltração de neutrófilos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A vasodilatação é uma característica clássica da inflamação aguda e é clinicamente caracterizada por vermelhidão e calor no local da lesão. O objetivo da resposta vasodilatadora é facilitar a distribuição local de mediadores solúveis e células inflamatórias. A vasodilatação induzida pela inflamação é mediada principalmente pelo óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outro sinal precoce de inflamação é a formação de edema. O edema é causado pelo fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de substâncias vasoativas como histamina, bradicinina, leucotrienos, produtos da ativação do complemento e da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamado (Figura 11) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Figura 11 – Evolução da inflamação aguda. Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.



Fonte: Adaptado de KUMAR; ABBAS; ASTER (2015).

Uma das principais funções da inflamação é recrutar leucócitos diretamente ao local da injúria. A vasodilatação e a exsudação de fluidos são acompanhadas por marginações, adesão e migração de leucócitos. Os neutrófilos são os primeiros e mais abundantes leucócitos a serem administrados num local de infecção ou inflamação. O fenômeno da transmigração é dividido em várias etapas distintas: marginação, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; OSTERNE, 2016).

Marginação é o processo de movimento de neutrófilos da corrente sanguínea central para a região vascular periférica. O rolamento dos neutrófilos é facilitado pela força do fluxo sanguíneo. Após a marginação, desenvolve-se uma fraca interação adesiva entre neutrófilos e células endoteliais vasculares, fazendo com que os neutrófilos permaneçam próximos ao endotélio vascular (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). As interações

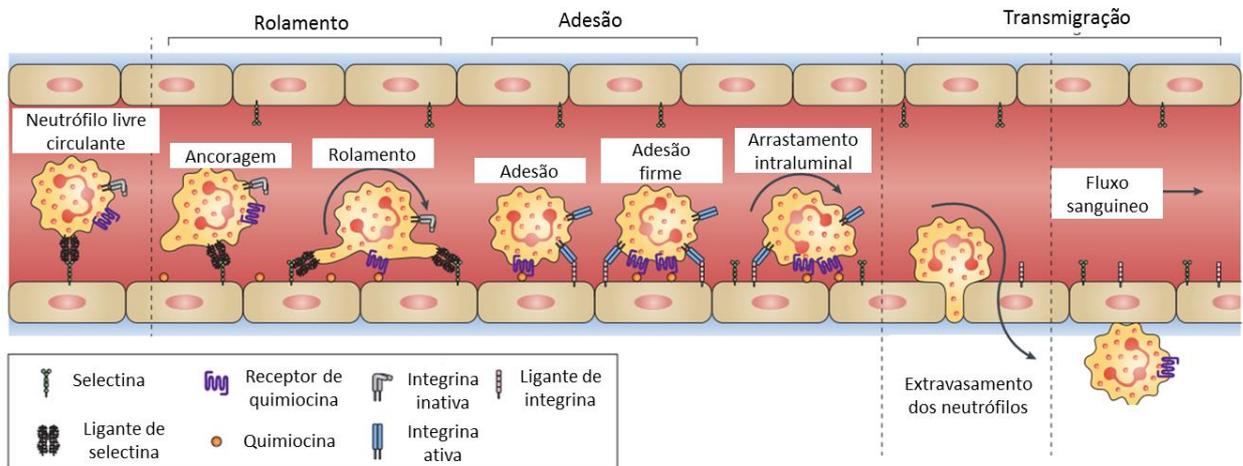
adesivas que permitem o rolamento de leucócitos são facilitadas por moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas) (PIRES, 2011).

As selectinas são lectinas endógenas expressas em leucócitos (L-selectina), células endoteliais (E-selectina) e plaquetas (P-selectina), que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas e são responsáveis pela marginação e rolamento de leucócitos ao endotélio vascular passo inicial na sequência dos eventos que resultará no extravasamento destas células nos sítios de lesão. As integrinas são proteínas expressas na superfície de neutrófilos e interagem com ligantes, especialmente com moléculas de adesão que estão presentes na membrana celular endotelial. Essas interações causam aderência firme do neutrófilo ao endotélio e facilitam a diapedese e a quimiotaxia (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Enquanto os leucócitos rolam sobre o endotélio, movidos pela força do fluxo sanguíneo, ocorre a ativação por quimiocinas e outros fatores atraentes (VIDEM; STRAND, 2004). Como consequência da ativação, ocorre uma redistribuição das integrinas leucocitárias, seguindo-se uma mudança conformacional nas mesmas, facilitando assim a aderência firme às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, expressas no endotélio ativado. O aumento da aderência leva a uma diminuição do rolamento dos leucócitos, fazendo com que os mesmos parem, apesar do fluxo sanguíneo contínuo. A aderência é necessária para a diapedese e quimiotaxia subsequentes dos neutrófilos e é mediada pela ação das integrinas e dos seus ligantes. Após a adesão, o neutrófilo deve penetrar no endotélio e membrana basal para entrar no ambiente inflamatório extravascular (diapedese). O objetivo final destas interações é facilitar a migração de neutrófilos do compartimento intravascular e para o interstício. Após o extravasamento, os leucócitos migram nos tecidos em direção à região de agressão por um processo denominado de quimiotaxia ou locomoção através de um gradiente químico (Figura 12) (GILROY *et al.*, 2004; ADEREM; SMITH, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; PIRES, 2011; OSTERNE, 2016).

A inflamação aguda pode finalizar-se com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY *et al.*, 2004; ADEREM; SMITH, 2004; PIRES, 2011; OSTERNE, 2016).

Figura 12 - Emigração de leucócitos para o local da injúria. Etapas de rolamento, adesão e transmigração.



Fonte: Adaptado de KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013.

Lectinas de Diocleinae apresentam atividade pró- ou anti-inflamatória dependendo da via pela qual a lectina é administrada. Por exemplo, quando aplicadas por via sistêmica, as lectinas *Dioclea violacea*, *Dioclea guianensis*, *Dioclea virgata* e *Cratylia floribunda* inibem migração de neutrófilo e edema de pata em ratos (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999), sendo portanto anti-inflamatórias por essa via. Com aplicação por via local foi observado resposta estimulatória da inflamação, como em lectinas de *Canavalia oxyphylla*, *Dioclea reflexa* e *Canavalia virosa* que induzem edema, sendo consideradas pró-inflamatórias por via local (SANTIAGO *et al.*, 2014; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015; OSTERNE *et al.*, 2017).

3.6 Nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a nocicepção é definida como "os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos", enquanto a dor é "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tais danos" (LOESER; TREEDE, 2008).

Assim, a nocicepção inclui os mecanismos pelos quais os estímulos nocivos são detectados pelo sistema nervoso periférico, codificados, transferidos e inconscientemente tratados pelo sistema nervoso. A detecção é assegurada por transdutores moleculares específicos suportados por neurônios nociceptivos cujos corpos celulares estão agrupados na raiz dorsal ou nos gânglios trigeminiais. Este sinal aferente é então tratado por redes complexas dentro do corno dorsal da medula espinhal (TODD, 2010) ou seu equivalente no

tronco encefálico. Este tratamento está sob a influência de informações sensoriais e controles descendentes do cérebro. Nocicepção também inclui parte do tratamento de informação pelo cérebro, bem como algumas respostas reflexas para proteger o organismo. Em contraste, a dor é uma experiência consciente que requer o tratamento cortical e a interpretação aversiva da informação nociceptiva. Trata-se de uma experiência subjetiva e complexa com um componente afetivo necessário, acompanhado de componentes sensorio-discriminativos, autonômicos e cognitivos. Embora a nocicepção e a dor pareçam estar estreitamente ligadas, as evidências clínicas também demonstraram que podem ser dissociadas uma da outra (BARROT, 2012).

Quando pertinente, nocicepção e dor são críticas para a sobrevivência (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Eles oferecem um sistema de alarme que tem a capacidade de iniciar uma resposta imediata adaptada, que pode evoluir para melhores respostas adaptativas através de aprendizagem associativa emocional. Apesar desta função fisiológica importante, é também crítico "silenciar" nocicepção ou dor quando perdem a sua pertinência como sistema de alarme, que é o caso quando a lesão ou risco de lesão foi previamente identificada, quando a dor é antecipada ou quando a dor torna-se crônica ou dissociada de uma lesão real (NEGUS *et al.*, 2006; MOGIL; DAVIS; DERBYSHIRE, 2010; BARROT, 2012).

Em relação a tipo e/ou mediadores envolvidos, a dor pode ser classificada como nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica, associadas à estimulação excessiva de nociceptores, ao dano tecidual neural, à disfunção de um nervo e a fatores psicológicos, respectivamente (FÜRST, 1999). Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ser pontualmente delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico. A dor crônica persiste por um longo período, sendo associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (ALMEIDA *et al.*, 2004; PIRES, 2011).

A dor é descrita como uma sensação desagradável produzida por processos que danificam ou são capazes de danificar os tecidos. Esses estímulos nocivos são detectados por fibras nervosas sensoriais primárias de alto limiar chamadas nociceptores (fibras A δ e C). Nociceptores são terminações nervosas livres que terminam nas camadas superficiais do corno dorsal da medula espinhal. Na medula espinhal, estas fibras nervosas sensoriais primárias liberam neurotransmissores como aminoácidos (glutamato) e neuropeptídeos (como a substância P e peptídeos relacionados ao gene da calcitonina), que ativam neurônios de segunda ordem. Os neurônios de segunda ordem transmitem informações através de tratos específicos que atingem o tálamo onde ocorre a sensação de dor. No tálamo, um neurônio de

terceira ordem é ativado, viajando do tálamo para o córtex somatossensorial, o que permite a percepção da dor (SCHAIBLE; RICHTER, 2004; BASBAUM *et al.*, 2009; VANDERAH, 2007; CURY *et al.*, 2011).

Os testes nociceptivos usam estímulos elétricos, térmicos, mecânicos ou químicos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). O teste von Frey é um teste mecânico que pode ser usado de forma confiável não só em ratos, mas também em camundongos. É derivado de um procedimento clínico para avaliar a alodinia, particularmente em pacientes com dor neuropática. Os filamentos de von Frey (ou pêlos de von Frey) são pêlos plásticos, de 5 cm de comprimento e de vários diâmetros, fixados em aplicadores e sua extremidade não é afiada. Eles são aplicados localmente até que se dobram, momento em que eles exercem uma pressão calibrada. Em roedores, eles são, na maior parte, usados na superfície plantar enquanto o animal está em uma grade. A resposta esperada é a retirada da pata (BARROT, 2012).

Muitas lectinas de leguminosas tiveram suas atividades de nocicepção determinadas em antinociceptivas *Andira anthelmia* (NASCIMENTO *et al.*, 2016); *Lonchocarpus araripensis* (AMORIM *et al.*, 2016); *Acacia farnesiana* (ALMEIDA *et al.*, 2015); *Canavalia brasiliensis* (PIRES *et al.*, 2013); *Parkia biglobosa* (SILVA *et al.*, 2013); *Clitoria fairchildiana* (LEITE *et al.*, 2012); *Dioclea virgata* (DELATORRE *et al.*, 2011); *Canavalia boliviana* (FIGUEIREDO *et al.*, 2009); Enquanto outras apresentaram atividades hipernociceptivas *Dioclea lasiophylla* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b); *Dolichos lablab* (FRIL), entre outras (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

3.7 Artemia como modelo de citotoxicidade

Artemia sp. é uma espécie de microcústáceo pertencente ao filo Artropoda (Figura 13). O teste de letalidade de artemia tem sido utilizado com sucesso para determinar a toxicidade de compostos bioativos que possuem uma variedade de atividades farmacológicas, incluindo agentes anticancerígenos, antivirais, inseticidas, pesticidas e compostos anti-HIV. Os náuplios de artemia são utilizados porque são altamente sensíveis. Além disso, os cistos podem ser facilmente obtidos, incubados e armazenados à temperatura ambiente por vários meses sem perder sua viabilidade (ARRUDA *et al.*, 2013).

Alguns dados publicados sugeriram uma boa correlação entre a atividade tóxica no ensaio de artemia e a citotoxicidade contra algumas linhas de células tumorais (ANDERSON *et al.*, 1991) e atividade hepatotóxica (KIVIRANTA *et al.*, 1991). O ensaio de artemia é usualmente utilizado como um teste de citotoxicidade de baixo custo e facilmente

realizável, substituindo ensaios de linhas celulares (PICCARDI *et al.*, 2000; HISEM *et al.*, 2011).

Figura 13 – Náuplio de *Artemia* sp.



Fonte: Google imagens (http://farm3.static.flickr.com/2011/2208595265_400e31c1fb.jpg). Acesso em: 04/04/2017.

No teste de toxicidade é realizada uma avaliação dos efeitos sofridos por esses animais quando expostos a alguma substância, geralmente em um período entre 24 a 96 horas, não havendo troca da solução-teste neste período. Nestes testes é verificado o número de animais vivos e mortos devido à exposição com a substância testada (BIRGE *et al.*, 1985). Após a observação é realizado o cálculo da CE (Concentração Efetiva) ou CL50 (Concentração Letal Mediana), que consiste no valor de concentração da substância capaz de matar 50% da população de animais expostos (BURATINI *et al.*, 2004; PEREIRA-JUNIOR, 2014).

A toxicidade de diversas lectinas foi observada utilizando o teste de artemia, dentre elas das lectinas de leguminosas *Canavalia ensiformis* (ConA), *C. brasiliensis* (ConBr), *C. boliviana* (ConBol), *C. grandiflora* (ConGF), *C. maritima* (ConM) (ARRUDA *et al.*, 2013), *Dioclea lasiophylla* (DlyL) (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013), *C. virosa* (ConV) (OSTERNE *et al.*, 2014), *C. oxyphylla* (CoxyL) (SANTIAGO *et al.*, 2014), *Dialium guineense* (DigL) (BARI *et al.*, 2013), *Dioclea reflexa* (DrfL) (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2015), dentre outras lectinas como das espécies marinhas *Holothuria grisea* (HGA-2) (DE MELO *et al.*, 2014), *Haliclona caerulea* (H-1 e H-2) (CARNEIRO *et al.*, 2013), *Cliona varians* e *Holothuria grisea* (CvL-2 e HGL) (MOURA *et al.*, 2015).

3.8 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo (BRASIL, 2011).

O processo pelo qual células tornam-se malignas envolve mutações que surgem como consequência de danos ao genoma. Esses danos podem resultar de processos endógenos como erros na replicação do DNA, instabilidade química intrínseca de certas bases do DNA ou de ataque por radicais livres gerados durante o metabolismo. O dano no DNA pode resultar de interações com agentes endógenos como radiação ionizante, radiação UV e reagentes químicos carcinogênicos. Nesse processo genes envolvidos nos mecanismos de homeostase que controlam proliferação e morte celular sofrem mutações que resultam na ativação de genes que estimulam a proliferação ou proteção contra morte celular, os oncogenes, e inativação de genes que normalmente inibem a proliferação, os genes supressores de tumor (BERTRAM, 2001).

