



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

IVANICE BEZERRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA LECTINA NOCICEPTIVA OBTIDA
DE SEMENTES DA ESPÉCIE *Platypodium elegans* VOG.

FORTALEZA

2017

IVANICE BEZERRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA LECTINA NOCICEPTIVA OBTIDA DE
SEMENTES DA ESPÉCIE *Platypodium elegans* VOG.

Tese apresentada ao Programa 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: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Co-orientador: Prof. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

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)

S58c Silva, Ivanice Bezerra da.
Caracterização estrutural de uma lectina nociceptiva obtida de sementes da espécie
Platypodium elegans VOG. / Ivanice Bezerra da Silva. – 2017.
109 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: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

1. *Platypodium elegans*; . 2. cristalografia de raios X. 3. docking molecular. 4. dinâmica
molecular. I. Título.

CDD 660.6

IVANICE BEZERRA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA LECTINA NOCICEPTIVA OBTIDA DE
SEMENTES DA ESPÉCIE *Platypodium elegans* VOG.

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

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

Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Co-orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

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

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

Dr. Jorge Luís Almeida Correia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais João e Yvana;

Ao meu irmão João Maria;

À minha família;

Ao meu noivo João Paulo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre iluminar os meus caminhos, me concedendo inúmeras bênçãos, como este dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, por me acolher em seu grupo e por ter compartilhado comigo conhecimentos que ultrapassam à trajetória acadêmica, que levarei por toda a vida.

À Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento, por todos os ensinamentos e demonstrações de amizade, cuidado, paciência e pela confiança em meu potencial.

Ao Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima, pelos incansáveis ensinamentos, estímulos e por ter me apresentado ao Biomol.

Aos professores Dr. João Batista Cajazeiras e Dr. Jorge Luís Correia, por todos os ensinamentos, inestimável amizade e aceite em compor a banca.

Aos professores participantes da banca, Prof. Dr. Francisco Nascimento Pereira Junior e Prof. Dra. Cíntia Renata Costa Rocha, meus sinceros agradecimentos.

À professora Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy e laboratório LAFFIN por permitir a realização dos experimentos de atividade biológica apresentados neste trabalho.

À todos os participantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), que compartilharam sem medidas os seus conhecimentos e me ajudaram em todas as etapas para a conclusão deste doutorado (Alfa, Neto, Hadson, William, Messias, Larissa, Morgana).

Em especial, a Vanir Reis, Vinícius Osterne, David Araripe e Mayara Queiroz pela contribuição crucial para a produção desta tese.

Aos amigos da pós-graduação, Cleane, Mayara T., Clareane, Cláudia, Gleiciane, Raulzito e André, obrigada por todos os momentos compartilhados, todo o apoio e amizade.

Às minhas irmãs de moradia, Simoni e Soraya, meus sinceros agradecimentos, vocês fazem toda a diferença nos meus dias, as levarei para sempre no coração.

À amizade que Fortaleza meu deu pra vida inteira, Luciana Andrade, os seus dias aqui foram imprescindíveis para a mim.

Aos amigos da UFRN e de Natal, que sempre fizeram parte dos meus dias, suportando meus medos e apoiando a minha jornada, meu muito obrigada.

À minha família, em especial a meus pais, pelo apoio imensurável, por todo o amor, pelo exemplo de simplicidade e humildade, por não terem medido esforços para que eu tenha chegado até aqui, meu muito obrigada. Todos os dias do meu sucesso, sempre serão dedicados a vocês. Ao meu irmão, obrigada por me aturar e também fazer tanto por mim. Amo vocês.

Ao meu noivo, João Paulo de Freitas por todo o amor, paciência e amizade por todos esses anos. O seu apoio para que eu continuasse esta trajetória foi fundamental. Obrigada por fazer parte dos meus dias. Amo você.

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

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Uma lectina nativa (nPELa), purificada a partir de sementes da espécie *Platypodium elegans*, tribo Dalbergieae, foi cristalizada e estruturalmente caracterizada, através de metodologias como a cristalografia por difração de raios X e ferramentas de bioinformática. Os cristais obtidos (do tipo ortorrômbico) foram difratados com qualidade e a estrutura de nPELa foi resolvida com excelência através de substituição molecular, em uma resolução de 1,6 Å. O monômero de nPELa apresentou um sítio de N-glicosilação no resíduo Asn119, assim confirmando a predição da literatura, antes baseada apenas em dados de sequência primária. Além deste, nPELa apresenta um sítio de ligação a metais e um domínio de reconhecimento a carboidratos conservados, semelhantes ao demonstrado para outras lectinas da tribo Dalbergieae, como PAL (*Pterocarpus angolensis*) e CTL (*Centrolobium tomentosum*). As análises de docking molecular sugerem a alta afinidade desta lectina por diferentes manosídeos, principalmente trimanosídeos, formados por ligações do tipo α -1,3 ou α -1,6, evidenciado através dos escores obtidos. Além disso, simulações de dinâmica molecular foram realizadas, como forma de demonstrar o comportamento estrutural de nPELa em solução aquosa, sendo a lectina isolada ou associada a ligantes específicos. Os resultados obtidos demonstraram a alta estabilidade de nPELa em solução e as modificações estruturais apresentadas em seu sítio de reconhecimento a carboidratos permitem a interação entre a lectina e os diferentes ligantes testados. Diferentes modificações foram observadas durante as simulações para cada um dos glicanos testados, que incluíram variações no número de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, através de mudanças nos resíduos envolvidos. Além disso, nPELa foi avaliada quanto a sua ação nociceptiva em ratos, sendo relatada como a primeira lectina da tribo Dalbergieae que apresentou atividade hipernociceptiva, de uma maneira dependente do sítio de reconhecimento a carboidratos.

Palavras-chave: *Platypodium elegans*. Cristalografia de raios X. Docking. Dinâmica.

ABSTRACT

A native lectin (nPELa), purified from seeds of the species *Platypodium elegans*, Dalbergieae tribes, was crystallized and structurally characterized by methodologies such as X-ray diffraction crystallography and bioinformatics tools. The obtained crystals (of orthorhombic type) were diffracted with quality and nPELa structure was solved with excellence through molecular substitution, with resolution of 1.6 Å. The nPELa monomer showed an N-glycosylation site at the Asn119 residue, therefore, confirming the literature prediction. In addition, nPELa has a metal binding site and a conserved carbohydrate recognition domain, in a similar way to what was shown by other Dalbergieae tribe lectins, such as PAL (*Pterocarpus angolensis*) and CTL (*Centrolobium tomentosum*). As molecular docking analysis suggests high affinity of this lectin for different mannosides, mainly trimanosides, formed by α -1,3 or α -1,6 glycosidic bond, as evidenced by the obtained scores. In addition, molecular dynamics simulations were performed as a way of demonstrating the structural behavior of nPELa in aqueous solution, as isolated lectin or associated with specific ligands. The results demonstrated a high stability of nPELa in solution, and structural modifications presented at its carbohydrate recognition site allow the interaction between the lectin and the different ligands tested. Different modifications were observed during simulations for each one of the glycans tested, which included different number of hydrogen bonds and hydrophobic interactions, through changes in residues involved. In addition, nPELa was evaluated for its nociceptive activity in rats and was reported as a first lectin of the Dalbergieae tribe which exhibited hypernociceptive activity in a manner dependent on the carbohydrate recognition site.

Keywords: *Platypodium elegans*. X-ray crystallography. Docking. Dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação estrutural de lectinas vegetais de acordo com seus sítios catalíticos.....	26
Figura 2 -	Classificação das lectinas vegetais em famílias evolutivamente relacionadas.....	27
Figura 3 -	Processamento pós traducional durante a biossíntese da lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> e de outras lectinas da subtribo <i>Diocleinae</i>	29
Figura 4 -	Estrutura de um monômero das lectinas de leguminosas.....	30
Figura 5 -	Processamento pós traducional proposto para a lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>	37
Figura 6 -	Métodos de cristalização por difusão à vapor.....	41
Figura 7 -	Representação gráfica do desvio médio quadrático (RMSD) de uma proteína (lisozima) em água.....	46
Figura 8 -	Representação gráfica da flutuação quadrática média (RMSF).....	46
Figura 9 -	Sinais mediadores do estímulo doloroso ao sistema nervoso central por nociceptores.....	51
Figura 10 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstrando o perfil da lectina nPELa purificada em coluna de agarose-manose.	62
Figura 11 -	Cristal de nPELa complexada com metil-dimanosídeo (MDM)..	63
Figura 12 -	Dados de validação da estrutura de nPELa obtidos através do wwPDB VALIDATION.....	65
Figura 13 -	Gráfico de Ramachandran da estrutura final de nPELa.....	66
Figura 14 -	Estrutura geral de um monômero de nPELa complexado com MDM.....	68
Figura 15 -	Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de PELA com as lectinas de sementes de Dalbergieae.....	70
Figura 16 -	Estrutura tridimensional de um dímero de nPELa complexado com MDM.....	71
Figura 17 -	Sítio de N-glicosilação de nPELa.....	72

Figura 18 - Sítio de ligação a metais de nPELa.....	73
Figura 19 - Representação das distâncias (Å) das ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos com o manganês (mn) e o cálcio (ca) no sítio de ligação aos metais.....	74
Figura 20 - Sítio de ligação a carboidratos de nPELa em complexação com metil-manosídeo.....	75
Figura 21 - Representação das distâncias (Å) das ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e os átomos do ligante (MDM), bem como a demonstração dos resíduos envolvidos em interações hidrofóbicas.....	76
Figura 22 - Sobreposição das estruturas de nPELa e CTL (5EYY) em complexação ao MDM.....	79
Figura 23 - Resultados das simulações de dinâmica molecular entre nPELa isolada e complexada a diferentes ligantes (MMA, MDM, M13).....	84
Figura 24 - Número de pontes de hidrogênio durante as simulações de dinâmica molecular entre a lectina e os diferentes açúcares...	85
Figura 25 - Sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) de nPELa com MMA durante a simulação de dinâmica molecular.....	86
Figura 26 - Sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) de nPELa com M13 durante a simulação de dinâmica molecular.....	87
Figura 27 - Sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) de nPELa com MDM durante a simulação de dinâmica molecular.....	88
Figura 28 - nPELa possui efeito hypernociceptivo.....	91
Figura 29 - Efeito hypernociceptivo de nPELa ocorre com participação de CRD e prostaglandinas.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Lectinas de Dalbergieae e suas especificidades.....	33
Tabela 02 - Dados de coleta de difração, refinamento e parâmetros de qualidade do cristal da lectina de <i>Platypodium elegans</i> nativa (nPELa) complexada com metil-dimanosídeo (MDM).....	67
Tabela 03 - Interações entre nPELa e metil-dimanosídeo (MDM).....	77
Tabela 04 - Escore das interações entre nPELa e diferentes glicanos obtidos por docking molecular.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AUC	Área sob a curva
AAL	Lectina de <i>Andira anthelmia</i>
ABO	Sistema de grupo sanguíneo
ACA	Lectina de <i>Amaranthus caudatus</i>
Alpha MM	α -metil-manosídeo
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BC2L-C	Lectina de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
COBEA	Sociedade Brasileira de Ciência Animais de Laboratório em
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
Coot	Crystallographic Object-Oriented Toolkit
CTL	Lectina de <i>Centrolobium tomentosum</i>
Da e kDa	Dálon e kilodálon
DlyL	Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i>
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
DrfL	Lectina de <i>Dioclea reflexa</i>
E.P.M	Erro padrão da média
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GlicNAc	N-Acetilglicosamina
GNA	Lectina de <i>Galanthus nivalis</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
Lac/Celo:	Lactose/celobiose
LAL	Lectina de <i>Lonchocarpus araripensis</i>
L-fuc	Fucose
LSL	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i>
mA	Miliampere
Man/Glic	Manose/glicose
M13	Manose- α 1,3-manose
MDM	Metil-dimanosídeo

MMA	α -metil-manosídeo
NAG	N-acetil-D-glicosamina
NeuNAc	Ácido acetilneuramínico
NPT	Número constante de pressão e temperatura
NVT	Constante de volume e temperatura
PAL	Lectina de <i>Pterocarpus angolensis</i>
PAS	Reagente ácido periódico de Schiff
PBL	Lectina de <i>Parkia biglobosa</i>
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
PELa	Lectina de <i>Platypodium elegans</i>
pH	Logarítmo negativo da concentração de hidrogênio tração de íons
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Aglutinina de amendoim
PPL-1	Lectina de <i>Parkia platycephala</i>
PPL-2	Lectina 2 de <i>Parkia platycephala</i>
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
RMSF	Flutuação quadrática média
RMSD	Desvio quadrático médio
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s.c.	Subcutânea
SBA	Aglutinina de soja
SBL	Lectina de soja
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil sulfato
SSGL	Lectina de <i>Swartzia simplex</i>
TEMED	N-N-N'-N'-tetrametilenodiamina
TxLC-I	Lectina do bulbo da tulipa
V e Vh	Volts e Volt hora
VGL	Lectina de <i>Vatairea guianensis</i>
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
W	Whatts
w:v	Peso:volume
WGA	Lectina do gérmen de trigo

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcentagem
- © Copyright
- ® Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1	Lectinas vegetais	21
3.1.1	<i>Histórico e definição de lectinas</i>	21
3.1.2	<i>Generalidades sobre lectinas vegetais</i>	22
3.1.3	<i>Classificação estrutural de lectinas</i>	24
3.2	Lectinas de leguminosas.....	28
3.2.1	<i>Lectinas da tribo Dalbergieae</i>	31
3.2.3	<i>Lectina de <i>Platypodium elegans</i></i>	37
3.3	Cristalografia de raios X.....	39
3.4	Dinâmica molecular	43
3.5	Docking molecular	47
3.6	Nocicepção.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	53
4.1	Obtenção da lectina de sementes de <i>Platypodium elegans</i>	53
4.1.1	<i>Material vegetal</i>	53
4.1.2	<i>Purificação da lectina nativa de <i>Platypodium elegans</i> (nPELa)</i>	53
4.1.3	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS</i>	53
4.2	Cristalização da lectina nativa de sementes de <i>Platypodium elegans</i>	54
4.2.1	<i>Ensaio de cristalização</i>	54
4.2.2	<i>Coleta de dados e resolução da estrutura cristalográfica</i>	55
4.3.	Ferramentas de bioinformática.....	57
4.3.1	<i>Docking molecular</i>	57
4.3.2	<i>Dinâmica molecular</i>	57
4.3.3	<i>Cálculo de energia livre (MM-PBSA)</i>	58
4.4	Ensaio de nocicepção	59
4.4.1	<i>Animais</i>	59
4.4.2	<i>Teste de pressão na pata de camundongos (von Frey filamentos)</i>	60

4.4.3	Análise Estatística	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Cristalização e resolução da estrutura tridimensional.....	62
5.1.1	Purificação da lectina	62
5.1.2	Cristalização.....	63
5.1.3	Coleta de dados e refinamento da estrutura.....	64
5.1.4	Estrutura tridimensional de nPELa em complexo com metil-dimanosídeo.....	68
5.2	Docking molecular	78
5.3	Dinâmica molecular	81
5.4	Nocicepção.....	90
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

A capacidade das células em receber e responder a sinais externos é fundamental à vida, seja em organismos unicelulares, por meio da percepção das variações nas condições do meio extracelular ou em organismos multicelulares, através da comunicação entre diferentes tipos de células (NELSON; COX, 2014). O reconhecimento proteína-carboidrato compreende uma das principais formas de comunicação intercelular, sendo importante em diversos processos biológicos (LORIS et al., 2004).

Os glicanos presentes nas superfícies celulares podem desempenhar funções como moléculas sinalizadoras, de reconhecimento e adesão (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2012). Estudos de glicobiologia têm revelado a importância de cadeias de açúcares associadas a glicoproteínas, glicolipídeos e proteoglicanos presentes em superfícies celulares, como moléculas envolvidas na biossinalização, comunicação entre células e controle de rotas intracelulares (GONÇALVES et al., 2013).

De maneira geral, os carboidratos estão envolvidos em diferentes funções biológicas além do fornecimento e armazenamento de energia, como em mecanismos de defesa, no desenvolvimento embrionário, diferenciação e crescimento celular, reconhecimento célula-célula, interação hospedeiro-patógeno, resposta imune, dentre outros (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; TAYLOR, DRICKAMER, 2003).

O potencial dos carboidratos como moléculas codificantes se deve a sua alta variabilidade estrutural e complexidade, quando comparados a nucleotídeos e aminoácidos, incluindo pontos de ramificação a partir de monômeros simples e principalmente devido a presença de vários grupos hidroxila em sua estrutura (ANDRÉ et al., 2015; GABIUS, 2008; GABIUS et al., 2011).

Um monossacarídeo simples, como a glicose, pode se ligar com o seu carbono anomérico (α ou β) a cinco hidroxilas presentes em uma segunda glicose, dando origem a até onze isômeros estruturais. Além de formar ligações em diferentes posições (1 \rightarrow 1, 2, 3, 4, 6 para hexopiranoses), os açúcares podem ter até duas configurações anôméricas (α/β), apresentar variação quanto ao tamanho do anel (piranose/furanose), bem como possíveis ramificações e substituições sítio específicas, como acetilação, fosforilação ou sulfatação (GABIUS et al., 2011), o que

permite que estas moléculas apresentem um enorme número de variações estruturais (SHARON; LIS, 1993).

As informações sinalizadas pelos diferentes tipos de carboidratos podem ser decodificadas por diversas proteínas, dentre estas, as lectinas (GONÇALVES et al., 2013). Estas moléculas desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos conhecidos, tais como comunicação, adesão e interação celular, mecanismos de defesa, resposta imunológica, fertilização e desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2012; GABIUS; GABIUS, 1997).

Amplamente distribuídas na natureza, as lectinas podem ser encontradas desde vírus a plantas, animais e humanos e compreendem um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um domínio não catalítico e seletivamente reconhecem carboidratos, se ligando de maneira reversível a açúcares livres ou glicanos presentes em glicoproteínas ou glicolípídeos, sem alterar suas estruturas (OLIVEIRA et al., 2013; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas têm sido utilizadas por décadas como modelos de estudo das bases moleculares de interação e especificidade entre proteína-carboidrato (SILVA et al., 2012). No entanto, embora estas proteínas apresentem a propriedade comum de se ligar a carboidratos, cada uma delas possui características estruturais próprias, compreendendo proteínas com diferentes potencialidades e aplicações.

Diversos estudos estruturais com lectinas têm sido conduzidos, como forma de aprofundar a compreensão das interações entre essas proteínas e seus ligantes. Das 1569 estruturas tridimensionais de lectinas atualmente solucionadas e depositadas no *Protein Data Bank* (PDB), 1520 foram obtidas por meio da cristalografia de raios X, o que demonstra a relevância desta metodologia.

A cristalografia de raios X permite a elucidação de estruturas tridimensionais de moléculas de alto peso molecular, como proteínas e ácidos nucléicos, bem como a obtenção de estruturas oligoméricas (BLUNDELL; JONHSON, 1976). Além disso, esta técnica permite não somente a obtenção de estruturas de lectinas isoladas, assim como complexadas a seus glicanos específicos, tornando-a ainda mais determinante para a compreensão da interação entre essas moléculas.

Diversas lectinas têm sido isoladas e caracterizadas de acordo com suas propriedades químicas, físico-químicas e biológicas, obtendo importância científica e

prática em diversos campos do conhecimento (POVINELI, KLFILHO, 2002), sendo utilizadas por exemplo, como ferramentas na tipagem sanguínea, diagnóstico médico, marcação histoquímica, fracionamento de glicoproteínas, biosensores, biomarcadores e *microarray* (DAN; LIU; NG, 2016; MISLOVIČOVÁ et al., 2009). Portanto, a investigação e caracterização de novas lectinas têm atraído um interesse crescente pela biotecnologia, com o objetivo de se obter novas ferramentas biotecnológicas.

A maioria das lectinas de leguminosas isoladas e estudadas são pertencentes a subfamília *Papilionoideae*. Dentre estas, diversas lectinas da tribo Dalbergieae foram purificadas e caracterizadas quanto à suas especificidades. Além de apresentar diferentes especificidades, as lectinas de Dalbergieae compreendem isoformas e glicofomas provenientes de um complexo processamento pós-traducional. Diversos trabalhos têm demonstrado a atuação dessas proteínas em diferentes atividades biológicas, o que amplia a possibilidade de uso dessas moléculas como ferramentas biotecnológicas

Tendo em vista que estudos estruturais com estas lectinas ainda são escassos, com apenas cinco exemplares com estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios X, o presente trabalho se propõe a determinar a estrutura tridimensional a partir de difração de cristais da lectina nativa extraída de sementes da espécie *Platypodium elegans* (Dalbergieae), bem como estudar a afinidade e as interações desta lectina por diferentes glicanos a partir de técnicas de bioinformática, como docking e dinâmica molecular, além de investigar o seu efeito nociceptivo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo determinar e caracterizar a estrutura tridimensional de uma lectina nociceptiva obtida de sementes de *Platypodium elegans* (PELa) através de ferramentas de cristalografia de raios X e de bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

- Cristalizar a lectina em complexo a ligantes específicos;
- Difratar os cristais obtidos e obter o conjunto dos padrões de difração;
- Resolver a estrutura cristalográfica de nPELa;
- Simular interações de docking molecular com nPELa e diferentes carboidratos;
- Realizar simulações de dinâmica molecular com nPELa e diferentes carboidratos específicos;
- Determinar o efeito nociceptivo de nPELa em ratos utilizando o método de von Frey;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Lectinas vegetais

3.1.1 Histórico e definição de lectinas

A capacidade de algumas proteínas em aglutinar eritrócitos foi primeiramente evidenciada no século XIX. Essas proteínas foram denominadas de hemaglutininas ou fitoaglutininas, por terem sido originalmente encontradas em plantas (SHARON; LIS, 2004).

Stillmark foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar experimentalmente a capacidade de uma fração proteica, obtida a partir de sementes de mamoma (*Ricinus communis* L.), em aglutinar eritrócitos e a nomeou de ricina (SINGH; SARATHI, 2012). Posteriormente, Hellin também demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica, denominada abrina, obtida a partir de extratos de sementes de *Abrus precatorius* L.. Estas proteínas foram empregadas em diversos estudos imunológicos importantes, como a transferência da imunidade humoral de mãe para filho (SHARON; LIS, 2004).

Poucos anos depois, diferenças na capacidade de aglutinação de vários extratos de sementes contra eritrócitos de diferentes animais foram relatadas por Landsteiner (1907), dentre outros pesquisadores, que tornaram evidente a vasta distribuição destas moléculas no reino vegetal.

A primeira lectina purificada, denominada de concanavalina A, foi isolada por James Sumner (1919) a partir de sementes de *Canavalia ensiformes* L. DC, utilizando a técnica de cristalização. Esta lectina foi co-purificada com a enzima urease e sua capacidade em aglutinar eritrócitos só foi demonstrada em 1936 por Sumner e Howell. Posteriormente, estes mesmos pesquisadores utilizaram a sacarose da cana-de-açúcar para demonstrar pela primeira vez a inibição da hemaglutinação causada por açúcares (SHARON; LIS, 2004).

Um dos principais marcos no estudo das lectinas foi registrado na metade do século XX, no qual foi demonstrado que algumas proteínas vegetais obtidas de sementes de plantas exibiam uma preferência por determinados tipos de hemácias do grupo sanguíneo humano do sistema ABO (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Boyd e Shapleigh (1954) foram responsáveis pela investigação da especificidade

dessas proteínas por eritrócitos específicos, definindo-as posteriormente como lectinas, palavra derivada do latim “*legere*”, que significa escolher ou selecionar (SHARON; LIS, 2004; SINGH; SARATHI, 2012).

Um segundo marco na história das lectinas ocorreu em 1960, quando Peter C. Nowell demonstrou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* L. (PHA) possuía atividade mitogênica sobre linfócitos. Até este momento, acreditava-se que os linfócitos eram células incapazes de se dividirem ou diferenciarem em outros tipos de células. Ainda na década de 60, Joseph Aub demonstrou que a aglutinina de germen de trigo (WGA) apresentava habilidade em aglutinar preferencialmente células malignas (SHARON; LIS, 2004).

Em meados da década de 70, diversas lectinas já haviam sido relatadas nos diferentes organismos, com apenas algumas destas proteínas de fato purificadas através de técnicas convencionais, que incluíam a cristalização induzida por sal, a precipitação com etanol, além de cromatografias de troca iônica e gel filtração (SHARON; LIS, 2004). O posterior surgimento da cromatografia de afinidade por Irwin J. Goldstein e Bipin B. L. Agrawal (1967) possibilitou um aumento exponencial no número de lectinas isoladas em um curto espaço de tempo (SHARON, LIS, 2004; SINGH; SARATHI, 2012), assim como a elucidação das funções e especificidades dessas proteínas, bem como sua definição.

A primeira definição de lectinas foi proposta por Goldstein e colaboradores (1980), que as definiu como proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune capazes de se ligarem a carboidratos e aglutinarem células e/ou precipitar polissacarídeos ou glicoconjugados. No entanto, a definição mais aceita atualmente foi apresentada por PEUMANS e VAN DAMME (1995), que define as lectinas como proteínas de origem não-imune, capazes de aglutinar células e glicoconjugados, incluindo proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico e se ligam de maneira reversível e específica a açúcares livres ou glicanos presentes em glicoproteínas ou glicolipídeos, sem alterar suas estruturas.

3.1.2 Generalidades sobre lectinas vegetais

O avanço nos estudos bioquímicos de lectinas vegetais foi acentuado nas últimas décadas, com novas lectinas com propriedades interessantes sendo isoladas e caracterizadas, suas sequências primárias e estruturas tridimensionais

estabelecidas, além de lectinas recombinantes e mutantes produzidas, como forma de aumentar a compreensão da função dessas moléculas (GOLDSTEIN, 2002), bem como suas possíveis aplicações.

Durante muito tempo, as pesquisas com lectinas vegetais têm focado na purificação e caracterização de lectinas presentes em sementes e tecidos vegetativos de armazenamento, devido principalmente a sua quantidade elevada (LANNON; VAN DAMME, 2010). Cerca de 1 a 10% do conteúdo total de proteínas de extratos de sementes maduras pode corresponder a lectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Uma vez que a maioria das lectinas vegetais foram isoladas a partir desses tecidos, têm-se especulado que a principal função destas moléculas seria a de atuar como proteínas de reserva (KOMATH; KAVITHA; SWAMY, 2006).

No entanto, embora predominantemente encontrada em sementes, as lectinas podem ser encontradas em diversos tecidos vegetais, como folhas, frutos, raízes e tubérculos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; POVINELI, KLFILHO, 2002; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011), o que amplia a especulação dos possíveis papéis fisiológicos desempenhados por essas moléculas.

Muitas funções têm sido propostas para as lectinas vegetais, tais como o transporte e armazenamento de carboidratos, alongação da parede celular e regulação do crescimento, reconhecimento celular, proteção contra patógenos e insetos, dentre outras (PUSZTAI, 1991; POVINELI, KLFILHO, 2002).

Estudos têm demonstrado o envolvimento de lectinas vegetais na simbiose entre leguminosas e bactérias nitrificantes do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, por meio da adesão destes microorganismos as raízes da planta mediante a interação da lectina com glicoconjugados presentes na parede celular bacteriana (VAN EIJDEN et al., 1995; TEIXEIRA et al., 2012).

As lectinas vegetais também podem promover a proteção da planta contra patógenos como fungos e bactérias, bem como contra herbivoria e ataque de insetos. Esta proteção ocorre principalmente devido a capacidade dessas proteínas de interagir com glicanos presentes na superfície celular destes organismos ou receptores celulares, impedindo o seu desenvolvimento.

As lectinas são incapazes de se ligar aos glicoconjugados presentes nas membranas dos fungos ou penetrar em seus citoplasmas, devido a parede celular presente nesses organismos (YAN et al., 2015). No entanto, essas moléculas podem atuar indiretamente por meio da ligação aos carboidratos presentes na superfície

das paredes celulares dos fungos (WONG et al., 2010), como a quitina, afetando o seu crescimento.

Várias lectinas vegetais possuem atividade antifúngica, compreendendo dois grupos principais: um grupo de merolectinas que possui um simples domínio de ligação a quitina e um segundo grupo formado por quimerolectinas compostas por um domínio de quitinase de classe I, além do domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) (WONG et al., 2010). Como exemplo, têm-se a lectina ligante a quitina obtida de raízes da espécie *Urtica dioica* L., que impede o crescimento de fungos das espécies *Botrytis cinerea*, *Trickoderma hamatum* e *Pkycomyces blakesleeanus* (BROEKAERT et al., 1989).

