



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

**ADOLPH ANNDERSON GONÇALVES COSTA BARRETO**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MODELAGEM MOLECULAR E**  
**INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA LECTINA CRLII EM PROCESSOS**  
**INFLAMATÓRIOS E DO POTENCIAL ANTITUMORAL DAS LECTINAS CRLI E**  
**CRLII.**

**FORTALEZA**

**2017**

ADOLPH ANNDERSON GONÇALVES COSTA BARRETO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MODELAGEM MOLECULAR E  
INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA LECTINA CRLII EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E  
DO POTENCIAL ANTITUMORAL DAS LECTINAS CRLI E CRLII.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Coorientadora: Profa. 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)

---

- B26c Barreto, Adolph Annderson Gonçalves Costa.  
Caracterização físico-química, modelagem molecular e investigação da ação da lectina CRLII em processos inflamatórios e do potencial antitumoral das lectinas CRLI e CRLII. / Adolph Annderson Gonçalves Costa Barreto. – 2017.  
101 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal.  
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

1. Lectina. 2. Cymbosema roseum. 3. Modelagem Molecular. 4. Anti-inflamatório. 5. Glioma. I. Título.

CDD 660.6

ADOLPH ANNDERSON GONÇALVES COSTA BARRETO

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MODELAGEM MOLECULAR E  
INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DA LECTINA CRLII EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS E  
DO POTENCIAL ANTITUMORAL DAS LECTINAS CRLI E CRLII.

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Coorientadora: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Orientador)  
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

---

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

---

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

---

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

A Comunidade Científica.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida guiando meus passos e dando forças para vencer as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal por ter aceitado ser meu orientador durante o Mestrado pela imensa dedicação, preocupação, compreensão, entusiasmo, confiança e ensinamentos em todos os momentos.

Aos professores Dra. Kyria Santiago do Nascimento e Dr. Benildo de Sousa Cavada pela oportunidade de mais uma vez poder fazer parte do laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas-BioMol, por incentivar e permitir o desenvolvimento, aprendizado e ensino da ciência no laboratório.

A todos os componentes do laboratório de Neuroquímica 3- Transdução de Sinal no Sistema Nervoso Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em especial Ana Paula e Ingrid, pela acolhida e contribuição no desenvolvimento desse trabalho, pelos momentos de aprendizagem e por todas as histórias e momentos de alegria que tivemos durante minha estadia.

Aos meus companheiros de bancada e colegas do BioMol pelas contribuições no desenvolvimento desse trabalho, pelos cafés da tarde e por tantos os momentos de alegria e partilha.

Aos meus amigos de graduação e laboratório Vanir, Mayara e Vinícius por serem essas pessoas incríveis que sempre buscam ajudar, ensinar e contribuir para o crescimento científico e pessoal de todos. Por todos os momentos em que vocês contribuíram com novos horizontes e perspectivas nos meus momentos de indecisão ou excesso de cautela em situações triviais e de trabalho e por todas as boas lembranças que poderei levar comigo de todos os momentos que partilhamos.

A minha família por me apoiar e incentivar durante toda a minha caminhada estudantil e em mais uma etapa da minha vida.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse momento.

A coordenação do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais.

A CAPES pelo apoio financeiro.

“O prazer mais nobre é a alegria da compreensão”.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

Lectinas são proteínas de origem não-imune que possuem pelo menos um sítio não catalítico capaz de reconhecer carboidratos de forma específica e reversível sem alterar a estrutura dessas moléculas. Essas proteínas estão vastamente distribuídas na natureza sendo encontradas em micro-organismos, animais invertebrados e vertebrados e em plantas. Em vegetais, as lectinas podem estar presentes em raízes, caules, folhas, frutos e sementes, onde são geralmente expressas em maior concentração. As lectinas vegetais mais bem estudadas são aquelas encontradas na família das leguminosas, merecendo destaque a subtribo *Diocleinae*, cujas lectinas apresentam um processamento pós-traducional peculiar, caracterizado por uma cadeia alfa formada pela junção e inversão dos fragmentos beta e gama. A literatura relata muitas aplicações biotecnológicas para diferentes lectinas vegetais, por exemplo atividade antimicrobiana, antidepressiva, pró e anti-inflamatória, indução de proliferação e morte celular, atividade anticancerígena, dentre outras. É importante ressaltar que, embora existam lectinas extremamente relacionadas estruturalmente, elas se comportam de maneira muito diferente quando comparadas em termos de potência na avaliação de uma dada atividade biológica. Dessa forma, investigar novas lectinas e seu potencial biotecnológico é de enorme valia no que diz respeito à descoberta de novas ferramentas que possam ser utilizados em diferentes modelos biológicos, no diagnóstico e/ou terapêutica nas diversas enfermidades que afligem a saúde humana, vegetal e animal. Neste contexto, este trabalho objetivou caracterizar físico-quimicamente, determinar a estrutura tridimensional e avaliar as atividades pró-inflamatória, anti-inflamatória e antiglioma da lectina lactose específica *Cymbosema roseum* (CRLII), bem como, avaliar a atividade antiglioma da lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRLI) purificadas a partir das sementes dessa planta. CRLII apresentou atividade hemaglutinante (A.H.) ótima em solução tampão com pH entre 6 e 8, termoestabilidade até 40°C e estrutura tridimensional modelada apresentou semelhança com a lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML). Quanto ao potencial biotecnológico em inflamação, CRLII apresentou atividade anti-inflamatória via sítio de reconhecimento de carboidratos (CRD) mostrando maior efeito na quarta hora. CRLII não apresentou atividade pró-inflamatória. Nos testes em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6, CRLII não demonstrou capacidade de reduzir a viabilidade, a migração ou causar alterações na morfologia e fisiologia nas células testadas, ao contrário de CRLI que reduziu a viabilidade e migração das células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 evidenciando necrose e apoptose como mecanismos de morte



celular. Novas investigações devem ser realizadas a fim de melhor explicar esses efeitos e de se estabelecer correlações estrutura/função.