Mecanismos moleculares, intrínsecos e extrínsecos, convergem para alterar o metabolismo celular central e fornecem suporte para as três necessidades básicas de células em divisão: geração rápida de ATP para manter o estado energético, aumento da biossíntese de macromoléculas e manutenção do estado redox celular apropriado. As alterações metabólicas são uma característica comum dos tecidos cancerígenos. Além das alterações genéticas que alteram o metabolismo das células tumorais, o microambiente tumoral anormal - como hipoxia, pH e baixas concentrações de glicose - tem um papel importante na determinação do fenótipo metabólico das células tumorais (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

As características do câncer compreendem oito capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento em múltiplos passos de tumores em humanos. Elas incluem manutenção de sinalização proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência a morte celular, ativação da imortalidade replicativa, indução de angiogênese, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético e evitar a destruição imunológica. Subjacentes a essas características são a instabilidade do genoma, o qual gera diversidade genética que acelera a aquisição e inflamação, que promove várias dessas características. Além das células cancerígenas, os tumores exibem outra dimensão de complexidade: eles contêm um repertório de células recrutadas, ostensivamente normais, que contribuem para a aquisição dessas características, criando um “microambiente tumoral” (HANAHA; WEINBERG, 2011).

3.8.1 Glioma

Glioma é um termo geral para um grupo de tumores que começam em células gliais e são subdivididos em 3 tipos: astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas (LOUIS *et al.*, 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Os astrocitomas são tumores que começam nos astrócitos. Cerca de 2 dos 10 tumores cerebrais são astrocitomas. A maioria dos astrocitomas pode se espalhar por todo o cérebro e misturar-se com o tecido cerebral normal, o que pode torná-los muito difíceis de remover por cirurgia. Astrocitomas são classificados como grau alto, grau intermediário ou baixo grau, baseado na aparência das células ao microscópio. Os astrocitomas de alto grau (glioblastomas) são os de crescimento mais rápido. Astrocitomas de grau intermediário, (astrocitomas anaplásicos) crescem a uma taxa moderada. Os astrocitomas de baixo grau (difusos) tendem a crescer lentamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Os oligodendrogliomas iniciam nos oligodendrócitos. Assim como os astrocitomas, a maioria pode se infiltrar no tecido cerebral, o que torna difícil a remoção por cirurgia. Raramente se espalham para fora do cérebro ou medula espinhal. Formas muito agressivas destes tumores são conhecidos como oligodendrogliomas anaplásicos e apenas cerca de 2% dos tumores cerebrais são desse tipo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Os ependimomas surgem de células ependimárias, que revestem os ventrículos. Variam de tumores de baixo grau (menos agressivos) até tumores de alto superior, que são chamados de ependimomas anaplásicos (constituem cerca de 2% dos tumores cerebrais) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Muitas lectinas de leguminosas como as lectinas de *Canavalia virosa* (ConV), *Glycine max* (SBA), ConA, ConBr, lectina de *Viscum*, WGA apresentaram atividade indutora de autofagia e apoptose, levando assim a morte de células malignas de diferentes tipos de câncer, como hepatocarcinoma, melanoma, leucemia e glioma (OSTERNE *et al.*, 2017; FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2007; MO; LIM, 2005; DE MEJIA; BRADFORD; HASLER, 2003; BANTEL *et al.*, 1999).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Purificação da lectina de sementes de *Canavalia villosa*

4.1.1 Extração proteica

As sementes de *Canavalia villosa* Benth foram adquiridas comercialmente da B & T World Seeds. Para o isolamento da lectina, as sementes de *Canavalia villosa* foram descascadas e moídas em moedor de café (Cadence MDR301 Monovolt) até a obtenção de um pó fino. A esse pó foi adicionado solução com NaCl 0,15 M 1:10 (w:v) para extração das proteínas totais solúveis em agitação constante por 4h a temperatura ambiente (25 °C). Em seguida a suspensão foi centrifugada a 10.000 \times g, 20 min, 4 °C, o sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de papel (Whatman™) e nomeado extrato total e o resíduo foi descartado.

4.1.2 Cromatografia de afinidade em gel de Sephadex-G50

A purificação da lectina de *Canavalia villosa* foi realizada em etapa única de cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex® G-50. A matriz foi previamente equilibrada com solução de extração com fluxo de 1 mL/min. O material não retido foi lavado com a mesma solução de NaCl 0,15 M, e o material retido, correspondendo a lectina, foi eluído com glicina 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M ou eluído com NaCl 0,15 M contendo glicose 0,1 M. As frações eluídas foram coletadas em volume de aproximadamente 2 mL e foram monitoradas por absorbância a 280 nm. O material eluído foi dialisado contra água destilada e liofilizado. A homogeneidade da amostra foi monitorada por SDS-PAGE e a proteína pura foi utilizada para análises posteriores.

4.1.3 Cromatografia de exclusão molecular

A pureza da lectina foi verificada em cromatografia de exclusão molecular. Para tal finalidade, a lectina liofilizada foi ressuspensa em fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 a 2mg/mL e carregada em coluna de sílica BioSuite™ 250 7.8 x 300 mm (Waters®) previamente equilibrada com fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 por 10 minutos, acoplada a um cromatógrafo HPLC (ACQUITY® UPLC System – Waters®). Cvil foi eluída em modo isocrático em fluxo de 0.45 mL/min e monitorado a 280 nm.

4.1.4 Dosagem de proteínas solúveis

A concentração de proteínas totais solúveis no extrato e nas frações foi verificada pelo método de Bradford (1976). A 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados 100 μ L da amostra. A mistura ficou em repouso por 10 minutos e em seguida teve sua absorbância determinada a 595 nm em espectrofotômetro de luz visível (GE Healthcare Ultrospec™ 2100 pro UV/Visible). A concentração de proteínas solúveis nas amostras analisadas foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com o uso de soluções de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) e os resultados expressos inicialmente em mgP/mL.

4.1.5 Ensaio da atividade hemaglutinante e cálculo da atividade hemaglutinante específica

A atividade hemaglutinante foi realizada pela dupla diluição seriada (1:2, 1:4, 1:8...) das amostras em NaCl 0,15 M nos poços da placa de microtitulação. A 50 μ L de cada diluição foi adicionado 50 μ L da solução de eritrócitos de coelho a 3% em NaCl 0,15 M, não tratados e tratados enzimaticamente com tripsina e papaína (AINOUZ *et al.*, 1992). O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 min, seguido de repouso em temperatura ambiente por mais 30 min. A presença ou não de atividade hemaglutinante foi detectada a olho nu. A maior diluição apresentando hemaglutinação foi expressa como a unidade de hemaglutinação por mL (UH/mL).

O cálculo da atividade hemaglutinante específica foi obtido pela divisão do título de hemaglutinação (UH/mL) pela dosagem de proteínas solúveis (mgP/mL), cujo quociente foi expresso em UH/mgP (unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína). Esse resultado confirma a condição concentradora da atividade hemaglutinante, considerando o extrato total e lectina pura.

4.1.6 Especificidade por carboidratos

A especificidade por carboidrato da lectina de *C. villosa* foi determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante. Foi realizada dupla diluição seriada em NaCl 0,15 M de cada açúcar a 0,1 M ou glicoproteína a 2mg/ mL em placa de microtitulação. Em cada poço com essa mistura foi adicionado 25 μ L da solução lectínica capaz de provocar hemaglutinação (4 UH). O ensaio foi incubado a 37 °C por 30 min e, a seguir, mantido em

repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 50 μ L da solução de eritrócito de coelho 3% tripsinizado (previamente determinado como o que apresentava os melhores títulos de hemaglutinação) a cada poço. A mistura foi novamente incubada a 37 °C por 30 minutos, seguido de 30 minutos em repouso em temperatura ambiente.

Os açúcares utilizados foram: D-glicose, D-galactose, L-ramnose, D-ribose, D-manose, α -lactose, α -metil-D-manosídeo, L-fucose, desoxiribose, inosina, N-acetilglicosamina e as glicoproteínas foram a fetuína e a ovalbumina. A inibição da atividade hemaglutinante foi feita pela seleção do açúcar ou glicoproteína que inibe a atividade da lectina e foi expresso como o mínimo da concentração capaz de inibir a hemaglutinação (Concentração mínima inibitória, MIC).

4.1.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Para acompanhar o processo de purificação e a estimativa da massa molecular aparente das subunidades da lectina purificada, foi realizada análise de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), adaptado do método descrito por Laemmli (1970).

A eletroforese foi realizada em sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad; Milão, Itália). O gel de resolução foi preparado com poliacrilamida (acrilamida/ bisacrilamida 30:0,8) a 15%, Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%. O gel de empilhamento foi preparado com poliacrilamida 4%, Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04%. As amostras foram dissolvidas em Tris 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 2% e glicerol 12,5%, seguido de aquecimento a 100 °C por 5 minutos. β -mercaptoetanol 2% foi adicionado a amostra antes da corrida. O marcador de peso molecular utilizado foi do kit LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare): Fosforilase B (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa) e inibidor de tripsina (20,1 kDa). As condições de corrida foram: corrente de 25 mA, mantida constante durante a corrida; a potência de 5 W e voltagem variando até 150 V. Após a corrida os géis foram corados com Comassie Colloidal Blue G-250 ou reagente ácido periódico de Schiff (PAS).

4.2 Caracterização físico-química da lectina de *Canavalia villosa*

4.2.1 Efeito da temperatura sobre a atividade hemaglutinante

Para analisar a termoestabilidade da lectina, a proteína a 1 mg/mL em NaCl 0,15 M foi incubada em temperaturas de 30 a 100 °C (com aumentos de 10 °C) por 60 min. As amostras foram arrefecidas até temperatura ambiente e então avaliadas quanto a atividade hemaglutinante. Avaliou-se então a manutenção ou não da hemaglutinação a cada temperatura testada.

4.2.2 Efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante

A lectina de *C. villosa* (1 mg/mL) foi dissolvida em diferentes tampões com faixa de valores de pH de 4,0 a 10,0 (acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 e 5,0; citrato de sódio 0,1 M pH 6,0; Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 e 8,0; e glicina-NaOH 0,1 M pH 9,0 e 10,0), todos contendo NaCl 0,15 M, e a atividade hemaglutinante foi medida. A atividade hemaglutinante na presença de pH foi comparada a resultados hemaglutinantes anteriores obtidos com NaCl 0,15 M.

4.2.3 Efeito do EDTA sobre a atividade hemaglutinante

Para a avaliação da dependência da lectina por cátions divalentes 1mg/mL da lectina de sementes de *Canavalia villosa* foi solubilizada em NaCl 0,15 M e dialisada contra EDTA 0,1 M contendo NaCl 0,15 M por 24 h. Em seguida a lectina foi dialisada contra NaCl 0,15 M para remoção do excesso de EDTA. Após isso, a atividade da lectina foi testada com adição de NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ e MnCl₂ 0,005 M. Os resultados da atividade hemaglutinante da lectina foram comparados antes e depois da dialise, bem como após a adição dos cátions divalentes testados.

4.2.4 Análise da presença de carboidratos estruturais

A presença de carboidratos covalentemente ligados à estrutura da proteína foi analisada por coloração utilizando-se o método do ácido periódico - reagente de Schiff (PAS) no gel obtido após SDS-PAGE (ZACHARIUS *et al.*, 1969). A presença no gel de bandas proteicas coradas com a cor magenta indica a presença de glicoproteínas ou glicolipídeos.

4.2.5 Eletroforese bidimensional

Para a eletroforese bidimensional, a lectina foi preparada utilizando-se 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). A amostra (0,4 mg/mL num total de 0,05 mg/fita) foi ressuspensa em solução de reidratação (ureia 7 M/ tiourea 2 M, DTT 0,065 M, CHAPS 0,5%, IPG Buffer pH 3-10 0,5% e traços de azul de bromofenol) foi aplicada em tiras com gradiente de pH imobilizado (IPG) (Immobiline DryStrip gels – GE Healthcare), pH 3-10 de 7 cm e, em seguida, foram cobertas com Drystrip Cover Fluid (GE Healthcare). A reidratação ocorreu por 16 h em IPGbox, GE Healthcare. A focalização foi realizada no focalizador Hoefer IEF100 System nas seguintes condições: etapa 1 (500 V por 30 min); etapa 2 (1.000 V por 1 h); etapa 3 (6.000 V por 1:30 h); etapa 4 (6.000 V por 8.000 Vh) e etapa 5 (1.000 V por 1h). Essas condições são sugeridas pelo fabricante para determinado pH e tamanho da tira. Em seguida as tiras foram armazenadas em freezer -80 °C para procedimentos posteriores.

Após a focalização, as tiras de IPG foram equilibradas em solução de equilíbrio (uréia 6M, SDS 2%, Tris-HCl 0,375 M, pH 8,8, e glicerol 20%) em duas etapas: na primeira foi adicionado ditioneitol (DTT) 2% a solução de equilíbrio, na segunda foi adicionado iodoacetamida 2,5%. Cada etapa ficou em agitação por 15 minutos. Em seguida, as tiras foram posicionadas na parte superior do gel da segunda dimensão e cobertas com agarose 0,5% (agarose 0,5%; SDS 1% e traços de azul de bromofenol). As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida a 12% na presença de SDS utilizando a metodologia descrita por Laemmli (1970). Para este procedimento foram utilizados o mesmo sistema de eletroforese, marcador de peso molecular e as mesmas condições de corrida que o gel de SDS-PAGE unidimensional.

Após a corrida, os géis foram corados com Comassie Blue G-250. Para digitalização dos géis foi utilizado o equipamento Image Scanner III e software LabScan 6.0 (ambos da GE Healthcare). O peso molecular aparente e ponto isoelétrico foram calculados utilizando ImageMaster 7.0 (GE Healthcare).

4.3 Análise de massa intacta e sequência de cvll por espectrometria de massas

4.3.1 Determinação da massa molecular de Cvll

A massa intacta da lectina foi determinada utilizando o espectrômetro (Autoflex III smartbeam, Bruker Daltonik GmbH) operado com voltagem de 20 kV, com reflector em

modo linear e com faixa de detecção de proteína de 10.000 a 100.000 Da. A lectina liofilizada foi solubilizada em TFA a 0,3% em acetonitrila (1:1 v/v) até uma concentração final de 1 pmol. A matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico foi preparada em 0,3% de TFA em acetonitrila (1:1 v/v) até uma concentração final de 10 mg/ mL. A proporção de matriz/proteína foi de 3:1. Os espectros de massa intacta foram analisados com flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik GmbH).