Outro importante papel das lectinas está associado a capacidade dessas proteínas em atuar contra insetos e herbívoros, através da interação com glicanos presentes no trato digestivo e exoesqueleto desses animais, influenciando em sua sobrevivência e crescimento (POVINELI, KLFILHO, 2002; INGALE; HIVRALE, 2013). As lectinas ligantes à quitina do arroz (*Oryza sativa* L.) e da urtiga (*Urtica dioica* L.) inibem o crescimento larvário do caruncho do feijão (*Callosobruchus maculatus*). Muitas lectinas obtidas de diferentes fontes demonstram essa propriedade contra uma grande variedade de pestes que afetam culturas vegetais como arroz, trigo, tabaco e tomate (INGALE; HIVRALE, 2013).

O conhecimento das diferentes propriedades das lectinas vegetais permitiu a aplicação destas moléculas em uma variedade de atividades biológicas, que incluem desde atividade antiviral, inseticida, antimicrobiana, anti-tumoral, atividade pró e anti-inflamatória, tipagem sanguínea, estimulação mitogênica, dentre outras, sendo utilizadas como valiosos instrumentos em pesquisas nas áreas da agricultura, médicas e biológicas (POVINELI, KLFILHO, 2002; INGALE; HIVRALE, 2013).

3.1.3 Classificação estrutural de lectinas

A ampliação do conhecimento das sequências e estruturas dessas proteínas têm revelado a existência de lectinas evolutivamente relacionadas ou não, que podem ser reunidas em diferentes grupos ou famílias. De maneira mais abrangente, as lectinas podem ser classificadas de acordo com sua especificidade a carboidratos em dois grupos principais: aquelas que são capazes de reconhecer

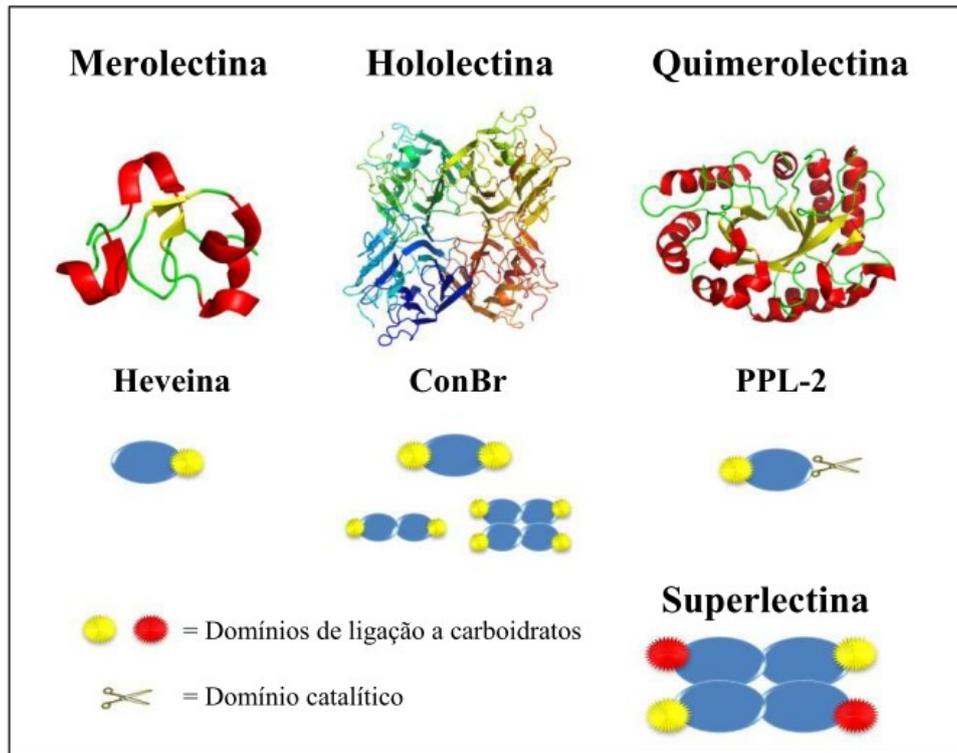
exclusivamente monossacarídeos, categorizadas em seis grupos, como as ligantes a (i) glicose/manose (Man/Glc), (ii) N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), (iii) L-fucose (L-Fuc), (iv) galactose (Gal), (v) N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) e (vi) ácido N-acetilneuramínico ou ácido siálico (NeuNAc) (SHARMA et al., 1998; KUMAR et al., 2012). E um segundo tipo de lectinas que reconhece apenas oligossacarídeos específicos (SHARON; LIS, 2003; KUMAR et al., 2012), como por exemplo glicanos do tipo oligomanose presentes em glicoproteínas, como na glicoproteína gp120 do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (BOTOS et al., 2002).

Uma segunda classificação utilizada também agrupa essas moléculas em dois tipos: as lectinas do tipo I são categorizadas de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas de suas sequências, como por exemplo as dependentes de cálcio (tipo C) e as de leguminosas (tipo L). As do tipo II compreendem proteínas semelhantes a lectina, com relação evolutiva ausente, como as anexinas e pentraxinas (KUMAR et al., 2012).

Independetemente de sua classificação, a especificidade das lectinas é determinada a partir de uma pequena sequência de aminoácidos presente em suas cadeias polipeptídicas, denominada de domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD). A habilidade de algumas lectinas em aglutinar eritrócitos ou de interagir com carboidratos complexos resulta da presença de dois ou mais CRDs em sua estrutura (KUMAR et al., 2012). Este domínio permite que a ligação dessas moléculas com carboidratos simples ou complexos ocorra de maneira reversível e não covalente (SINGH; SARATHI, 2012).

O vasto conhecimento de numerosas lectinas vegetais permitiu a categorização destas proteínas em quatro grupos principais de acordo com seus CRDs em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (FIGURA 1) (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). As merolectinas apresentam um único CRD que reconhece açúcares simples e não são capazes de causar hemaglutinação ou precipitar gliconjugados, como por exemplo, a proteína heveína presente no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis* Willd. Ex A. Juss), ligante à quitina (VAN PARJIS et al., 1991).

Figura 1 – Classificação estrutural de lectinas vegetais de acordo com seus sítios catalíticos. Representação esquemática de merolectinas (Heveína PDB: 1Q9B), hololectinas (ConBr PDB: 3JU9), quimerolectinas (PPL-2 PDB: 2GJS) e superlectinas.



Fonte: PEREIRA-JÚNIOR, 2011.

As hololectinas apresentam dois ou mais domínios de ligação a carboidratos idênticos ou parecidos e são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Essas lectinas são conhecidas como aglutininas verdadeiras, sendo encontradas principalmente em lectinas obtidas de sementes de leguminosas, como as pertencentes aos gêneros *Canavalia* e *Dioclea*.

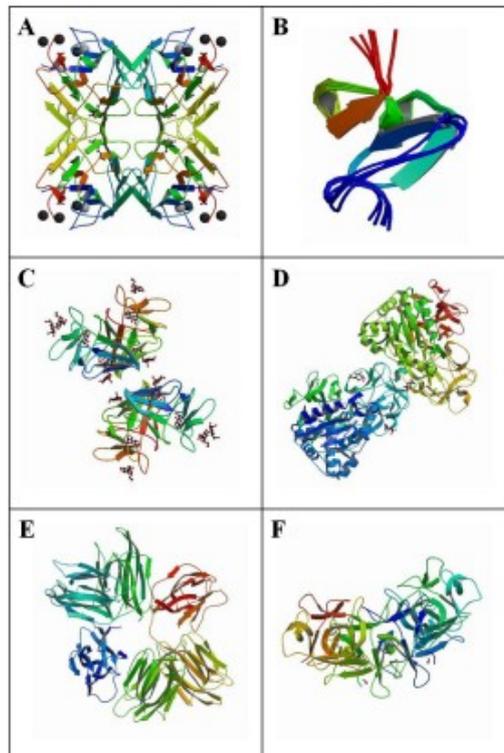
As quimerolectinas são compostas por pelo menos um domínio de reconhecimento a carboidratos e outro domínio com atividade biológica distinta, e sua capacidade de hemaglutinação depende do número de CRDs encontrados em sua sequência. Como exemplo, a lectina obtida a partir de sementes de *Parkia platycephala* Benth possui um sítio catalítico com atividade endoquitinásica, além do domínio de ligação a carboidratos (CAVADA et al., 2006).

Por fim, as superlectinas são compostas por dois domínios ou mais de reconhecimento à carboidratos, capazes de reconhecer açúcares estrutural e funcionalmente diferentes. São exemplo de superlectinas, a lectina do bulbo de

tulipa (TxLC1), que reconhece manose e N-acetil-D-galactosamina (VAN DAMME et al., 1996) e a lectina BC2L-C obtida a partir de *Burkholderia cenocepacia*, que se liga de maneira independente a gliconjugados de manose/heptose e epítomos de eritrócitos humanos fucosilados (ŠULÁK et al., 2011).

Van Damme e colaboradores (1998) também propuseram um segundo sistema de classificação para as lectinas vegetais, baseado em estudos de semelhanças estruturais e evolutivas, que as subdivide em sete principais famílias: 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 à jacalina; lectinas de floema de Curcubitaceae e lectinas de Amaranthaceae (FIGURA 2).

Figura 2 – Classificação das lectinas vegetais em famílias evolutivamente relacionadas. A: Lectinas de leguminosas (ConBr, código PDB 3JU9); B- Lectina ligante à quitina composta por domínios heveínicos (Heveína, código PDB 1HEV); C- Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose (GNA, código PDB 1NIV); D- RIP do tipo II (Abrina, código PDB 2ZR1), E- Lectinas relacionadas à jacalina (PPL-1, código PDB 1ZGR), F- Lectina da família da Amaranantina (ACA, código PDB 1JLY).



Fonte: ALMEIDA, 2016.

Como exemplos de lectinas incluídas nessa classificação, têm-se: a lectina Concanavalina A (ConA) de leguminosa (*Canavalia ensiformis*), que se liga a

resíduos de glicose/manose; a aglutinina de soja (*Glycine max*) (SBA), também conhecida como lectina de soja (SBL), que se liga a N-acetil-D-galactosamina/galactose; a lectina de tojo (*Ulex europaeus*) que se liga a L-fucose; e a aglutinina de gérmen de trigo com domínio heveína (WGA) que se liga a N-acetil-D-glicosamina (DE HOFF; BRILL; HIRSCH, 2009).

3.2 Lectinas de leguminosas

As leguminosas (Fabaceae) compreendem a terceira maior família de angiospermas, formada por cerca de 751 gêneros e 19.500 espécies, dividida em três subfamílias denominadas de Papilionoideae (Faboideae), Caesalpinoideae e Mimosoideae (BRUNEAU et al., 2013). Dentre estas, a subfamília Papilionoideae é a mais diversa, formada por aproximadamente 13.800 espécies, 478 gêneros e 28 tribos, distribuídas amplamente pelo mundo, como florestas tropicais, savanas, florestas sazonalmente secas e regiões temperadas (WOJCIECHOWSKI, 2013). Esta subfamília inclui representantes herbáceos, arbustivos, lianescentes ou arbóreos, com a presença de flores papilionadas e diferentes tipos de frutos (legume, lomento, sâmara ou dupra) e sementes (SÃO-MATEUS et al., 2013).

As espécies pertencentes a este grupo se destacam também devido a sua importância econômica para a agricultura e indústria alimentícia, como por exemplo, a soja (*Glycine max* (L.) Merr.), o feijão culinário (*Phaseolus* L. spp. e *Vicia faba* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), lentilha (*Lens culinaris* Medik.), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), ervilha (*Pisum sativum* L.), bem como culturas forrageiras como alfafa (*Medicago sativa* L.), trevo (*Trifolium* L.) e leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) (BRUNEAU et al., 2013; CARDOSO et al., 2012; 2013).

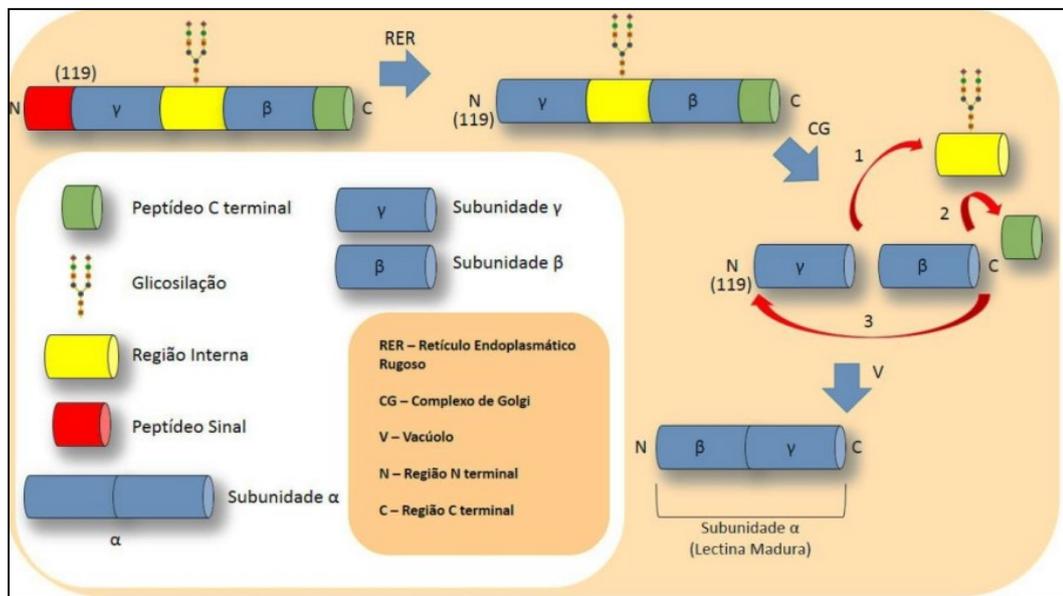
Dentre as lectinas vegetais, as lectinas de leguminosas compreendem a família de proteínas mais bem estudadas até o presente momento, com o maior número de proteínas já isoladas (NASCIMENTO et al., 2012), devido principalmente a abundância e importância econômica dessas espécies. Estas lectinas compartilham um alto grau de similaridade estrutural com distintas especificidades a carboidratos (TEIXEIRA et al., 2012).

A maioria das lectinas de leguminosas são sintetizadas com um peptídeo sinal e direcionadas para a via de secreção para os compartimentos vacuolar e extracelular (LANNON; VAN DAMME, 2010). A síntese destas proteínas,

especialmente as lectinas da subtribo Diocleinae, inicia no retículo endoplasmático rugoso na forma de pré-pro-lectina, compreendendo uma proteína precursora composta por um peptídeo sinal (20 a 30 resíduos de aminoácidos) localizado na região N-terminal, duas cadeias polipeptídicas (β e γ), uma cadeia intermediária que será glicosilada ainda no retículo endoplasmático e um peptídeo sinal na região C-terminal. Essa glicosilação corresponde a uma unidade oligomanose N-ligada a um pentadecapeptídeo interno, que é excisado durante a maturação.

Após a clivagem do peptídeo sinal N-terminal, a pré-proteína passa por um novo processamento proteolítico no complexo de Golgi, em que uma endopeptidase remove o peptídeo sinal na região C-terminal e da cadeia intermediária, tornando-a deglicosilada e ativa. As cadeias β e γ livres são então religadas em uma posição invertida em relação ao precursor inicial, formando a cadeia α madura, processo conhecido como permutação circular (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; SHARON; LIS, 2007) (FIGURA 3).

Figura 3 – Processamento pós traducional durante a biossíntese da lectina de *Canavalia ensiformis* e de outras lectinas da subtribo *Diocleinae*.



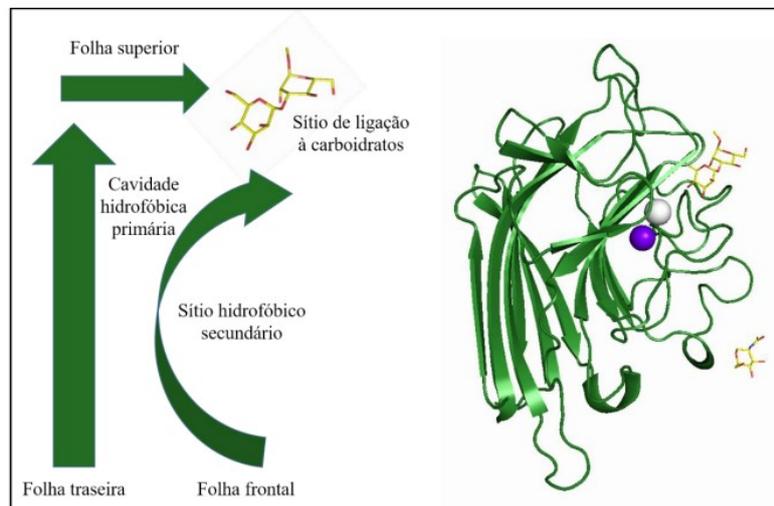
Fonte: SANTIAGO et al., 2014.

As lectinas de leguminosas são geralmente compostas por subunidades, idênticas ou não, que variam de 2 a 4 monômeros, com massa molecular em torno de 25 a 30 kDa, compostas por uma cadeia polipeptídica simples com cerca de 250 aminoácidos, cuja união é estabelecida por interações não covalentes como pontes

de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (ALMEIDA, 2016). Cada subunidade apresenta um único sítio de ligação a carboidratos e pequenas alterações em suas sequências de aminoácidos podem dar a origem a modos variados de associação quaternária, embora as suas estruturas terciárias sejam praticamente idênticas (SINHA et al., 2007).

As estruturas dos monômeros de diferentes lectinas vegetais são extremamente similares, constituídos principalmente de folhas β (SINHA et al., 2007). Essa estrutura foi primeiramente demonstrada em lectinas de Concanavalina A, em que cada monômero é formado por duas folhas β antiparalelas, uma com seis fitas β (atrás) e outra com sete fitas β (frente), conectadas por uma outra folha de cinco fitas β (superior), gerando uma estrutura conhecida como β -sanduíche ou motivo “*jellyroll*”, também referido como “lectin fold” (SRINIVAS et al., 1996; HAMELRYCK, 1998) (FIGURA 4).

Figura 4 – Estrutura de um monômero das lectinas de leguminosas. À esquerda têm-se a estrutura esquemática de um monômero, composto por duas folhas principais antiparalelas, uma com seis fitas β (folha traseira) e outra com sete fitas β (folha frontal), conectadas por uma outra folha de cinco fitas β (folha superior), gerando uma estrutura conhecida como β -sanduíche ou motivo “*jellyroll*”. À direita, demonstra-se os dois sítios hidrofóbicos que estabilizam a estrutura da lectina de *Centrolobium tomentosum* (CTL) complexada com metil-dimansosídeo (PDB 5EYX).



Fonte: ALMEIDA, 2016.

Em sua maioria, as lectinas de leguminosas são formadas por dímeros canônicos ou por tetrâmeros formados pela união de dímeros, com os tetrâmeros apresentando duas interfaces semelhantes as interfaces dos dímeros. Algumas

lectinas de leguminosas exibem uma oligomerização dependente de pH (CALVETE et al., 1999; NAGANO et al., 2008).

A dimerização inicial ocorre pela associação lado a lado das seis β folhas traseiras para formar uma folha contígua de 12 fitas (SINHA et al., 2007). Aminoácidos como aspartato e asparagina são altamente conservados nas folhas β , apresentando importante papel no reconhecimento a carboidratos e participando nas ligações de hidrogênio com o açúcar (INGALE; HIVRALE, 2013).

O sítio de ligação à carboidratos está localizado no lado côncavo do β -sanduíche, compreendendo resíduos de aminoácidos altamente conservados, formando vários “*loops*” com diferentes graus de variabilidade (SHARMA; SUROLIA, 1997). As conformações destes *loops* são determinadas pela presença de íons de metais, como o cálcio e o manganês, ambos coordenados por cadeias laterais de pelo menos quatro aminoácidos e duas moléculas de água (BOUCKAERT et al., 2000; LORIS et al., 1998).

O reconhecimento das lectinas vegetais por carboidratos é reversível e a remoção dos íons metálicos resulta em importantes mudanças conformacionais, até mesmo a perda da capacidade da lectina de se ligar a carboidratos. A ligação dos açúcares aos CRDs de lectinas ocorre portanto através de ligações de hidrogênio, ligações coordenadas por metais, ligação de van der Waals, além de interações hidrofóbicas (KOMATH, 2006).

Além do sítio de ligação a carboidratos, as lectinas de leguminosas possuem uma região estrutural hidrofóbica altamente conservada, que permite a interação dessas proteínas com outros tipos de moléculas, tais como auxina, fitohormônios (KOMATH, 2006), adenina (HAMELRYCK et al., 1998) e ácido α -aminobutírico (DELATORRE et al., 2007), o que reforça o envolvimento dessas proteínas em diferentes papéis biológicos importantes.

3.2.1 Lectinas da tribo Dalbergieae

A maioria das lectinas de leguminosas já isoladas e estudadas são membros da subfamília Papilionoideae (MANN et al., 2001). Esta subfamília apresentou uma recente reorganização em diversos clados de acordo com estudos de filogenia molecular, sendo a tribo Dalbergieae correspondente a um clado monofilético denominado de Dalbergióide, no qual foram incluídos alguns gêneros,

como *Arachis*, *Adesmia* e *Aeschynomene* (BRUNEAU et al., 2013; CARDOSO et al., 2013; LAVIN et al., 2001).

As espécies pertencentes ao clado Dalbergióide apresentam como principal característica morfológica a presença de nódulos radiculares do tipo aeschynomenóides (BRUNEAU et al., 2013), que são ausentes em espécies do gênero *Andira* e *Vatairea*, permitindo a reorganização destas em clados externos, como sugerido por CARDOSO e colaboradores (2013). Entretanto, a relação entre estes gêneros ainda permanece obscura em estudos de filogenia molecular (BRUNEAU et al., 2013), levando diversos autores a considerarem os gêneros *Andira* e *Vatairea* ainda como pertencentes a tribo Dalbergieae. Diversas lectinas de exemplares da tribo Dalbergieae foram purificadas e caracterizadas quanto à suas especificidades, bem como quanto a suas possíveis atividades biológicas, exemplificadas na tabela a seguir (TABELA 01).

Os resultados até então obtidos para a tribo Dalbergieae sugerem a existência de pelo menos dois grupos de lectinas, que podem ser categorizados de acordo com suas diferentes especificidades. Em sua maioria, as lectinas da tribo Dalbergieae apresentam especificidade pelos açúcares glicose/manose e são constituídas por uma única cadeia polipeptídica, contendo um sítio único de glicosilação e um peptídeo sinal, sem evidente existência de processamento pós-traducional. Já o segundo grupo é formado por lectinas que compartilham características como a especificidade por galactose e seus derivados, como as do gênero *Vatairea*, proteínas estas constituídas por pelo menos três cadeias polipeptídicas (α , β e γ) e dois sítios de glicosilação (VASCONCELOS et al, 2015).

Tabela 01 – Lectinas de Dalbergieae e suas especificidades. A tabela demonstra uma lista de espécies pertencentes a tribo Dalbergieae que já tiveram suas lectinas isoladas e caracterizadas quanto à sua especificidade. Os açúcares listados foram abreviados em: Man/Glc (glicose/manose); Gal (galactose); Alpha MM (metil α - manosídeo); Lac (lactose); Celo (celobiose); GlcNAc (N-acetilglicosamina); GalNAc (N-acetilgalactosamina).

Espécie	Especificidade	Referência
<i>Andira fraxinifolia</i> (Benth.)	Man/Glc	RANGEL <i>et al.</i> , 2009
<i>Andira surinamensis</i> (Bondt.)	Man/Glc	NOBRE, 2012
<i>Andira anthelmia</i> (Vell.) Benth	Man/Glc	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2015
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Gal	LOTAN <i>et al.</i> , 1975
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Alpha MM	SINGH; DAS, 1994
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Lac/ Celo	SINGH; DAS, 1994
<i>Lonchocarpus araripensis</i>	GlcNAc	PIRES <i>et al.</i> , 2008
<i>Lonchocarpus capassa</i>	Gal/GalNAc	JOUBERT <i>et al.</i> , 1986
<i>Lonchocarpus sericeus</i>	GlcNAc	ALENCAR <i>et al.</i> , 1999
<i>Centrolobium microchaete</i> (Mart. ex Benth.)	Man/Glc	VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2015
<i>Centrolobium tomentosum</i> (Guillem.ex. Benth)	Man/Glc	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2016
<i>Machaerium acutifolium</i> Benth	GlcNAc	BEZERRA <i>et al.</i> , 2003
<i>Platymiscium floribundum</i> Vogel	Man/GlcNAc	PEREIRA-JÚNIOR <i>et al.</i> , 2012
<i>Platypodium elegans</i> Vogel	Man/Glc	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2012
<i>Pterocarpus angolensis</i>	Man/Glc	LORIS <i>et al.</i> , 2003
<i>Pterocarpus rotundifolius</i>	Man/Glc	MARONDEDZE <i>et al.</i> , 2004
<i>Vatairea guianensis</i> Aubl.	Gal/GalNAc	SILVA <i>et al.</i> , 2012
<i>Vatairea macrocarpa</i> (Benth.) Ducke	Gal/GalNAc	CAVADA <i>et al.</i> , 1998

Além das lectinas do gênero *Vatairea*, uma lectina obtida da espécie *Arachis hypogaea* (LOTAN *et al.*, 1995) pode também ser inserida nesse grupo, embora apresente características diferenciadas, como a presença de apenas duas cadeias polipeptídicas (α e β) e um processamento pós-traducional semelhante a lectina convanavalina A, como demonstrado por YOUNG e colaboradores (1991).

É importante destacar a possível existência de um terceiro grupo ainda não bem caracterizado, que inclui lectinas que apresentam especificidade por N-

acetilglicosamina (GlcNAc), como demonstrado para a lectina de *Machaerium acutifolium*, *Lonchocarpus araripensis*, *Lonchocarpus sericeus* e *Platysmicium floribundum*.

As lectinas de *Arachis hypogaea* foram uma das primeiras relatadas na literatura para a tribo Dalbergieae. Nesta espécie é possível isolar mais de um tipo de lectina, dependendo do tecido/órgão escolhido, sendo uma lectina específica a galactose e seus derivados (PNA) encontrada nas sementes (LOTAN et al., 1995) e duas lectinas específicas respectivamente a metil α -manosídeo (SL-I) e lactose/celobiose (SL-II) encontradas no caule (SINGH; DAS, 1994).

A PNA é a lectina mais bem estudada e de maior apelo biotecnológico dentre as lectinas isoladas de *Arachis*. Esta proteína corresponde a um homotetrâmero de 110 kDa, formado por 4 subunidades de aproximadamente 27-28 kDa, sendo cada uma constituída de um sítio de ligação a carboidratos específico para derivados de D-galactose, sejam estes α ou β galactosídeos (LOTAN et al., 1975). No entanto, ensaios de inibição com a lectina PNA nativa, bem como com o seu precursor expresso em *Escherichia coli*, demonstraram a maior afinidade desta lectina pelo dissacarídeo Gal(β 1-3)GalNAc, principal constituinte dos antígenos T e Tn (LOTAN et al., 1975; RODRIGUEZ-ARANGO et al., 1992).

A especificidade de PNA pelo antígeno T também pôde ser evidenciada através da obtenção da estrutura tridimensional desta lectina em complexação com o referido antígeno (RAVISHANKAR et al., 1997). Os antígenos T/Tn estão principalmente presentes na superfície de células tumorais malignas e tímócitos imaturos (SHARMA; VIJAYAN; SUROLIA, 1996), o que torna a PNA uma potencial ferramenta utilizada como marcador para a histoquímica do câncer (SOUSA et al., 2015), como demonstrado pela sua atual comercialização em complexação com diferentes corantes por diferentes empresas (GeneTex[®]; Sigma-Aldrich[®]; Vector Laboratories[®]).

Dentre as lectinas do gênero *Vatairea*, a lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) é a mais bem estudada, correspondendo a uma proteína ligante a galactose/N-Acetilgalactosamina, formada por 4 subunidades, sendo duas maiores de 34 e 32 kDa e duas menores de 22 e 13 kDa, que formam um tetrâmero em solução independente do pH (CALVETE et al., 1998; RAMOS et al., 2000).

Diversos trabalhos têm demonstrado os diferentes efeitos biológicos causados por VML, que incluem a indução de infiltração de leucócitos em edema de

pata (ALENCAR et al., 2007), liberação de mediadores quimiotáticos por macrófagos (ALENCAR et al., 2007), aumento da resistência vascular renal, filtração glomerular e fluxo urinário (MARTINS et al., 2005) e migração de neutrófilos *in vivo* (ALENCAR et al., 2007). Além disso, VML se destaca devido a sua notável capacidade de reconhecer antígenos Tn (DAM et al., 2007), demonstrada através da resolução de sua estrutura tridimensional em complexação com este ligante (SOUSA et al., 2015).