**Palavras-chave:** Lectina. *Cymbosema roseum*. Modelagem molecular. Anti-inflamatório. Glioma.

## ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immune origin that have at least one non-catalytic site capable of recognizing carbohydrates in a specific and reversible manner without altering the structure of these molecules. These proteins are widely distributed in nature being found in microorganisms, invertebrate and vertebrate animals and in plants. In vegetables, lectins may be present in roots, stems, leaves, fruits and in seeds, where they are generally expressed in higher concentration. The most studied vegetable lectins are those found in the legume family in which is worth mentioning the subtribe Diocleinae, whose lectins present a peculiar post-translational processing, is characterized by an alpha chain formed by the junction and inversion of the beta and gamma fragments. The literature reports many biotechnological applications for different plant lectins, for example antimicrobial activity, antidepressive, pro and anti-inflammatory, induction of proliferation and cell death, anticancer activity among others. It is important to note that, although lectins are extremely structurally related, they behave very differently when compared in terms of potency in the evaluation of a given biological activity. In this way, investigating new lectins and their biotechnological potential is of enormous value in the discovery of new tools that can be used in different biological models, in the diagnosis and/or therapeutics in the various diseases that afflict human, vegetal and animal health. In this context, this work aimed to characterize physicochemically, to determine the three-dimensional structure and to evaluate the pro-inflammatory, anti-inflammatory and antiglioma activities of the specific lectin lactose *Cymbosema roseum* (CRLII), as well as to evaluate the antiglioma activity of the lectin specific mannose of *Cymbosema roseum* (CRLI) isolated from this plant seeds. CRLII presented optimum hemagglutinating activity (A.H.) in buffer solution with pH between 6 and 8, thermostability up to 40 ° C and the three-dimensional modeled structure presented similarity with the lectin from *Vatairea macrocarpa* (VML). Regarding the biotechnological potential in inflammation, CRLII showed anti-inflammatory activity via carbohydrate recognition domain (CRD) showing greater effect in the fourth hour. CRLII did not present pro-inflammatory activity. In tests on C6 lineage of *Rattus norvegicus* glioma cells, CRLII showed no ability to reduce viability, migration or cause changes in morphology and physiology in the cells tested, unlike CRLI which reduced the viability and migration of C6 lineage of *Rattus norvegicus* glioma cells line evidencing necrosis and apoptosis as mechanisms of cell death. New investigations must be carried out in order to better explain these effects and to establish structure / function correlations.

**Keywords:** Lectin. *Cymbosema roseum*. Molecular modelling. Anti-inflammatory. Glioma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do monômero de uma lectina de família <i>Leguminosae</i> .....	24
Figura 2 – Etapas da permutação circular.....	25
Figura 3 – Flor, desenho da planta e sementes de <i>Cymbosema roseum</i> .....	26
Figura 4 – Estrutura tridimensional de CRLI.....	27
Figura 5 – Processo inflamatório: alterações teciduais.....	31
Figura 6 – Recrutamento de leucócitos.....	32
Figura 7 – Cromatograma e SDS-PAGE CRLI.....	49
Figura 8 – Cromatograma e SDS-PAGE CRLII.....	50
Figura 9 – Influência do pH na estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII.....	51
Figura 10 – Termoestabilidade de CRLII.....	52
Figura 11 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de CRLII com lectinas da família <i>Leguminosae</i> .....	53
Figura 12 – Parâmetros utilizados para a escolha do melhor modelo para representar a estrutura tridimensional de CRLII.....	56
Figura 13 – Monômero de CRLII.....	57
Figura 14 – Estrutura quaternária de CRLII.....	58
Figura 15 – LIGPLOT e representação do sítio de ligação a metais de CRLII.....	59
Figura 16 – LIGPLOT e representação do CRD de CRLII com <i>N</i> -acetil-D-galactosamina.....	60
Figura 17 – LIGPLOT e representação do CRD de CRLII com $\alpha$ -lactose.....	61
Figura 18 – Atividade pró-inflamatória de CRLII.....	62
Figura 19 – Atividade anti-inflamatória de CRLII.....	63
Figura 20 – Análise morfológica de C6 tratada com CRLII por 24h.....	64
Figura 21 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLII por 24h.....	65
Figura 22 – Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLII por 48h.....	66
Figura 23 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLII por 48h.....	67
Figura 24 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLII por 24 e 48h.....	68
Figura 25 – Imagens da análise do efeito de CRLII na migração da linhagem C6 nos tempos 0, 24 e 48h.....	69
Figura 26 – Análise do efeito de CRLII na migração celular da linhagem C6.....	70