4.3.2 Digestão “in gel” e sequenciamento dos peptídeos por espectrometria de massas

As bandas referentes a proteína de interesse foram excisadas do gel (SDS-PAGE), em seguida foram descoradas com bicarbonato de amônio 0,1 M em acetonitrila (1: 1 v/v) e secas com acetonitrila pura. Posteriormente, as bandas foram reidratadas em soluções de tripsina e quimotripsina (Promega, Madison, WI, EUA) em bicarbonato de amônio 0,05 M para a etapa de clivagem proteolítica. Os peptídeos obtidos foram extraídos em ácido fórmico 5% em acetonitrila (1:2 v/v) e secos em SpeedVac (SHEVCHENKO *et al.*, 2007).

Os peptídeos secos, provenientes da digestão, foram ressuspensos em ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% e preparados numa placa MALDI com matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico numa proporção (1:2 v/v). A matriz foi preparada a uma concentração de 10 mg/ mL e solubilizada em TFA a 0,3% em acetonitrila (1: 1 v/v). A estrutura primária da lectina de *Canavalia villosa* foi determinada por espectrometria de massa em tandem utilizando ionização MALDI e analisador TOF (Autoflex III smartbeam, Bruker Daltonik GmbH). O espectrômetro funcionou utilizando voltagem de 20 kV, e detector em modo reflector, analisando peptídeos dentro de uma faixa de massa de 400 a 5000 Da. Os espectros peptídicos obtidos foram processados e sequenciados manualmente utilizando flexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonik GmbH).

A sequência primária parcial de Cvill foi submetida a análise de similaridade e homologia entre as sequências de aminoácidos obtidas e todo o banco não redundante de proteínas depositadas no Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI). Inicialmente, a sequência primária parcial de Cvill foi submetida ao programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e as proteínas com maior *score* foram selecionados para os alinhamentos de sequências utilizando o ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014).

4.4 Resolução da estrutura tridimensional de Cvill por cristalografia de raios X

4.4.1 Cristalização da Cvill

A lectina liofilizada de *Canavalia villosa*, Cvill, foi ressuspensa em Tris-HCl 0,025 M pH 7,6 a 12,5 mg/ mL. A suspensão da proteína foi então centrifugada a 4.000 \times g por 10 min e o sobrenadante utilizado para os passos futuros de triagem de cristalização. Para experimento com o ligante, a proteína em solução foi incubada com α -metil-manosídeo na concentração final de 0,005 M por uma hora antes dos experimentos de cristalização. A proteína foi então submetida a triagem de condições de cristalização, utilizando-se o método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991). Os kits utilizados foram *crystal screen* I e II (Hampton) e JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience) com variáveis iniciais de pH, sal e precipitantes.

O método utilizado foi o de difusão de vapor de gota suspensa utilizando-se placas para gota suspensa de 96 poços (fundo reto) e manuseadas em robô TTP Labtech's mosquito® Crystal. Foram adicionados 100 μ L da condição de cristalização em cada poço e a gota foi composta por 100 nL da solução de proteína e 100 nL da condição de cristalização (1:1). Os poços foram vedados com ViewDrop™ II para placa de 96 poços para até 3 gotas suspensas por poço. Após a obtenção de cristais foi realizada a otimização das condições de cristalização, variando-se a concentração de precipitante e o pH da solução, repetindo o método da difusão de vapor.

Na otimização, foi utilizado o método de gota sentada e foi realizado em placa MRC-Maxi 48 poços (Swissci). Foram adicionados 200 μ L da condição de otimização em cada poço e a gota foi composta por 2 nL da solução de proteína e 2 nL da condição de cristalização (1:1).

4.4.2 Coleta de dados

Os cristais de Cvill foram resfriados a temperatura de 100 K e previamente submersos em solução crioprotetora com glicerol a 20% para evitar formação de gelo. Os dados de difração de raios X foram coletados em um comprimento de onda de 1.47 Å usando-se uma fonte de radiação Síncrotron (estação MX2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS – Campinas, Brasil).

4.5 Efeitos de Cvill na análise da toxicidade contra *Artemia* sp., atividade inflamatória, antinociceptiva e em células de glioma

4.5.1 Toxicidade contra Artemia

Para avaliação do efeito citotóxico da lectina, cistos de *Artemia* sp. foram submetidos à eclosão sob luz, em condições de aeração permanente e temperatura controlada. Para isso 20 mg de cistos de artemia foram adicionados em um frasco de PVC contendo 200 mL de água do mar artificial e incubados durante 48 h, período pré-estabelecido como ideal de crescimento dos náuplios para experimentos de toxicidade. Após isto, foi preparada uma solução da lectina a 200 µg/mL em água do mar artificial.

Em uma placa de Linbo de 24 poços foi adicionada uma alíquota da solução de proteína concentrada a fim de atingir as concentrações finais de 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL, e, em seguida, acrescentou-se a cada poço mais uma alíquota da solução de água do mar artificial contendo 10 exemplares de náuplios, totalizando, ao final, 2 mL de solução por poço. O experimento foi conduzido em triplicatas, para cada condição, e o controle negativo foi feito da mesma forma, com água do mar artificial, 10 exemplares de náuplios, volume final de 2 mL, porém sem a adição da lectina. Para efeito de inibição, a lectina (100 µg/mL) foi incubada em água do mar artificial contendo 0,1 M de D-manose, durante 1 h a 37 °C. Ao final dos testes comparou-se as condições testadas com a condição controle.

4.5.1.1 Determinação do CL50

Após um período de 24 h, os dados obtidos no teste de letalidade foram processados usando-se o software Microsoft Excel 2013, e os valores de LC50 foram computados a partir da porcentagem de morte e logaritmo das concentrações por análise PROBIT, como descrito por Finney (1971).

4.5.2 Avaliação do efeito inflamatório através do modelo edema de pata

Ratos Swiss (machos) (30-35 g) foram mantidos com acesso livre a alimento e água. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (UECE- Nº 10130208-8 / 40), Fortaleza-

CE, de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos EUA (Publicação NIH n ° 85-23, revista em 2011).

O edema de pata foi induzido pela injeção subcutânea (s.c.) intraplantar de Cville (3, 30 e 300 µg/pata) na pata traseira de ratos. O volume da pata foi medido por pletismometria (PanLab, LE 7500-Spain) antes da injeção s.c. (tempo zero) e depois do intervalo de tempo selecionado (0,5 a 8h). Os resultados foram calculados como a variação do volume da pata (µL) ou a área sob a curva do curso-tempo (AUC, em unidades arbitrárias) em relação ao tempo zero (LANDUCCI *et al.*, 1995). O grupo controle recebeu salina estéril (NaCl 0,9%). Os ensaios avaliados foram: estímulo inflamatório por injeção via subcutânea (s.c.) e o envolvimento do domínio lectínico, onde a lectina foi previamente incubada (por 60 minutos a 37 °C) com seu açúcar específico, manose 0,1 M, antes das injeções. A lectina e o açúcar também foram incubados em soluções separadas utilizando-se as mesmas condições como controles.

4.5.3 Antinocicepção

Os ratos foram colocados individualmente em caixas de plexiglass transparentes em plataformas com assoalho de malha de arame para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras (VIVANCOS *et al.*, 2004). Eles foram aclimatados às câmaras de teste e a frequência de retirada da pata (reação de flinch), em resposta a 3 aplicações de filamentos rígidos de von Frey, foi determinada antes (valor basal) e 1- 6 h após injeção intraplantar s.c. de Cville 300 µg / pata). O grupo de controle recebeu salina (0,01 mL / pata) s.c.

4.5.4 Viabilidade celular da linhagem C6 expostas a Cville

Para avaliar a citotoxicidade de Cville em células tumorais da linhagem C6 utilizou-se o método colorimétrico com sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) Mosmann (1983). Em células metabolicamente viáveis, as desidrogenases mitocondriais clivam o anel de tetrazólio, tornando um composto amarelo em azul escuro, formazan, que são cristais insolúveis em água. Assim, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Um dia antes do experimento, o meio com as células foi tratado com tripsina. As células (50.000 células/ mL) foram distribuídas em placas de 96 poços (100 µL/poço). As placas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ (5%). Após 24 h (houve a troca

do meio e) as células nos poços foram tratadas com as diferentes concentrações de Cvill (10, 30, 50 e 100 µg/mL).

Após 24 h do tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas por uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/mL diluído em tampão HEPES-salino com glicose pH 7,4 (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM). Em seguida, o meio com MTT foi removido e foi então adicionado 100 µL de DMSO/poço para a solubilização dos cristais de formazana (MOSMANN, 1983). A absorvância foi medida por espectrofotometria a 540 nm em leitor de placas (Infinite M200-Tecan).

Os valores de absorvância, medidos para cada concentração de cada amostra, foram transformados em porcentagens de viabilidade celular (X %), em relação à média dos controles celulares, considerados 100% viáveis. Os dados foram expressos como uma média ± média do erro padrão (n=3). p< 0,05 comparado ao controle (*).

4.5.5 Análise dos efeitos na morfologia das células da linhagem C6 após tratamento com Cvill

Após 24 h as células tratadas com Cvill nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL, foram observadas em microscópio óptico para a visualização de redução no tamanho e a alteração da forma. As imagens foram registradas pela câmera (Eclipse T2000-U, Nikon) (CUI *et al.*, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação da lectina de sementes de *Canavalia villosa*

O extrato total preparado das sementes de *Canavalia villosa* apresentou alto título de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de coelho nativo ou tratados com enzimas proteolíticas (Tabela 1). O maior título foi observado contra eritrócitos de coelho tratados com papaína para o extrato total e proteína pura.

Tabela 1 – Atividade hemaglutinante do extrato total e lectina pura de *Canavalia villosa*

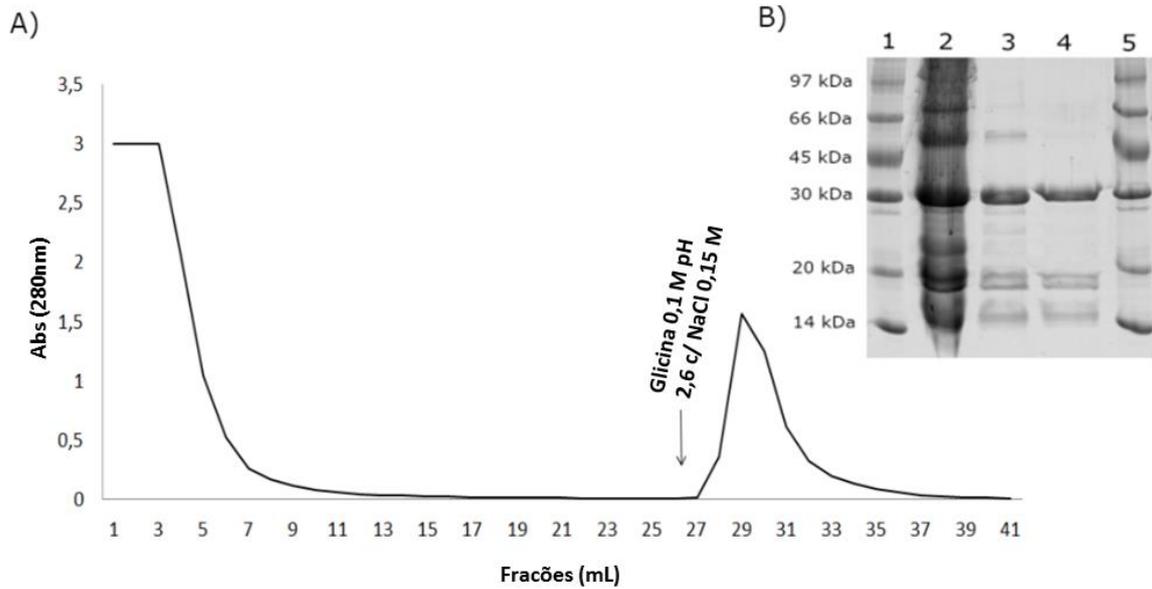
Amostra	Eritrócito de coelho a 3%		
	Nativo	Tripsinizado	Papainizado
Extrato total	16.384	131.072	1.048.576
Lectina pura	4.096	32.768	1.048.576

Valores expressos em Unidade Hemaglutinante (U.H.)

A lectina pura foi obtida por único passo de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 quando a proteína, adsorvida à matriz, foi eluída da coluna utilizando glicina 0,1 M pH 2,6, contendo solução de NaCl 0,15 M (Figura 14 A) e apresentou atividade de hemaglutinação expressiva com uma atividade específica de $1,05 \times 10^7$ UH/ mg de proteína contra eritrócitos de coelho tratados com tripsina. Esta lectina, nominada de Cvill, mostrou um aumento de 19,46 vezes na purificação quando comparada com a atividade específica do extrato bruto (Tabela 2) e teve um rendimento de 19,35 mg de lectina por grama de farinha. O protocolo de purificação foi escolhido considerando a afinidade por manose e glicose que muitas lectinas de sementes de Diocleinae tendem a apresentar (CAVADA *et al.*, 2001; CORREIA *et al.*, 2011; OSTERNE *et al.*, 2014) e essa especificidade foi confirmada também no ensaio de inibição da atividade hemaglutinante de Cvill (Tabela 3).

Análise de cromatografia de exclusão molecular (Figura 15) e SDS-PAGE (Figura 14 B) fornecem um indicativo de pureza da lectina, que foi confirmada por análise de massa intacta, com Cvill apresentando o padrão de três bandas característico de lectinas da subtribo Diocleinae, caracterizado pela cadeia polipeptídica intacta α e pelos fragmentos β e γ (MOURA *et al.*, 2009; GRANGEIRO *et al.*, 1997; BEZERRA; PAIVA, 2006), todos biologicamente ativos.

Figura 14 – Cromatograma e caracterização eletroforética de Cvill.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em Sephadex G-50. Aproximadamente 10 mL do extrato total foram aplicados em uma coluna de Sephadex G-50 (6,5 × 1,8 cm) previamente equilibrada com a solução de extração NaCl 0,15 M. A fração não retida (PI) foi removida com o tampão de equilíbrio, enquanto que, a fração retida (PII) foi eluída com solução de equilíbrio contendo Glicina 0,1 M pH 2,6 Com NaCl 0,15 M. Frações de aproximadamente 2 mL foram coletadas manualmente e analisadas por espectrofotometria com leitura a 280 nm. (B) SDS-PAGE. 1: marcador de peso molecular com valores de peso especificados, 2: extrato bruto da proteína, 3: lectina pura, Cvill (PII de cromatografia), 4: Cvill na presença de B-mercaptoetanol e 5: marcador de peso molecular.