Do mesmo modo que a VML, a lectina de *Vatairea guianensis* (VGL) apresenta especificidade a galactose/N-Acetil-galactosamina, sendo diferenciada de acordo com seu perfil eletroforético em uma proteína composta por uma dupla banda de 30-32 kDa, denominada de cadeia α , e duas bandas menores de 18 e 15 kDa respectivamente correspondentes a cadeia β e γ (SILVA et al., 2012).

Estudos com a VGL demonstraram a capacidade desta lectina em induzir a inflamação de maneira aguda em ensaios de edema de pata e peritonite, associada à elevação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (DOMINGOS, 2014), sua potencial atividade neuroprotetora frente a neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro* em hipocampus de ratos (JACQUES, 2012), bem como seu efeito relaxante *in vitro* em aortas endotelizadas de ratos, envolvendo a participação do óxido nítrico e do CRD da lectina (SILVA et al., 2012).

Lectinas da tribo Dalbergieae ligantes a N-acetilglicosamina também tiveram suas atividades biológicas demonstradas, como a lectina de *Lonchocarpus sericeus* (LSL), que desencadeou uma diminuição na resposta inflamatória e na colonização bacteriana em um quadro de peritonite infecciosa em ratos (ALENCAR et al., 2005) e diminuição da migração leucocitária e hipernocicepção mecânica (NAPIMOGA et al., 2007). Uma outra lectina deste gênero ligante a GlcNAc, obtida de sementes de *Lonchocarpus araripensis* (LAL), demonstrou possuir ação antinociceptiva em camundongos (AMORIM, 2013) e antiinflamatória em modelos de edema de pata e peritonite em ratos (PIRES et al., 2016).

Outras lectinas da tribo ligantes a manose também foram caracterizadas e tiveram suas atividades biológicas demonstradas, como a lectina de *Centrolobium tomentosum* (CTL), que apresentou um efeito inflamatório agudo em modelos de edema de pata em ratos (ALMEIDA et al., 2016) e a lectina de *Andira anthelmia* (AAL), que demonstrou um efeito analgésico envolvendo o domínio de reconhecimento a carboidratos (NASCIMENTO et al., 2015).

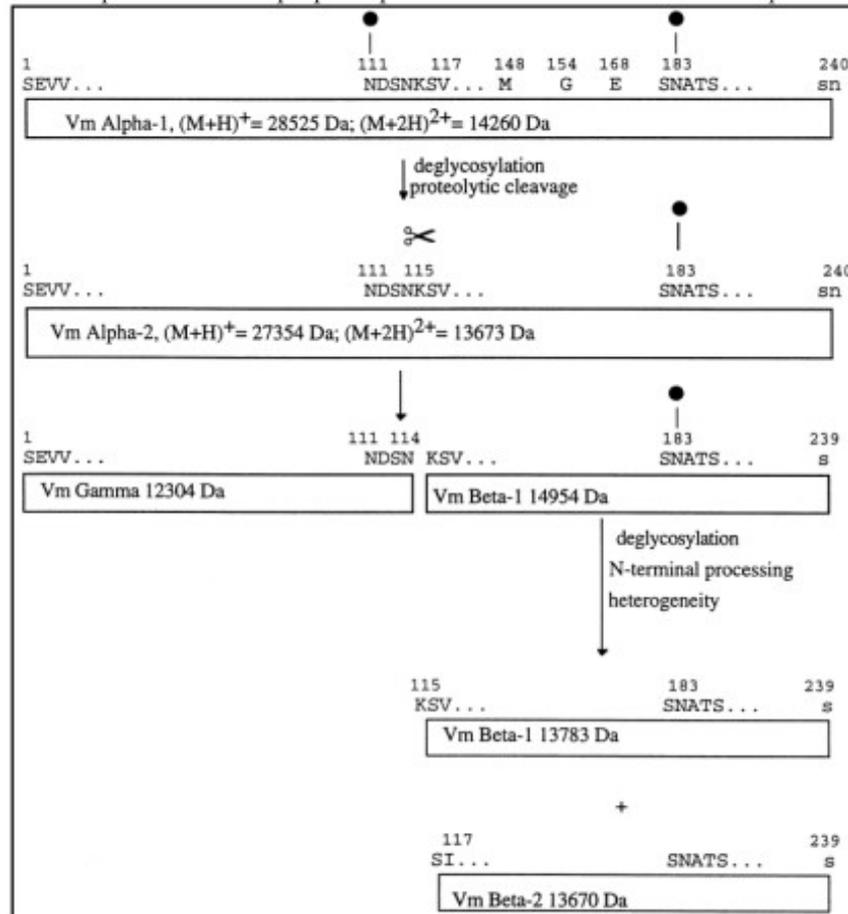
Apenas algumas lectinas da tribo Dalbergieae tiveram suas estruturas tridimensionais determinadas: como exemplos de lectinas ligantes a manose, a lectina de *Pterocarpus angolensis* (PAL) (LORIS et al., 2003, 2004); *Platypodium elegans* recombinante (PELa) (BENEVIDES et al., 2012), *Centrolobium tomentosum* (CTL) (ALMEIDA et al., 2016) e a lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) (SOUSA et al., 2015). Estas proteínas compartilham características que são conservadas entre as demais lectinas de leguminosas, embora pertençam a uma tribo considerada como uma das mais primitivas dentre as Papilionoideae.

O conhecimento do perfil estrutural dessas proteínas permitiu a proposição de um modelo de processamento pós-traducional peculiar, que difere da permutação circular demonstrada para a subtribo Diocleinae. Este modelo foi proposto por Calvete e colaboradores (1998), utilizando como exemplo a lectina de *Vatairea macrocarpa*, no qual foi demonstrado o envolvimento de uma aspariginil-endopeptidase, responsável pela geração de cadeias polipeptídicas que não sofrem religação, mas que interagem entre si e são co-purificadas por cromatografia de afinidade.

O processamento da lectina VML inicia com a cadeia α sofrendo uma clivagem entre os resíduos Asn₁₁₄ e Lys₁₁₅, clivagem esta diretamente dependente da deglicosilação do resíduo Asn₁₁₁. A partir dessa clivagem são gerados os fragmentos γ (N-terminal deglicosilado) e β (C-terminal glicosilado), com a possível formação de isoformas a partir do fragmento β , que pode ainda sofrer uma deglicosilação no resíduo Asn₁₈₃ seguido de um processamento N e C-terminal. Esses fragmentos são reunidos por ligações não covalentes, gerando uma cadeia α praticamente idêntica a não processada (FIGURA 5). Este tipo de processamento ocorre de maneira semelhante em lectinas de uma tribo relacionada, denominada de Sophoreae.

Portanto, estudos estruturais com lectinas da subtribo Dalbergieae são ainda necessários, para permitir uma melhor compreensão desse complexo processamento, bem como das possíveis implicações na especificidade e função das diferentes isoformas e glicofomas dessas lectinas.

Figura 5 – Processamento pós traducional proposto para a lectina de *Vatairea macrocarpa*. Os pontos de glicosilação e clivagem são simbolizados respectivamente pelo círculo preenchido e tesoura.



Fonte: CALVETE et al., 1998.

3.2.3 Lectina de *Platypodium elegans*

O gênero *Platypodium*, compreende duas espécies de árvores leguminosas de grande porte, sendo a *Platypodium elegans* Vogel conhecida popularmente como uruvalheira, amendoim do mato ou faveiro. Esta espécie foi registrada em todas as regiões do Brasil, sendo nativa do cerrado e de áreas de transição entre cerrado e floresta estacional, encontradas em terrenos bem drenados (LORENZI, 1998; FLORA DO BRASIL 2020).

Trabalhos anteriores realizados por BENEVIDES (2008) demonstraram a existência de uma lectina específica a manose/glicose em frações de sementes de *Platypodium elegans*, bem como seu potencial fungicida e termiticida. No entanto, a existência de diferentes isoformas nesta fração lectínica desencadeava dificuldades na caracterização funcional e estrutural de uma lectina para esta espécie.

Para tanto, métodos alternativos de biologia molecular foram utilizados por BENEVIDES (2012), como forma de produzir uma lectina recombinante em sistemas heterólogos. A estratégia adotada neste trabalho incluiu o isolamento do gene a partir de RNAs mensageiros presentes em sementes de *Platypodium elegans*, utilizando iniciadores desenhados a partir da sequência primária de uma lectina de uma espécie relacionada, a PAL de *Pterocarpus angolensis*. O gene isolado de PELa foi ligado a um vetor do tipo pET e a transformação em cepas bacterianas de expressão realizada, como forma de produzir esta proteína, seguida de seu isolamento e caracterização.

A lectina de *Platypodium elegans* recombinante (rPELa), assim como outras lectinas similares, demonstrou especificidade aos açúcares glicose/manose, no entanto diferentemente das demais, esta lectina apresentou afinidade também por glicanos assimétricos demonstrado por métodos de *glycan array* e cristalografia de raio X. A sequência de aminoácidos de rPELa foi deduzida a partir do cDNA obtido, sendo composta por 261 aminoácidos e dois sítios preditos de N-glicosilação (Asn-7 e Asn-127).

A lectina nativa de *Platypodium elegans* (PELa) foi posteriormente purificada e caracterizada por ARARIPE e colaboradores (2017), compreendendo uma lectina formada por 3 duplas bandas de 30, 19 e 10 kDa respectivamente, com a notável presença de glicosilação. PELa demonstrou especificidade pelos açúcares glicose/manose, N-acetilglicosamina, α -metil-D-manopiranosídeo e glicopiranosídeo, além da glicoproteína fetuína. Neste trabalho também foram demonstradas as condições ótimas para a manutenção da atividade de PELa, que inclui temperaturas de até no máximo 60 °C, bem como uma faixa de pH em torno de 6-10, com a necessária presença de cátions divalentes como Ca^{2+} e Mn^{2+} .

Assim como para outras lectinas da tribo, o efeito de PELa sob a inflamação foi avaliado, no qual foi demonstrado que tanto a proteína nativa como a recombinante podem induzir a um quadro proinflamatório, com a ativação de macrófagos e liberação de mediadores inflamatórios. No entanto, a lectina nativa não apresentou o mesmo efeito anti-edematogênico demonstrado pela rPELa, que pode ser justificado pela presença de resíduos glicosilados na proteína nativa.

A presença de glicosilação em lectinas pode causar modificações na estrutura dos seus domínios de reconhecimento a carboidratos, assim influenciando na ação da mesma, bem como na sua capacidade de ativar a resposta imune em

ratos de maneira diferenciada. Portanto, estudos adicionais com a lectina nativa de *Platypodium elegans* são necessários, como forma de compreender a influência da glicosilação sobre a estrutura e função desta lectina. Para tanto, técnicas para a obtenção de modelos tridimensionais de proteínas podem ser utilizadas, como a cristalografia de raios X.

3.3 Cristalografia de raios X

A análise de estruturas cristalinas utilizando a difração de raios X é um dos métodos disponíveis mais avançados para obter informações estruturais de alta resolução de macromoléculas biológicas (ACHARYA; LLOYD, 2005). Esta técnica permite a determinação espacial de todos os átomos que constituem uma macromolécula, servindo como uma ferramenta fundamental no estudo estrutural de proteínas (VERLI, 2014).

A cristalização de proteínas surgiu na metade do século XIX, como uma técnica inicialmente desenvolvida para o isolamento e determinação do grau de pureza de proteínas, bem como para estudos das propriedades catalíticas de enzimas. Apenas em 1958, com o trabalho de Max Perutz e John Kendrew, pesquisadores estes que receberam o prêmio Nobel em Química em 1962 pela determinação da estrutura tridimensional da mioglobina, a cristalografia passou a ser reconhecida como uma ferramenta que tem como objetivo principal a determinação de estruturas tridimensionais de proteínas e seus complexos (MCPHERSON; GAVIRA, 2004).

Atualmente, esta técnica é bastante robusta e composta por métodos experimentais e computacionais bem desenvolvidos, que englobam o uso de metodologias avançadas, como a expressão e purificação de proteínas, sistemas automatizados e poderosas fontes de radiação síncrotron, que permitiram a determinação de estruturas de alto rendimento (ACHARYA; LLOYD, 2005).

A primeira e mais importante etapa da cristalização consiste na obtenção da proteína de interesse em quantidade e pureza suficientes para a realização dos ensaios. O teor de pureza recomendado para cristalografia de proteínas é superior a 95%. Portanto, a escolha adequada da fonte de proteínas (natural ou heteróloga) e das estratégias de purificação são determinantes.

O isolamento de proteínas a partir de suas fontes naturais ainda é bastante utilizado, embora dificuldades como a baixa concentração da proteína de interesse nas células ou tecidos de escolha, além da presença de isoformas ou proteínas com modificações pós-traducionais que podem ser encontradas e implicam no aumento da heterogeneidade da amostra e conseqüentemente na não formação ou formação de cristais de baixa qualidade (VERLI, 2014).

Dessa forma, a maioria das proteínas cristalizadas na atualidade são provenientes de fontes recombinantes, sendo obtidas a partir de diferentes sistemas de expressão (MCPHERSON; GAVIRA, 2004). Para tanto, o fragmento de DNA responsável pela codificação da proteína em estudo deve ser conhecido, adicionado a vetores de expressão e clonado em organismos hospedeiros que cedem suas maquinarias celulares para a produção da proteína de interesse, incluindo bactérias, fungos, plantas, células de insetos e de mamíferos. Além destes, sistemas de expressão independentes de células hospedeiras (*cell-free*) também podem ser utilizados (VERLI, 2014).

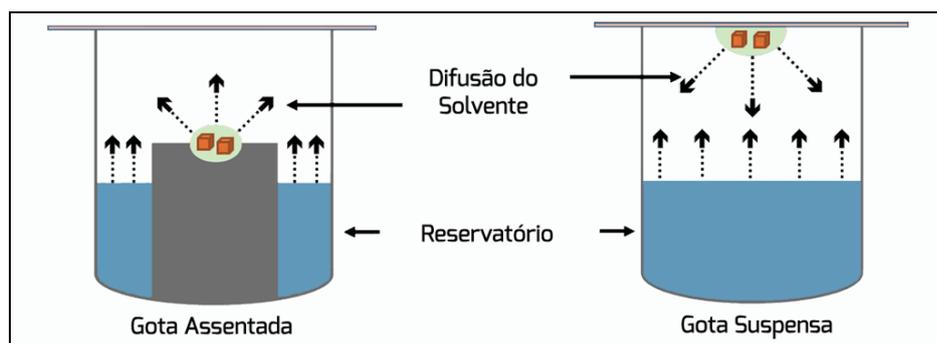
Após a obtenção da proteína pura, inicia-se a determinação das condições ideais de cristalização. Estas condições são complexas e multifatoriais, e englobam diferentes parâmetros físicos e químicos, como por exemplo, temperatura, pressão, tempo, pH, agentes precipitantes, força iônica, grau de supersaturação e pureza da amostra (VERLI, 2014). Assim sendo, cada proteína cristaliza sob condições específicas, que dependem diretamente das propriedades da mesma, como a distribuição de cargas na superfície, presença de regiões flexíveis e distribuição de conformações.

Basicamente, os métodos de cristalização envolvem a mistura da solução pura de proteínas com diferentes soluções de cristalização contendo agentes tamponantes, aditivos e agentes precipitantes variados. O uso de agentes precipitantes, associado a um aumento na concentração da solução protéica através da remoção do solvente promove o deslocamento das moléculas para um estado de supersaturação, no qual pode se desenvolver uma fase amorfa ou cristalina. Neste momento, a solução de proteína alcança a zona de nucleação, onde podem se formar núcleos correspondentes a agregados ordenados de proteína, e com a diminuição da solubilidade da proteína, os núcleos atingem a zona metaestável, onde ocorrerá o crescimento do cristal (DUCRUIX;GIEGÉ, 1992; VERLI, 2014).

Várias técnicas podem ser utilizadas para a cristalização de macromoléculas, sendo o método de difusão a vapor mais utilizado para proteínas (HAMPEL et al., 1968). Este método baseia-se no equilíbrio entre duas soluções através da fase de vapor em um sistema fechado (VERLI, 2014). Sendo assim, primeiramente uma gota contendo a proteína a ser cristalizada é adicionada a uma solução que contenha os componentes ideais para a cristalização. Esta mesma gota é equilibrada contra um reservatório contendo a solução ideal de cristalização, a uma concentração mais alta que na gota. Desta forma, o equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos), até que a pressão de vapor na gota seja igual à pressão de vapor no reservatório.

Uma vez alcançado o equilíbrio, com a troca do vapor de água da gota para o reservatório, o volume da gota diminui e há um aumento da concentração de todos os constituintes da gota de cristalização. As principais metodologias de cristalização por difusão à vapor envolvem o uso de gotas suspensas, gotas sentadas e em menor grau, gotas sanduíche (FIGURA 6).

Figura 6 – Métodos de cristalização por difusão à vapor. Uma gota (representada em azul claro) contendo a proteína a ser cristalizada é adicionada a uma solução ideal de cristalização. No caso da gota sentada ou assentada, esta é posicionada em suporte presente no reservatório, enquanto que na gota suspensa, esta é mantida na parte superior do poço. Estas gotas são equilibradas contra um reservatório contendo a solução do agente de cristalização a uma concentração mais alta que na gota. O equilíbrio prossegue por meio da difusão das espécies voláteis (setas pontilhadas), até que a pressão de vapor na gota se igual à pressão de vapor no reservatório e a partir de então os cristais sejam formados (representados em laranja).



Fonte: VERLI, 2014.

Com o avanço do conhecimento das condições ideais de cristalização, kits comerciais foram desenvolvidos, contendo numerosas condições com diferentes tipos de agentes precipitantes em concentrações variadas, tampões, pHs e sais (CARTER; CARTER, 1979). Uma vez determinada as condições iniciais, é possível

otimizar as condições de cristalização para a obtenção de melhores cristais, quanto ao tamanho e forma (WOOH et al., 2003; JANCARIK; KIM, 1991). Os cristais ideais apresentam um alto grau de ordenação interna, sendo compostos por repetições translacionais de moléculas ou átomos em todas as direções.

Uma vez obtidos, os cristais serão submetidos à difração de raios X e a densidade eletrônica de cada átomo do cristal que interagir com a radiação será dispersada, gerando um padrão de difração característico, que consiste em uma série de reflexões com diferentes intensidades (ACHARYA; LLOYD, 2005). 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.

O padrão de difração de proteínas é tridimensional e reflete tanto a simetria dos arranjos cristalinos quanto a organização da proteína na célula unitária, que é definida como a unidade de repetição que constitui o cristal (VERLI, 2014). A extensão do padrão de difração a partir de um cristal está diretamente correlacionada com seu grau de ordem interna e quanto maior a resolução à qual se estende, mais estruturalmente uniformes são as moléculas no cristal e mais precisa é a sua organização periódica (MCPHERSON; GAVIRA, 2004).

Para obter o padrão de difração, o cristal é girado em torno de um eixo perpendicular ao feixe de raios X e os raios difratados são coletados em um detector capaz de gravar um grande número de pontos (*spots*), com a geração de várias imagens, sendo cada uma delas correspondente a rotação de 0,2-1° grau. As imagens obtidas são posteriormente indexadas e a determinação do grupo espacial, dimensões e orientação da célula unitária e mosaicidade estimados, através de diferentes ferramentas de bioinformática contidas em pacotes como o CCP4[®]. Esse passo é importante para o planejamento de uma coleta de dados eficiente, que minimiza o tempo e otimiza os resultados obtidos (SMYTH; MARTIN, 2000; WLODAWER et al., 2013).

Algumas informações angulares são inevitavelmente perdidas durante a difração, caracterizando o chamado “problema da fase” (LI; HE; ZHANG, 2015; WLODAWER et al., 2013). Para tanto, métodos como a substituição molecular podem ser utilizados como forma de resolver o problema da fase, utilizando o princípio de que macromoléculas com alta homologia sequencial apresentem a tendência de se enovelar de forma similar, servindo assim como modelo para a

obtenção de um conjunto de fases a ser refinado (ABERGEL, 2013; WLODAWER et al., 2013).

Uma vez obtido o modelo preliminar, este deve ser refinado quanto as posições atômicas, de modo a encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto para a estrutura da molécula e a sua estrutural real. Todo o processamento de refinamento é realizado com análises de correlação do R_{factor} , que é um fator de correlação entre o modelo atual e o real (HOLTON et al., 1992; MURSHDOV et al., 2011).

Estruturas com resolução menor que 2,0 Å são consideradas resolvidas quanto o valor do R_{factor} atingir valores menores ou igual a 20%. Outro fator também analisado, denominado de R_{free} , corresponde a uma pequena porcentagem das reflexões que são excluídas do refinamento e utilizadas como parâmetro de comparação com o R_{factor} , e não pode ultrapassar 5% (KARPLUS; DIEDERICHS, 2015; MORRIS et al., 2014).

Por fim, os modelos obtidos são validados quanto aos parâmetros estruturais, como distâncias ideais entre as ligações, ângulos de ligação, rotâmeros, diagrama de Ramachandran, dentre outros. Após esta etapa, os modelos finais são depositados e disponibilizados nos bancos de dados, como o *Protein Data Bank* (PDB).

A resolução de estruturas tridimensionais tem gerado um grande impacto em pesquisas na biologia, bioquímica e biotecnologia, possibilitando o conhecimento evolutivo e funcional dessas moléculas, bem como fornecendo os conhecimentos essenciais para aplicações destas por exemplo, em desenhos racionais de fármacos, na criação e descoberta de novas drogas e produtos farmacêuticos (MCPHERSON; GAVIRA, 2004).

3.4 Dinâmica molecular

Os estudos de cristalografia podem demonstrar de forma convincente o importante papel que a flexibilidade de proteínas desempenha na interação com seus ligantes, entretanto, isto pode requerer um alto custo e um trabalho extenso, que podem ser substituídos por técnicas computacionais que possam prever os movimentos das proteínas (DURRANT; MCCAMMON, 2011). Uma das principais técnicas computacionais estabelecidas na atualidade para o estudo de fármacos e

proteínas compreende a simulação de sistemas moleculares através da dinâmica molecular (HARVEY; DE FABRITIIS, 2012; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

As simulações por dinâmica foram inicialmente aplicadas na década de 80, em associação ao surgimento emergente de computadores potentes, para o estudo da movimentação de proteínas e outros biopolímeros (SALSBURY, 2010). Desde então, esta técnica tem-se desenvolvido, possibilitando a análise do dobramento de proteínas na escala de microsegundos, bem como estudos de predição de interações entre receptor ligante, dentre outros (PRONK et al., 2013).

Por definição, a dinâmica molecular é um procedimento de simulação que consiste na computação da movimentação dos átomos em uma molécula ou de átomos individuais em sólidos, líquidos e gases, de acordo com as leis de movimento de Newton (VERLI, 2014). Esta técnica permite a visualização do comportamento molecular de uma determinada molécula, englobando propriedades como conteúdo de estrutura secundária, orientação das cadeias laterais, conformação de alças, bem como a energia de interação entre diferentes moléculas, em função do tempo e da solução biológica a qual ela se encontra (VERLI, 2014; KARPLUS; MCCAMMON, 2002).

Em resumo, as simulações são uma maneira poderosa para fornecer informações em resolução atômica sobre a forma como as moléculas de uma proteína se movem e interagem com seus ambientes (VENDRUSCOLO; DOBSON, 2011). Atualmente, diversos programas estão disponíveis para a realização de simulações de dinâmica molecular, bem como diferentes campos de força. Cada campo de força corresponde a uma função matemática que objetiva reproduzir aspectos do comportamento molecular, que por sua vez são calibrados (ou seja, parametrizadas) para reproduzir o comportamento dos compostos de interesse.

No caso de sistemas biomoleculares, os campos de força comumente utilizados são o AMBER, CHARMM e GROMOS, que embora diferentes na forma de parametrização, geram resultados similares (SALSBURY, 2010; DURRANT; MCCAMMON, 2011). No entanto, o GROMACS compreende um dos pacotes de programas mais utilizados, pois permite alcançar a maior eficiência de simulação possível para pequenos e médios clusters que estão disponíveis em laboratórios de pesquisa (PRONK et al., 2013).

Uma vez escolhido o campo de força, é preciso determinar a estrutura que será utilizada durante as simulações, seja esta oriunda de modelagens teóricas,

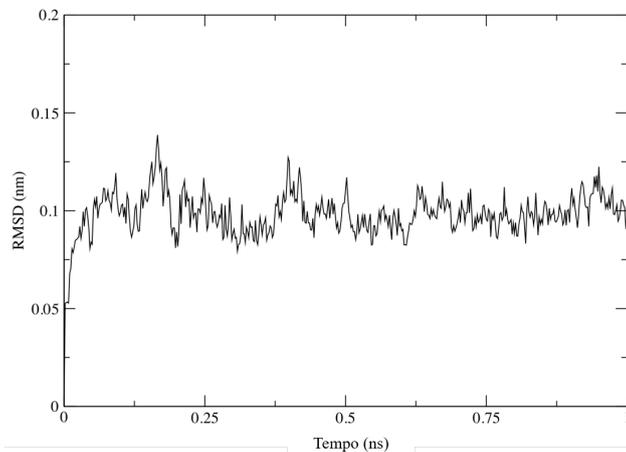
experimentos de cristalografia de raios X ou de ressonância magnética nuclear, bem como o solvente a ser utilizado (SALSBURY, 2010). Em todo caso, as interações entre a estrutura e o solvente utilizados podem promover um aumento considerável nas repulsões eletrostáticas entre os átomos, sendo necessária a realização de uma minimização de energia do sistema, para que haja uma diminuição da energia potencial do mesmo e a conformação da molécula permaneça estável durante toda a simulação (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Outros aspectos como as condições periódicas de contorno, a equilíbrio, amostragem, o tempo de integração e o cálculo de interações não ligadas devem ser considerados nas simulações de dinâmica (VERLI, 2014). Basicamente as condições periódicas de contorno equivalem a formas geométricas (geralmente cúbicas) que mantém os átomos do sistema inseridos, sendo replicados em todas as direções. Assim, o número total de átomos na caixa central e no sistema como um todo é conservado. Já o período de equilíbrio, equivale ao tempo gasto para o alcance do equilíbrio termodinâmico pelo sistema, sendo este variável e dependente do sistema em estudo (VERLI, 2014; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

Após o alcance do equilíbrio, é possível então gerar as trajetórias da dinâmica molecular e calcular as diferentes propriedades para o sistema de interesse (SALSBURY, 2010). O comportamento de uma proteína ao longo de uma simulação pode ser analisado através de diferentes ferramentas, que incluem o RMSD, o RMSF, o raio de giro, distâncias entre átomos ou grupamentos e a evolução do conteúdo de estrutura secundária em função do tempo (VERLI, 2014).

O RMSD (desvio quadrático médio) é o principal indicador das modificações de uma proteína ao longo da simulação, que calcula a distância média entre os átomos de proteínas sobrepostas. Este pode ser calculado para todos os átomos que compõem uma proteína, no entanto, geralmente se utiliza na avaliação das modificações dos esqueletos peptídicos. Como demonstrado na FIGURA 7, os valores de RMSD tendem a aumentar durante a simulação até o alcance do equilíbrio.

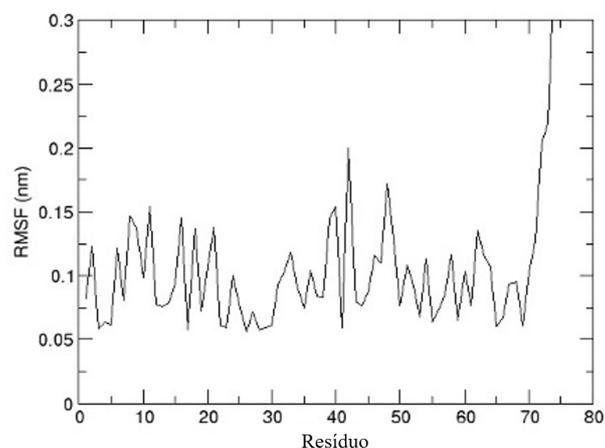
Figura 7 – Representação gráfica do desvio médio quadrático (RMSD) de uma proteína (lisozima) em água. O desvio quadrático médio (nm) é demonstrado em função do tempo (ns) e expressa as modificações sofridas pela proteína ao longo do tempo de simulação em relação à estrutura de partida.