Figura 27– Marcação de fluorescência com laranja de acridina após tratamento por 24h com CRLII.....	71
Figura 28 – Marcação de fluorescência com iodeto de propídio e Hoechst após tratamento por 24h com CRLII.....	73
Figura 29 – Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLI por 24h.....	75
Figura 30 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLI por 24h.....	76
Figura 31 – Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLI por 48h.....	77
Figura 32 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLI por 48h.....	78
Figura 33 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLI por 24 e 48h.....	79
Figura 34 – Imagens da análise do efeito de CRLI na migração da linhagem C6 nos tempos 0,24 e 48h.....	80
Figura 35 – Análise do efeito de CRLI na migração celular da linhagem C6.....	81
Figura 36 – Marcação de fluorescência com laranja de acridina após tratamento por 24h com CRLI .....	82
Figura 37 – Marcação de fluorescência com iodeto de propídio e Hoechst após tratamento por 24h com CRLI.....	84

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Lectinas com maior similaridade a CRLII.....	54
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local.
C6	Linhagem de células de glioma de <i>Rattus norvegicus</i> .
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio.
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformes</i> .
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> .
ConGF	Lectina de <i>Canavalia grandiflora</i>
CRLI	Lectina manose específica de <i>Cymbosema roseum</i> .
CRLII	Lectina lactose específica de <i>Cymbosema roseum</i> .
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
CTL	Lectina de <i>Centrolobium tomentosum</i>
ConV	Lectina de <i>Canavalia virosa</i>
CoxyL	Lectina de <i>Canavalia oxyphylla</i>
kDa	KiloDalton
DGL	Lectina de <i>Dioclea guianensis</i> .
DguiL	Lectina de <i>Dioclea guianensis</i>
DMEM	Meio de cultura modificado Dulbecco-Eagle (Deulbecco Modified Eagle Medium).
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DOPE	Energia Discreta Otimizada de Proteína (Discrete Optimized Protein Energy).
DRL	Lectina de <i>Dioclea rostrata</i>
DSL	Lectina de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
DvirL	Lectina de <i>Dioclea virgata</i>

DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
DwL	Lectina de <i>Dioclea wilsonii</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
E.P.M	Erro padrão da média
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina etanosulfônico.
IA	Iodeto de propídeo.
KCl	Cloreto de potássio.
LA	Laranja de acridina.
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio.
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de manganês.
Molpdf	Função objetiva do <i>MODELLER</i> .
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
NaCl	Cloreto de sódio.
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center of Biotechnology Information).
PBS	Tampão fosfato salino.
PDB	Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank).
PSI-BLAST	Escore de posição específica – ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local.
RPM	Rotações por minuto.
Rob	Lectina de <i>Robinia pseudoacacia</i> .
SBF	Soro fetal bovino.
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante com dodecil sulfato de sódio.



SJL            Lectina de *Sophora japonica*

SWISS-MODEL    Modelo de Estrutura de Proteínas e Ferramentas de Avaliação (Protein Structure and Model Assessment Tools).

TEMED        N,N,N,N-Tetrametiletlenodiamina.

Uniprot        Recurso Universal de Proteínas (Universal Protein Resource).

VML            Lectina de *Vatairea macrocarpa*.

WFL            Lectina de *Wisteria floribunda*.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1	<i>Histórico das lectinas</i> .....	21
1.1.1	Lectinas da família <i>Leguminosae</i> .....	23
1.1.2	Subtribo <i>Diocleinae</i> .....	24
1.1.3	<i>Cymbosema roseum</i> .....	26
1.1.3.1	Lectinas de <i>Cymbosema roseum</i> .....	27
1.2	<i>Modelagem molecular</i> .....	28
1.3	<i>Docking molecular</i> .....	29
1.4	<i>Processo inflamatório</i> .....	30
1.5	<i>Câncer</i> .....	32
1.5.1	<i>Glioma</i> .....	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
2.1	<i>Objetivo geral</i> .....	36
2.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	36
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
3.1	<i>Reagentes</i> .....	37
3.2	<i>Purificação das lectinas de Cymbosema roseum CRLI e CRLII</i> .....	37
3.3	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante com SDS</i> .....	38
3.4	<i>Caracterização físico-química da estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII</i> .....	39
3.4.1	<i>Estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII frente a diferentes condições de pH</i> .....	39
3.4.2	<i>Estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII frente a diferentes temperaturas</i> ..... .....	39

3.4.3	Dependência de cofatores metálicos e estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII .....	40
3.5	<i>Modelagem molecular de CRLII</i> .....	40
3.6	<i>Docking molecular da estrutura de CRLII com os carboidratos N-acetil-D-galactosamina e <math>\alpha</math>-lactose</i> .....	41
3.7	<i>Atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória de CRLII em modelo de edema de pata</i> .....	42
3.7.1	Atividade pró-inflamatória de CRLII .....	42
3.7.2	Atividade anti-inflamatória de CRLII .....	43
3.7.3	Avaliação da participação do CRD na atividade anti-inflamatória de CRLII .....	43
3.8	<i>Efeitos de CRLI e CRLII em células de glioma de Rattus norvegicus da linhagem C6</i> .....	44
3.8.1	Análise da viabilidade das células da linhagem C6 pelo teste colorimétrico do MTT após tratamento com CRLI ou CRLII .....	45
3.8.2	Análise dos efeitos na morfologia das células da linhagem C6 após tratamento com CRLI ou CRLII .....	46
3.8.3	Efeitos na migração de células de glioma da linhagem C6 após tratamento com CRLI ou CRLII .....	46
3.8.4	Avaliação dos efeitos fisiológicos nas células da linhagem C6 por marcação fluorescente com laranja de acridina, iodeto de propídio e Hoechst após tratamento com CRLI ou CRLII por 24h.....	47
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
4.1	<i>Purificação e SDS-PAGE de CRLI e CRLII</i> .....	49
4.2	<i>Caracterização físico-química da estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII</i> .....	50
4.3	<i>Modelagem molecular de CRLII</i> .....	52