Tabela 2. Purificação da lectina de *Canavalia villosa*

Fração	^a Proteínas mg/mL	^b U.H. total (título)	^c Atividade específica (U.H./mgP)	Purificação (vezes)
Extrato total	1,936	1.048.576	541.619,83	1
G-50 (PII)	0,099	1.048.576	10.538.452,26	19

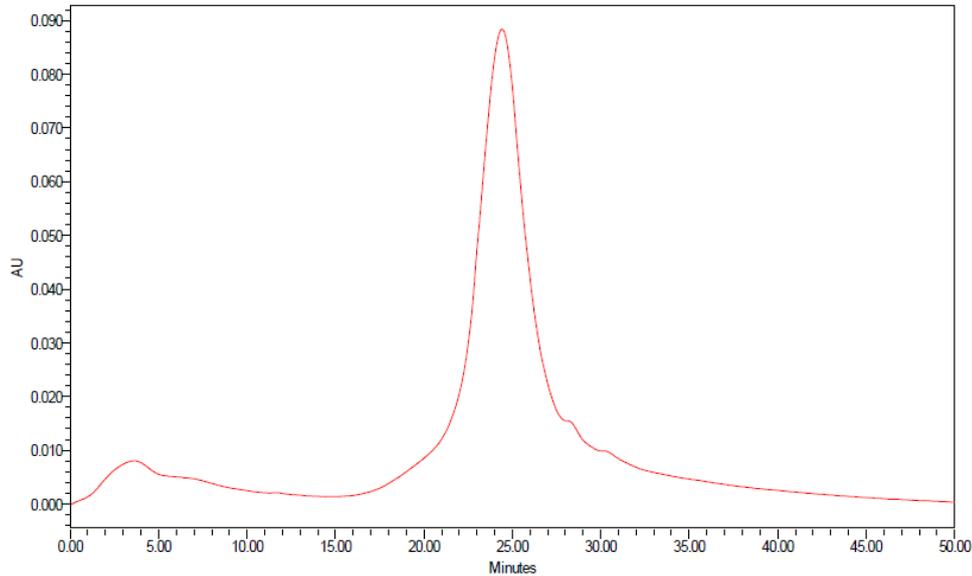
^aConteúdo de proteína determinado pelo método de Bradford

^bTítulo de hemaglutinação (U.H.)

^cAtividade específica como razão entre a atividade hemaglutinante e o conteúdo de proteína

O ensaio de inibição da hemaglutinação confirmou a especificidade de Cvill para glicose, manose, α -metil-D-manosídeo e pelas glicoproteínas fetuína e ovalbumina. A melhor inibição por carboidrato ocorreu com α -metil-manosídeo, que apresentou uma concentração inibitória mínima (MIC) de 3,125 mM, enquanto que a segunda melhor inibição ocorreu com manose com MIC 6,25 mM, seguido por glicose 12,5 mM. A melhor inibição de glicoproteína foi observada com ovoalbumina a 0,0039 mg/mL, seguido de fetuina 0,0625 mg/mL. Todos os outros açúcares foram considerados não inibitórios neste ensaio (Tabela 3).

Figura 15 – Cromatografia de exclusão por tamanho de Cvill



Fonte: Elaborado pelo autor. Cvill em Fosfato de Sódio 100 mM pH 7,0. Cromatografia de exclusão molecular conduzida em sistema HPLC (ACQUITY® UPLC System – Waters®) em matriz de sílica (BioSuite™ 250, 5µm HR SEC) em modo isocrático. Aplicados 2 mg/mL da lectina. Absorbância: 280 nm.

Tabela 3. Inibição da hemaglutinação da lectina de *Canavalia villosa*.

Carboidratos e glicoproteínas	MIC*
D-glicose	12,5 mM
D-galactose	NI**
L-ramnose	NI
D-ribose	NI
D-mannose	6,25 mM
α-lactose	NI
α-metil-D-manosídeo	3,125 mM
L-fucose	NI
Desoxiribose	NI
Inosina	NI
N-acetil-D-glicosamina	NI
Fetuína 2 mg/mL	0,0625 mg/mL
Ovoalbumina	0,0039 mg/mL

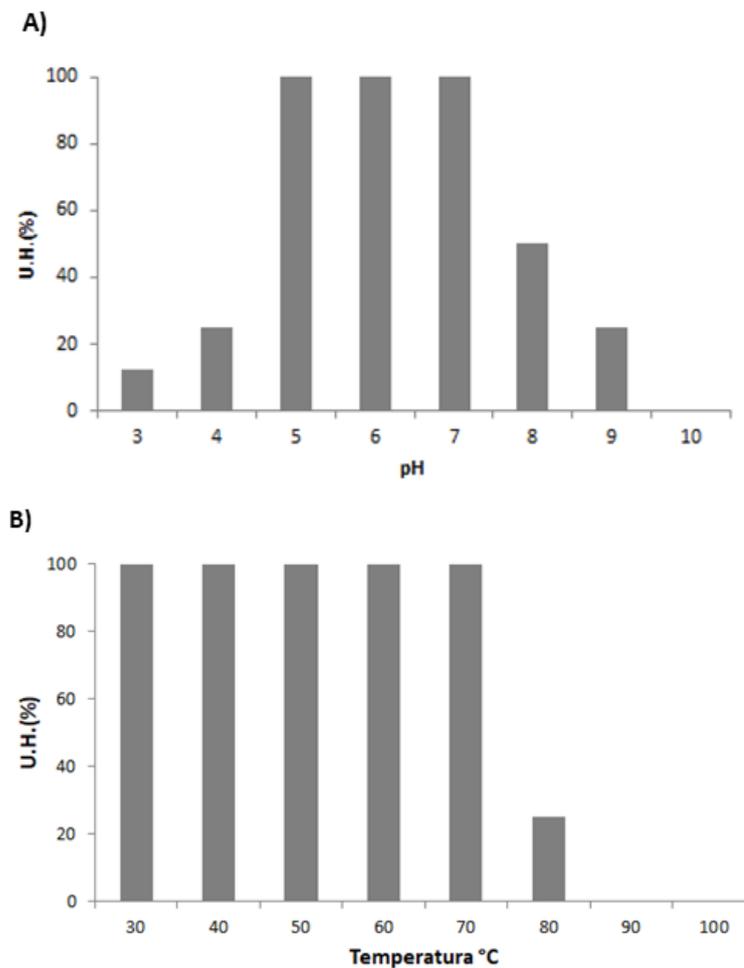
*MIC, concentração mínima inibitória; **NI, açúcar não inibitório

5.2 Caracterização físico-química de Cvill

A proteína foi analisada quanto a estabilidade em pH e mostrou-se relativamente estável. Cvill foi totalmente ativa entre pH 5,0 e 7,0, reduzindo sua atividade para 50% a pH 8,0; 25% a pH 9,0 e, finalmente, perdendo completamente a atividade a pH 10,0. A pH ácido, Cvill mostrou um mínimo de 12,5% da sua atividade a pH 3,0 (Figura 16 A).

Cvill também mostrou-se termostável e manteve a atividade máxima a temperaturas até 70 °C, diminuindo para 25% de atividade a 80 °C, seguido por perda total de atividade a 90 °C (Figura 16 B). Esta termoestabilidade e estabilidade relativa ao pH também foi observadas em outras lectinas de Diocleinae, como *Dioclea lasiophylla*, (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013) *Canavalia oxyphylla*, (SANTIAGO *et al.*, 2014) e *Canavalia gladiata* (WONG; NG, 2005). A lectina continuou também a se apresentar completamente ativa após liofilização.

Figura 16 – Efeitos do pH e temperatura na atividade hemaglutinante de Cvill. (A) ensaio de estabilidade de pH. (B) ensaio de termoestabilidade.



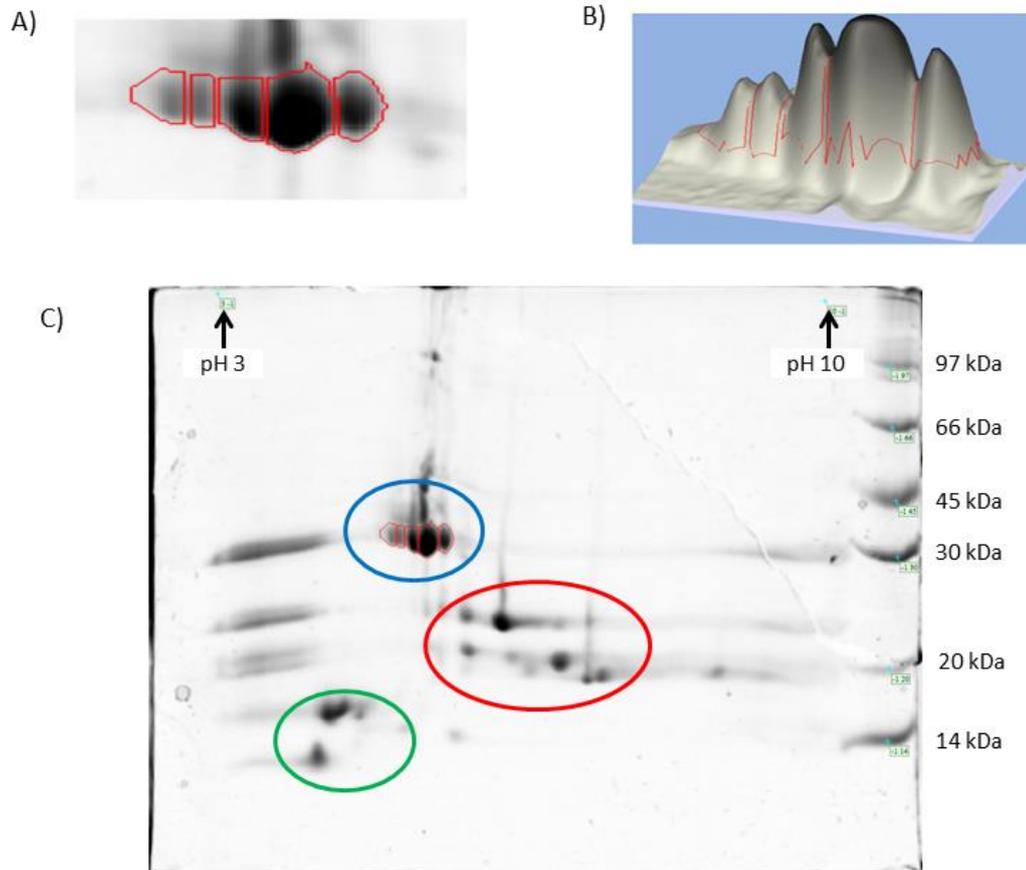
Após tratamento da lectina com EDTA, a atividade hemaglutinante de Cvill permaneceu inalterada. Esses dados sugerem que Cvill, em contraste a outras lectinas de leguminosas (CAVADA *et al.*, 2001; LORIS *et al.*, 1998), não necessita de cátions divalentes

para sua atividade, ou provavelmente eles estão fortemente ligados a proteína e a diálise com EDTA não foi capaz de quelar esses íons (SANTIAGO *et al.*, 2013; OSTERNE *et al.*, 2014).

Embora essa propriedade não seja tão comum em lectinas da subtribo Diocleinae, atividade hemaglutinante não afetada por EDTA foi também observada nas lectina de *Canavalia catártica* (SUSEELAN *et al.*, 2007), *C. oxyphylla* (SANTIAGO *et al.*, 2014) e *C. virosa* (OSTERNE *et al.*, 2014). Muitos estudos estruturais cristalográficos (BARROSO-NETO *et al.*, 2014, 2016; LORIS *et al.*, 1998) sugerem que esses íons, principalmente cálcio e manganês, se ligam a sítios específicos em lectinas de Diocleinae para estabilizar o local de ligação aos carboidratos e, portanto, são essenciais na atividade da lectina. Assim, com a resolução estrutural de Cvill poderemos confirmar a necessidade ou não de cátions divalentes na estrutura e atividade da lectina.

Como determinado por gel de eletroforese bidimensional, Cvill apresenta cinco isoformas de cadeia α com pontos isoelétricos de 5,00; 5,09; 5,24; 5,41 e 5,62 (Figura 17), bem como isoformas dos fragmentos β e γ . Essas isoformas presentes em lectinas de Diocleinae, como *Canavalia bonariensis* (SILVA *et al.*, 2016), *Dioclea lehmanni* e *Canavalia maritima* (PEREZ *et al.*, 1991) podem ser formadas durante o processo pós-traducional de permutação circular (CARRINGTON, AUFFRET; HANKE, 1985) pela combinação de diferentes fragmentos β e γ formando isoformas da cadeia α . Cvill não foi corada pelo método PAS, sugerindo que não é uma glicoproteína. Além disso, na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol, observou-se uma banda extra de aproximadamente 50 kDa (Figura 14 B). Esta banda é provavelmente o resultado da dimerização de monômeros causada por interações hidrofóbicas ou formação de ligações dissulfeto, o que pode ser uma característica única entre as lectinas de leguminosas, considerando que as lectinas do gênero *Canavalia* não apresentam cisteínas em suas seqüências, exceto a lectina de *Dioclea lehmanni*, (PEREZ *et al.*, 1991) que mostra uma única cisteína na posição 107.

Figura 17 – Eletroforese bidimensional de C_{vill}.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Pontos (spots) da banda α , com cinco isoformas marcadas em vermelho. (B) Visão tridimensional das isoformas no gel. (C) Gel 2D mostrando as isoformas da subunidade α (circulado em azul, fragmentos β (circulados em vermelho) e fragmentos γ (circulados em verde).

5.3 Massa intacta e sequência primária de C_{vill}

5.3.1 Determinação da massa de C_{vill}

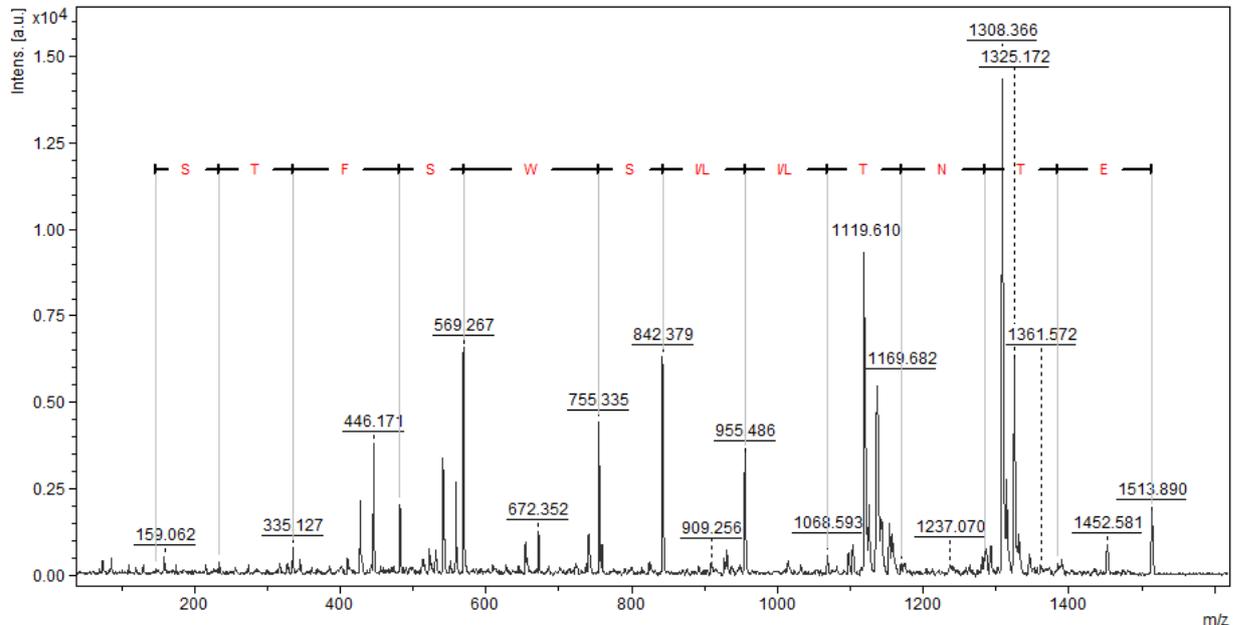
O peso molecular aparente observado em gel ratifica os dados de massa molecular obtidos por espectrometria de massas de 25.647 Da para cadeia α , 12,966 Da para fragmento β e 12.685 Da para fragmento γ (Figura 14 B).