Fonte: Adaptado de http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/lysozyme/Images/rmsd_0_1.jpg

Em contrapartida, o RMSF (flutuação quadrática média) calcula a variação da posição dos átomos ou de resíduos de aminoácidos individualmente durante a simulação, indicando a flexibilidade do sistema. Portanto, é esperado que valores maiores sejam observados para regiões de alças e menores para hélices (FIGURA 8).

Figura 8 – Representação gráfica da flutuação quadrática média (RMSF). A flutuação quadrática média (nm) é demonstrada em função do tempo (ns) e expressa as variações de posição para cada um dos resíduos de aminoácidos que compõem a proteína em estudo.



Fonte: Adaptado de http://ringo.ams.sunysb.edu/images/1/1b/Ubq_rmsf_plot.jpg.

Além dos cálculos citados, outras análises podem ser realizadas, como as interações das proteínas em complexo com seus ligantes, através do acompanhamento do número de ligações de pontes de hidrogênio entre estes ao longo da simulação. As simulações por dinâmica molecular assim permitem a investigação da estrutura e função de biomoléculas e seus complexos, ao incorporar flexibilidade a ambos, como ligantes e receptores, permitindo a compreensão da interação entre eles (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). Além disso, a redução nos custos e aumento do processamento computacional, bem como o melhoramento dos programas e campos de força disponíveis torna possível a aproximação das análises de dinâmica por experimentos de bancada convencionais (VERLI, 2014).

3.5 Docking molecular

Uma segunda ferramenta computacional que têm recebido grande destaque em pesquisas associadas à saúde e a biotecnologia, como também na descoberta de fármacos, é o atracamento molecular ou docking molecular. O docking molecular pode ser definido como um método computacional que realiza a predição da conformação e orientação de uma molécula ligante dentro do sítio alvo de um receptor (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006; KITCHEN et al., 2004; YURIEV; HOLIEN; RAMSLAND, 2015).

De maneira geral, as moléculas receptoras utilizadas nas simulações por docking correspondem a proteínas isoladas ou oligômeros protéicos e os ligantes a pequenas moléculas ou outras proteínas (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). Embora as proteínas sejam os receptores mais comuns, moléculas como o DNA podem ser moduladas por fármacos e também utilizadas como alvos de interesse (VERLI, 2014).

Os algoritmos do docking e as funções de pontuação são capazes de gerar estruturas complexas de receptor-ligante (YURIEV; HOLIEN; RAMSLAND, 2015), possibilitando assim a predição do modo de ligação entre estes, além de também estimar a afinidade entre um ligante e um receptor alvo (ALMEIDA, 2016; VERLI, 2014). O grau de afinidade e de especificidade do ligante pela proteína são definidos pelas características físico-químicas e interações intermoleculares existentes entre eles, que incluem as ligações de hidrogênio, as interações provenientes do efeito hidrofóbico, interações de van der Waals, interações

eletrostáticas e ligações covalentes que podem ser formadas durante o processo de interação receptor-ligante (VERLI, 2014).

Em simulações de docking rígido, o algoritmo de pesquisa explora diferentes posições para o ligante no local ativo do receptor, utilizando os graus de liberdade de translação e de rotação (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). O alto desempenho dos algoritmos, associado ao aumento na potência dos computadores possibilitou o ancoramento de milhares de ligantes de maneira simultânea em uma simulação por docking, o que o tornou extremamente útil para a indústria farmacêutica, por permitir um *screening* de moléculas alvo de maneira efetiva e com baixo custo (MENG et al., 2011; TAYLOR; JEWSBURY; ESSEX, 2002).

Atualmente existem diversos programas de docking molecular disponíveis, de forma gratuita ou paga, que se diferenciam principalmente pelo método de busca e pela função de avaliação de afinidade empregada (VERLI, 2014). Independente do programa escolhido, é preciso primeiramente obter as coordenadas das estruturas tridimensionais tanto do receptor quanto do ligante.

Para tanto, as estruturas das proteínas podem ser obtidas através de técnicas de predição, como a modelagem molecular por homologia ou *threading* (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006), ou diretamente de bancos de dados como o *Protein Data Bank* (PDB). Este banco é atualmente a maior fonte de estruturas de proteínas resolvidas por metodologias experimentais como a cristalografia de raios X e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Assim como as proteínas, as estruturas dos ligantes podem ser obtidos em diferentes bancos de dados, como o PUBCHEM.

Uma vez que se obtenha as estruturas dos receptores, é importante o reconhecimento de seus sítios ativos, para o correto direcionamento da molécula ligante e um docking eficiente. De maneira ideal, os algoritmos de amostragem devem ser capazes de reproduzir interações entre o receptor-ligante de maneira aproximada ao modo de ligação encontrado em condições experimentais (MENG et al., 2011).

Durante a execução do docking, os receptores e ligantes são encaixados e os complexos formados são analisados por meio de cálculos estatísticos e funções de pontuação, sendo estas pontuações mais altas entre os complexos que mais se aproximam das condições experimentais. O objetivo da função de pontuação é delinear as posições corretas das incorretas em um tempo de computação razoável (MENG et al., 2011). Portanto, o docking molecular pode ser utilizado como uma

ferramenta eficiente na compreensão da afinidade entre lectinas e diferentes açúcares, bem como na exploração de novos ligantes que possam ser reconhecidos por estas proteínas.

Diversos trabalhos envolvendo lectinas e docking molecular são encontrados na literatura, como o realizado por POL-FACHIN (2017), que utilizou o docking juntamente com simulações de dinâmica molecular para determinar a especificidade, localização do sítio de reconhecimento a carboidratos e conformação das lectinas glicosilada e não glicosilada da espécie *Crataeva tapia* (CrataBL).

NGUYEN e colaboradores (2016) demonstraram que a porção lectínica de um recetor vegetal denominado DORN1 possuía capacidade de se ligar ao ATP com alta afinidade. Além destes, a predição de afinidade entre lectinas e carboidratos foi realizada em diversos trabalhos, como por exemplo, para a lectina SSSL de *Swartzia simplex* (MARANHÃO et al., 2017), DrfL de *Dioclea reflexa* (PINTO-JUNIOR et al., 2017a), DlyL de *Dioclea lasiophylla* (PINTO-JUNIOR et al., 2017b) e PBL de *Parkia biglobosa* e PPL de *Parkia platycephala* (BARI et al., 2016).

3.6 Nocicepção

A dor é uma experiência complexa, que envolve não somente a transdução de estímulos ambientais nocivos, assim como também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001). Segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como uma experiência emocional, com sensação desagradável, associada à uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termo de tal lesão, que provoca reações protetoras motoras que geram comportamento evasivo (MELZACK; LOESER, 1999; ALMEIDA; ROINZENBLATT; TUFIK, 2004; ZIMMERMAN, 2001).

Ao contrário de outros sinais sensoriais, a dor não é a expressão direta de um único sinal sensorial, mas sim o produto de um processamento elaborado pelo cérebro de uma variedade de sinais neurais (VERMA; SHEIKH; AHMED, 2014). Estes sinais desencadeiam comportamentos protetores e estímulos sensoriais que chegam ao cérebro e assim podem ser percebidos como dolorosos (TRACEY, 2017).

Os mecanismos moleculares pelos quais os neurônios sensoriais primários detectam estímulos que produzem a dor corresponde a um processo

conhecido como nocicepção. A nocicepção é um mecanismo sensorial que permite aos animais perceber e evitar estímulos prejudiciais aos tecidos, sendo fundamental para a sobrevivência (TRACEY, 2017). A dor e a nocicepção têm pelo menos três funções definidas, que incluem: 1 - avisar o indivíduo da existência de uma lesão tecidual real; 2 - avisar o indivíduo da probabilidade de que um dano tecidual esteja prestes a ocorrer, através da percepção do estímulo potencialmente danoso e 3 - advertir um grupo social do perigo, assim que este existir, para qualquer um de seus membros (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

No entanto, a nocicepção e a dor compreendem diferentes processos, sendo o primeiro referente a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos, enquanto que a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (MELZACK; LOESER, 1999; ALMEIDA; ROINZENBLATT; TUFIK, 2004).

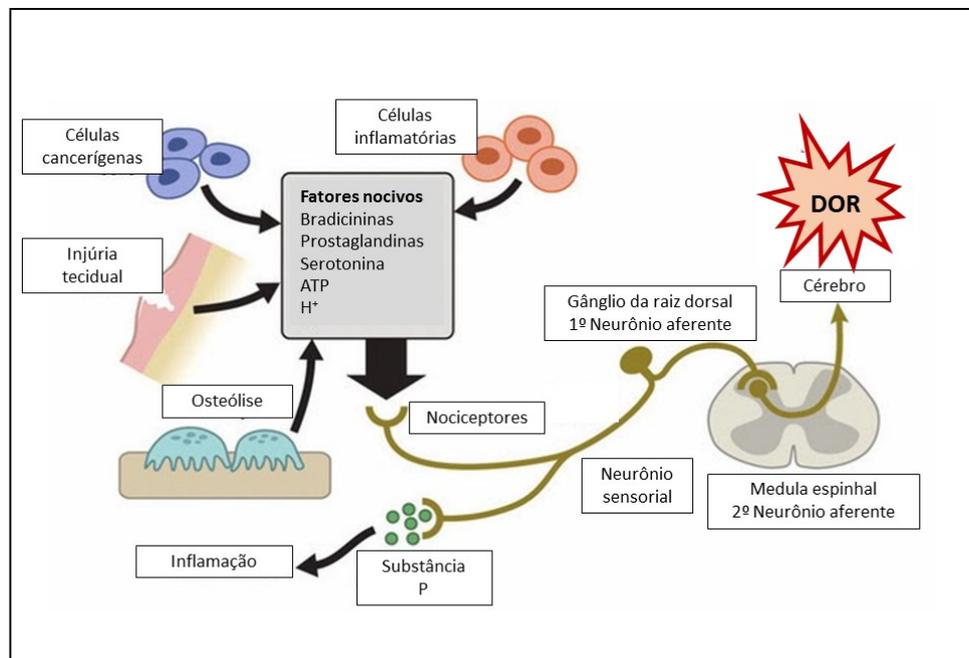
O mecanismo da nocicepção é baseado em neurônios especializados, chamados nociceptores, que detectam e respondem a formas prejudiciais de estímulos presentes no ambiente, sendo excitados por calor, pressão intensa ou substâncias químicas irritantes (JULIUS; BASBAUM, 2001; TRACEY, 2017). Estes nociceptores podem ser classificados de acordo com a sua velocidade de condução (rápida ou lenta), pelo diâmetro, quantidade de mielinização e tipos de estímulos que eles respondem, podendo apresentar um caráter polimodal (respondem a mais de um estímulo) ou especializado em suas respostas (TRACEY, 2017).

Os nociceptores correspondem à terminações nervosas livres e representam à parte mais distal dos neurônios aferentes de primeira ordem, que constituem fibras do tipo A δ e C. Os terminais nociceptivos de fibras C na pele têm vesículas contendo neuropeptídeos tais como a substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, que são libertados após a estimulação para causar efeitos fisiológicos no tecido circundante (PIRES, 2011). Existem suposições de que os nociceptores A δ e C medeiam a "primeira" e "segunda" dor respectivamente, ou seja, a dor rápida e aguda, e a dor tardia (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A propagação da dor da região da lesão até o sistema nervoso central é iniciada com a ativação de receptores sensíveis ao estímulos nocivos, que podem ser encontrados na pele, membranas, tecidos conjuntivos de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos sanguíneos

(JULIUS; BASBAUM, 2001; ALMEIDA, ROIZENBLATT; TUFIK, 2004). Após uma lesão, os nociceptores podem tornar-se sensibilizados pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como prostaglandinas, bradicinina, substância P, ATP extracelular e prótons (TRACEY, 2017). Outros mediadores como a colecistocinina, encefalinas, glutamato e óxido nítrico também estão envolvidos nesses processos (MILLAN, 1999; VANEGAS, 2004; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Vários desses mediadores podem ser produzidos pelo sistema vascular, células imunes, tecido lesionado ou nervos sensoriais (FIGURA 9).

Figura 9 – Sinais mediadores do estímulo doloroso ao sistema nervoso central por nociceptores.



Fonte: Adaptado de <http://1.bp.blogspot.com/-eAvLgQ2f8no/UvaLdEHYgKI/AAAAAAAAA2-0/Ppqqb7TtETE/s1600/pain.jpg>

Os tipos de mediadores envolvidos também podem ser utilizados para categorizar a dor, podendo esta 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). Além disso, alguns distúrbios relacionados a sensação dolorosa podem existir, como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo nócico), alodínia (dor em resposta a um estímulo mecânico ou térmico,

normalmente não doloroso) e a hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON, 1999).

Por fim, a dor pode ser classificada também de acordo com o seu tempo de duração em aguda ou crônica, sendo a primeira caracterizada por ser pontualmente delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico, enquanto que a dor crônica persiste por um longo período e está associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (ALMEIDA et al., 2004).

A dor compreende um sintoma de muitos distúrbios clínicos e tem uma implicação individual e subjetiva, que pode levar a amplificação ou diminuição da sensação dolorosa (MELZACK; LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA et al., 2004). Diversos fármacos são utilizados na atualidade, em sua maioria, como forma de promover uma redução na percepção da dor, efeito este conhecido como antinociceptivo, processo extremamente importante em diversos quadros patológicos. Já o efeito contrário, conhecido por hipernocicepção, ocorre com a indução de um aumento na percepção da dor e aumento da sensibilidade, que também pode ser útil no tratamento de pacientes que apresentam uma considerável perda na percepção dos estímulos dolorosos.

Diversas lectinas apresentam atividades nociceptivas já descritas na literatura, como lectinas de algas marinhas (NEVES et al., 2007; BITENCOURT et al., 2008, FIGUEIREDO et al., 2010) e lectinas de leguminosas, sendo estas últimas categorizadas em lectinas tanto hipernociceptivas (NAPIMOGA et al., 2007; BARI, 2016; SILVA et al., 2013) como antinociceptivas (PINTO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2009; NUNES et al., 2009).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da lectina de sementes de *Platypodium elegans*

4.1.1 Material vegetal

Sementes maduras de *Platypodium elegans* Vog foram adquiridas comercialmente da Reserva de Reflorestamento **Flora Tietê**, São Paulo e armazenadas a temperatura ambiente.

4.1.2 Purificação da lectina nativa de *Platypodium elegans* (nPELa)

A lectina de PELa foi purificada de acordo com os protocolos realizados por BENEVIDES (2006) e ARARIPE e colaboradores (2017). Para tanto, as sementes foram previamente maceradas até a produção de um pó fino e tratadas com n-hexano para delipidação. Em seguida, a farinha obtida foi submetida a uma extração em NaCl 0,15 M (1:10) sob contínua agitação e a suspensão centrifugada a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado, filtrado e aplicado em um matriz de agarose-manose (Sigma-Aldrich) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M. A fração de proteínas não retidas (PI) foi removida com NaCl 0,15 M e a fração retida (PII), correspondente a proteína de interesse, foi eluída com uma solução de D-manose 0,1 M em NaCl 0,15 M. As frações foram coletadas e monitoradas por absorvância a 280 nm. A lectina purificada foi dialisada 8 vezes contra água ultrapura, liofilizada e sua pureza monitorada por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE).

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

A lectina purificada foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, de acordo com o protocolo descrito por (LAEMMLI, 1970). Para tanto, nPELa foi solubilizada a uma concentração final de 4 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 contendo SDS 1%, glicerol 10% e azul de Bromofenol 0,02%, seguida de aquecimento a 100 °C durante 5 minutos.

Os géis de separação (*main gel*) e empilhamento (*stacking gel*) foram preparados em uma concentração final de 12,5% e 4%, respectivamente, sendo o primeiro solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 8,8, contendo SDS 20%, TEMED P.A. e persulfato de amônio (100 mg/ mL), e o segundo solubilizado em tampão Tris-HCl 0,1 mol/L pH 6,8, contendo também SDS, TEMED e persulfato nas mesmas concentrações.

A corrida de eletroforese foi realizada em um sistema Mini-Protean II mini-gel (Bio-Rad) com uma variação de voltagem de até 150 V e amperagem constante a 25 mA, durante 60 minutos. O tampão de corrida utilizado continha Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 1%, pH 8,8. Ao final da corrida, o gel de separação foi fixado em uma solução contendo isopropanol 25% e ácido acético 10%.

Para a visualização das proteínas, o gel foi então corado com o Azul Brilhante de Comassie R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção de 1:3,5:8 (v/v/v). Posteriormente, o corante excedente foi removido com água destilada para análise das proteínas reveladas no gel. Além da amostra de interesse, foi utilizado um marcador de peso molecular de longo alcance (Promega), formado por proteínas constituídas de 10 kDa a 225 kDa.

4.2 Cristalização da lectina nativa de sementes de *Platypodium elegans*

4.2.1 Ensaio de cristalização

Inicialmente foi realizado um ensaio de pré-cristalização segundo o manual do fabricante (PCT - Pre-Crystallization Test, Hampton Research). O kit PCT é composto por 4 reagentes pré-formulados, utilizados para avaliar a concentração de sal e precipitante adequados, bem como a concentração ideal da proteína a ser cristalizada. Este ensaio tem como principal objetivo prevenir a formação de precipitados amorfos ou gotas claras. Para tanto, diferentes concentrações da proteína foram utilizadas, sendo a concentração ideal definida e utilizada nos ensaios posteriores de cristalização.

Para o ensaio de cristalização, a lectina liofilizada foi primeiramente solubilizada em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,6 na concentração final de 12,5 mg/mL. A solução da proteína foi centrifugada a 4000 x g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para o ensaio. A proteína em solução também foi incubada

com três carboidratos específicos, os monossacarídeos α -D-manose, α -metil-D-manosídeo e o dissacarídeo metil-O3-(α -D-manose)- α -D-manose (metil-dimanosídeo), na concentração final de 5 mM durante uma hora. A associação de proteínas a ligantes específicos durante os ensaios cristalográficos pode promover a estabilização de sítios importantes, como o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) em lectinas permitindo, assim, a sua melhor caracterização.

A proteína foi então submetida ao ensaio de cristalização, utilizando o método da matriz esparsa inicialmente descrito por JANCARIK & KIM (1991). Os kits utilizados para este ensaio foram o “*Crystallization Extension Kit for Proteins*” (Sigma Aldrich), bem como o “*Crystal Screen I*” e “*Crystal Screen II*” (Hampton Research).

O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, utilizando o método de difusão a vapor e gota suspensa. As placas foram manuseadas no robô TTP LabTech’s Mosquito Crystal, com a adição de 100 μ L para cada poço correspondente a uma condição de cristalização e a gota formada por 100 nL da solução de proteína e 100 nL da condição de cristalização respectiva. Os poços foram então vedados com silicone e a placa foi mantida em repouso à temperatura de 20 °C.

Após a obtenção de cristais em uma determinada condição, otimizações foram realizadas, variando a concentração de sal, agentes precipitantes e pH da solução, repetindo todo o ensaio de cristalização. Essa otimização visa melhorar a condição de formação do cristal, com características que o tornem compatíveis a uma melhor difração de raios X.

4.2.2 Coleta de dados e resolução da estrutura cristalográfica

Os dados de difração de raios X foram coletados a temperatura de -173,5 °C. Para evitar a formação de gelo, os cristais foram mergulhados em uma solução crioprotetora aquosa de glicerol (30%). Os dados foram coletados em uma faixa de resolução ideal ou comprimento de onda de 1,49 Å, utilizando uma fonte de luz de radiação síncroton (estação MX2 no Laboratório Nacional de Luz Síncroton – LNLS – Campinas, Brasil) e um detector PILATUS2M (Dectris, Suíça), sendo 180 imagens coletadas com oscilação de 1°. Os conjuntos de dados foram indexados, integrados e escalonados através do programa MOSFLM (LESLIE; POWELL, 2007) e SCALA (EVANS, 1993), ambos disponíveis no pacote CCP4 (WINN et al., 2011).

O método de escolha para resolução da estrutura foi o de substituição molecular, utilizando o programa MOLREP (VARGIN; TAPLYAKOV, 1997). Algumas coordenadas atômicas podem ser utilizadas como modelo de acordo com sua alta similaridade e melhor correspondência. Neste trabalho foram utilizadas as coordenadas atômicas da lectina recombinante de *Platypodium elegans* complexada com trimanosídeo (PDB id: 3ZVX), que apresenta 99% de similaridade com a estrutura primária da PELa nativa (BENEVIDES et al., 2012). Após a utilização das operações de simetria de rotação e translação, os valores de R_{factor} e o coeficiente de correlação foram analisados, admitindo um modelo de qualidade para resultados de R_{factor} e coeficiente de correlação inferior a 40% e superior a 60%, respectivamente.

Após a substituição molecular, a estrutura foi submetida a refinamentos de corpo rígido e refinamentos posicionais para um melhor ajuste da molécula em sua unidade assimétrica através do programa PHENIX (ADAMS et al., 2010). Este refinamento permite encontrar uma melhor concordância entre o modelo utilizado e a estrutura real da molécula. Posteriormente, ajustes manuais foram realizados através da visualização dos mapas de densidade no programa Coot (EMSLEY et al., 2010). Todos os passos manuais foram seguidos de ciclos de refinamentos posicionais e os valores de R_{free} e R_{factor} monitorados, importantes para calcular a concordância do refinamento (BRÜNGER, 1992).

Em seguida foram realizadas análises estereoquímicas dos ângulos de ligação, distâncias interatômicas e interações com ajuda do gráfico de Ramachandran e mapa de Fourier e a qualidade do modelo foi avaliada através dos programas Molprobity (CHEN et al., 2010) e *PDB Validation Tool* (READ et al., 2011). Por fim, foram criadas ilustrações a partir do modelo tridimensional final de nPELa em complexação com o metil-dimanosídeo, para melhor visualização de seu sítio de reconhecimento a carboidratos, sítio de interação com metais, sítio de glicosilação e representação das interações com os açúcares por meio dos programas PyMol *Molecular Graphics System* (DELANO, 2002) e LigPlot v. 1.4.5 (WALLACE et al., 1996). O modelo gerado foi depositado no *Protein Data Bank* (PDB) com código 5U38.

4.3 Ferramentas de bioinformática

4.3.1 Docking molecular

As possíveis interações existentes entre a lectina PELa nativa com diferentes açúcares foram avaliadas através do Docking Molecular. Para tanto, o Docking rígido foi realizado através do software CLC Drug Discovery Workbench Software v. 3.0 (CLC Bio, Boston, MA, USA). Essa ferramenta determina as conformações de ligação mais favoráveis e detecta várias conformações dos ligantes enquanto mantém a proteína como uma estrutura rígida. Sendo assim, a conformação de menor energia para cada composto foi obtida da biblioteca de ligantes presente no *Protein Data Bank*.

A localização do domínio de reconhecimento a carboidratos de PELa foi determinado através da sobreposição com a PELa recombinante (PDB id: 3ZVX), em uma raio corresponde a 11 Å ao redor do CRD para todos os compostos e o máximo de iterações de 5000 para cada ligante.

O algoritmo PLANTSPLP foi usado para calcular o escore de docking (KORB; STUTZLE; EXNER, 2009). As melhores conformações dos ligantes foram selecionadas baseadas no escore de *docking* e interações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Para representar as interações entre PELa e os melhores ligantes, o LigPlot+, v. 1.4.5 (WALLACE et al., 1996) foi utilizado.

4.3.2 Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica foram realizadas usando o *Gronigen Machine for Chemical Simulations* (GROMACS) v. 5.1.2 (BERENDSEN et al., 1995; ABRAHAN et al., 2015), com o campo de força GROMOS 54a7 (SCHMID et al., 2011). Uma caixa cúbica foi gerada com o módulo editconf e a proteína foi solvatada com o modelo de água de carga única (spc) usando o módulo genbox.

As parametrizações dos açúcares α -metil-manosídeo (MMA), metil-dimanosídeo (MDM) e manose- α -1,3-manose (M13) foram realizadas pelo servidor ATB (KOZIARA et al., 2014) e checadas manualmente. Íons de sódio (Na^+) foram adicionados para neutralizar o sistema conforme necessário.

Posteriormente, minimizações de energia foram aplicadas usando o método *steepest descent* com critério para convergência de 10 KJ/mol. A minimização foi seguida por equilíbrio em termostatos NVT seguido por NPT com acoplamento de pressão isotrópico Parrinello-Rahman para 1 bar e acoplamento de temperatura Nose-Hoover (PARRINELLO, RAHMAN, 1981) para 300 K. Interações eletrostáticas de longa distância foram calculadas pelo método de *Particle Mesh Ewald* (PME) (DARDEN et al., 1993) com um limiar de 12 Å, e 15 Å foi usado para computar interações de van der Waals de longo alcance. Constrição linear (LINCS) (HESS et al., 1997) foi utilizado para limitar as ligações. O tempo de simulação utilizado foi de 10 ns para a maioria das simulações (PELa nativa e complexada com os açúcares MMA e MDM) e 20 ns para o PELa ligada ao M13. As coordenadas foram salvas a cada 10 ps.

4.3.3 Cálculo de energia livre (MM-PBSA)

A energia livre de ligação entre a PELa nativa e os açúcares (MMA, M13 e MDM) foi obtida pelo método *Mecânica molecular – Área de superfície Poisson-Boltzmann* (MM-PBSA) (KUMARI; KUMAR, 2014). Duzentos (200) *frames* foram escolhidos no intervalo de 6000-8000 ps para cada uma das trajetórias de dinâmica molecular obtidas, objetivando calcular a diferença de energia livre (Equação 1), e cada componente foi estimado pela Equação 2.

$$\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}} - (G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}}) \quad (\text{Equação 1})$$

Na equação 1, G_{complexo} se refere a energia em fase gasosa, $G_{\text{proteína}}$ a energia livre de proteína e G_{ligante} a energia livre do ligante.

$$G = E_{\text{gás}} + G_{\text{solvação}} - TS \quad (\text{Equação 2})$$

Na equação 2, $E_{\text{gás}}$ refere-se à energia em fase gasosa, que inclui as contribuições das energias eletrostáticas, de Van der Waals e de deformação interna. A energia livre de solvação $\Delta G_{\text{solvação}}$ inclui contribuições polares (ΔG_{PB}) e não polares (ΔG_{SA}) (Equação 3).

$$G = \Delta G_{PB} + \Delta G_{SA} \quad (\text{Equação 3})$$

A equação de Possion-Boltzman (PB) foi aplicada para estimar a contribuição polar (ΔG_{PB}) (GILSON; SHARP; HONIG, 1988). Para resolver a equação, as constantes dielétricas internas e externas foram ajustadas para 1 e 80, respectivamente. A energia de solvatação não polar (ΔG_{SA}) foi estimada pela área da superfície acessível ao solvente (SASA), determinada por combinação linear do método de sobreposições emparelhadas. O “ γ ” corresponde a tensão superficial proporcionalmente constante, ajustada para $0,00542 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1} \times \text{Å}^2$, e “b” a energia livre de solvatação não polar para um ponto do soluto, que foi ajustada para $0,92 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$. O raio da esfera para o cálculo de SASA foi de $1,4 \text{ Å}$.

$$\Delta G_{SA} = \gamma \Delta \text{SASA} + b$$

Uma estimativa aproximada do valor de entropia pode ser obtida pela análise de modo normal, no entanto, a NMA é considerada problemática e demorada. Portanto, o cálculo de entropia foi eliminado em nosso estudo. Após a simulação, o arquivo de energia foi usado para gerar o valor de energia livre de ligação entre nPELa e os açúcares MMA, MDM e M13.

4.4 Ensaio de nocicepção

4.4.1 Animais

Camundongos Swiss machos (25-35 g) provenientes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará - UFC foram mantidos na sala de quarentena do Instituto Superior de Ciências Biomédicas - ISCB da Universidade Estadual do Ceará - UECE nos dias antecedentes aos experimentos, recebendo água e ração *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura. Os protocolos utilizados nesse trabalho seguiram os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA),

tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de animais da UECE (CEUA nº 10130208-8/40).

4.4.2 Teste de pressão na pata de camundongos (von Frey filamentos)

O modelo de von Frey permite avaliar a resposta (retirada da pata) dos animais através de estimulação mecânica com um filamento. É utilizado para quantificar a hipernocicepção observada na dor de origem inflamatória ou produzida por mediadores específicos (CUNHA et al., 2004).