4.4	<i>Docking molecular de CRLII e os carboidratos N-acetil-D-galactosamina e <math>\alpha</math>-lactose</i> .....	59
4.5	<i>Atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória da lectina CRLII pelo modelo de edema de pata.....</i>	61
4.6	<i>Efeitos de CRLII na morfologia e viabilidade em células de glioma de Rattus norvegicus da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h.....</i>	63
4.7	<i>Efeitos de CRLII na migração em células de glioma de Rattus norvegicus da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h.....</i>	68
4.8	<i>Análise dos efeitos fisiológicos de CRLII nas células de glioma de Rattus norvegicus da linhagem C6 por fluorescência com laranja de acridina, iodeto de propídio e Hoechst quando tratadas por 24h.....</i>	70
4.9	<i>Efeitos de CRLI na morfologia e viabilidade em células de glioma de Rattus norvegicus da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h.....</i>	74
4.10	<i>Efeitos de CRLI na migração e crescimento em células de glioma de rato da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h.....</i>	79
4.11	<i>Análise dos efeitos de CRLI nas células C6 por fluorescência quando tratadas por 24h</i> .....	81
<b>5</b>	<b>RESUMO DOS RESULTADOS</b> .....	85
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico das lectinas

Um dos primeiros trabalhos com lectinas foi realizado em 1860 por Silas Weir Mitchell em que há o relato da atividade hemaglutinante do veneno de *Crotalus durissus* (cobra cascavel) em sangue de pombo (MITCHELL, 1860). Em 1888, Peter Hermann Stillmark obteve um extrato proteico puro de mamona (*Ricinus communis*) e denominou a proteína de ricina e, em 1891, H. Hellin denominou a proteína de *Abrus precatorius* como abrina. Ambas as proteínas apresentaram a capacidade de aglutinar eritrócitos, sendo essa a razão pelo qual se acreditava que essas proteínas eram tóxicas (OLSNES, 2004).

Aplicando doses subcutâneas subletais de ricina e abrina, em 1891, Von Paul Ehrlich conseguiu imunizar camundongos contra os efeitos tóxicos dessas proteínas, entretanto, os anticorpos anti-ricina ou anti-abrina não eram capazes de conferir proteção ao animal contra o efeito tóxico da ricina quando o anticorpo anti-abrina era utilizado e vice-versa. Dessa forma, Ehrlich foi capaz de estabelecer que há especificidade na resposta do anticorpo. Além disso outros princípios fundamentais da Imunologia foram estabelecidos, como o fenômeno da memória imunológica e da transferência da imunidade humoral da genitora para a prole (EHRlich, 1891a, 1891b; SINGH; SARATHI, 2012).

Em 1907, Landsteiner e Raubitschek demonstraram que os extratos de diferentes plantas eram capazes de aglutinar sangue de diferentes animais, além de que os extratos possuíam especificidade para determinado tipo de sangue animal, como o extrato de lentilha que é capaz de aglutinar o sangue de coelho, mas não de pombo (LIENER, 1963). Além da capacidade de aglutinar sangue de animais, em 1936, Sumner e Howell relatam que a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) também aglutina leveduras e bactéria, além de precipitar amido e glicogênio. Além disso, os autores sugerem que a capacidade de aglutinação está relacionada com a reação entre a proteína e os carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos (SUMNER; HOWELL, 1936).

Além da capacidade de aglutinar eritrócitos de animais, extratos de diferentes plantas demonstraram a possibilidade para o reconhecimento entre os tipos sanguíneos humanos (A, B e O), (BOYD; SHAPLEIGH, 1954), que haviam sido descritos por Landsteiner anteriormente (LANDSTEINER, 1901). Por fim, surge pela primeira vez a palavra lectina, que é proveniente do latim *legere*, significando escolher ou selecionar, para descrever todas as proteínas com capacidade

de aglutinar eritrócitos de diferentes animais (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Posteriormente, a palavra foi generalizada para descrever todas as proteínas que apresentem dois sítios de ligação a carboidratos e especificidade a todos os tipos de carboidratos e tenham origem não imune, independentemente tipo sanguíneo utilizado para identificá-la (GOLDSTEIN et al., 1980; SHARON; LIS, 1972).