5.3.2 Sequenciamento de C_{vill}

Para a determinação da sequência MS/MS, as bandas de SDS-PAGE, excisadas manualmente, foram digeridas por duas enzimas, tripsina e quimotripsina. Cada peptídeo foi manualmente sequenciado através da interpretação dos espectros MALDI-TOF / TOF (Figura

18). Foram obtidas seis seqüências peptídicas, cinco a partir de digestão tríptica e uma de digestão quimiotríptica (Tabela 4). Juntos, estes peptídeos correspondem a 99 resíduos e cerca de 41% da cobertura de seqüência da cadeia média de lectinas tipo ConA.

Figura 18 – Espectro MS/MS do peptídeo de Cvill.



Fonte: Elaborado pelo autor. Interpretação manual do ion 1513,890 do fragmento γ para determinação da seqüência ETNTXXSWSFTSK utilizando o software flexAnalysis. A letra X na seqüência indica resíduos de leucina (L) ou isoleucina (I) que não podem ser diferenciados por espectrometria de massas.

Tabela 4 – Seqüência primária parcial da lectina de *Canavalia villosa*.

^a Peptídeo	Massa Teórica (Da)	Massa Experimental (Da)	^b Seqüência
T1	1358.56	1358.80	VGTAHXXYNSVGK
T2	1513.75	1513.89	ETNTXXSWSFTSK
T3	2124.03	2124.35	SNSTAETNAXHFTXNQFTK
T4	2146.30	2146.39	DXXXQGDATTDSDGNXQXTR
T5	1981.96	1982.07	PADGXTFFXSNMDSTXPR
C1	1839.08	1839.15	DVDXDNVXPEWVRVGL

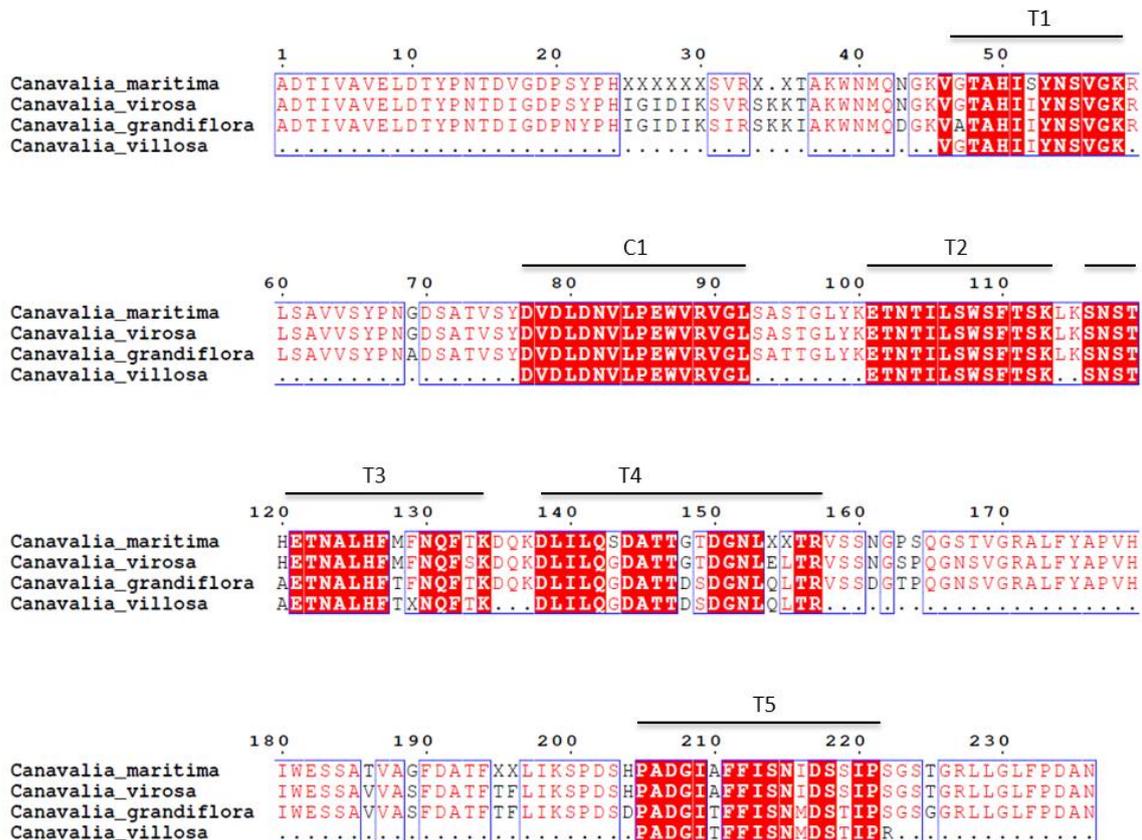
^aPeptídeos identificados como T foram digeridos por tripsina, e os identificados como C foram digeridos por quimotripsina.

^bA letra "X" na seqüência pode ser resíduo de leucina ou isoleucina.

Os peptídeos obtidos de Cvill foram comparados contra o banco de dados não redundante de proteínas no NCBI utilizando a ferramenta blastp. Foi observada alta similaridade da seqüência de Cvill com outras lectinas de Diocleinae, com melhor identidade ocorrendo com a lectina de *C. grandiflora* (UniProt A0A067XG71), seguido pela lectina de

C. marítima (UniProt P81364) e então por *C. virosa* (UniProt P81461). Um alinhamento de sequências foi realizado entre Cvill e as lectinas que mostraram maior similaridade de sequência primária utilizando o ESPrnt 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014) (Figura 19).

Figura 19 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de *C. villosa* (Cvill) com lectinas de Diocleinae.



Fonte: Elaborado pelo autor. Alinhamento da sequência de aminoácidos de *C. villosa* (Cvill) com lectinas de Diocleinae usando o programa ESPrnt 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). *C. grandiflora* (UniProt A0A067XG71), *C. marítima* (UniProt P81364), *C. virosa* (UniProt P81461).

Uma importante característica de lectinas da subtribo Dicleinae é a conservação de resíduos de aminoácidos em determinadas regiões de estrutura primária envolvidas no sítio de reconhecimento a carboidratos (Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228), sítio de ligação a metais (Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19, His24, Val32, Ser34, Asp208 e Arg228) e cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214) (CAVADA *et al.*, 2001; PEREIRA-JÚNIOR, 2014). Mesmo com sequência primária incompleta, foi possível verificar a presença de alguns desses resíduos na sequência obtida de Cvill, onde os resíduos presentes são principalmente

encontrados na cavidade hidrofóbica (Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Phe212 e Ile214) e Asp208 observado no DRC e sítio de ligação a metais.

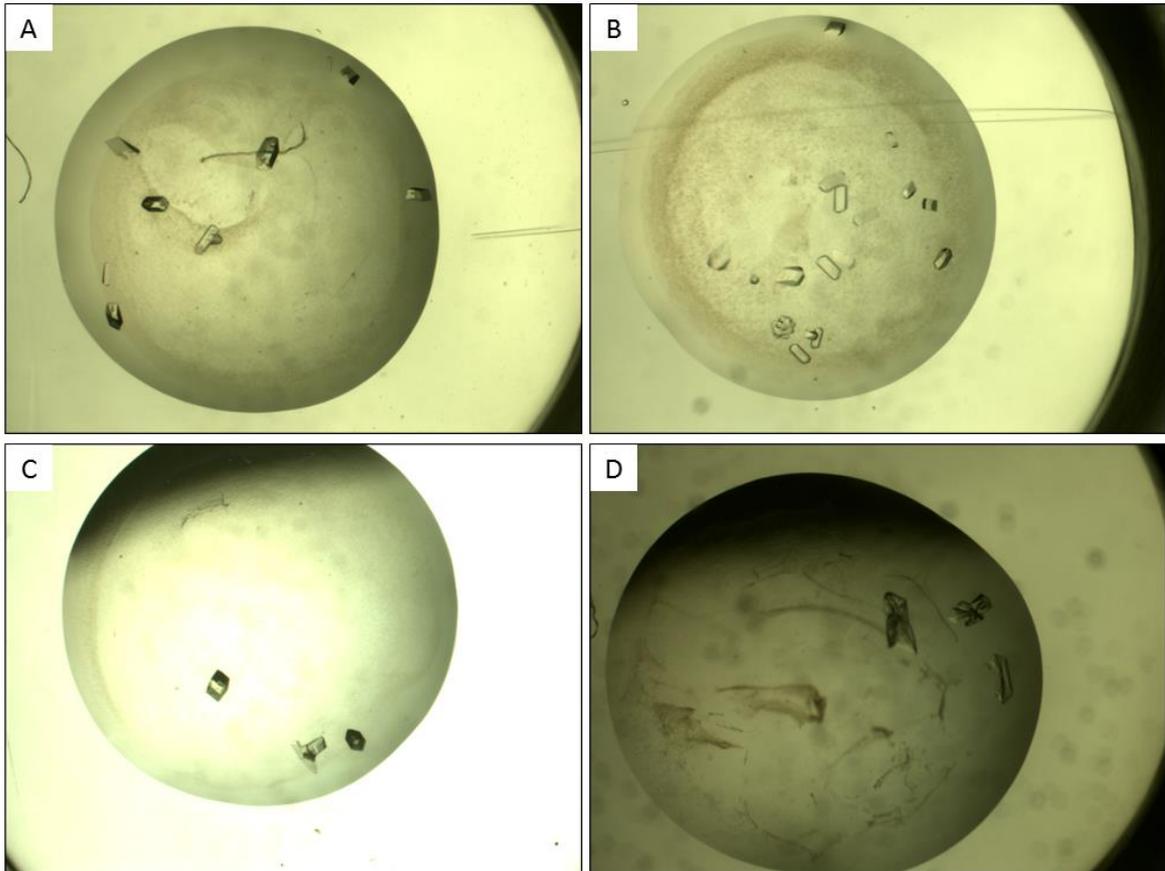
Os peptídeos obtidos são muito semelhantes em sequência primária com as lectinas mostradas no alinhamento, principalmente os peptídeos C1 e T2. Cvill mostrou variação em alguns resíduos das sequências lectínicas confrontadas em X130 (Phe130) em T3, Arg223 (Ser223) em T5 (Figura 19). É necessário mais informação de sequência primária para construir uma árvore filogenética que inclua a informação da lectina *Canavalia villosa*.

5.4 Cristalização da Cvill

A proteína Cvill previamente purificada foi submetida a triagem de cristalização. Os kits utilizados foram *crystal screen* I e II (Hampton) e JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience) com variáveis iniciais de pH, sal e precipitantes. Foi observado crescimento de cristais em duas condições do kit JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience) e estes seguiram para o teste de otimização. Em duas semanas foram obtidos cristais de Cvill complexada com α -metil-manosídeo nas condições 6 (PEG1000 20%, fosfato de potássio-citrato pH 4,2 0,1M e sulfato de lítio 0,2M) e 25 (PEG8000 20%, fosfato de potássio-citrato pH 4,2 0,1M e cloreto de sódio 0,2M). Foram realizadas otimizações desta condição em placas MRC-Maxi 48 poços (Swissci) variando-se o pH e a concentração do agente precipitante. Após duas semanas foram obtidos cristais na condição 6: otimizações A2, A6 e D2; Condição 25: otimização H3. As condições de otimização nas quais observou-se a presença de cristais (Figura 20) foram: A2 – PEG1000 17,5%, fosfato de potássio-citrato 0,1 M, pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M; A6 – PEG1000 17,5%, fosfato de potássio-citrato 0,1 M, pH 5,0 e sulfato de lítio 0,2 M; D2 – PEG1000 25%, fosfato de potássio-citrato 0,1 M, pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M; H3 – PEG8000 24%, fosfato de potássio-citrato 0,2 M, pH 4,4 e cloreto de sódio 0,2 M. Para cada cristal foram coletadas 360 imagens com oscilação de ângulo de 0,5 °.

Os dados de difração dos cristais de Cvill com alfa-metil-D-manosídeo foram coletados a 2,7 Å de resolução para o cristal da condição A2; 2,4 Å para a condição A6; 2,7 Å para a condição D2 e 2,6 Å para a condição H3. A melhor condição de resolução de difração foi observada na condição A6.

Figura 20 – Cristais de Cvill. A) condição A2; B) condição A6; C) condição D2; D) condição H3.



Fonte: elaborado pelo autor. Condições de otimização nas quais observou-se a presença de cristais A) A2 - PEG1000 17,5%, fosfato de potássio-citrato 0,1 M, pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M; B) A6 - PEG1000 17,5%, fosfato de potássio-citrato 0,1 M, pH 5,0 e sulfato de lítio 0,2 M; C) D2 - PEG1000 25%, fosfato de potássio-citrato 0,1 M, pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M; D) H3 - PEG8000 24%, fosfato de potássio-citrato 0,2 M, pH 4,4 e cloreto de sódio 0,2 M.

Para determinar a estrutura terciária da proteína é necessária uma maior porcentagem de cobertura da sequência primária. Mais tentativas serão realizadas para a obtenção da sequência primária através de repetições e/ou variações da técnica de espectrometria de massas, como variação em fonte e analisador, utilização de diferentes endopeptidases, bem como obtenção da sequência primária através de técnicas de biologia molecular, como clonagem da sequência gênica.