Os camundongos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico com assoalho de rede de malha não maleável, sendo aplicada no centro da planta da pata uma pressão com um filamento flexível, suficiente para proporcionar a curvatura do mesmo (CUNHA et al., 2004). A escolha do filamento flexível foi realizada por teste prévio através da indução de hipernocicepção com carragenina em camundongos. Foram testados os filamentos de 0,4 e 0,8 mm, sendo este último o considerado ideal, com os animais apresentando acima de 50% de resposta. A remoção total da pata da tela de apoio foi considerada como resposta de retirada. A estimulação com o filamento foi repetida por até 6 vezes, com intervalos de 1 min, sendo 6 sacudidas da pata consideradas 100% de resposta.

A hipernocicepção nos animais foi induzida pela injeção s.c. intraplantar de 50 µl de PELa (3, 30 e 300 µg/pata) e a resposta de retirada da pata foi avaliada dispondo-se os camundongos sobre o assoalho imediatamente antes (tempo zero) e após (0.5 - 72h) a injeção do estímulo. Os animais controle receberam salina em substituição à lectina.

A participação do domínio lectínico foi avaliada pela incubação da lectina, por 1 h a 37 °C, associada ao açúcar ligante α -metil-D-manosídeo (α -CH₃: 0,1 M) para garantir a ocupação do domínio lectínico, antes da administração s.c. nos animais. No grupo controle, o açúcar ligante foi incubado isoladamente nas mesmas condições. A investigação da participação das prostaglandinas foi analisada pela administração s.c. dorsal de indometacina (5 mg/kg) uma hora antes da injeção da lectina.

4.4.3 Análise Estatística

Os dados experimentais foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Diferenças significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguido do teste corretivo de Bonferroni para os ensaios comportamentais. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

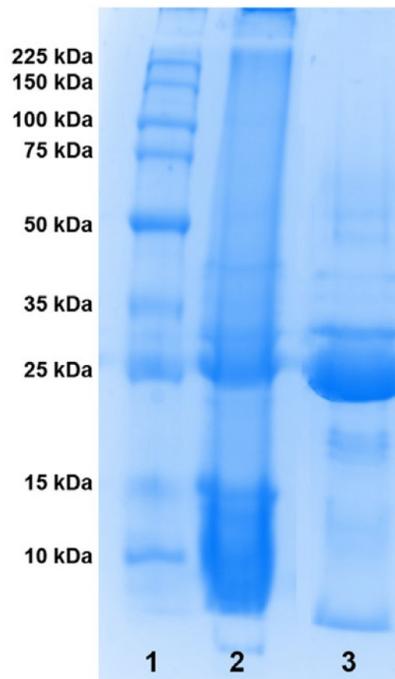
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cristalização e resolução da estrutura tridimensional

5.1.1 Purificação da lectina

A lectina nativa de *Platypodium elegans* (nPELa) foi purificada em um único passo cromatográfico, em matriz de afinidade do tipo agarose-manose, na qual as proteínas não retidas foram removidas com uma solução de NaCl 0,15 M e a lectina retida foi eluída com uma solução de D-manose 0,1 M em NaCl 0,15 M. A pureza da amostra foi confirmada através de uma eletroforese em gel em poliacrilamida (SDS-PAGE) (FIGURA 10).

Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstrando o perfil da lectina nPELa purificada em coluna de agarose-manose. Linha 1- Marcador molecular (Broad Range Protein Molecular Weight Marker v849A Promega); Linha 2- Extrato bruto; Linha 3- nPELa 12 µg.



Fonte: Elaborado pelo autor.

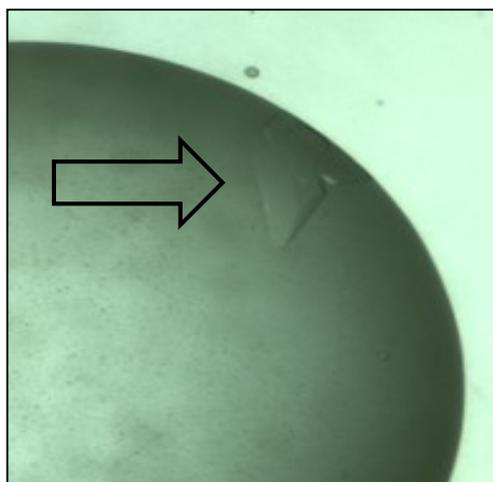
5.1.2 Cristalização

A lectina nativa de *Platypodium elegans* (nPELa) foi cristalizada a partir de uma solução de 12,5 mg/mL da lectina solúvel em Tris-HCl 25 mM pH 7,6, previamente incubada com diferentes manosídeos (α -D-manose, metil-manosídeo e metil-dimanosídeo) em uma concentração final de 5 mM. As incubações foram realizadas por uma hora e posteriormente cada uma das soluções formadas (nPELa-ligante) foram submetidas aos ensaios de cristalização.

As melhores condições para a cristalização da nPELa foram obtidas através de um *screening* de cristalização, utilizando os kits *Crystal Screen I* e *II* da Hampton®. Os cristais foram obtidos através do método de difusão à vapor em gota suspensa após algumas semanas, com a placa mantida em repouso à temperatura constante de 20 °C.

A condição que apresentou crescimento dos cristais foi a nº 48 do kit “*Crystal Screen II*” da Hampton, composta por Bicina 0,1 M pH 9,0, Dioxano 2% e PEG 20.000 10%, sendo estes obtidos apenas para a nPELa associada ao metil-dimanosídeo (MDM). Após a obtenção dos cristais, foram realizadas otimizações da condição de cristalização em placas de 24 poços, variando o pH e a concentração do agente precipitante, com a obtenção de cristais ideais na condição em que se utilizou Bicina 0,1 M pH 8,9, Dioxano 3% e PEG 20.000 10% (FIGURA 11).

Figura 11 - Cristal de nPela complexada com metil-dimanosídeo (MDM). Cristal obtido a partir da condição nº 48 do kit “*Crystal Screen II*” da Hampton. Bicina 0,1 M pH 8,9, Dioxano 3% e PEG 20.000 10%.



5.1.3 Coleta de dados e refinamento da estrutura

Os cristais de nPELa + MDM obtidos foram congelados em solução crioprotetora (condição de cristalização com glicerol 30% v/v) e levados para o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas – São Paulo) para difração, utilizando uma fonte de radiação síncrotron da estação XM2 e um detector PILATUS2M® (Dectris, Suíça). Os dados foram obtidos em um comprimento de onda de 1,49 Å e 180 imagens foram coletadas com um ângulo de oscilação de 1°.

As imagens foram indexadas, integradas e escalanodas através do programa MOSFILM e SCALA, integrantes do pacote CCP4. O grupo espacial do cristal foi definido como ortorrômbico C222₁ (ângulos $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), com os seguintes parâmetros de célula ($a = 53,24 \text{ \AA}$, $b = 87,51 \text{ \AA}$ e $c = 120,12 \text{ \AA}$). O coeficiente de Matthew ($2,62 \text{ \AA}^3/\text{Da}$) indicou a presença de um monômero por unidade assimétrica, com a presença de 53% de solvente.

A etapa seguinte para a resolução da estrutura cristalográfica de nPELa foi a substituição molecular através do programa MOLREP, onde se utilizou um modelo estrutural de uma lectina semelhante para a resolução do problema de fase. Neste caso, foi utilizado a estrutura da lectina de *Platypodium elegans* recombinante (id PDB: 3ZVX) como modelo, devido a sua alta identidade (99%). Os parâmetros avaliados foram o wRfactor = 0,395 e o score = 0,707, que indicaram que o modelo escolhido era adequado para a substituição molecular.

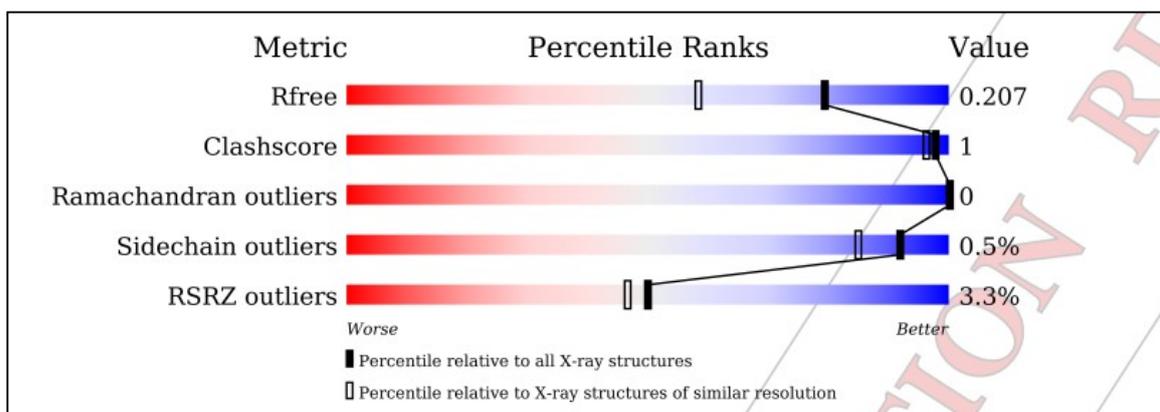
Após a definição do modelo de substituição molecular, a estrutura de nPELa foi submetida a diversos refinamentos de corpo rígido e posicionais através do programa PHENYX, por meio do posicionamento do modelo no mesmo espaço ocupado que a molécula real em sua rede cristalina, objetivando encontrar uma melhor concordância entre o modelo proposto e a estrutura real obtida. Algumas correções das posições dos aminoácidos também foram necessárias e estas foram realizadas através do programa Coot, bem como a adição dos ligantes e das moléculas de água. A resolução final obtida após o refinamento foi de 1,6 Å e os valores de R_{factor} e R_{free} de 18,39% e 20,78% respectivamente.

Por fim, a estrutura final foi submetida à validação através do servidor online *PDB Validation Reports* (wwPDB), que demonstra valores de parâmetros relacionados a geometria da estrutura como: R_{free} (medida do ajuste do modelo para um pequeno subconjunto dos dados experimentais, que não foram utilizados no

refinamento), *clashscore* (escore derivado do número de pares de átomos no modelo que incomumente se aproximam), *sidechain outliers* (avalia ângulos de torções preferenciais através do MOLPROBITY), *Ramachandran outliers* (resíduos com torções de phi (ϕ) e psi (ψ) incomuns) e *RSRZ outliers* (avalia a qualidade do ajuste entre o modelo atômico utilizado e o real).

De acordo com os resultados obtidos a partir do *PBD Validation*, a estrutura tridimensional da PELA nativa apresentou parâmetros de validação significativamente satisfatórios, evidenciado pelos valores predominantemente encontrados na faixa de coloração azul, resultados estes que mais se aproximam dos valores ideais (FIGURA 12).

Figura 12- Dados de validação da estrutura de nPELa obtidos através do wwPDB VALIDATION. O gráfico demonstra os escores de nPELa em comparação aos dados de validação global de todas as estruturas obtidas por cristalografia de raios X já depositadas, sendo a faixa de coloração vermelha relativa a dados de menor qualidade e a azul a valores melhores. Os retângulos preenchidos indicam a comparação em porcentagem entre os dados de nPELa em relação a todas as estruturas de raios X depositadas e os retângulos não preenchidos, a porcentagem de comparação relativa a estruturas de raios X com resolução similar



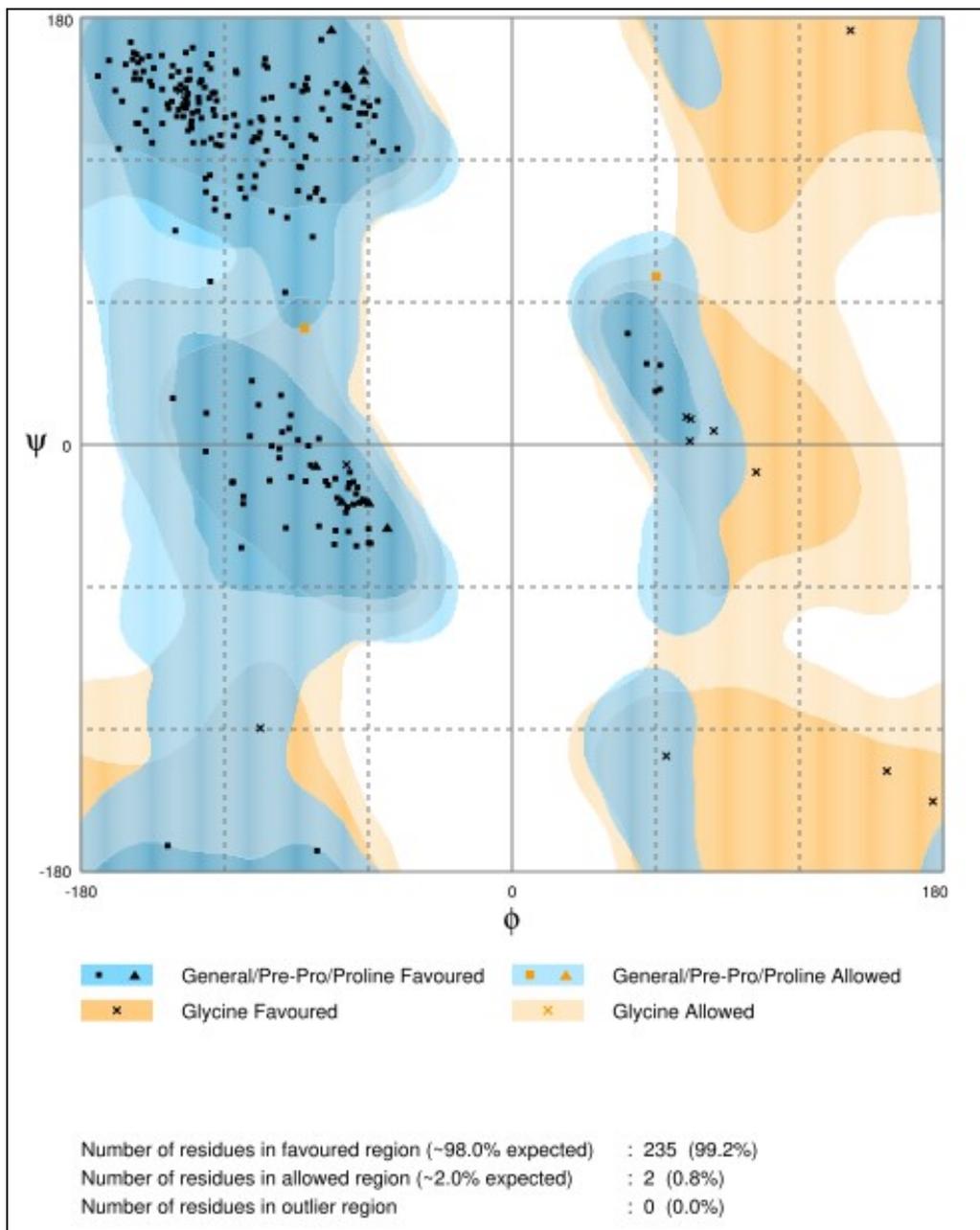
Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação da posição dos diferentes tipos de aminoácidos em relação às regiões permitidas ou não, foi feita através do gráfico de Ramachandran, obtido através do MOLPROBITY (CHEN et al., 2010). Neste gráfico, é possível visualizar as torções dos ângulos phi (ϕ) e psi (ψ) de todos os aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica e que contribuem para a sua conformação estrutural. A estrutura de nPELa apresentou 100% dos resíduos localizados em regiões

permitidas, sendo 99,2 % dos resíduos presentes em regiões favoráveis (FIGURA 13).

Após a validação da estrutura de nPELa, as coordenadas obtidas foram depositadas no *Protein Data Bank*, sendo registrada com o código 5U38. Os resultados estatísticos obtidos para os dados de coleta e difração, substituição molecular, refinamento e validação são demonstrados na TABELA 02.

Figura 13 - Gráfico de Ramachandran da estrutura final de nPELa.



Fonte: Elaborado pelo autor. Para tanto, foi utilizado o programa RAMPAGE (LOVELL et al., 2002).

Tabela 02 - Dados de coleta de difração, refinamento e parâmetros de qualidade do cristal da lectina de *Platypodium elegans* nativa (nPELa) complexada com metil-dimanosídeo (MDM).

Parâmetros	Valores
Dados de coleta	
Grupo espacial	C222 ₁
Parâmetros de célula unitária	
a, b, c (Å)	53.24 Å, 87.51 Å, 120.12 Å
Ângulos de célula (α, β, γ)	90°, 90°, 90°
Reflexões totais	201,256 (19,803)
Reflexões únicas	37,353 (5,355) ^d
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limite de resolução (Å)	26.62 – 1.6 (1.69 – 1.6) ^d
R _{merge} ^a (%)	12.03 (43.05) ^d
Completeza	99.8 (99.8) ^d
Multiplicidade	5.4 (3.7) ^d
I/σ (I) média	7.2 (2.1) ^d
Wilson B-factor (Å ²)	9.75
Molecular replacement	
wRfactor	0.395
Score	0.707
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	26,62 - 1.6
R _{factor} ^b (%)	18.39 (30.05) ^d
R _{free} ^c (%)	20.78 (32.91) ^d
Número de reflexões	37,305 (3,669) ^d
Reflexões utilizada para R-free	1821 (176) ^u
Número de resíduos por unidade assimétrica	239
Número de moléculas de água	295
R.M.S.D	
Comprimento da ligação (Å)	0.006
Ângulos de ligação (graus)	0.85
Fator de temperatura	
Média do B fator para toda a cadeia da proteína (Å ²)	15.22
Ligantes	27.30
Solvente	27.53
Gráfico de Ramachandran	
Rotâmeros discrepantes (%)	0.47
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	99.16
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	0.84

Fonte: Elaborado pelo autor.

^a
$$R = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}$$
 onde $I(hkl)$ é a intensidade da medição da reflexão h e $\langle I(hkl) \rangle$ é o valor médio de $I(hkl)_j$ para todas as medidas;

^b $R_{work} = 100 \frac{\sum \|F_{oll} - F_{c}\|}{\sum \|F_{oll}\|}$, onde $\|F_{oll}\|$ e $\|F_{c}\|$ são as amplitudes do fator de estrutura observadas e calculadas, respectivamente;

^c R_{free} = R-factor calculado aleatoriamente para 5% de um subconjunto de reflexões excluídas do refinamento;

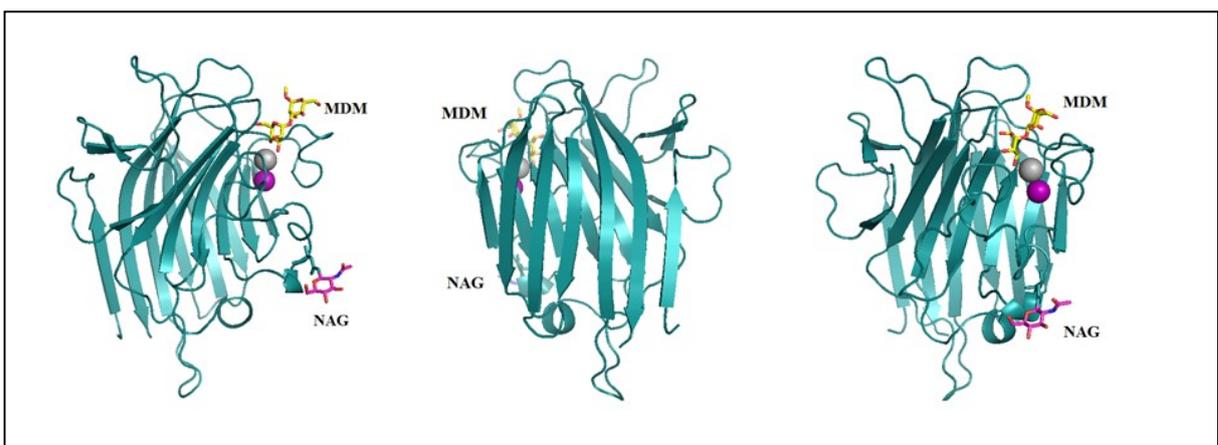
^d Os valores em parêntese representam a camada mais alta.

5.1.4 Estrutura tridimensional de nPELa em complexo com metil-dimanosídeo

A estrutura geral do monômero da lectina nativa de *Platypodium elegans* (nPELa) complexada com metil-dimanosídeo (MDM) apresenta o motivo β -sanduíche ou *jelly roll*, presente na maioria das lectinas de leguminosas. Estes monômeros são formados por 14 fitas beta antiparalelas e duas pequenas hélices alfas, interligadas por voltas (*loops*) e alças formando uma estrutura achatada, já demonstrada para lectinas pertencentes a tribo Dalbergieae, como CTL (*Centrolobium tomentosum*) (ALMEIDA, 2016) e PAL (*Pterocarpus angolensis*) (LORIS et al., 2003).

O monômero de nPELa é constituído por 239 resíduos de aminoácidos, 295 moléculas de água, 1 íon cálcio e 1 manganês, além do ligante MDM disposto no sítio de reconhecimento a carboidratos e uma molécula de N-acetil-D-glicosamina (NAG) localizada no sítio de glicosilação (FIGURA 14). Dos 245 resíduos presentes na estrutura primária da PELA recombinante, apenas os quatro últimos aminoácidos (²⁴²AQKE²⁴⁵) presentes na extremidade C-terminal não puderam ser identificados no mapa de densidade eletrônica de PELA nativa (ALMEIDA, 2016).

Figura 14 - Estrutura geral de um monômero de nPELa complexado com MDM. Os resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura são representados em azul, os íons cálcio e manganês como esferas cinza e roxa respectivamente, o ligante (MDM) em amarelo e o açúcar (NAG) representante da glicosilação em rosa.



Fonte: Elaborado pelo autor via PYMOL.

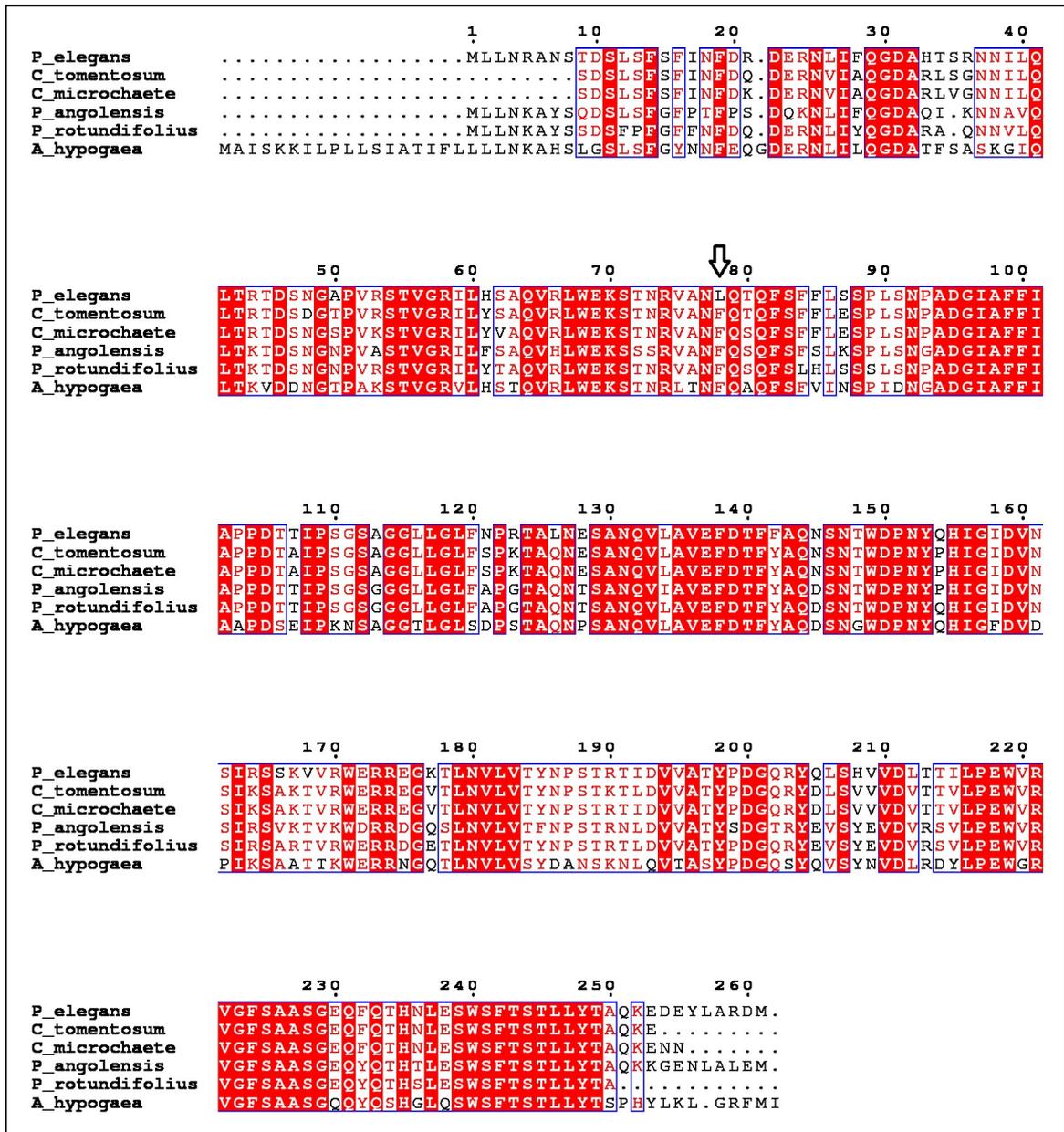
Além disso, a PELA nativa apresentou um resíduo de fenilalanina (Phe70) em detrimento de um resíduo de leucina (Leu78) encontrado na sequência primária

da rPELa. Leu79 em rPELa corresponde ao resíduo 70 quando comparada a nPELa, levando em consideração a exclusão de 8 aminoácidos relativos ao peptídeo sinal N-terminal. A diferença entre estes aminoácidos se deve provavelmente a erros de sequenciamento gênico para a rPELa, bem como de dedução de sequência primária, já que a maioria das lectinas de Dalbergieae apresentam o resíduo de Phe70 conservado, como demonstrado pelo alinhamento obtido via Esript 3.0 (FIGURA 15).

Embora um monômero tenha sido encontrado para nPELa, a maioria das lectinas de leguminosas se encontram em formas diméricas ou tetraméricas em condições naturais (MANOJ; SUGUNA, 2001; SRINIVAS et al., 2001; SINHA et al., 2007). Portanto, a estrutura geral da nPELa foi também representada na forma de um dímero canônico, estrutura esta formada pela associação lado a lado de duas folhas- β anteriores, uma de cada monômero, formando assim uma folha- β contígua de 12 fitas, com os sítios de reconhecimento a carboidrato e de glicosilação dispostos nos extremos da estrutura dimérica, como demonstrado na FIGURA 16.

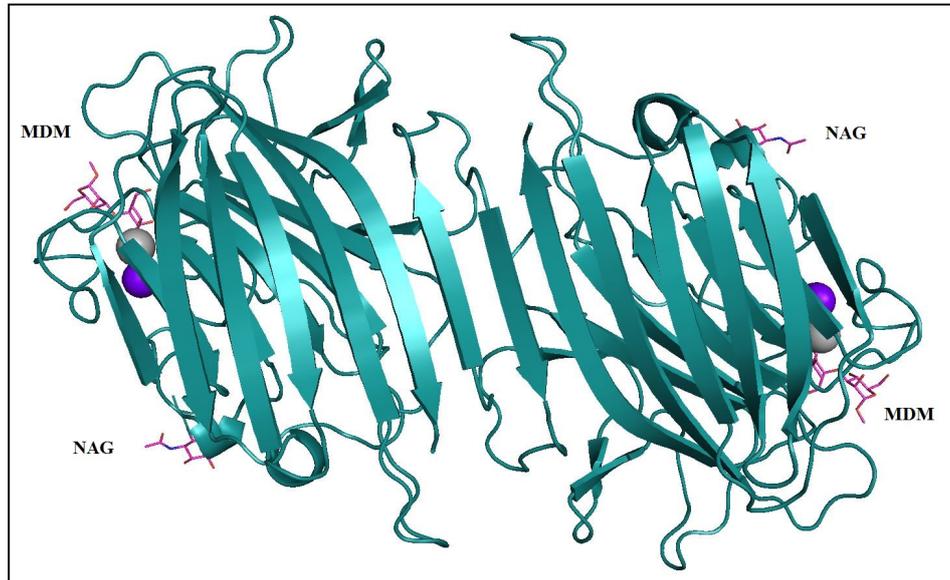
A presença de glicosilação em lectinas da tribo Dalbergieae têm sido demonstrada na literatura, através de metodologias simples, que incluem a quantificação de açúcares pelo método fenol-ácido sulfúrico e a identificação de proteínas glicosiladas através da coloração com o reagente de Schiff (PAS). Desse modo, foram identificadas como proteínas glicosiladas, as lectinas de *Vatairea macrocarpa* (CAVADA et al., 1998), *Vatairea guianensis* (SILVA et al., 2012), *Platymiscium floribundum* (PEREIRA-JUNIOR et al., 2012), *Andira anthelmia* (NASCIMENTO et al., 2015), *Centrolobium microchaete* (VASCONCELOS et al., 2015), *Centrolobium tomentosum* (ALMEIDA et al., 2016), assim como a lectina nativa de PELa (ARARIPE et al., 2017).