Além da capacidade de aglutinação, em 1960 foi descrita a primeira atividade biológica em que a lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) possui a capacidade de causar mitose em linfócitos (NOWELL, 1960). Assim como a PHA, ConA também possui essa mesma característica, entretanto, ConA tem sua atividade inibida com baixas doses de manose, demonstrando que para a ocorrência da atividade é necessário a interação entre a lectina e o carboidrato de superfície do linfócito (POWELL; LEON, 1970). Outra importante descoberta acerca das capacidades das lectinas está relacionada com a habilidade em detectar diferenças entre os carboidratos de superfície em células normais e células tumorais. Um dos primeiros relatos para essa atividade foi publicado por Joseph C. Aub utilizando a lectina de germen de trigo e linfomas (AUB; SANFORD; COTE, 1965; AUB; TIESLAU; LANKESTER, 1963). A partir de então, outros trabalhos com diferentes lectinas, como a ConA e a lectina de *Glicine max* (SBA), passaram a relatar atividade semelhante (MARIKOVSKY; INBAR, 1974; NICOLSON, 1973).

A partir de 1967 com o aprimoramento da técnica utilizada para a purificação de lectinas através do surgimento da cromatografia de afinidade, houve um rápido crescimento no número de lectinas purificadas de outros seres vivos além das plantas, possibilitando a descoberta de novas aplicações e utilização em diferentes áreas do conhecimento (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965; SHARON; LIS, 2004).

Atualmente, as lectinas são classificadas como proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que possuem pelo menos um sítio não catalítico capaz de reconhecer reversivelmente carboidratos específicos sem alterar a estrutura dessas moléculas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Além de plantas, as lectinas também são encontradas em outros organismos, como bactéria, fungos, protozoários, anfíbios, crustáceos e mamíferos (NIO-KOBAYASHI, 2016; SHARON, 2008; SHOBA; ROSE, 2016; SINGH; WALIA; KANWAR, 2016; SOUSA-FILHO et al., 2016; VARROT; BASHEER; IMBERTY, 2013; WAWRA et al., 2016).

Muitos estudos têm buscado entender os mecanismos que governam e influenciam a atividade dessas moléculas através, principalmente, da caracterização físico-química, determinação

da especificidade a carboidratos e resolução da estrutura tridimensional. Além disso, a descrição e o entendimento das atividades biológicas que essas moléculas podem desempenhar fazem parte das aplicações de lectinas (DE SOUSA et al., 2016; GARDÈRES et al., 2016; SHANMUGAVEL et al., 2016; YADAV et al., 2016b). Com relação as aplicações de lectinas, elas têm sido utilizadas como ferramentas biotecnológicas em pesquisa na busca de novos biomarcadores para diagnóstico de câncer (JIN et al., 2016; SYED et al., 2016) e como potenciais agentes terapêuticos para o tratamento do câncer, dor e de inflamações, por exemplo (ABREU et al., 2016; CAMPOS et al., 2016; LIAO et al., 2016; OSTERNE et al., 2017; PIRES et al., 2016)

O conhecimento da estrutura tridimensional proporciona o entendimento do modo de interação das lectinas com os seus ligantes, a localização do sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD), bem como a comparação da relação entre as pequenas alterações estruturais e as diferenças na atividade biológica observadas entre lectinas com especificidade ao mesmo tipo de carboidratos (RAVAL et al., 2004; ROMERO et al., 2015; SAIJO, 2016; WANGKANONT et al., 2016).

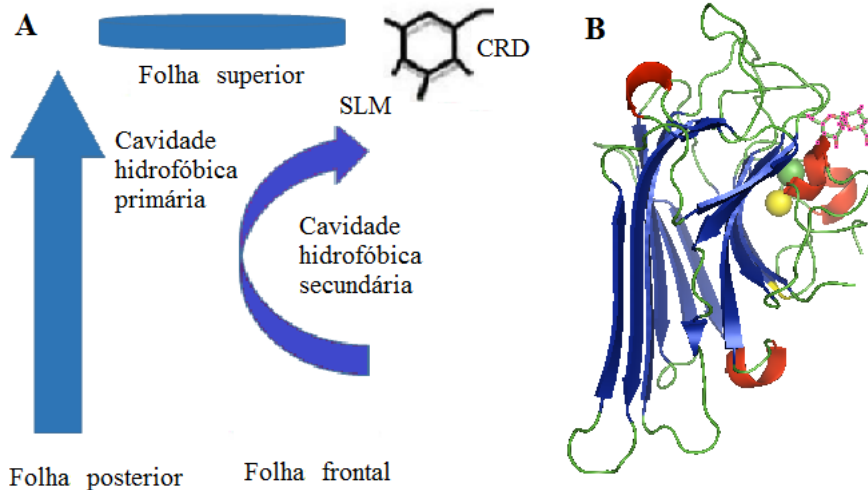
#### 1.1.1 Lectinas da família Leguminosae

A maior quantidade de lectinas purificadas e caracterizadas pertencem a família das leguminosas, isso deve-se ao fato de que suas sementes são particularmente ricas em lectinas (MÄKELÄ, 1957; SHARON, 1993), além de possuírem grande importância econômica como produtoras de alimentos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016). Essa família abrange 917 gêneros e 23.535 espécies e possui mais de 70 lectinas já conhecidas que apresentam características exclusivas: como propriedades físico-químicas e aspectos estruturais semelhantes, massa molecular variando entre 25 e 30 kDa por monômero, sendo cada subunidade formada por uma cadeia polipeptídica, contendo um sítio de reconhecimento a carboidrato específico (CRD) e um sítio de ligação a metais, que auxilia na estabilização do CRD. (BOUCKAERT et al., 2000; LORIS et al., 1998; SHARON, 1993; THE PLANT LIST, 2016; WEIS; DRICKAMER, 1996).