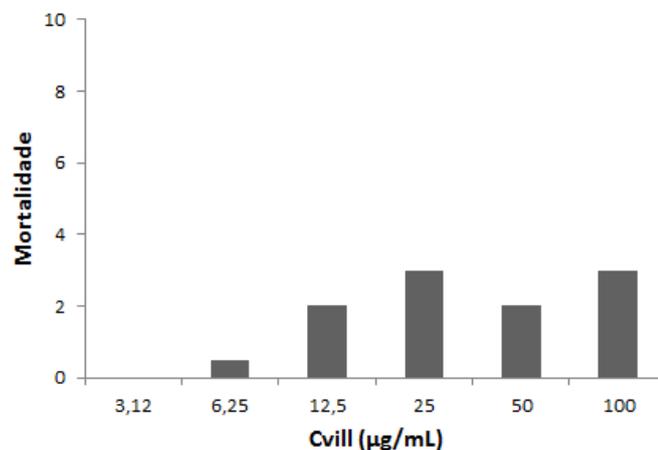
5.5 Efeitos de Cvill na análise da toxicidade contra *Artemia* sp., atividade inflamatória, antinociceptiva e em células de glioma

5.5.1 Ensaio de toxicidade em *Artemia* sp.

Após 24 h, Cvill apresentou toxicidade média contra *Artemia* sp. Com uma CL50 de 133,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As lectinas do gênero *Canavalia* apresentam tipicamente uma gama de diferentes toxicidades neste experimento, com valores de CL50 variando de 54,38 em *Canavalia brasiliensis* a 376,48 em *Canavalia ensiformis* (ARRUDA *et al.*, 2013) também foram observadas outras lectinas de Diocleinae com toxicidade bastante elevada com CL50 variando de 4,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em *Cratylia floribunda* (CFL) a 2,52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em *Dioclea grandiflora* (DGL) (DOS SANTOS *et al.*, 2010).

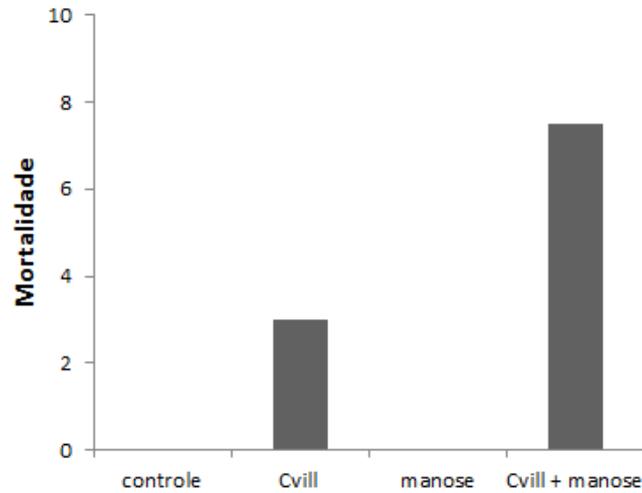
A toxicidade em Cvill demonstrou ser dose-dependente, com a letalidade aumentando da concentração mínima para a mais alta testada (Figura 21). Quando a lectina foi incubada com manose, a taxa de letalidade aumentou, indicando que a afinidade da lectina pelos receptores no trato digestivo das Artemias é maior do que a afinidade da lectina pela manose ou que a toxicidade não está associada com o local de ligação de carboidrato (Figura 22). A letalidade da artemia é um ensaio bem estabelecido para determinar a toxicidade de moléculas bioativas e para realizar estudos toxicológicos (ARRUDA *et al.*, 2013; CALDWELL, BENTLEY; OLIVE, 2003; GARAVENTA *et al.*, 2010; MIGLIORE *et al.*, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2010).

Figura 21 – Efeito citotóxico de Cvill em diferentes concentrações contra *Artemia* sp.



Fonte: Elaborado pelo autor. A mortalidade está representada como o número de náuplios de artemia mortos.

Figura 22 - Inibição do efeito tóxico de Cvill contra *Artemia* sp.



Fonte: Elaborado pelo autor. Efeito tóxico de Cvill (100 µg/mL) previamente incubada com 0,1 M de manose. A mortalidade está representada como o número de náuplios de artemia mortos.

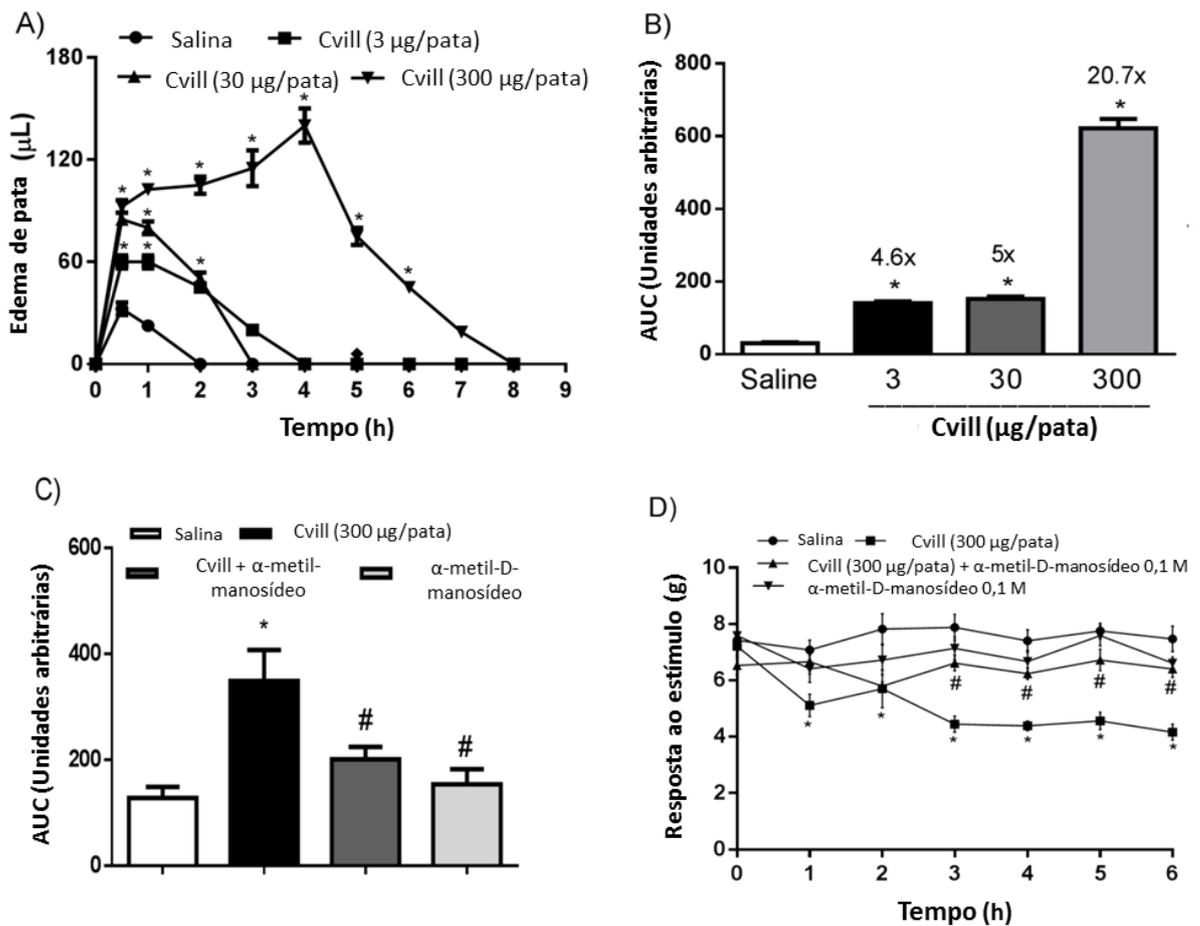
5.5.2 Indução de edema de pata e hipernocicepção em rato

Para testar a capacidade pró-inflamatória de Cvill, a lectina foi injetada por via subcutânea intraplantar nas concentrações de 3, 30 e 300 µg/pata. Foi observado que Cvill induziu o edema de pata, aumentando o volume da pata 4,6- ($140 \pm 5,74$ AUC), 5- ($152,5 \pm 6,54$ AUC) e 20,7 ($621,87 \pm 25,48$ AUC) - vezes, respectivamente, comparado ao grupo controle o qual foi injetado salina ($30 \pm 2,67$ AUC) (Figura 23 B). Todos os edemas iniciaram após 30 minutos. Para as concentrações 3 e 30 µg/ pata no início do edema (3: $60,00 \pm 3,77$ µL, 30: $85,00 \pm 3,27$ µL), sendo significativo até 2 h (3: $45,00 \pm 3,27$ µL, 30: $50,00 \pm 3,77$ µL). Na concentração de 300 µg/ pata, no início do edema ($92,5 \pm 3,65$ µL) e durou até 6 h ($45 \pm 3,27$ µL), tempo em que os valores basais foram recuperados (Figura 23 A). Para avaliar se o DRC da lectina está envolvido no efeito inflamatório da lectina, foi realizada a administração de α -metil-D-manosídeo associada a Cvill (300 µg / pata). A associação de Cvill e α -metil-D-manosídeo resultou na inibição do edema (Cvill: $348,6 \pm 58,58$ AUC contra Cvill + α -metil-D-manosídeo: $200,85 \pm 23,23$ AUC) (Figura 23 C). Nem solução salina nem α -metil-D-manosídeo induziu edema por si só (Figura 23 C).

Para avaliar o efeito nociceptivo, Cvill a uma concentração de 300 µg / pata foi administrado de forma injeção intraplantar subcutânea (s.c.). Os valores basal (antes da aplicação) e de 1 a 6 h após a injeção foram determinados e o grupo controle recebeu salina (0,01 mL/ pata) s.c. Cvill a 300 µg/ pata aumentou a retirada da pata em resposta à

estimulação mecânica com von Frey durante a 1ª h e durou 6 h, em comparação com solução salina (Figura 23 D). Para avaliar se o DRC da lectina está envolvido no nociceptivo da proteína, foi realizada a administração de α -metil-D-manosídeo associada a Cvill (300 μ g / pata). Foi observado que a administração de α -metil-D-manosídeo associada a Cvill (300 μ g / pata) inibiu o efeito hipernocicepção provocada por Cvill entre 3 e 6 h (Figura 23 D).

Figura 23. Cvill induz o edema da pata e a hipernocicepção em camundongos.



Fonte: elaborado pelo autor: Animais receberam salina s.c. (0,01 mL/pata), apenas Cvill (3, 30, 300 μ g / pata), apenas α -metil-D-manosídeo (0,1 M) ou Cvill incubada com α -metil-D-manosídeo (300 μ g / pata). (A, B) O edema foi medido antes (tempo zero) e 0,5 - 8 h após indução e expresso como o aumento no volume da pata (μ L) ou área sob a curva-AUC (unidades arbitrárias). (C) AUC de Cvill incubada com α -metil-D-manosídeo. (D) A hipernocicepção foi medida antes e 1 - 6 h após a injeção de Cvill. Média \pm S.E.M. (N = 8). * P < 0,05 comparado a solução salina; #p < 0,05 comparado a Cvill.

Neste estudo foi possível observar que α -metil-D-manosídeo inibe os efeitos edematogênicos e hiper-nociceptivos induzidos por Cvill e que o domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) desempenha um papel importante nas atividades biológicas das lectinas (ASSREUY *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2012; DE ALENCAR *et al.*, 2013;

OSTERNE *et al.*, 2017). Este estudo dá suporte a hipótese de que a o DRC da lectina está envolvido nestes efeitos.

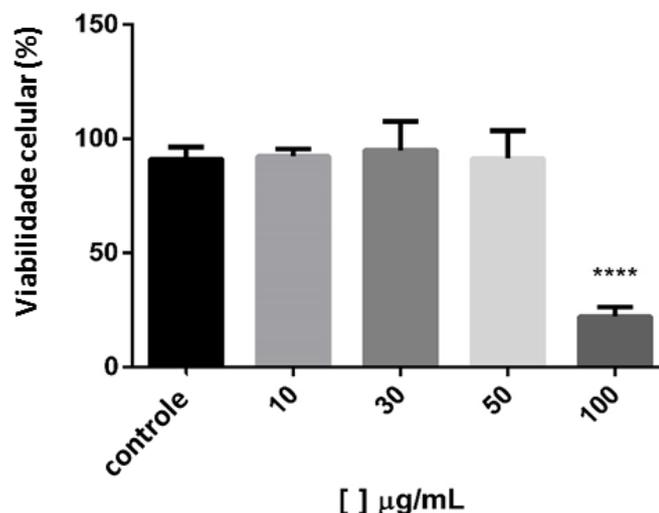
Lectinas de Diocleinae apresentam atividade pró- ou anti-inflamatória dependendo da via pela qual a lectina é administrada. Este estudo mostrou que Cvill teve um efeito edematogênico precoce, característico da inflamação aguda. Com aplicação por via local foi observado resposta estimulatória da inflamação, como em lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia gladiata*, e *Canavalia marítima* (ASSREUY *et al.*, 2009); *Canavalia grandiflora* (SIMÕES *et al.*, 2012); *Canavalia oxyphylla* (SANTIAGO *et al.*, 2014), *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2015) e *Canavalia virosa* (OSTERNE *et al.*, 2017) que induzem edema, sendo consideradas pró-inflamatórias por via local.

Muitas lectinas de leguminosas tiveram suas atividades de nocicepção determinadas e apresentaram atividades hipernociceptivas, como *Dioclea lasiophylla* (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b); *Dolichos lablab* (FRIL), entre outras (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

5.5.3 Efeitos de Cvill na morfologia e viabilidade em células de glioma da linhagem C6

Para avaliar o efeito dose dependente da resposta citotóxica de Cvill, células C6 foram tratadas com concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL de Cvill, por 24 h. Foi observado que apenas a concentração de 100 µg/mL apresentou diferença estatística sobre a redução de viabilidade, no período de 24 h de tratamento. Cvill apresenta uma potente atividade em 100 µg/mL com aproximadamente 75% redução da viabilidade (Figura 24).

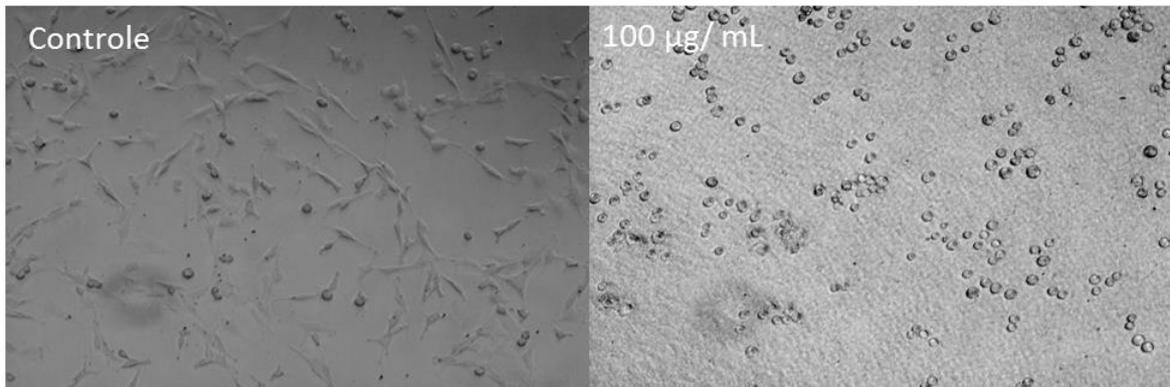
Figura 24 – Concentração e viabilidade da linhagem C6 tratada com Cvill após 24h.



Fonte: Elaborado pelo autor. Média ± média do erro padrão (n=3). ****p<0,0001.