Figura 15 – Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de PELA (ID G1EUI6) com as lectinas de sementes de Dalbergieae: CTL-*Centrolobium tomentosum* (ID C0HJX1), CML-*Centrolobium microchaete* (ID C0HK20), PAL-*Pterocarpus angolensis* (ID Q8GSD2), PRL- *Pterocarpus rotundifolius* (ID Q6GUG5), SLI-*Arachis hypogaea* (Q70DJ5) utilizando o ESPrpt 2.2 Web Program. O resíduo indicado pela seta corresponde ao variante apenas para a PELA e conservado entre as demais.



Fonte: Elaborado pelo autor via Esprpt 3.0.

Figura 16 - Estrutura tridimensional de um dímero de nPELa complexado com MDM. Os resíduos de aminoácidos que compõem a estrutura estão representados em azul, os íons cálcio e manganês como esferas cinza e roxa respectivamente, os 2 ligantes (MDM) e os 2 açúcares (NAG) representantes da glicosilação em rosa.

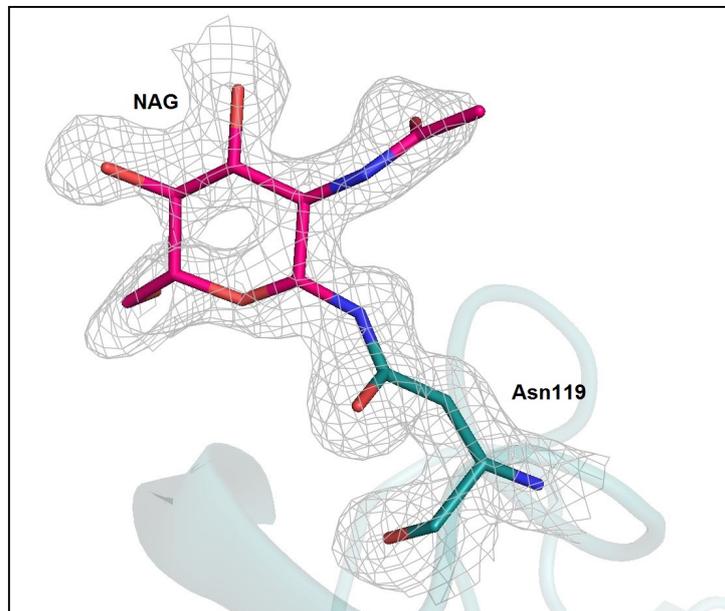


Fonte: Elaborado pelo autor via PYMOL.

A glicosilação de nPELa foi confirmada através da cristalografia, em que foi possível reconhecer e modelar um resíduo de N-acetil-D-glicosamina (NAG) a partir da nuvem eletrônica obtida, de maneira semelhante ao encontrado por ALMEIDA e colaboradores (2016) para a CTL. O sítio de N-glicosilação de nPELa foi identificado no resíduo Asn119, situado sobre uma pequena hélice alfa na superfície da proteína (FIGURA 17). Este padrão de glicosilação em um resíduo de asparagina também foi demonstrado para outras lectinas glicose/manose específicas da tribo, como a PAL em Asn118 (LORIS et al., 2003) e CTL também em Asn119 (ALMEIDA et al., 2016).

Outros sítios de glicosilação também foram sugeridos por BENEVIDES (2012) para a PELA nativa, através de ferramentas de predição. Além da glicosilação no resíduo Asn127, equivalente ao confirmado resíduo glicosilado Asn119 na proteína cristalizada neste trabalho, também foi sugerido a existência de prováveis sítios de glicosilação os resíduos Asn7 e Asn186, que não foram observados na proteína nativa cristalizada.

Figura 17 – Sítio de N-glicosilação de nPELa. O glicano N-acetil-D-glicosamina (NAG) (representado em rosa) está associado covalentemente ao nitrogênio da amida presente na cadeia lateral do aminoácido Asn119 (representado em azul).

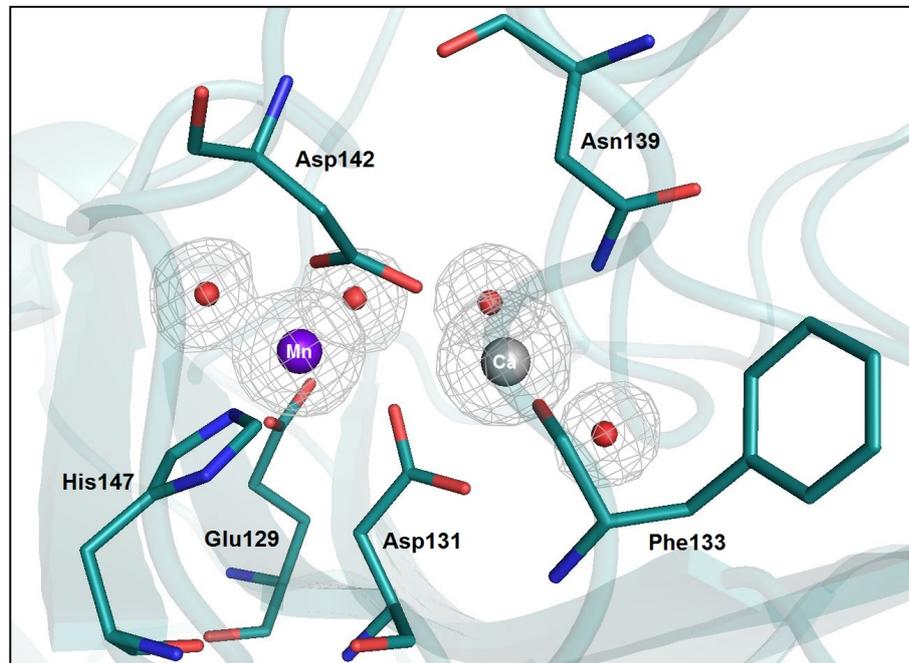


Fonte: Elaborado pelo autor via PYMOL.

Além do sítio de glicosilação, a nPELa apresenta um sítio de ligação a metais, semelhante ao encontrado em outras lectinas da tribo Dalbergieae (BENEVIDES et al., 2012; LORIS et al., 2004, ALMEIDA et al., 2016), que fazem coordenação com os íons metálicos cálcio e manganês (FIGURA 18). Este sítio fica localizado de maneira aproximada ao sítio de ligação a carboidratos e já foi demonstrada a participação destes íons na estabilização das interações entre lectina e o seu carboidrato ligante (SHARON; LIS, 1990; POVINELI, KLFILHO, 2002).

De maneira semelhante a CTL (ALMEIDA et al., 2016), quatro aminoácidos e duas moléculas de água estabilizam cada íon. O manganês em nPELa é coordenado pelos resíduos Glu129, Asp131, Asp142 e His147 (FIGURA 19A). Estes resíduos são os mesmos determinados para a CTL e rPELa, sendo nesta última os resíduos correspondentes na sequência primária a Glu 137, Asp139, Asp 150 e His155, devido aos 8 resíduos adicionais que compõem o peptídeo sinal na região N-terminal. Igualmente a CTL, o cálcio é coordenado pelos resíduos Asp131, Phe133, Asn139 e Asp142, correspondentes em rPELa a Asp139, Phe141, Asn147 e Asp150 (FIGURA 19B).

Figura 18 – Sítio de ligação a metais de nPELa. Os íons metálicos cálcio (esfera cinza) e manganês (esfera roxa) são coordenados por diferentes resíduos de aminoácidos da lectina (representados em azul), além de moléculas de água (esferas vermelhas).

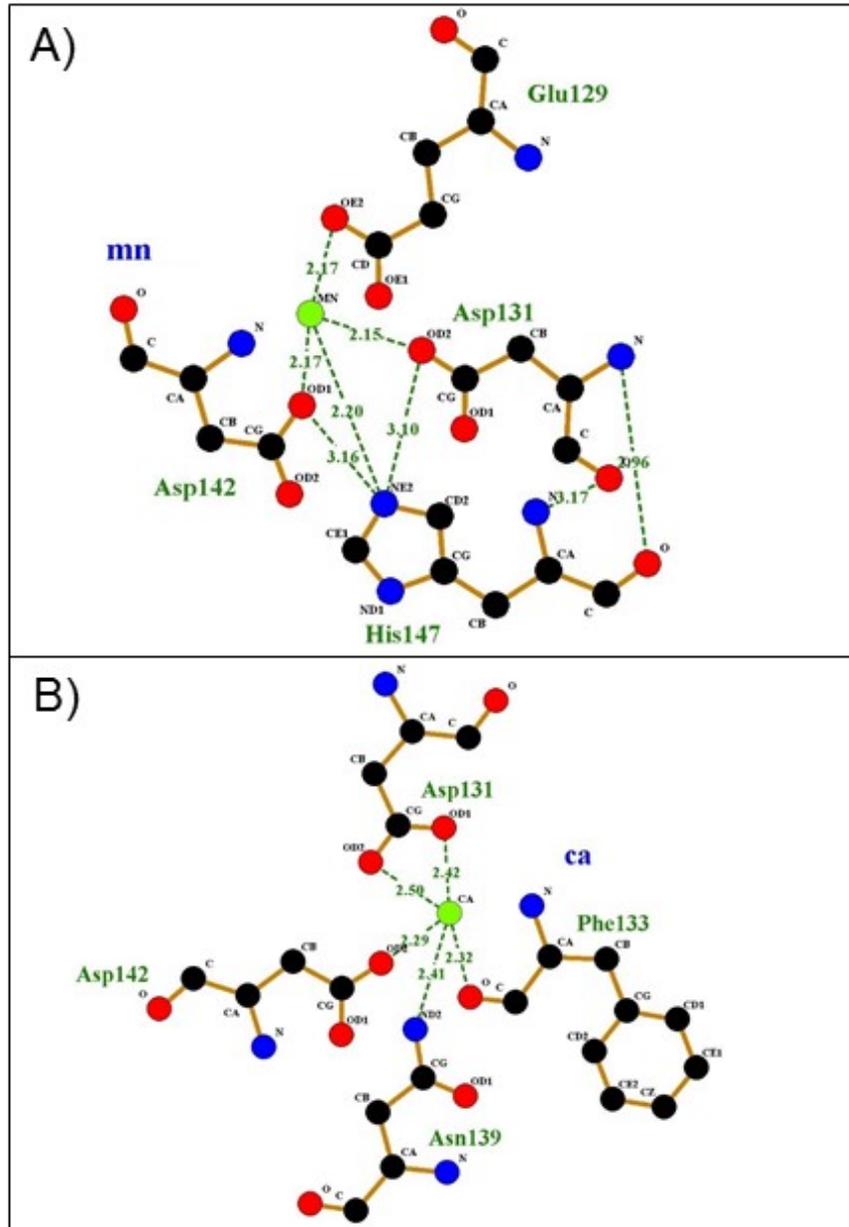


Fonte: Elaborado pelo autor via PYMOL.

Assim como o sítio de ligação a metais, o sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) é conservado entre as lectinas de leguminosas (LORIS et al., 1998). Este sítio consiste em uma cavidade disposta na superfície da proteína, sendo formado por até cinco *loops* separados (SHARMA; SUROLIA, 1997), que variam em diferentes graus entre lectinas com diferentes especificidades (LORIS et al., 2003).

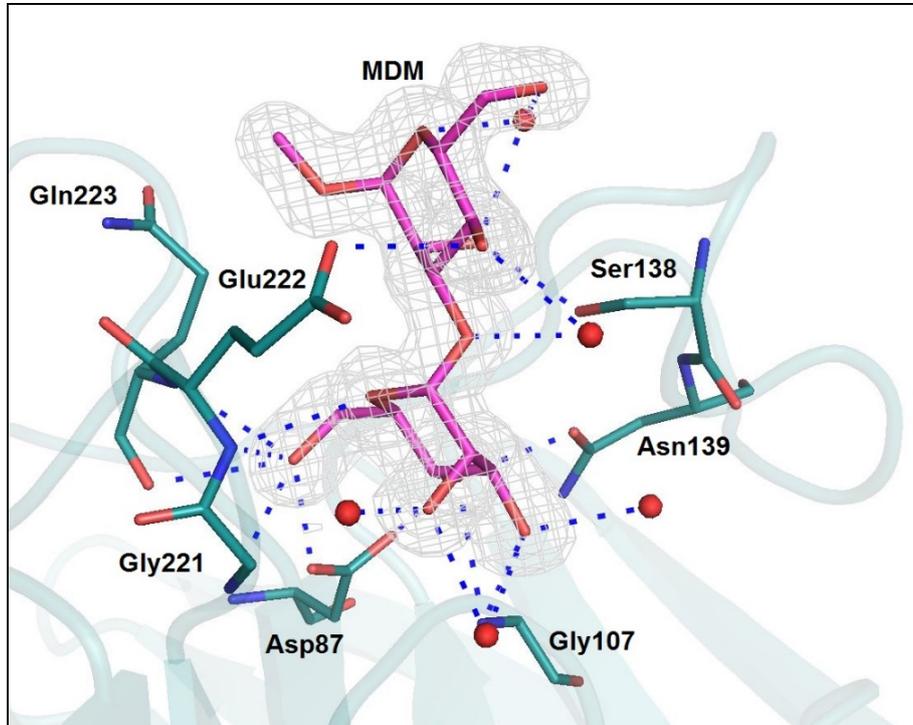
O domínio de reconhecimento a carboidratos de nPELa apresenta cinco loops semelhantemente encontrados em lectinas como a rPELa, CTL e PAL, com uma forte similaridade em sequência e conformação estrutural (ALMEIDA et al., 2016). Assim como a CTL, nPELa foi cristalizada com o açúcar metil-dimanosídeo (MDM) complexado ao seu domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) (FIGURA 20).

Figura 19 – (A) Representação das distâncias (Å) das ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e o manganês (mn) no sítio de ligação aos metais; (B) Representação das distâncias (Å) das ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e o cálcio (ca) no sítio de ligação aos metais.



Fonte: Elaborado pelo autor via LigPLOT.

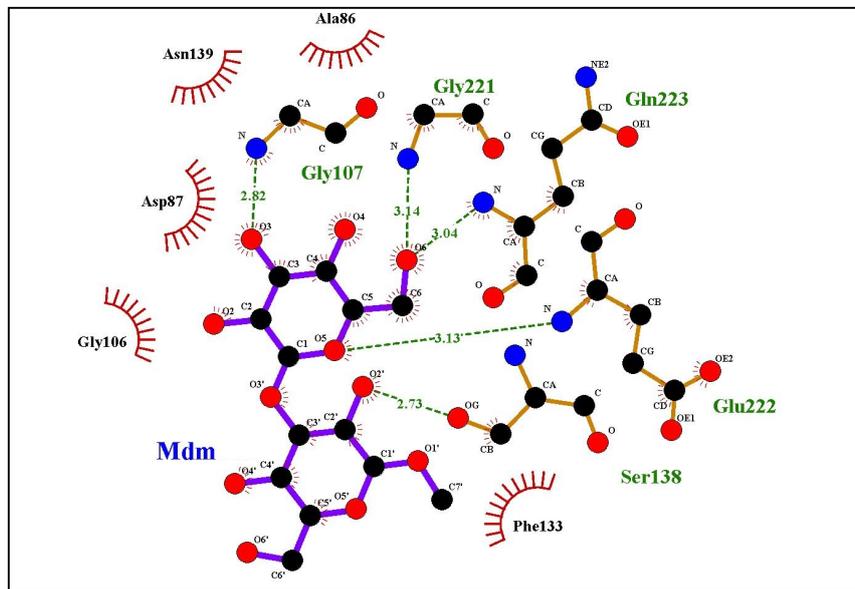
Figura 20 – Sítio de ligação a carboidratos de nPELa em complexação com metil-manosídeo. Os resíduos de aminoácidos envolvidos estão representados em azul, o açúcar MDM em rosa e as pontes de hidrogênio como linhas pontilhadas na cor azul escuro.



Fonte: Elaborado pelo autor via PYMOL.

A interação entre nPELa e MDM no CRD foi estabilizada por várias ligações, envolvendo contatos polares entre os resíduos Gly107, Asn139, Asp87, Ser138, Glu222, Gly221, Glu222 e Gln223 e os átomos de oxigênio O3, O4, O5, O6, O2' e O4' presentes no MDM. A interação foi também estabilizada por várias interações de van der Waals e hidrofóbicas, envolvendo resíduos de Ala86, Asp87, Gly106, Gly107, Phe133, Ser138, Gly221, Glu222 e Gln223 (FIGURA 21). Todas as interações entre a nPELa e MDM são demonstradas na TABELA 03.

Figura 21 – Representação das distâncias (Å) das ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e os átomos do ligante (MDM), bem como a demonstração dos resíduos envolvidos em interações hidrofóbicas.



Fonte: Elaborado pelo autor via LIGPLOT.

Diversas lectinas da tribo Dalbergieae também foram cristalizadas em complexação a ligantes específicos, como as lectinas PNA (RAVISHANKAR et al., 1997), PAL (LORIS et al., 2003), rPELa (BENEVIDES et al., 2012), VML (SOUZA et al., 2015) e CTL (ALMEIDA et al., 2016). Dentre estas, apenas as lectinas rPELa, PAL e CTL constituem lectinas manose/glicose específicas assim como a nPELa. Portanto, as estruturas de rPELa, nPELa, PAL e CTL apresentam resíduos que compõem o sítio de glicosilação, ligação a metais e domínio de reconhecimento a carboidratos conservados.

As lectinas PAL, CTL e nPELa apresentam a clássica estruturação do CRD formado com até cinco loops, nomeados de A a E (SHARMA, SUROLIA, 1997). É possível observar resíduos essenciais nos *loops* A e B, responsáveis pela estabilização reconhecida do açúcar manose, como o Asp87 no *loop* A e a Gly107 no *loop* B (LORIS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2016). Estes resíduos são predominantemente encontrados no CRD de outras lectinas de leguminosas (LORIS et al., 1998), de maneira independente a sua especificidade, como por exemplo, na lectina de *Vatairea macrocarpa* cristalizada em complexação ao seu açúcar específico GalNAc (SOUZA et al., 2015).

Tabela 03 – Interações entre nPELa e metil-dimanosídeo (MDM).

Aminoácido	MDM	Distância (Å)
<i>Interações de Van der Waals</i>		
Gly107 CN	C4	3,49
Gly107 CA	O4	3,49
Asp87 OD1	C6	3,49
Asp87 OD2	C6	3,49
Asp87 CG	O4	3,48
Phe133 CD2	O4	3,48
Gly221 C	O6	3,45
Gly221 CA	O6	3,28
Glu222 CD	O4'	3,48
Glu222 OE2	C3'	3,29
Glu222 OE2	C4'	3,30
Glu222 OE2	C5'	3,32
Ser138 CB	O2'	3,33
<i>Ligações de hidrogênio</i>		
Gly107 N	O3	2,82
Gly107 N	O4	3,19
Asn139 OD1	O4	2,93
Asp87 OD1	O4	2,60
Asp87 OD2	O6	2,74
Gly221 N	O6	3,14
Glu222 N	O5	3,13
Glu222 N	O6	3,21
Glu222 OE2	O4'	2,86
Gln223 N	O6	3,04
Gln223 O	O6	3,16
Ser138 OG	O2'	2,73

Fonte: Elaborado pelo autor.

Outro *loop* extremamente importante na manutenção da estrutura do CRD das lectinas, bem como na determinação dos açúcares que podem ser acomodados

no CRD é o *loop* C, formado pelo sítio de ligação a metais. O *loop* C pode ser constituído de 12 a 16 resíduos de aminoácidos, apresentando diferentes conformações (LORIS et al., 2004). Em nPELa, os resíduos constituintes do sítio de ligação aos metais se assemelham aos encontrados em PAL e CTL, como os resíduos Phe133, Asn139 e Asp142 (LORIS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2016). No entanto, diferentemente do encontrado em PAL e CTL, o resíduo Ser138 evidenciado nestes trabalhos parece não participar da coordenação dos metais para nPELa, interagindo apenas com o metil-dimanosídeo no CRD.

No *loop* D, há a participação de resíduos que comumente determinam a especificidade aos glicanos (LORIS et al., 2004). Este *loop* em nPELa é constituído pelos resíduos Gly221, Glu222 e Gln223, conservados entre a maioria das lectinas manose/glicose específicas de Dalbergiaceae, como CTL, PAL e rPELa (LORIS et al., 2004; BENEVIDES et al., 2012; ALMEIDA et al., 2016). Por fim, o *loop* E demonstrado em PAL, como participante da interação desta lectina com o dissacarídeo Man(α 1-2)Man (LORIS et al., 2004), não pôde ser observado como constituinte do sítio de ligação a carboidratos em nPELa, assim como em CTL e rPELa.

5.2 Docking molecular

As interações entre nPELa com diferentes monossacarídeos e oligossacarídeos foram testadas *in silico* por docking molecular. Para tanto, a estrutura de nPELa obtida teve o seu sítio de reconhecimento a carboidratos fixado e diferentes açúcares presentes no banco de dados foram selecionados e posicionados no CRD para a realização das interações. Os escores obtidos são demonstrados na TABELA 04.

De maneira geral, os resultados demonstraram que nPELa interage com diferentes manosídeos, independente de sua configuração (α ou β). No entanto, estas interações ocorreram mais fortemente com dimanosídeos e trimanosídeos, quando comparadas aos escores obtidos para os monossacarídeos manose (α = -49,67/ β = -46,06) e metil-manosídeo (-52,31), glicanos estes experimentalmente reconhecidos como ligantes específicos de nPELa (BENEVIDES et al., 2012).

Dentre estes, nPELa se ligou mais fortemente ao trimanosídeo Man- α 1,3-Man- β 1,4-GlnNAc com um escore de -80,30, seguido pelos trissacarídeos Man- α 1,3-

Man- α 1,6-ManOMe (-79,15), Man- α 1,3-Man- α 1,6-Man (-76,79), Man- α 1,6-Man- α 1,6-Man (-71,59) e isomaltotriose (-61,66). Dentre os dissacarídeos testados, nPELa interagiu mais fortemente com Man- α 1,3-ManOMe com escore de -66,26, seguido de Man- α 1,3-Man (-64,94), Man- α 1,6-ManOMe (-60,52) e Man- α 1,6-Man (-60,43).

Os escores obtidos para esses oligossacarídeos evidenciam a preferência de nPELa por açúcares com ligações do tipo α 1-3 e α 1-6 entre suas manoses constituintes, bem como por açúcares metilados, evidenciado pela existência de escores maiores quando se realiza a comparação entre os mesmos glicanos não metilados.

Trabalhos anteriores demonstraram a forte ligação das lectinas PAL, rPELa e CTL à trimanosídeos (LORIS et al., 2004; BENEVIDES et al., 2012; ALMEIDA et al., 2016). De maneira semelhante, a CTL também apresentou um maior escore de ligação para o trissacarídeo Man- α 1,3-Man- α 1,6-Man (ALMEIDA et al., 2016). A disposição do ligante MDM no CRD de nPELa ocorre de maneira similar a lectina de CTL (PDB 5EYY), como demonstrado na FIGURA 22. Estas estruturas apresentaram uma pequena variação entre seus RMSD de 0,311 Å.

Figura 22 – Sobreposição das estruturas de nPELa e CTL (5EYY) em complexação ao MDM.

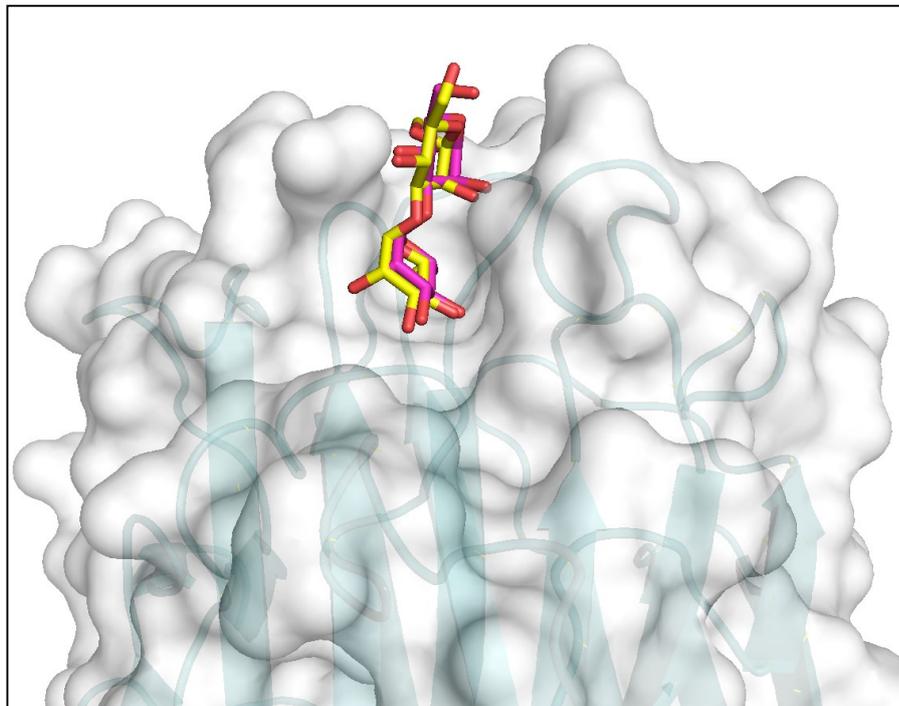


Tabela 04 – Escore das interações entre nPELa e diferentes glicanos obtidos por docking molecular.

Açúcares	Escore
Monossacarídeos	
β-D-glicose	-46,06
β-D-manose	-47,33
α-D-glicose	-48,31
α-D-manose	-49,67
Metil-α-D-glicopiranosídeo	-51,35
O-1-Metil manose	-52,31
Dissacarídeos	
Man-α1,2-Man	-44,96
Man-α1,2-ManOMe	-47,30
Man-β1,2-Man	-45,06
Man-β1,2-ManOMe	-45,06
Man-α1,3-Man	-64,94
Man-α1,3-ManOMe	-66,26
Man-β1,3-Man	-46,23
Man-β1,3-ManOMe	-46,36
Man-α1,4-Man	-51,89
Man-α1,4-ManOMe	-51,21
Man-β1,4-Man	-48,22
Man-β1,4-ManOMe	-48,35
Man-α1,6-Man	-60,43
Man-α1,6-ManOMe	-60,52
Man-β1,6-Man	-53,58
Man-β1,6-ManOMe	-49,55
Isomaltose	-56,79
Trissacarídeos	
Man-α1,2-Man-α1,2-Man	-52,15
Man-α1,2-Man-α1,6-Man	-51,65
Man-α1,2-Man-α1,3-Man	-51,70
Man-α1,3-Man-α1,6-Man	-76,79
Man-α1,3-Man-α1,6-ManOMe	-79,15
Man-α1,3-Man-β1,4-GlcNAc	-80,30
Man-α1,6-Man-α1,3-ManOMe	-62,42
Man-α1,6-Man-α1,6-Man	-71,59
Isomaltotriose	-61,66
Maltotriose	-51,78
N-glicanos	
Man3	-40,12
Man5	-36,65
Man9	-43,70

Fonte: Elaborada pelo autor via PyMOL.

5.3 Dinâmica molecular

As simulações computacionais de dinâmica molecular permitem a avaliação das modificações estruturais sofridas pelas proteínas em solução, bem como em consequência da interação destas com seus ligantes específicos, durante o tempo. Para tanto, o comportamento molecular de nPELa foi avaliado através de simulações de dinâmica molecular em sistema aquoso via GROMACS no tempo total de até 20 ns.

A estabilidade de nPELa durante as simulações de dinâmica molecular foi avaliada através do gráfico de RMSD. Neste gráfico, é possível observar o comportamento do esqueleto proteico de nPELa durante o tempo, em relação à sua estrutura inicial (FIGURA 23A). A lectina nPELa isolada e complexada ao glicano M13 alcançam o equilíbrio mais rapidamente, em torno de 1000 ps e 3000 ps respectivamente, enquanto que a nPELa complexada ao MMA e MDM alcançam o mesmo equilíbrio em um tempo maior, de aproximadamente 5000 ps.