Além de apresentar alta similaridade em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias, as lectinas da família de leguminosas apresentam em comum o motivo estrutural *jelly-roll*, que é formado por duas folhas- $\beta$  anti-paralelas, sendo uma frontal composta por sete fitas e uma posterior composta por seis fitas. Na parte superior há uma terceira folha- $\beta$  composta por cinco fitas e unindo essas folhas há alças de tamanhos variáveis dependendo de cada lectina, que são

estabilizadas por dois núcleos hidrofóbico (BANERJEE et al., 1996; CHANDRA et al., 2001; LORIS et al., 1998; SOWDHAMINI et al., 1998; WILLIAMS; WESTHEAD, 2002).

Figura 1 – Representação esquemática do monômero de uma lectina de família *Leguminosae*.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Diagrama esquemático da estrutura terciária geral para um monômero de lectina de leguminosa. SLM – sítio de ligação a metais, CRD – sítio de reconhecimento a carboidratos. (B) Estrutura terciária do monômero da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) (PDB 1I3H) ligada ao carboidrato dimanosídeo (em representação de linhas), abaixo os íons metálicos manganês (esfera amarela) e cálcio (esfera verde claro).

### 1.1.2 Subtribo *Diocleinae*

Lectinas da subtribo *Diocleinae* apresentam alta similaridade em suas estruturas primárias, podendo haver pequenas diferenças de alguns aminoácidos. Geralmente, têm especificidade aos carboidratos glicose/manose e seus derivados e apresentam dimerização ou tetramerização de seus monômeros dependente de pH, ou seja, de acordo com o pH do meio em que a lectina se encontra poderá haver a formação de um dímero ou tetrâmero. Apesar dessa alta semelhança, essas lectinas apresentam diferentes atividades biológicas (CAVADA et al., 2001; DELATORRE et al., 2007; NAGANO et al., 2008). Dentre algumas das atividades desempenhadas por essas lectinas podem ser citadas a lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRLI), que apresenta efeito pró-inflamatório quando administrado por via local e anti-inflamatória quando administrada por via endovenosa, as lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia maritima* (ConM), *Dioclea lasiocarpa* (DLL) e *Dioclea sclerocarpa* (DSL) apresentam atividade antitumoral contra diferentes tipos de câncer (GONDIM, 2014; ROCHA et al., 2011).

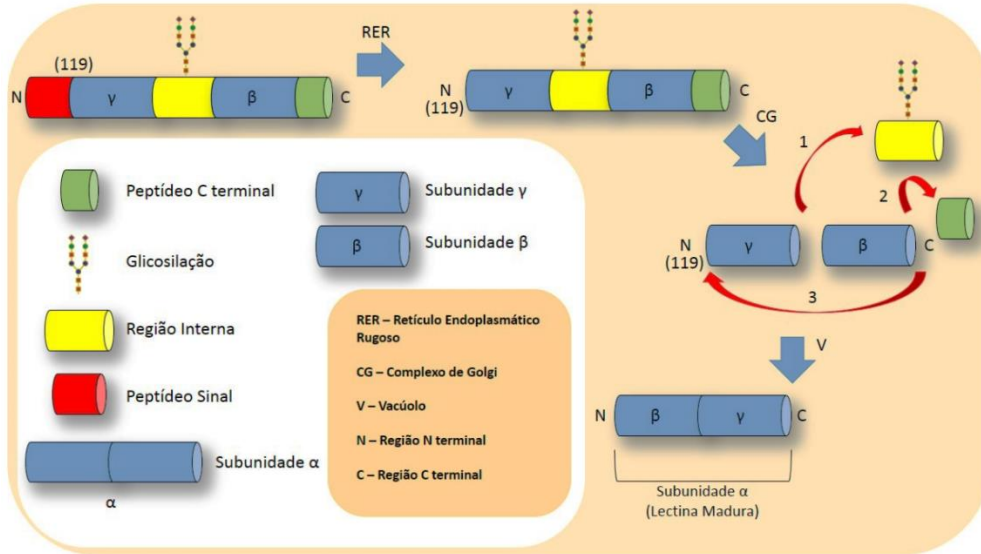
Um processo característico de lectinas de *Diocleinae* é a permutação circular, um tipo de processamento pós-traducional sofrido durante a expressão da lectina e que ocasiona o



surgimento de um conjunto de subunidades proteicas facilmente visualizadas em amostras puras em gel de poliacrilamida. A permutação circular foi primeiramente descrita para a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) sendo utilizada como modelo para explicar esse fenômeno (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985). Inicialmente, ao ser traduzida a partir do RNAm, a pré-pró-ConA apresenta um peptídeo sinal que é removido no retículo endoplasmático e endereçada para o complexo de Golgi como pró-ConA. Nesse compartimento, uma porção glicosilada, que possui 15 aminoácidos e está localizada no centro da molécula, é removida, portanto, a cadeia inicial é dividida em duas,  $\beta$  e  $\gamma$ . Ao mesmo tempo em que ocorre a clivagem do peptídeo glicosilado, uma outra porção localizada na região C-terminal de  $\gamma$  é removida. Após esse processo, a cadeia  $\gamma$ , que antes estava na região N-terminal do fragmento intacto de pró-ConA, é religada a cadeia  $\beta$  na porção N-terminal formando a cadeia  $\alpha$  e, por fim, ConA ativa (Figura 2). Todas essas etapas são catalizadas pela enzima asparaginil endopeptidase, entretanto, esse processamento não possui rendimento de 100% e as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  estão presentes nos géis de poliacrilamida juntamente com a banda da cadeia  $\alpha$  (CHRISPEELS et al., 1986; FAYE; CHRISPEELS, 1987; HERMAN; SHANNON; CHRISPEELS, 1985; SHARON, 2007).