Os ensaios de MTT foram acompanhados por microscopia convencional para avaliar se existiam mudanças morfológicas nas células pelo efeito do tratamento com Cvill (Figura 25). Como pode ser observado, o efeito citotóxico de Cvill (Figura 24) ocorre após 24 h de tratamento na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sendo acompanhada por mudanças morfológicas de retração dos prolongamentos citoplasmáticos, provavelmente resultante da perda de adesão (Figura 25). Assim, podemos concluir que a lectina Cvill apresenta efeitos citotóxicos dose dependentes na linhagem de células C6.

Figura 25 - Análise morfológica da linhagem C6 tratada com Cvill por 24h.



Fonte: Elaborado pelo autor. As células foram visualizadas utilizando microscópio óptico. Fotos demonstrando as mudanças morfológicas de C6 após o tratamento com Cvill 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24h.

O glioblastoma é um tumor cerebral primário altamente agressivo com mau prognóstico. Apesar da terapia agressiva com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, quase todos os pacientes sucumbem à doença em dois anos (TUCKER-BURDEN *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, muitas lectinas de leguminosas como as lectinas de *Canavalia virosa* (ConV), *Glycine max* (SBA), ConA, ConBr, lectina de *Viscum*, WGA foram estudadas e mostraram atividade indutora de autofagia e apoptose, levando assim a morte de células malignas de diferentes tipos de câncer, como hepatocarcinoma, melanoma, leucemia e glioma (OSTERNE *et al.*, 2017; FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2007; MO; LIM, 2005; DE MEJIA; BRADFORD; HASLER, 2003; BANTEL *et al.*, 1999).

Com base nos resultados de viabilidade celular, obtidos pelo ensaio de MTT e análise de morfologia por microscopia ótica, foi demonstrado que a lectina Cvill apresenta efeito sobre células da linhagem C6, diminuindo a viabilidade e causando alteração da morfologia celular, com retração dos prolongamentos citoplasmáticos, levando as células a tornarem-se esféricas até se desprender da placa, como observado na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 24 h de tratamento.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi purificada uma lectina de sementes de *Canavalia vilosa* (Cvill) específica para manose/ glicose. A lectina é composta por três cadeias polipeptídicas com massas de 25647, 12966 e 12685 Da. Por espectrometria de massas, aproximadamente 41% da sequência primária foi determinada e apresentou similaridade com sequências de lectinas do mesmo gênero. Cvill foi cristalizada e o cristal difratado com boa resolução, no entanto, não foi possível resolver a estrutura tridimensional da lectina devido a sequência primária não estar completa. Com relação as propriedades biológicas, Cvill foi tóxica contra náuplios de *Artemia* sp., apresentou propriedades edematogênicas e hipernociceptivas em camundongos e reduziu a viabilidade celular em células de glioma de rato causando alteração da morfologia.

Esses resultados sugerem que Cvill pode ser utilizada como ferramenta no estudo de estrutura-função de lectinas, mecanismos da inflamação e como potencial agente anticâncer. Experimentos adicionais são necessários a fim de determinar a sequência primária completa, como repetições e/ou variações da técnica de espectrometria de massas ou a obtenção da sequência primária através de técnicas de biologia molecular.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; SMITH, K.D. A. Systems approach to dissecting immunity and Inflammation. **Seminars in Immunology**, Seattle, v.16, p.55-67. 2004.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198-207. 2003.
- AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H.; BENEVIDES, N.M.; FREITAS, A.L.P.; COSTA, F.H.F.; CARVALHO, M.R.; PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extract. **Botanica Marina**. v. 35, n. 6, p. 475-479. 1992.
- 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 of Inflammation**, v. 8, n. 2, p. 107-113. 1999.
- ALMEIDA, A. C.; OSTERNE, V. J.S.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; SILVA-FILHO, J. C.; LOSSIO, C. F.; NASCIMENTO, F.L.F.; ALMEIDA, R.P.H.; TEIXEIRA, C.S.; LEAL, R.B.; DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity. **Archives of biochemistry and Biophysics**, v. 596, p. 73-83. 2016.
- ALMEIDA, A.C.; SILVA, H.C.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; CAJAZEIRAS, J.B.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth seeds exhibiting low toxicity on *Artemia* sp. **International Journal of Medicinal Plants**, v. 47, p. 1567-77. 2014.
- ALMEIDA, L.M.; PIRES, A.F.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, BS; ASSREUY, A.M.S. Edematogenic and antinociceptive activities of the lectin isolated from the albumin fraction of *Acacia farnesiana*. **Ciencia Animal (UECE)**, v. 25, p. 19-22, 2015.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, São Paulo, v.1000, n. 1, p.40-56, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**. v. 25, n. 17, p. 3389-402. 1997.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N.R.; DAVIS, B.G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 3, p. 1593–608. 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY **Glioma**. 2014. Disponível em: <http://www.cancer.org/>. Acesso em: 31/03/2017.
- AMORIM, R.M.F.; PIRES, A.F.; DOS SANTOS-NASCIMENTO, T; Cavada, BS; Nascimento, KS; Cajazeiras, JB; Leal-Cardoso, JH; Mota, MRL; Assreuy, AMS. The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms

that include neuronal inhibition of Na⁺ currents. **Inflammation Research** (Printed ed.), v. 65, p. 701-708, 2016.

ANDERSON, J.E.; GOETZ, C.M.; MCLAUGHLIN, J.L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, p. 107–111. 1991.

ARRUDA, F.V.S.; MELO, A.A.; VASCONCELOS, M.A.; CARNEIRO, R.F.; BARROSO-NETO, I.L.; SILVA, S.R.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; SAKER-SAMPAIO, S. Toxicity and binding profile of lectins from the genus *Canavalia* on brine shrimp. **BioMed Research International**. 2013.

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

ASSREUY, A.M.S.; FONTENELE, S.R.; PIRES, A.F.; FERNANDES, D.C.; RODRIGUES, N.V.F.C.; BEZERRA, E.H.S.; MOURA, T.R.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 509-521, 2009.

BANTEL, H.; ENGELS, I.H.; VOELTER, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; WESSELBORG, S. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Research**. v. 59, n. 9, p. 2083-90. 1999.

BARI, A.U.; SILVA, H.C.; SILVA, M.T.L.; PEREIRA JÚNIOR, F.N.; CAJAZEIRAS, J.B.; SAMPAIO, A.H.; LEAL, R.B.; TEIXEIRA, E.H.; ROCHA, B.A.M.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. **JMR. Journal of Molecular Recognition**, v. 26, p. 351-356, 2013.

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

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

BARROT M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**. v. 211, p. 39-50. 2012.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-84. 2009

BENEVIDES, R.G. **Caracterização bioquímica e estrutural de uma lectina recombinante de sementes de *Platypodium elegans* Vogel**, 292 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BERTRAM, J.S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167-223, 2001.

BEZERRA, W.M.; PAIVA, C. Establishment of a heterologous system for the expression of *Canavalia brasiliensis* lectin: a model for the study of protein splicing. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n. 1, p. 216-23. 2006.

BEZERRA, G.A.; OLIVEIRA, T.M.; MORENO, F.B.M.B.; SOUZA, E.P.; ROCHA, B.A.M.; BENEVIDES, R.G.; DELATORRE, P.; AZEVEDO-JR, W.F.; CAVADA, B.S. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: New insights into the understanding of the structure–biological activity relationship in legume lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 160, n. 2, p.168-176. 2007.

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

BIRGE, W.J.; BLACK, J.A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environment Toxicology and Chemistry**, v. 49, p. 808-810, 1985.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 128 p.

BURATINI, S.V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A.; Bulletin of Environmental. **Contamination and Toxicology**, v.73, p. 878. 2004.

CAIRNS, R.A.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85-95. 2011.

CALDWELL, G.S.; BENTLEY, M.G.; OLIVE, P.J.W. The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 301-306. 2003.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDÁ, 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.

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

CARNEIRO, R.F.; MELO, A.A.; NASCIMENTO, F.E.; SIMPLICIO, C.A.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA, R.D.; MOTA, S.S.; CAVADA, B.S.; NAGANO, C.S. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. **Journal of Molecular Recognition**. v. 26, n. 1, p. 51-8. 2013.

CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D.E. Polypeptide ligation occurs during posttranslational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64-67, 1985.

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 Science**, v. 2, n. 2, p. 123-135. 2001.

CHANG, C.P.; YANG, M.C.; LIU, H.S.; LIN, Y.S.; LEI, H.Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 286-296, 2007.

COOPER, D.R.; POREBSKI, P.J.; CHRUSZCZ, M.; MINOR, W. X-ray crystallography: Assessment and validation of protein-small molecule complexes for drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 771-782. 2011.

CORREIA, J.L.A.; NASCIMENTO, A.S.F.D.; CAJAZEIRAS, J.B.; GONDIM, A.C.S.; PEREIRA, R.I.; SOUSA, B.L.D.; SILVA, A.L.C.; GARCIA, W.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.M.; NAGANO, C.S.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9077-9089. 2011.

CUI, F.; ZAN, F.; LI, Y.; SUN, W.; YANG, Y.; PING, L. *Grifola frondosa* Glycoprotein GFG-3a Arrests S phase, Alters Proteome, and Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 2, p. 267-279, 2016.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric oxide**. v. 25, n. 3, p. 243-54. 2011.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T.B. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. **Medicinal Research Reviews**. v. 36, n. 2, p. 221-47, 2015.
DOI:10.1002/med.21363.

DE ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.R.L.; RODRIGUES, N.V.F.C.; MARTINS, J.L.; NASCIMENTO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding *Dioclea violacea* lectin. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 1, p. 220-225. 2013.

DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. Mass spectrometry: principles and applications. **John Wiley & Sons**, 2007.

DE MEJIA, E.G.; BRADFORD, T.; HASLER, C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. **Nutrition reviews**, v. 61, n. 7, p. 239–246, 2003.

DE MELO, A.A.; CARNEIRO, R.F.; SILVA, W.M.; MOURA, R.M.; SILVA, G.C.; SOUSA, O.V.; SABOYA, J.P.S.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. HGA-2, a novel galactoside-binding lectin from the sea cucumber *Holothuria grisea* binds to bacterial cells. **International journal of biological macromolecules**. v. 64, p. 435-42. 2014.

DELATORRE, P. **Lectinas de leguminosas: novos enfoques estruturais para velhas moléculas**. 84 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.; SIMÕES, R.C.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; SILVA, H.C.; BEZERRA, E.H.S.; BEZERRA, M.J.B.; MARINHO, E.S.; GADELHA, C.A.A.; SANTI-GADELHA, T.; FARIAS, D.L.; ASSREUY, A.M.S.; MARQUES-DOMINGOS, G.F.O.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Mass spectrometry and X-ray diffraction analysis of two crystal types of *Dioclea virgata* lectin: an antinociceptive protein candidate to structure/function analysis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 164, n. 6, p. 741-754. 2011.

DELATORRE, P.; ROCHA, B.A.M.; SOUZA, E.P.; OLIVEIRA, T.M.; BEZERRA, G.A.; MORENO, F.B.M.B.; FREITAS, B.T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A.H.; AZEVEDO-JÚNIOR, W.F.; CAVADA, B.S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC structural biology**, v. 7, n. 1, p. 52. 2007.

DESSAU, M.A.; MORDIS, Y. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. **Journal of Visualized Experiments**, v. 47, p. 2285, 2011.

DOS SANTOS, A.F.; CAVADA, B.S.; ROCHA, B.A.M.; NASCIMENTO, K.S.; SANT'ANA, A.E.G. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource technology**, v. 101, n. 2, p.794-798. 2010.

DREISEWERD, K. The desorption process in MALDI. **Chemical reviews**, v. 103, n. 2, p. 395-426. 2003.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; SILVEIRA, A.L.; CAVALCANTI, B.C.; RAMOS, M.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; ARAÚJO, D.A.M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1161–1169. 2012.

FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electrospray ionization—principles and practice. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 37-70. 1990. FIGUEIREDO, J.G.; BITENCOURT, F.S.; BESERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E.H.S.; MOTA, M.R.L.; ASSREUY, A.M.S.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia*

boliviana seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 5, p. 407-414, 2009.

FINNEY, D.J. Probit Analysis. 3rd Ed. **University Press**, Cambridge, UK. v. 18, p. 37-77. 1971.

FU, L.L.; ZHAO, X.; XU, H.L.; WEN, X.; WANG, S.Y.; LIU, B.; BAO, J.K.; WEI, Y.Q. Identification of microRNA-regulated autophagic pathways in plant lectin-induced cancer cell death. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 5, p. 477-485, 2012.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research. Bull**, Budapest, v. 48, n. 2, p. 129-141. 1999.

GABIUS, H.J.; SIEBERT, H.C.; ANDRE, S.; JIMENEZ-BARBERO, J.; RUDIGER, H. Chemical biology of the sugar code. **Chembioche.**, v. 5, n. 6, p. 741-64. 2004.

GARAVENTA, F.; GAMBARDELLA, C.; DI FINO, A.; PITTORE, M.; FAIMALI, M. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural end-point for ecotoxicological surveys. **Ecotoxicology**. v. 19, n. 3, p. 512-519. 2010.

GEMEINER, P.; MISLOVIČOVÁ, D.; TKÁČ, J.; ŠVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; KOGAN, G.; KOŽÁR, T. Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 1-15. 2009.

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews**, London, v.3, n. 5, p.104-416, 2004.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr , the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 43-48. 1997.

HAMID, R.; MASOOD, A.; WANI, I.H.; RAFIQ, S. Lectins: proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 93-103. 2013.

HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES, J.R. Mass spectrometry for proteomics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 5, p.483-490. 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HISEM, D.; HROUZEK, P.; TOMEK, P.; TOMŠÍČKOVÁ, J.; ZAPOMĚLOVÁ, E.; SKÁCELOVÁ, K.; LUKEŠOVÁ, A.; KOPECKÝ, J. Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 76-83. 2011.

HOLLINGSWORTH, S.A.; KARPLUS, P.A. A fresh look at the Ramachandran plot and the occurrence of standard structures in proteins. **Biomolecular Concepts**, v. 1, n. 3-4, p. 271-883. 2011.

HOLTON, J.M.; CLASSEM, S.; FRANKEL, K.A.; TAINER, J.A. The R-factor gap in macromolecular crystallography: an untapped potential for insights on accurate structures. **The FEBS Journal**, v. 281, n. 18, p. 4046-4060, 2014.

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

JANCARIK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, n. 4, p. 409-411. 1991.

JENSEN, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post- translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 33-41. 2004.

KARAS, M.; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299-2301. 1988.

KELLY, L.; PUETT, J.D.; PIERCE, J.M. **Method for cleaving and deglycosylating antibodies to promote ligand binding**. 2007, USA Patent, 20070117170.