Os resultados obtidos assim demonstram, que a ligação de nPELa com MMA e MDM causam maiores mudanças na estrutura global da proteína, levando a necessidade de mais tempo para o alcance da estabilidade desta em solução. Provavelmente, a presença do grupo metil nesses açúcares desencadeia um aumento das interações hidrofóbicas entre a nPELa e os ligantes, o que explicaria a necessidade de um maior tempo para a estabilização do esqueleto proteico de nPELa em sistema aquoso.

Diferentemente dos açúcares metilados, a ligação de nPELa com o M13 não promove tantos efeitos estruturais. Este resultado corrobora também com os dados de RMSF obtidos durante a simulação (FIGURA 23B), no qual é possível observar uma estabilização da maior parte dos resíduos de nPELa envolvidos na ligação com o M13.

O gráfico de RMSF permite a detecção de regiões flexíveis da proteína durante a simulação, através da avaliação da movimentação das cadeias laterais de cada resíduo, aumentando assim a compreensão dos efeitos dos ligantes sob a proteína em estudo. Neste caso, nPELa ligada ao MDM apresentou variações estruturais consideráveis em resíduos próximos aos encontrados no *loop* C, provavelmente os resíduos Ser138 e Asn139, quando comparados a nPELa isolada e ligada aos glicanos MMA e M13 (FIGURA 23B).

Os resultados obtidos refletem a dupla importância do resíduo Asn139, na coordenação do cálcio no sítio de ligação a metais, bem como na estabilização das interações da proteína com o ligante, assim como o resíduo Ser138. Estas modificações estão possivelmente relacionadas a uma maior abertura do CRD para a acomodação do MDM, já que dentre os açúcares testados, corresponde ao de maior complexidade.

O número de ligações de hidrogênio envolvidas nas interações entre nPELa e os ligantes também foram avaliadas durante as simulações. Como demonstrado na FIGURA 24, todos os ligantes interagiram com nPELa durante a simulação, sendo em média visualizadas de 2 a 10 pontes de hidrogênio. No entanto, o número de pontes de hidrogênio foi mais constante durante a simulação de nPELa com os açúcares MMA (FIGURA 24A) e MDM (FIGURA 24C), com uma média de 4 a 7 ligações.

Diferentemente da nPELa com MMA e MDM, o número de ligações de hidrogênio entre nPELa e M13 oscilou constantemente durante o tempo de simulação, com variações extremas que alcançaram entre 2 a 8 interações (FIGURA 24B), o que pode indicar a participação de um maior número de resíduos participantes na estabilização deste glicano no CRD.

As interações existentes entre a nPELa e os diferentes açúcares durante a simulação foram representadas através do PyMOL e LigPLOT, nos intervalos de 0, 5 e 10 ns. Estes resultados possibilitaram o acompanhamento dos resíduos participantes na estabilização destes açúcares nos diferentes momentos da simulação, permitindo assim avaliar a importância, bem como a conservação dos resíduos envolvidos na estruturação do CRD.

Os resíduos participantes nas interações entre nPELa e os diferentes ligantes nas simulações de dinâmica se assemelham aos mesmos descritos para a estrutura cristalina de nPELa obtida, no qual há o envolvimento de resíduos como o Asp87, Gly106, Gly107, Gly221, Glu222, e Gln223.

Na FIGURA 25 (C-F), é possível observar a participação de um novo resíduo nos tempos de 5 e 10 ns na estabilização do MMA no sítio de ligação a carboidratos de nPELa quando comparado ao tempo 0 ns. Este resíduo está envolvido na formação do *loop* E, descrito na literatura como uma região que reconhecidamente não possui função direta no reconhecimento a carboidratos nos CRDs para a maioria das estruturas das lectinas.

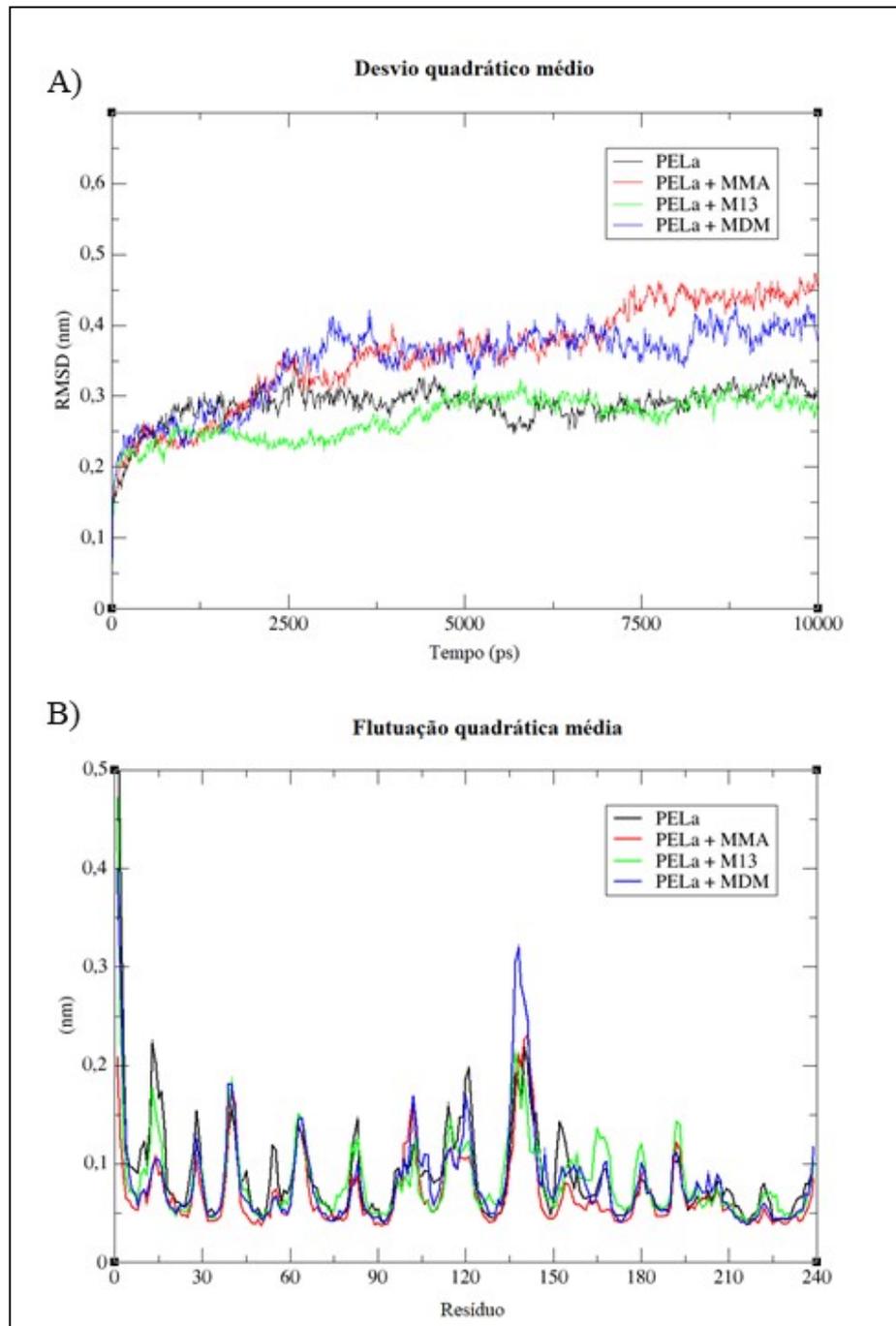
No entanto, a participação deste resíduo já foi descrita em diversos trabalhos, como na leucoaglutinina de *M. amurensis* em complexo com sialolactose, na lectina IV de *Griffonia simplicifolia* em complexo com Le-tetrassacarídeo e ConA em complexo com Man-(α 1-2)-Man (LORIS et al., 2003). Além da participação da Ser46 para nPELa + MMA, novos resíduos foram observados nos tempos de 5 e 10 ns, como a Ala105 e Ala106, atuando na formação de interações hidrofóbicas (FIGURA 25 C-F).

As interações entre nPELa + M13 no tempo 0 ns ocorreram de maneira semelhante as encontradas entre a lectina e o MDM, com a participação de Asp87, Gly107, Gly221, Glu222, Gln 223 e Ser138, com exceção apenas do resíduo Asn139. Além disso, no tempo 0 ns foi possível observar um grande número de interações hidrofóbicas na estabilização do M13, envolvendo resíduos como Ala86, Gly106, Gly221, Phe133 (FIGURA 26 B).

Após o tempo de 5 e 10 ns, nPELa manteve interações com o M13 de maneira semelhante ao observado para o MDM, mantendo o glicano estabilizado apenas por três pontes de hidrogênios entre os resíduos Asp87, Glu222 e Gln223 (FIGURA 26 C-F), com a conservação das mesmas interações hidrofóbicas. Entretanto, no tempo de 10 ns (FIGURA 26 F), houve um aumento considerável no número de interações hidrofóbicas entre nPELa e o M13, com a participação de novos resíduos, como Glu222 e Phe134 (FIGURA 26 F).

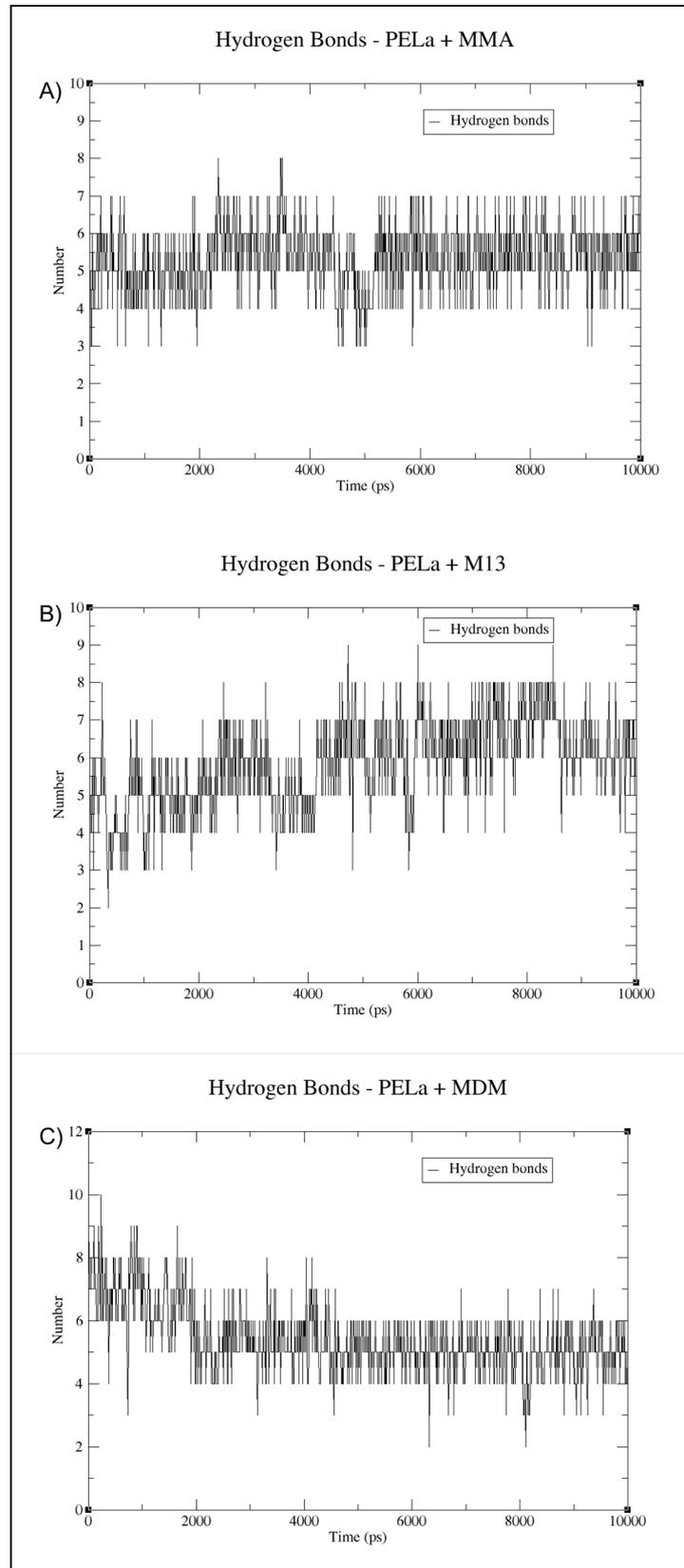
As interações entre nPELa + MDM no tempo 0 ns foram também semelhantes as observadas na estrutura cristalizada, com a participação de resíduos como Asp87, Gly107, Asn139, Gly221, Glu222, Gln 223 e Ser138, além da participação de interações hidrofóbicas através dos resíduos Ala86, Gly106 e Phe133 (FIGURA 27 A-B). Após o tempo de 5 e 10 ns, nPELa manteve interações com o MDM também através de três pontes de hidrogênios entre os resíduos Asp87, Glu222 e Gln223 (FIGURA 27 C-F), sendo as interações hidrofóbicas necessárias na estabilização do glicano diminuídas apenas a duas, entre os resíduos Ala86 e Gly221 (FIGURA 27 C-F).

Figura 23 – Resultados das simulações de dinâmica molecular entre nPELa isolada e complexada a diferentes ligantes (MMA, MDM, M13). A- Gráfico de RMSD resultante das simulações de dinâmica molecular para o esqueleto proteico de nPELa; B- Gráfico de RMSF resultante da dinâmica molecular para todos os resíduos constituintes de nPELa.



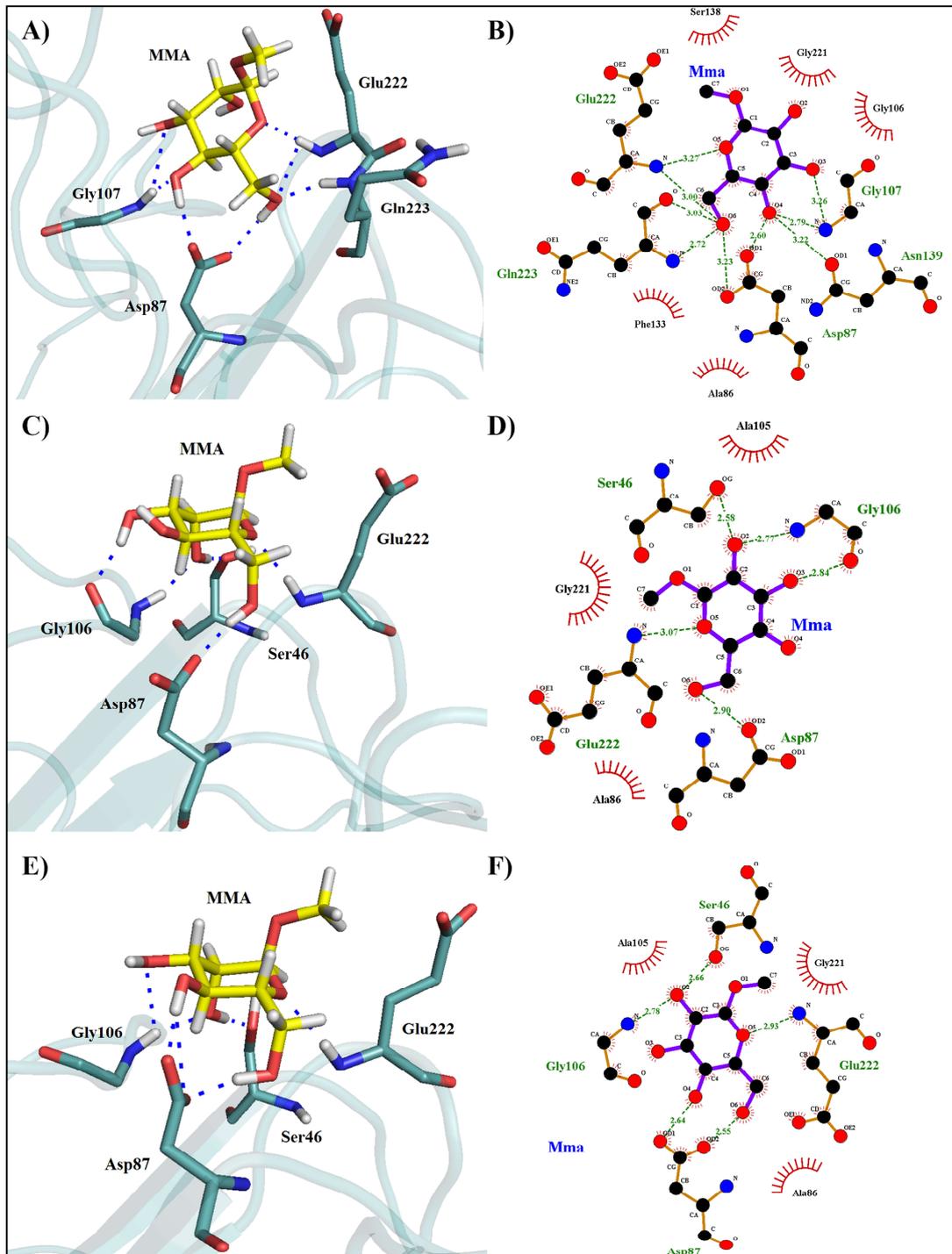
Fonte: Elaborado pelo autor via XMGRACE.

Figura 24 – Número de pontes de hidrogênio durante as simulações de dinâmica molecular entre a lectina e os diferentes açúcares. A- nPELa + MMA; B- nPELa + M13 e C- nPELa + MDM.



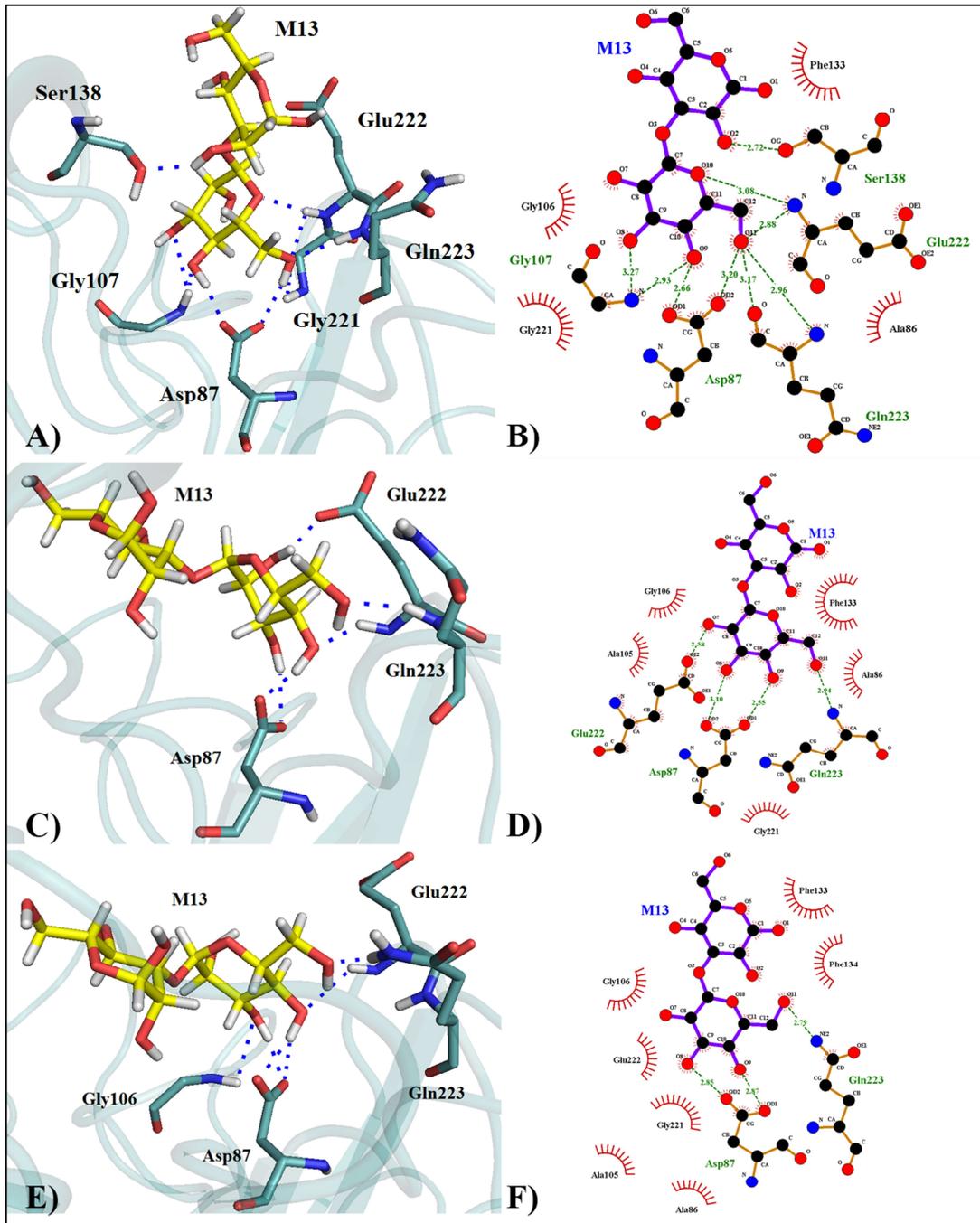
Fonte: Elaborado pelo autor via XMGRACE.

Figura 25 – Sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) de nPELa com MMA durante a simulação de dinâmica molecular. As linhas pontilhadas azuis representam os contatos polares. E as imagens obtidas via LigPLOT as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que estabilizam o MMA dentro do CRD. A e B) 0 ns; C e D) 5 ns; E e F) 10 ns.



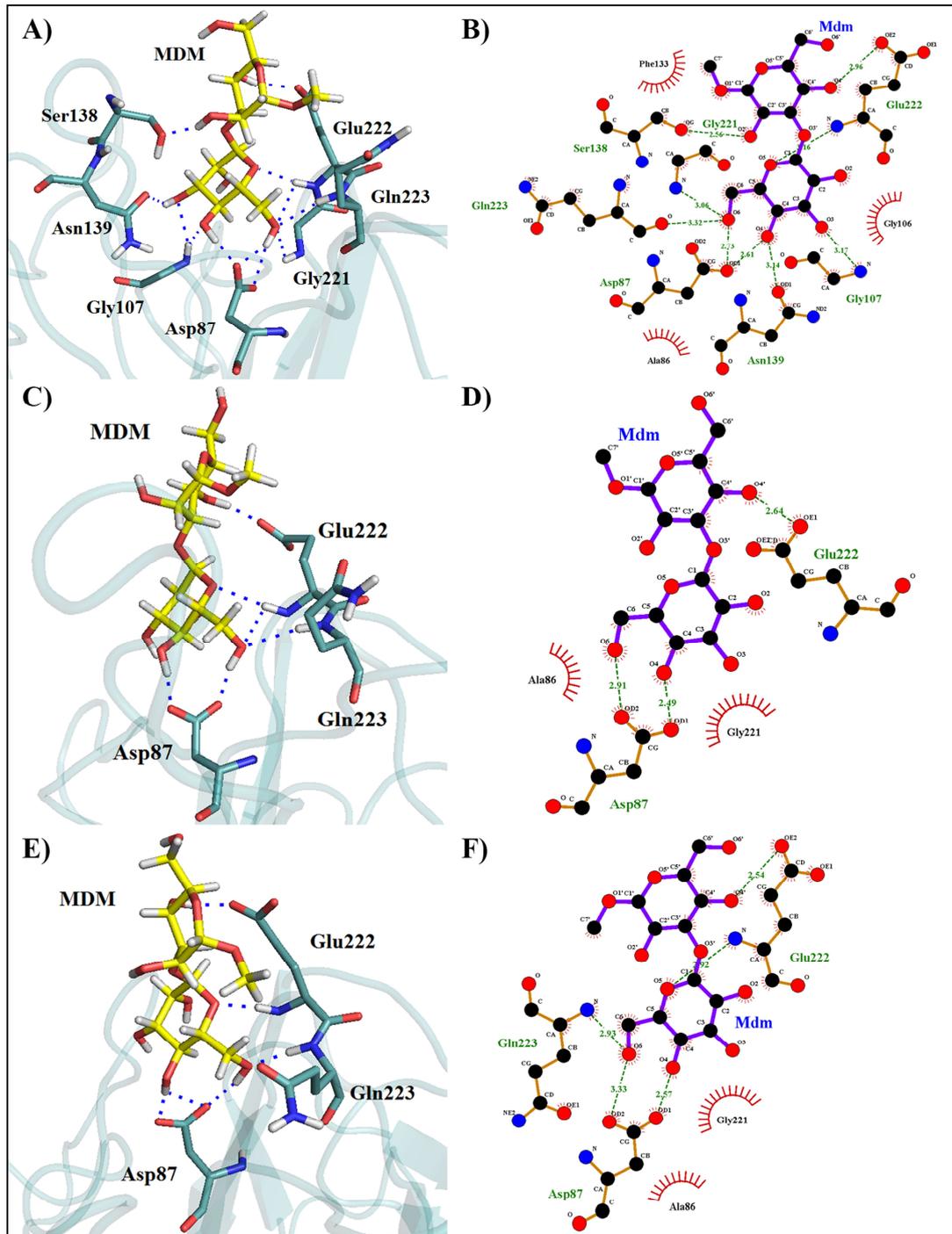
Fonte: Elaborado pelo autor via PyMOL e LIGPLOT.

Figura 26 – Sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) de nPELa com M13 durante a simulação de dinâmica molecular. As linhas pontilhadas azuis representam os contatos polares. E as imagens obtidas via LigPLOT as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que estabilizam o M13 dentro do CRD. A e B) 0 ns; C e D) 5 ns; E e F) 10 ns.



Fonte: Elaborado pelo autor via PyMOL e LIGPLOT.

Figura 27 – Sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) de nPELa com MDM durante a simulação de dinâmica molecular. As linhas pontilhadas azuis representam os contatos polares. E as imagens obtidas via LigPLOT as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que estabilizam o MDM dentro do CRD. A e B) 0 ns; C e D) 5 ns; E e F) 10 ns.



Fonte: Elaborado pelo autor via PyMOL e LIGPLOT.

A energia de livre de ligação entre nPELa e os glicanos MMA, M13 e MDM durante as simulações foram calculadas através do método de MM-PBSA. Os valores de energia livre de ligação obtidos para o MMA, M13 e MDM foram respectivamente de $-13,266 \pm 0,695$, $-28,529 \pm 0,646$ e $-25,347 \pm 0,737$ kJ/mol, o que demonstra uma afinidade maior de nPELa por dimanosídeos não-metilados, em detrimento dos resultados obtidos por docking molecular, que evidenciam um aumento no escore para glicanos metilados.

Os resultados obtidos também demonstram que a afinidade de nPELa por estes açúcares não foi tão alta, quando comparados aos resultados obtidos por PINTO-JUNIOR e colaboradores (2017) para a lectina de *Dioclea reflexa* em complexação ao Xman, que apresentou uma energia de $-44,832 \pm 2,5$ kJ/mol.

Os dados de MM-PBSA também permitem inferir as ligações que demonstraram maior participação na afinidade dos ligantes com nPELa, sendo as contribuições eletrostáticas mais representativas para os três ligantes estudados, com valores de $-153,672 \pm 1,243$ kJ/mol para MMA, $-127,830 \pm 0,701$ kJ/mol para MDM e $-158,887 \pm 1,134$ kJ/mol para M13. Assim como para a lectina Drfl (PINTO-JUNIOR et al., 2017), as energias de solvatações atuaram de maneira desfavorável, sendo de $200,539 \pm 1,243$ kJ/mol para MMA, $154,241 \pm 0,697$ kJ/mol para MDM e $187,673 \pm 1,243$ kJ/mol para M13.

5.4 Nociceção

Estudos anteriores demonstraram a participação de nPELa na inflamação, através da administração e.v. desta lectina, que não reverteu a inflamação induzida por carragenina. No entanto, quando isolada, nPELa induziu a formação de edema da pata e ativação de macrófagos em ratos (ARARIPE et al., 2017). Dessa forma, sabendo que a dor é um dos sinais cardinais da inflamação, o efeito nociceptivo de nPELa também foi avaliado neste trabalho.

nPELa (3, 30 e 300 µg/pata) aumentou a retirada da pata dos animais em resposta a estimulação mecânica com filamentos de von Frey em 2,1x (32,47 ± 3,8 AUC) na dose de 3 µg/pata, em 2,3 x (35,41 ± 2,6 AUC) na dose de 30 µg/pata e em 4,2x (64,99 ± 6,3 AUC) na dose de 300 µg/pata em comparação ao grupo salina (15,53 ± 1,4 AUC) (Figura 28A).