Apesar da permutação circular ser comum em lectinas da subtribo *Diocleinae*, estudos de sequências têm demonstrado que esse fenômeno não ocorre em algumas lectinas, portanto, isso pode explicar as diferenças de afinidade apresentadas por proteínas isoladas de uma mesma semente. Isso é evidenciado pelas lectinas extraídas da semente de *Cymbosema roseum* (CRLII), que apresentam especificidades aos diferentes carboidratos manose (CRLI) e lactose (CRLII) e não há a presença das bandas  $\beta$  e  $\gamma$  no gel de poliacrilamida de CRLII (PÉREZ, 1998; PEREZ; HERNANDEZ; MORA, 1990; ROCHA et al., 2009).

Figura 2 – Etapas da permutação circular.



Fonte: Santiago (2013).

### 1.1.3 *Cymbosema roseum*

*Cymbosema roseum* Benth, também conhecida como *Dioclea purpúrea*, é espécie vegetal pertencente à família *Leguminosae*. É uma planta trepadeira presente na América Central e América do Sul. No Brasil, é encontrada, principalmente, em florestas inundáveis, como igapós e florestas de várzea, na região Norte e no estado do Maranhão (Figura 3) (MAXWELL, 1970).

Figura 3 – Flor, desenho da planta e sementes de *Cymbosema roseum*

Reino: *Plantae*

Filo: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Leguminosae*

Tribo: *Phaseoleae*

Subtribo: *Diocleinae*

Gênero: *Cymbosema*

Espécie: *Cymbosem roseum*

[http://www.dixpix.ca/Amazon/flora/fabaceae/030\\_cymbosema\\_roseum.html](http://www.dixpix.ca/Amazon/flora/fabaceae/030_cymbosema_roseum.html)

<http://www.dulcenascimento.com.br/NewFiles/galeria1.html>

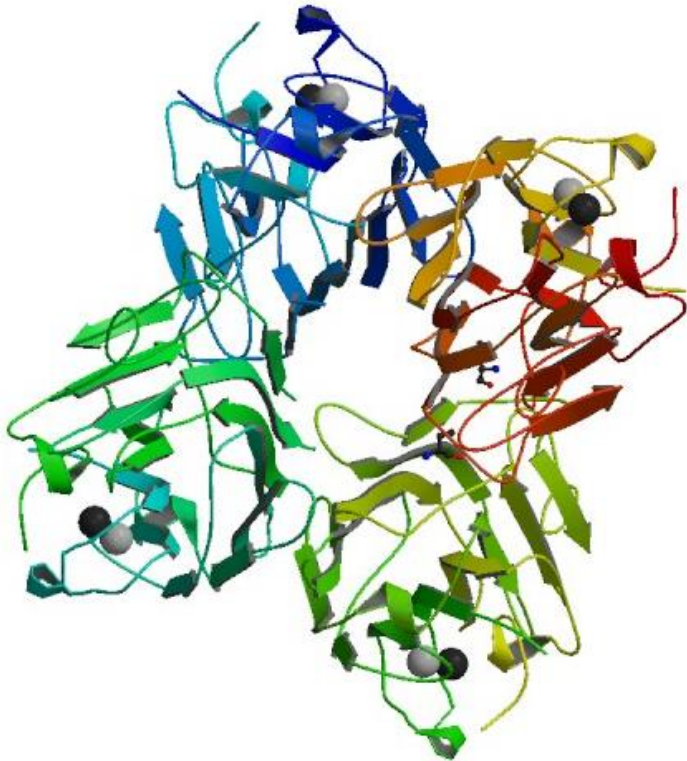
Acesso em 6/11/2016 as 18:06 h

### 1.1.3.1 Lectinas de *Cymbosema roseum*

Duas lectinas foram isoladas e purificadas a partir das sementes de *C.roseum*, sendo elas: a lectina manose específica (CRLI) e a lectina lactose específica (CRLII), utilizando as cromatografias de afinidade Sephadex G-50 e Sepharose 4B-lactose, respectivamente.

CRLI apresenta estrutura primária com 237 aminoácidos (código de acesso no Uniprot P86184) e massa molecular conhecida de 25,326 Da para a cadeia  $\alpha$ . Além disso, ela apresenta atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho tratados e não tratados, sendo inibida pelos monossacarídeos manose e seu derivados e por *N*-glicanos. CRLI apresenta estrutura resolvida por difração de Raios-X (figura 4) e algumas atividades biológicas conhecidas, como a capacidade de interagir com mastócitos e ocasionar a liberação de histamina e atividades pró-inflamatória e anti-inflamatória em modelo de edema de pata.