KERMATH, B.M.; BENNETT, B.C.; PULSIPHER, L.M. **Food Plants in the Americas: A Survey of the Domesticated, Cultivated, and Wild Plants Used for Human Food in North, Central, and South America and the Caribbean**. 2014. Disponível em https://www.researchgate.net/profile/Brian_Kermath/publication/263888295_Food_Plants_in_the_Americas_A_Survey_of_the_Domesticated_Cultivated_and_Wild_Plants_Used_for_Human_Food_in_North_Central_and_South_America_and_the_Caribbean/links/0a85e53c3d7cc87b95000000.pdf?disableCoverPage=true. Acessado em: 09/04/2017.

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

KIVIRANTA, J.; SIVONEN, K.; NIEMELÄ, S.I.; HUOVINEN, K. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 6, n. 4, p. 423-436. 1991.

KOCOUREK, J.; HOREKSI, V. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". **In lectins biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 3, p 3-6, 1983.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, n. 3, p. 159-75. 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins Basic Pathology**. 9^aed.Philadelphia: Elsevier. 2015.

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

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 3, p. 578-583. 1995.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652. 2001.

LEITE, J.F.M.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.R.L.; BRINGEL, P.H.S.F.; LACERDA, R.R.; GOMES, V.M.; CAJAZEIRAS, J.B.; NASCIMENTO, K.S.; PESSÔA, H.L.F.; GADELHA, C.A.A.; DELATORRE, P.; CAVADA, B.S.; SANTI-GADELHA, T. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. **Molecules** (Basel. Online), v. 17, n. 3, p. 3277-3290. 2012.

LI, H.; HE, M.; ZHANG, Z. Image definition evaluation functions for X-ray crystallography: a new perspective on the phase problem. **Acta Crystallographica**, v. 71, n. 5, p.526-533. 2015.

LI, W.W.; YU, J.Y.; XU, H.L.; BAO, J.K. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p. 282-286. 2011.

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

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-477. 2008.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36. 1998.

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

LOUIS, D.N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; VON DEIMLING, A.; FIGARELLA-BRANGER, D.; CAVENEE, W.K.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O.D.; KLEIHUES, P.; ELLISON, D.W. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Acta neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803-20. 2016.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 14, n. 10, p.735-745. 2001.

MCPHERSON, A. Current approaches to macromolecular crystallization. **European Journal of Biochemistry**, v. 189, n. 1, p. 1-23. 1990.

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J.A. Introduction to protein crystallization. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications**, v. 70, n. 1, p. 2-20, 2014.

MIGLIORE, L.; CIVITAREALE, C.; BRAMBILLA, G.; DOJMI DI DELUPIS, G. Research note toxicity of several important agricultural antibiotics to artemia. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 1801-1806. 1997.

MISLOVIČOVÁ, D.; GEMEINER, P.; KOZAROVA, A.; KOŽÁR, T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, n. 1, p. 1–19. 2009.

MO, Y.; LIM, L.Y. Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. **Journal of Controlled Release**, v. 107, n. 1, p. 30-42. 2005.

MOGIL, J.S.; DAVIS, K.D.; DERBYSHIRE, S.W. The necessity of animal models in pain research. **Pain**, v. 151, n. 1, p. 12–17. 2010.

MORENO, F.B.M.B.; DE OLIVEIRA, T.M.; MARTIL, D.E.; VIÇOTI, M.M.; BEZERRA, G.A.; ABREGO, J.R.B.; CAVADA, B.S.; DE AZEVEDO, W.F. Identification of a new quaternary association for legume lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 161, n. 2, p. 133-143. 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOURA, R.M.; MELO, A.A.; CARNEIRO, R.F.; RODRIGUES, C.R.; DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; SAMPAIO, A.H. Hemagglutinating/Hemolytic activities in extracts of marine invertebrates from the Brazilian coast and isolation of two lectins from the marine sponge *Cliona varians* and the sea cucumber *Holothuria grisea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 973-84. 2015

MOURA, T.R.; BEZERRA, G.A.; BEZERRA, M.J.B.; TEIXEIRA, C.S.; BEZERRA, E.H.S.; BENEVIDES, R.G.; ROCHA, B.A.M.; SOUZA, L.A.G.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavalia boliviana* Piper seeds. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**. v. 65, n. 3, p. 213-215. 2009.

MOURINO-ALVAREZ, L.; LABORDE, C. M.; BARDERAS, M.G. Proteomics and Metabolomics in Aortic Stenosis: Studying Healthy Valves for a Better Understanding of the Disease. **Calcific Aortic Valve Disease**, InTech, p.151-172. 2013.

MURSHDOV, G.N.; SKUBÁK, P.; LEBEDEV, A.A.; PANNU, N.S.; STEINER, R.A.; NICHOLLS, R.A.; WINN, M.D.; LONG, F.; VAGIN, A.A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 67, n. 4, p. 355-367, 2011.

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, n. 2, p. 417– 428. 2008.

NASCIMENTO, K.S.; NASCIMENTO, F.L.F.; SILVA, M.T.L.; NOBRE, C.B.; MOREIRA, C.G.; BRIZENO, L.A.C.; DA PONTE, E.L.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **JMR. Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 248-252. 2016.

NEGUS, S.S.; VANDERAH, T.W.; BRANDT, M.R.; BILSKY, E.J.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 2, p. 507–514. 2006.

OSTERNE, V.J.S.; SILVA-FILHO, J.C.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; ALMEIDA, A.C.; BARRETO, A.A.G.C.; WOLIN, I.A.V.; NASCIMENTO, A.P.M.; AMORIN, R.M.F.; ROCHA, B.A.M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; LEAL, R.B.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 271-282. 2017.

OSTERNE, V.J.; SANTIAGO, M.Q.; PINTO-JUNIOR, V.R.; CAJAZEIRAS, J.B.; CORREIA, J.L.; LEITÃO, C.C.; CARNEIRO, R.F.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; VASCONCELOS, M.A.; ROCHA, B.A.M.; ASSREUY, A.M.S.; BRINGEL, P.H.S. F.; NAGANO, C.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342-3353. 2014.

OSTERNE, V.J.F. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anticâncer**. 95 f. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual do Ceará, 2016.

PEREIRA-JÚNIOR, F. N. **Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* HOOK F**. 103 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual do Ceará, 2014.

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

PEREZ, G.; HERNANDEZ, M.; MORA, E. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea lehmanni*. *Phytochem.*, v. 29, p. 1745-1749, 1990.

PEREZ, G.; PEREZ, C.; CAVADA, B.S.; MOREIRA R.; RICHARDSON, M. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea Lehmanni* and *Canavalia maritima*. **Phytochemistry**. v. 30, n. 8, p. 2619-2621. 1991.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

- PICCARDI, R.; FROSINI, A.; TREDICI, M.R.; MARGHERI, M.C.; Bioactivity in free-living and symbiotic cyanobacteria of the genus *Nostoc*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3, p. 543–547. 2000.
- PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; SANTIAGO, M. Q.; CORREIA, J. L. A.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; LEAL, R. B.; PEREIRA, M.G.; CHICAS, L.S.; NAGANO, C.S.; ROCHA, B.A.R.; SILVA-FILHO, J.C.; FERREIRA, W.P.; ROCHA, C.R.C.; NASCIMENTO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 12-23. 2017a.
- PINTO-JUNIOR, V.R.; CORREIA, J.L.; PEREIRA, R.I.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.; MADEIRA, J.C.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**. 2015.
- PINTO-JÚNIOR, V.R.; DE SANTIAGO, M.Q.; OSTERNE, V.J.D.S.; CORREIA, J.L.A.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; CAJAZEIRAS, J.B.; VASCONCELOS, M.A.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, A.S.F.; MIGUEL, T.B.A.R.; MIGUEL, E.C.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10857-10869. 2013.
- PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.S.; SANTIAGO, M.Q.; LOSSIO, C.F.; NAGANO, C.S.; ROCHA, C.R.C.; NASCIMENTO, J.C.F.; NASCIMENTO, F.L.F.; SILVA, I.B.; OLIVEIRA, A.S.; CORREIA, J.L.A.; LEAL, R.B.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. **Biochimie** (Paris. Print), v. 135, p. 126-136. 2017b.
- PIRES, A.F.; ASSREUY, A.M.S.; LOPES, É.A.B.; CELEDÔNIO, N.R.; SOARES, C.E.A.; RODRIGUES, N.V.F.C.; SOUSA, P.L.; BENEVIDES, R.G.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; SANTOS, C.F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 201-207. 2013.
- PIRES, A.F. **Lectinas isoladas de sementes de Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae): modelo para estudos de relações estrutura/função de proteínas**. 150 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual do Ceará, 2011.
- ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic acids research**. v. 42, n. W1, p. W320-4. 2014.
- SANTIAGO, M.Q.; LEITÃO, C.C.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; PINTO-JUNIOR, V.R.; OSTERNE, V.J.; LOSSIO, C.F.; CAJAZEIRAS, J.B.; SILVA, H.C.; ARRUDA, F.V.S.; PEREIRA, L.P.; ASSREUY, A.M.S.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & LO Williams. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, n. 3, p. 117-123. 2014.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**. v. 405, n. 1, p. 114-8. 1997.

SCHAIBLE, H.G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**. v. 389, n. 4, p. 237-43. 2004.

SCHEMBERA, E. The Legume Flora of the Golfo Dulce Rain Forests: Diversity and Ecological Observations. **Thesis Institute of Botany, University of Vienna**. 2004.
Disponível em: http://www.univie.ac.at/lagamba/researchdb/upload/files/diplarb_druck.pdf.
Acessado em: 09/04/2017.

SECHI, S.; ODA, Y. Quantitative proteomics using mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 1, p. 70-7. 2003.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 2, p. 433-445. 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. V. 14, n. 1, p. 53-62. 2004.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. 2nd ed. Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 454.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860. 2007.

SILVA, H.C.; BARI, A.U.; PEREIRA-JUNIOR, F.N.; SIMÕES, R.C.; BARROSO-NETO, I.L.; NOBRE, C.B.; PEREIRA, M.G.; NASCIMENTO, K.S.; ROCHA, B.A.M.; DELATORRE, P.; NAGANO, C.S.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S. Purification and Partial Characterization of a New Pro-Inflammatory Lectin from *Bauhinia bauhinioides* Mart (Caesalpinoideae) Seeds. **Protein and Peptide Letters**, v. 18, n. 4, p. 396-402, 2011.

SILVA, H.C.; BARI, A.U.; ROCHA, B.A.M.; NASCIMENTO, K.S.; PONTE, E.L.; PIRES, A.F.; DELATORRE, P.; TEIXEIRA, E.H.; DEBRAY, H.; ASSREUY, A.M.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **JMR. Journal of Molecular Recognition**, v. 26, v. 10, p. 470-478, 2013.

SILVA, M.T.L.; OSTERNE, V.J.S.; NOBRE, C.A.S.; CHAVES, R.P.; SILVA, I.B.; MOREIRA, C.G.; ANDRADE, M.L.L.; NAGANO, C.S.; ROCHA, C.R.C.; LEAL, R.B.; MARTINS, J.L.; CAVADA, B.S.; NASCIMENTO, K.S. Structural Characterization, Docking and Dynamics Simulations of *Canavalia Bonariensis* Lectin. **Journal of Drug Design and Research**, v. 3, n.1, p. 1-8. 2016.

SIMÕES, R.C.; ROCHA, B.A.M.; BEZERRA, M.J.B.; BARROSO-NETO, I.L.; PEREIRA-JÚNIOR, F.N.; NAGANO, C.S.; DELATORRE, C.; PIRES, A.F.; 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. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 7, p. 811-818. 2012.

SMYTH, M.S.; MARTIN, J.H.J. X Ray crystallography. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 8-14, 2000.

SOUSA, B.L.; SILVA-FILHO, J.C.; KUMAR, P.; PEREIRA, R.I.; ŁYSKOWSKI, A.; ROCHA, B.A.; DELATORRE, P.; BEZERRA, G.A.; NAGANO, C.S.; GRUBER, K.; CAVADA, B.S. High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 59, p. 103–110. 2015.

STANDING, K.G. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 13, n. 5, p. 595–601. 2003.

SUSEELAN, K.N.; BHAGWATH, A.; PANDEY, R.; GOPALAKRISHNA, T. Characterization of ConC a lectin from *Canavalia cathartica* Thouars seeds. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 528–535. 2007.

TEIXEIRA, E.H.; ARRUDA, F.V.; NASCIMENTO, K.S.; CARNEIRO, V.A.; NAGANO, C.S.; DA SILVA, B.R.; SAMPAIO, A.H.; CAVADA, B.S. Biological applications of plants and algae lectins: an overview. **INTECH Open Access Publisher**, 2012.

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

TODD, A.J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 823–836. 2010.

TUCKER-BURDEN, C.; CHAPPA, P.; KRISHNAMOORTHY, M.; GERWE, B.A.; SCHARER, C.D.; HEIMBURG-MOLINARO, J.; HARRIS, W.; USTA, S.N.; EILERTSON, C.D.; HADJIPANAYIS, C.G.; STICE, S.L. Lectins identify glycan biomarkers on glioblastoma-derived cancer stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 13, p. 2374-2386. 2012.

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

VAN DAMME, E.J.M.; BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J.; PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two diferente mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 419–427, 1996.

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, n. 2, p. 258–262, 1991.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**. V. 91, n. 1, p. 1-2. 2007.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. Porto Alegre, Brasil, v. 1, n. 1. 2014.

VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 25-33. 2004.

VIVANCOS, G.G.; VERRI, W.A.; CUNHA, T.M.; SCHIVO, I.R.S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391-399. 2004.

WILLIAMS, A.; WESTHEAD, D. Sequence relationships in the legume lectin fold and other jelly rolls. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 15, p.771-774, 2002.

WLODAWER, A.; MINOR, W.; DAUTER, Z.; JASKOLSKI, M. Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. **The FEBS Journal**. v. 280, n. 22, p. 5705-36. 2013.

WONG, J.H.; NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/ mannose/ rhamnase-specific lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 439, n. 1. p. 91-98. 2005.

WOODSON-JÚNIOR, R.E.; SCHERY, R.W.; DWYER, J.D.; D'ARCY, W.G.; DILLON, M.O.; WHITE, P.S.; POSTON, M.E.; FRANTZ, P.R.; WINDLER, D.R.; MCLAUGHLIN, L.; SCHUBERT, B.G.; MAXWELL, R.H.; DUNN, D.B.; LACKEY, J.A. Flora of panama. **Annals of The Missouri Botanical Garden**. 2007. Disponível em: <http://www.seabean.com/%5C%5C/Mucuna/Literature/Woodson%20et%20al.%201980.%20Flora%20of%20Panama.pdf>. Acessado em 09/04/2017.

WOOH, J.W.; KIDD, R.D.; MARTIN, J.L.; KOBE, B. Comparison of three commercial sparse-matrix crystallization screens. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 59, n. 4, p. 769-772. 2003.

ZACHARIUS, R.M.; ZELL, T.E.; MORRISON, J.H.; WOODLOCK, J.J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 30, n.1, 148–152. 1969.