O efeito hipernociceptivo na maior dose (300 µg/pata) iniciou-se às 0,5 h, com efeito máximo na quarta hora (85,41 ± 4,26% vs. salina: 16,66 ± 9,96%) (Figura 28A,B). Este efeito hipernociceptivo de nPELa (64,25 ± 10,02) foi completamente abolido por sua associação com α-metil-manosídeo (α-CH₃) (24,25 ± 5,6%) e pelo pré-tratamento com indometacina (30,92 ± 5,33) (Figura 29A, B).

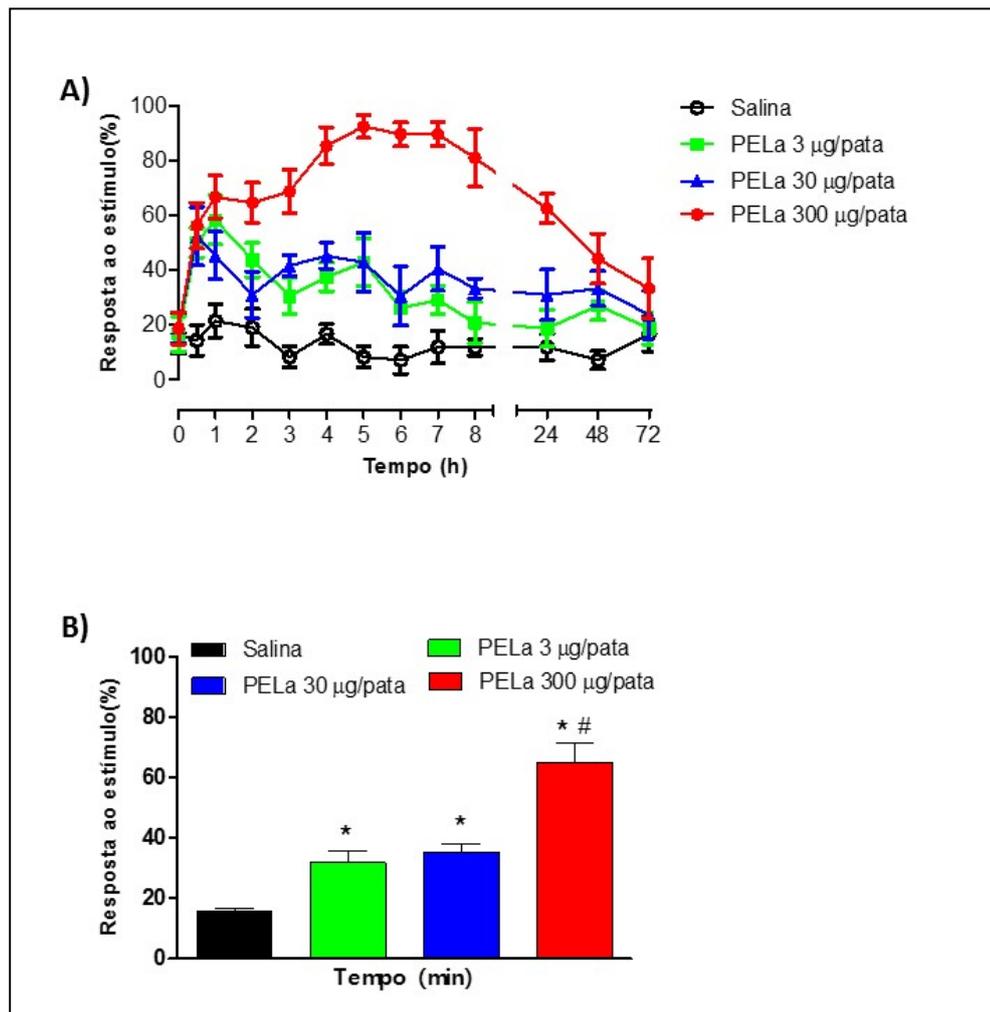
Diferentemente do observado neste estudo, a maioria das lectinas da tribo Dalbergieae têm demonstrado efeito antinociceptivo, como as lectinas de *Andira anthelmia* (NASCIMENTO et al., 2016), *Lonchocarpus araripensis* (AMORIM et al., 2016) e *Lonchocarpus sericeus* (NAPIMOGA et al., 2007).

Portanto, os resultados obtidos demonstraram que a lectina nativa de sementes de *Platypodium elegans* (nPELa) é a primeira lectina da tribo Dalbergieae a demonstrar atividade hipernociceptiva em ratos, de maneira dependente ao seu sítio de reconhecimento a carboidratos. O envolvimento do CRD já foi relatado em muitas atividades de lectinas, incluindo hipernociceção para a lectina de *Dioclea lasiophylla* (PINTO-JUNIOR et al., 2017).

Os principais mediadores responsáveis pela hipernociceção mecânica em ratos são os eicosanóides e aminas simpáticas (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; KHASAR et al, 1999). De fato, as prostaglandinas (PGs), além de promover a vasodilatação arteriolar, edema (DRAY, 1995) e febre, induzem hipernociceção estimulando a síntese de cAMP neuronal e sensibilizando os nociceptores (WEISENFELD-HALLIN; SODERSTEN, 1984). Neste trabalho, a inibição da via de

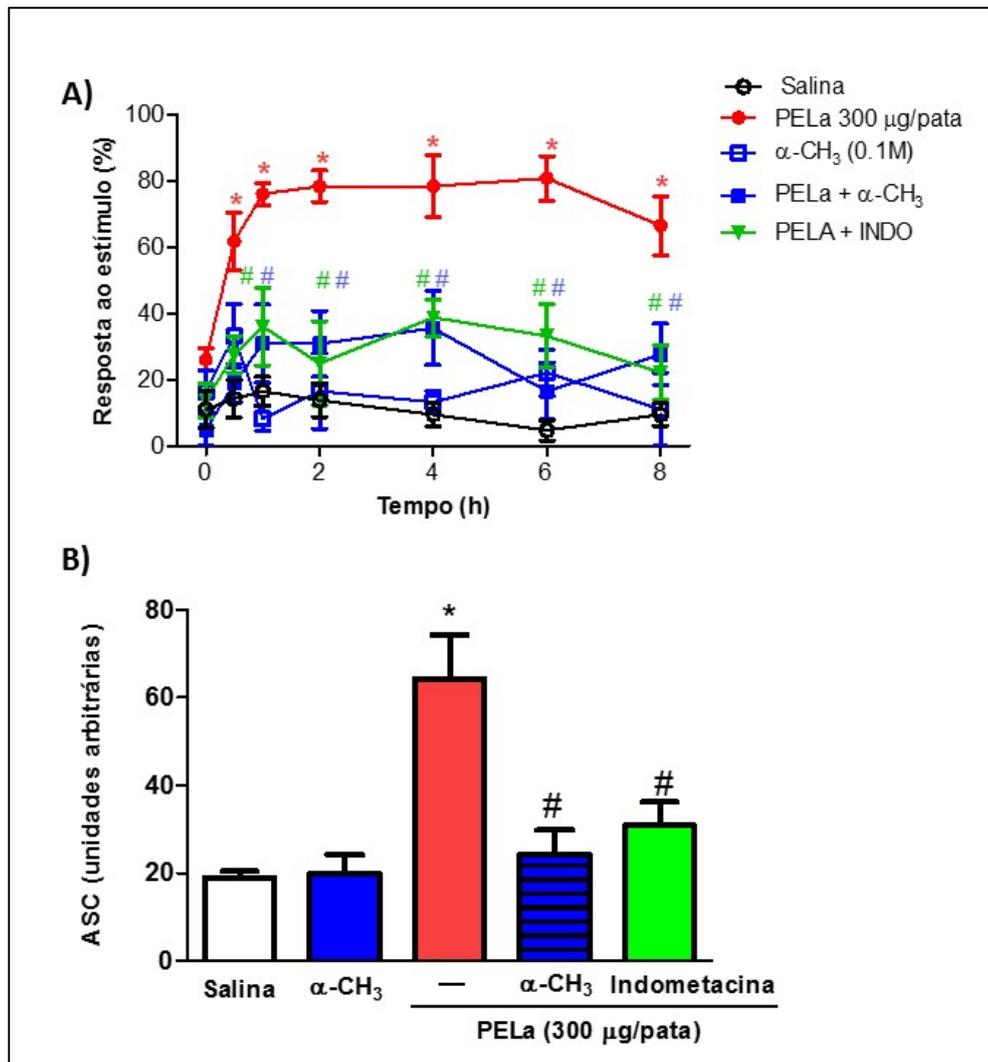
produção das prostaglandinas, a via das ciclooxigenases, através da administração prévia de indometacina, desencadeou a perda da atividade hipernociceptiva de nPELa. Portanto, é possível afirmar que nPELa induz a hipernocicepção via CRD e ciclooxigenase.

Figura 28 – nPELa possui efeito hipernociceptivo. PELA (3, 30, 300 $\mu\text{g/pata}$) ou salina foi administrada s.c. na pata direita traseira de camundongos. A) Curso temporal; B) Área sobre a curva (ASC). Média \pm E.P.M. (n=8). ANOVA e Bonferroni test. *p<0.05 vs. salina; #p<0.05 vs. nPELa.



Fonte: Elaborado pelo autor via Prisma 5.0.

Figura 29 – Efeito hipernociceptivo de nPELa ocorre com participação de CRD e prostaglandinas. Salina ou nPELa (300 $\mu\text{g/pata}$), sozinha ou associada ao α -metil-manosídeo ($\alpha\text{-CH}_3$) 0,1 M, foi administrada s.c. na pata direita traseira de camundongos. Os animais receberam indometacina (5 mg/kg, s.c.), 30 min antes da lectina. A) Curso temporal; B) Área sobre a curva (ASC). Média \pm E.P.M. (n=8). ANOVA e Bonferroni test. * $p < 0.05$ vs. salina; # $p < 0.05$ vs. nPELa.



Fonte: Elaborado pelo autor via Prisma 5.0.

6 CONCLUSÃO

A lectina nativa obtida a partir de sementes de *Platypodium elegans* (nPELa) foi cristalizada com sucesso e teve a sua estrutura tridimensional resolvida com alta resolução (1,6 Å). nPELa apresentou uma grande similaridade estrutural com outras lectinas da tribo Dalbergieae, com afinidade para diferentes manosídeos (α ou β), sendo preferencialmente estes formados por ligações do tipo α -1,3 ou α -1,6, demonstrado através de escores obtidos por simulações de docking molecular.

O comportamento estrutural de nPELa em solução, em associação a ligantes específicos, foi avaliado através de simulações de dinâmica molecular em sistema aquoso. Estes resultados demonstraram a alta estabilidade de nPELa em solução e a versatilidade estrutural de seu sítio de reconhecimento a carboidratos, que demonstrou variações consideráveis na composição dos resíduos participantes, como forma de assegurar a ligação da lectina com os diferentes açúcares. As modificações no sítio incluíram variações no número de resíduos envolvidos na formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Além disso, nPELa é a primeira lectina da tribo Dalbergieae que apresentou atividade hipernociceptiva em ratos, de maneira dependente ao seu sítio de reconhecimento a carboidratos.

REFERÊNCIAS

ABERGEL, C. Molecular replacement: tricks and treats. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 69, p. 2167-2173, 2013.

ABRAHAM, M. J.; MURTOLO, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, B. H.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **Software X.**, v. 1-2, p. 19-25, 2015.

ACHARYA, K. R.; LLOYD, M. D. The advantages and limitations of protein crystal structures. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 10–14, 2005.

ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Cryst.**, v. 66, p. 213-221, 2010.

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

ALENCAR, N. M. N. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 919–22, 2005.

ALENCAR, N. M. N. et al. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, n. 4, p. 275–282, 2007.

ALMEIDA, ALYSSON CHAVES. **Caraterização estrutural e biológica de uma lectina de sementes de *Centrolobium tomentosum* GUILL. EX BENTH.** Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

ALMEIDA, A. C. et al. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Centrolobium tomentosum* Guill. ex Benth seeds exhibiting low toxicity on *Artemia* sp. **International Journal of Indigenous Medical Plants**. v. 47, p. 1547-1577, 2014.

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

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, 2006.

AMORIM, R. M. F. et al. The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na⁺ currents. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 701–708, 2016.

ANDRÉ, S. et al. Lectins: Getting familiar with translators of the sugar code.

Molecules, v. 20, n. 2, p. 1788–1823, 2015.

ARARIPE, D. A. et al. Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 102, p. 323–330, 2017.

BARI, A. U. et al. Lectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 194–201, 2016.

BENEVIDES, R. G. et al. A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 26352-26364, 2012.

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

BERENDSEN, H. J. C. , VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Comp. Phys. Comm**, v. 91, p. 43 -56, 1995.

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

BEZERRA, D. P. et al. Purificação de uma lectina presente em sementes de *Machaerium acutifolium*. Anais da XXVI Reunião Nordestina de Botânica, In: **XXVI Reunião Nordestina de Botânica**, Fortaleza, 2003.

BITENCOURT, F.S.; FIGUEIREDO, J.G.; MOTA, M.R.L.; BEZERRA, C.C.R.; SILVESTRE, P.P.; VALE, M.R.; NASCIMENTO, K.S. ; SAMPAIO, A.H. ; NAGANO, C.S. ; SAKER-SAMPAIO, S. ; FARIAS, W.R.L. ; CAVADA, B.S. ; ASSREUY, A.M.S. ; ALENCAR, N.M.N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Fortaleza, v. 377, n. 2, p. 139-48, 2008.

BLUNDELL, T. L.; JOHNSON, L.N. Protein crystallography. **Academic Press**. USA, 1976.

BROEKAERT, W. F. et al. A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. **Science**, v. 245, n. 4922, p. 1988–1990, 1989.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, n. 1, p. 335–373, 2003.

BRUNEAU, A. et al. Legume phylogeny and classification in the 21st century : progress , prospects and lessons for other species-rich clades Legume phylogeny

and classification in the 21st century : Progress , prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217–248, 2013.

BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, v. 355, p. 472-475, 1992.

CARDOSO, D. et al. Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 58–75, 2013.

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

CARTER, C. W. JR.; CARTER, C. W. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 12219, 1979.

CAVADA, B. S. et al. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkya platycephala* seeds. **The FEBS Journal**., v. 273, p. 3962-3974, 2006.

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

CHEN, V. B., BRYAN, A. W., HEADD, J. J., KEEDY, D. A., IMMORMINO, R.M., KAPRAL, G. J., MURRAY, L. W., RICHARDSON, J. S., RICHARDSON, D. C. Molprobity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica D**, 66, 12-21, 2010.

CUNHA, T. M.; VERRI JR, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz Jour of Med and Biol Research**, v. 37, p.401-407, 2004.

DAM, T. K. et al. Binding studies of alpha-GalNac-specific lectins to the alpha-GalNac (Tn-antigen) from of porcine submaxillary mucin and its smaller fragments. **The Journal of biological chemistry**., v. 282, p. 28256-28263, 2007.

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. 221–247, mar. 2016.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N-log (N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chem Phy**, v.98 , p. 10089, 1993.

DE HOFF, P. L.; BRILL, L. M.; HIRSCH, A. M. Plant lectins: The ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 1, p. 1–15, 2009.

DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. **DeLano Scientific**, San

Carlos, CA, USA, 2002.

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

DOMINGOS, G. F. O. M.; **A lectina de Vatairea guianensis induz inflamação aguda que envolve mediadores derivados de macrófagos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Instituto Superior de Ciências Médicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2014.

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, London, v.15, p.190-197, 1994.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, n. 1, p. 71, 2011.

DUCRUIX, A.; GIEGE, R. Crystallization of nucleic acids and proteins. A practical approach. **Oxford University Press**, 435p., 1992.

EMSLEY, B. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallogr. D**, v. 66, p. 486-501, 2010.

EVANS, P. R. "Data reduction", Proceedings of CCP4 Study Weekend, **Data Collection & Processing**, 114-122, 1993.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I-Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, v. 18, p-179-90, 1979.

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

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

FLORA DO BRASIL 2020. *Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23124>>. Acesso em: 23 Abr. 2017.

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

GABIUS, H.-J. Glycans: bioactive signals decoded by lectins. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 6, p. 1491–6, 2008.

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

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A. Glycobiology Review: Carbohydrates, Lectins, and Implications in Cancer Therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 236, 2011.

GILSON, M; K.; SHARP, K. A.; HONIG, B. H. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: Method and error assessment. **Journal of Comp. Chem.**, v. 9, p.327-335, 1988.

GOLDSTEIN, I. J. Lectin structure-activity: The story is never over. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 6583–6585, 2002.

GONÇALVES, F. M. et al. Vatairea macrocarpa lectin (VML) induces depressive-like behavior and expression of neuroinflammatory markers in mice. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 11, p. 2375–2384, 2013.

HAMELRYCK, T. W. et al. Properties and structure of the legume lectin family. **Trends in Glycoscience and Glycobiology**, v. 10, p. 349-404, 1998.

HAMPEL, A., LABANANSKAS, M., CORNNERS, P. G., KIRKEGARD, L., RAJBHANDARY, U. L., SIGLER, P. B., AND BOCK, R. M. Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNA's. **Science**, 162, 1384, 1968.

HARVEY, M. J.; DE FABRITIIS, G. High-throughput molecular dynamics: The powerful new tool for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 19–20, p. 1059–1062, 2012.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Comp Chem.**, v. 18, p. 1463-1472, 1997.

HOLTON, J. M. et al. The R-factor gap in macromolecular crystallography: an untapped potential for insights on accurate structures. **FEBS J.**, v. 281, p. 4046-4060, 2014.

INGALE, A. .; HIVRALE, A. . Plant as a plenteous reserve of lectin. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 12, p. e26595, 2013.

JACQUES, A. V.; **Avaliação do efeito neuroprotetor de lectinas frente à neurotoxicidade glutamatérgica**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

JANCARICK, J.; KIM, S. H. Sparse-matrix sampling - A screening method for crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.** 24, 409-411, 1991.

JOUBERT, F. J. SHARON, N; MERRIFIELD, E. H. Purification and properties of a lectin from *Lonchocarpus capassa* (apple-leaf) seed. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 323-327, 1986.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KARPLUS, M.; MCCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations of biomolecules. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 9, p. 646–652, 2002.

KHASAR, S. G.; LIN, Y. H.; DADGAR, J.; MCCAMON, T.; WANG, D.; HUNDLE, B.; ALEY, K. O.; ISENBERG, W.; MCCARTER, G.; GREEN, P. G.; HODGE, C. W.; LEVINE, J. D., MESSING, R. O. A novel nociceptor signalling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron.**, v.24, p. 253-60, 1999.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KOMATH, S. S.; KAVITHA, M.; SWAMY, M. J. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & biomolecular chemistry**, v. 4, n. 6, p. 973–988, 2006.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. **Journal of Chem. Inform. and Modeling.**, v. 49, p. 84-86, 2009.

KOZIARA, K. B.; STROET, M.; MALDE, A. K.; MARK, A. E. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: prediction of hydration free enthalpies. **J Compuy Aided Mol Des.**, v.28 (3), p. 221-33, 2014.

KUMAR, K. K. et al. Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

KUMARI, R.; KUMAR, R. g_mmpdsa- A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chem. Infor. and Model**, v. 54 (7), p. 1951-1962, 2014.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural protein during the assembly of the bacteriophage t4, **Nature**, 227, 680-685, 1970.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1800, n. 2, p. 190–201, 2010.

LAVIN, M. et al. The dalbergioid legumes (fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 3, p. 503–533, 2001.

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

LESLIE, A.; POWELL, H. Processing diffraction data with mosflm. **Evolving Methods for macromolecular crystallography**, v. 245, p. 41-51, 2007.

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

LORENZI, H. Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, 368p, 1998.

LORIS, R. et al. Crystal structure of Pterocarpus angolensis lectin in complex with glucose, sucrose, and turanose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 16297–16303, 2003.

LORIS, R. et al. Structural Basis of Oligomannose Recognition by the Pterocarpus angolensis Seed Lectin. **Journal of Molecular Biology**, v. 335, n. 5, p. 1227–1240, 2004.

LOSSIO, F. C. et al. Isolation, purification and partial physicochemical characterization of a lectin in *Andira pisonis* Mart seed. **BMC Proceedings**, v. 8., p. 226, 2014.

LOTAN, R. et al. The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*). **The Journal of biological chemistry**, v. 250, n. 21, p. 8518–8523, 1975.

MANN, K.; FARIAS, C. M. A.; GALLEGOS DEL SOL, F.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J. The amino-acid sequence of the glucose/manose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveal three tandemly arranged jacalin related domains. *Eur. J. Biochem.*, v. 218, p. 4414-4422, 2001.

MANOJ, N. SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Eng.**, 14, 735–745, 2001.

MARANHÃO, P. A. C. et al. cDNA cloning, molecular modeling and docking calculations of L -type lectins from *Swartzia simplex* var. *grandiflora* (Leguminosae, Papilionoideae), a member of the tribe Swartzieae. **Phytochemistry**, v. 139, p. 60–71, 2017.

MARONDEDZE, C.; CHIDZWONDO, F.; SITHOLE-NIANG, I.; READ, J. S. ***Pterocarpus angolensis* lectin gene**. Submitted to the EMBL/GenBank/DBJ databases, 2004.

MARTINS, A. M. C. et al. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 10, p. 1329–33, 2005.

MCPHERSON, A.; GAVIRA, J. A. Introduction to protein crystallization. **Acta**

Crystallographica Section F: Structural Biology Communications, v. 70, n. 1, p. 2–20, 2004.

MELZACK, R.; LOESER, J. D. Pain: an overview. **Pain**, Seattle, v. 353, p.1607-1609, 1999.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, Paris, v.57, p. 1-164,1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, Paris, v.66, p.355-474, 2002.

MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–57, 2011.

MISLOVIČOVÁ, D. et al. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, n. 1, p. 1–19, 2009.

MORRIS, D. M. et al. Extending the range of pentasubstituted cyclopentadienyl compounds: The synthesis of a series of tetramethyl (alkyl or aryl) cyclopentadienes (Cp^R), their iridium complexes and their catalytic activity for asymmetric transfer hydrogenation. **Polyhedron**, v. 84, p. 120-135, 2014.

MURSHUDOV, G. et al. Refmac5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica D**, v. 67, p. 335-367, 2011.

NAGANO, C. S. et al. Insights in to the structural basis pf the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochem. J.** v. 409, p. 417-428, 2008.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinamica molecular: Teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13–24, 2008.

NAPIMOGA, M. H. et al. Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 824–835, 2007.

NASCIMENTO et al. Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 248-252, 2016.

NASCIMENTO, K. S. et al. An overview of lectins purification strategies. **Journal of molecular recognition : JMR**, v. 25, n. 11, p. 527–41, nov. 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: [s.n.], 2014.

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

Juazeiro do Norte, v. 40, p. 127-34, 2007.

NGUYEN, C. T. et al. Computational analysis of the ligand binding site of the extracellular ATP receptor, DORN1. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–20, 2016.

NOBRE, C. B. **Caracterização físico-química e efeito sobre bactérias orais de uma lectina de sementes de *Andira surinamensis* (Bondt) Splitg. ex Amshoff**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

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

PARRINELO, M.; RAHMAN, A. Crystal structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics study. **Phys. Rev. Lett.**, v. 45, p. 1196, 1980.

PEREIRA-JUNIOR, F. N. et al. Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, p.443-449, 2012.

PEREIRA-JUNIOR, F. N. **Purificação, caracterização parcial e cristalização de uma lectina ligante de manose/N-acetil-D-glicosamina das sementes de *Platymiscium floribundum* Vogel**. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins; versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-227, 1998.

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

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. 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. et al. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. **Biochimie**, v. 135, p. 126–136, 2017b.

PIRES, A. F. et al. Atividade antiinflamatória da lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis*. **3ª Reunião Regional FESBE**, Fortaleza, CE, 2008.

POL-FACHIN, L. Insights into the effects of glycosylation and the monosaccharide-binding activity of the plant lectin CrataBL. **Glycoconjugate journal**, 15 mar. 2017.

- POVINELI, KLFILHO, F. F. As múltiplas funções das lectinas vegetais. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.**, v. 24, p. 135–156, 2002.
- PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 2013.
- PUSTZAI, A. Plant lectins. **Cambridge University Press**. Cambridge, 1991.
- RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. *Curr. Opin. Neurobiol.*, Quebec , v.12, p.195-204, 2002.
- RAMOS, M. V., BOMFIM, L. R., CAVADA, B. S., ALENCAR, N. M. N., GRANGEIRO, T., DEBRAY, H. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. *Protein Peptide Letters*, 7, 241-248, 2000.
- RANGEL, T. B. A. et al. Isolamento e caracterização parcial de lectina proveniente de sementes da espécie vegetal *Andira fraxinifolia* (*Leguminosae- Fabaceae*). **Anais/ Resumos da 61º Reunião Anual da SBPC**, issn 2176-1221, 2009.
- RAVISHANKAR, R. et al. **Crystal structure of the peanut lectin - T-antigen complex. Carbohydrate specificity generated by water bridges***Current Science*, 1997.
- READ, R. J. et al. New generation of crystallographic validation tools for the protein data bank. **Structure**, v. 19, p. 1395-1412, 2011.
- RODRIGUEZ-ARANGO, E. et al. Cloning , sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the eDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. **DNA Sequence**, v. 307, n. 2, p. 185–189, 1992.
- SALSBURY, F. R. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, n. 6, p. 738–744, 2010.
- SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **JMR. Journal of Molecular Recognition**. v. 27, p. 117-123, 2014.
- SÃO-MATEUS, W. M. B. et al. Papilionoideae (Leguminosae) na Mata Atlântica do Rio Grande do Norte , Brasil Introdução Material e Métodos. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 4, p. 315–362, 2013.
- SCHMID, N.; EICHENBERGER, A. P.; CHOUTKO, A.; RINIKER, S.; WINGER, M.; MARK, A. E.; VAN GUSTEREN, W. F. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 AND 54B7. **Eur Biophys J.**, v. 40 (7), p. 843-56, 2011.
- SHARMA, V.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor- associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21209–21213,

1996.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J. Biol.Chem.**, v.282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.

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

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, v. 268, n.3, 12 p., 1993.

SILVA, H. C. et al. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2347–2355, 2012.

SINGH, H.; SARATHI, S. P. Insight of Lectins- A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 3, n. 4, p. 1–9, 2012.

SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 318 (4), p. 1057-1065, 2004.

SINHA, S. et al. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 5, p. 498–505, 2007.

SMITH, M. S.; MARTIN, J. H. J. X Ray crystallography. **Mol. Pathol.**, v. 53, n.1, p. 8-14, 2000.

SOUSA, B. L. et al. High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 59, n. 1, p. 103–110, 2015.

SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1527, p. 102-111, 2001

ŠULÁK, O. et al. *Burkholderia cenocepacia* bc2I-c is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, 2011.

TAYLOR, M.; DRICKAMER, K. Introduction to Glycobiology. **Oxford University Press**, Oxford, 207 p., 2003.

TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002.

TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, v. 27, n. 4, p. R129–R133, 2017.
VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p.

1538–1550, 2011.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectin: A composite of several distinct families of structural and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Ver. Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European journal of biochemistry**, v. 236, p. 419-427, 1996.

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

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

VARGIN, A., TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **J. Appl. Crystallographica**, v. 30, p. 1002-1025, 1997.

VASCONCELOS, M. A. et al. Purification and primary structure of a novel mannose-specific lectin from *Centrolobium microchaete* Mart seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 600-607, 2015.

VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C. M.; Protein Dynamics: Moore's Law in Molecular Biology. **Current Biology**, v. 21, p. 68-70, 2011.

VERLI et al. **Bioinformática: da Biologia Molecular à Flexibilidade Molecular**. Centro de Biotecnologia, UFRGS, 2014.

VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A. S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 3, p. 213–220, 2014.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Prot. Eng.*, v. 8, p. 127-134, 1996.

WIESENFIELD-HALLIN, Z.; SODERSTEN, P. Spinal opiates affect sexual behaviour in rats. **Nature.**, v. 17-23; p. 257-8, 1984.

WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica D**, v. 67, p. 235-242, 2011.

WLODAWER, A. et al. Protein crystallography for aspiring crystallographers, or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. **FEBS J.**, v. 280, p. 5705-5736, 2013.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Towards a new classification of Leguminosae: Naming clades using non-Linnaean phylogenetic nomenclature. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 85–93, 2013.

WOOH, J. W. et al. Comparison of three commercial sparse-matrix crystallization screens. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 59, p. 769-772, 2003.

WONG, J. H. et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1221–1235, 2010.

YAN, J. et al. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 4961–4981, 2015.

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

YURIEV, E.; HOLIEN, J.; RAMSLAND, P. A. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review. **Journal of Molecular Recognition**, v. 28, n. 10, p. 581–604, 2015.

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