Figura 4 – Estrutura tridimensional de CRLI.



Fonte: Obtida no Banco de Dados de Proteínas (PDB) código de acesso 3A0K.

CRLII é uma proteína heteroglicosilada que apresenta estrutura primária com 239 aminoácidos (código de acesso no Uniprot P86795) e massa molecular conhecida de 25,698 Da para a cadeia  $\alpha$ . Além disso, ela apresenta atividade hemaglutinante com eritrócitos de coelho

tratados e não tratados e inibida por galactose, lactose e seus derivados e por *N*-glicanos e *O*-glicanos. Diferentemente da CRLI, CRLII não apresenta estrutura tridimensional definida e, com relação as atividades biológicas, há a descrição da capacidade de interagir com mastócitos e ocasionar a liberação de histamina (LOPES et al., 2005; ROCHA, 2007; ROCHA et al., 2009, 2011).

Nesse contexto, a caracterização físico-química, a determinação da estrutura tridimensional para CRLII, bem como, a descrição de novas atividades biológicas para CRLI e CRLII faz-se necessário.

### *1.2 Modelagem molecular*

Geralmente, para que ocorra o entendimento da função de uma proteína, há a necessidade do entendimento da sua estrutura tridimensional. Apesar de existirem técnicas que permitem a resolução da estrutura de uma proteína, como a difração por raios-X e de ressonância magnética nuclear, essas técnicas não são bem-sucedidas para todas as proteínas. Portanto, a utilização de métodos computacionais pode auxiliar na resolução da estrutura tridimensional de proteínas (XIANG, 2006).

Há uma grande similaridade entre a sequência de aminoácidos entre duas proteínas que apresentem uma mesma função em organismos evolutivamente próximos, entretanto, essa similaridade diminui a medida em que ocorre o distanciamento evolutivo entre esses organismos. Essa baixa similaridade da estrutura primária entre proteínas de organismos evolutivamente distante pode ser reduzida quando há a comparação entre as estruturas terciárias. Isso deve-se ao fato que a estrutura terciária apresenta domínios extremamente conservados, visto que, eles são cruciais para o desempenho da função dessas proteínas, portanto, as diferenças na estrutura primária não ocasionam diferenças significativas na estrutura terciária. Dessa forma, a modelagem molecular explora esses domínios conservados para a predição da estrutura tridimensional de uma proteína que apresenta a mesma função, ou função similar, ou conservação da estrutura terciária, a uma proteína de estrutura conhecida, mesmo que eles estejam filogeneticamente distantes (HOLTJE; FOLKERS, 2003; SILVA; SILVA, 2007).

A utilização da modelagem somente é possível devido ao rápido crescimento no depósito de estruturas resolvidas em bancos de dados, como o Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank-PDB), e ao desenvolvimento de *software* capazes de gerar a estrutura da

proteína desejada e de avaliar a qualidade dessas estruturas. Portanto, modelos de qualidade confiáveis podem ser gerados quando há similaridade maior ou igual a 30% entre as sequências de aminoácidos das proteínas modelo e alvo (NAYEEM; SITKOFF; KRYSTEK, 2006; XIANG, 2006).

Com os modelos estruturais gerados por modelagem outras descobertas científicas são geradas, pois é possível identificar padrões estruturais em lectinas que estão conservados nessas proteínas e presentes em organismos pertencentes a diferentes reinos e, assim, relacionar as mudanças estruturais sofridas em lectinas com o curso da evolução (ABHINAV; SAMUEL; VIJAYAN, 2016). A modelagem também pode ser utilizada para a predição de lectinas recombinantes e auxiliar na análise da importância da estrutura para o desempenho da função, como a lectina recombinante de *Dioclea grandiflora* (pDGL) em que a proteína nativa foi utilizada como modelo para a geração da estrutura tridimensional da recombinante (DE SOUSA et al., 2016). Além disso, outras lectinas tiveram suas estruturas resolvidas com o auxílio da modelagem molecular, como as lectinas de *Allium ascalonicum*, *Acacia farnesiana*, *Viscum álbum*, *Echinometra lucunter*, dentre outras (CARNEIRO et al., 2015; ERIKA et al., 2013; ESCHENBURG et al., 1998; RAJA et al., 2016).

### 1.3 Docking molecular

Desenho racional ou *docking* molecular é uma potente ferramenta da bioinformática utilizada para entender e prever os mecanismos que governam as interações entre proteínas e ligantes quando há a formação de um complexo (POLANSKI; KIMMEL, 2007). Normalmente, para a avaliação desse complexo, a estrutura da proteína permanece rígida, enquanto o ligante é flexível. Dessa forma, as interações entre proteína e o ligante ocorre em três etapas em que é realizada a marcação de regiões prováveis para acontecerem ligações em ambas as moléculas, sobreposição destas regiões e a análise estatística, em que um escore é atribuído para o melhor complexo. De posse desse escore é possível determinar o melhor encaixe para um ligante e comparar o encaixe de diferentes ligantes com a proteína e, assim, determinar o melhor ligante (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2005, 2012).

A principal função do *docking* molecular consiste em descobrir compostos que possam interagir com proteínas específicas e entender a forma e afinidade dessa interação para, assim, fornecer subsídios que permitam inibir, reduzir ou evitar a interação dessa proteína com outras ou

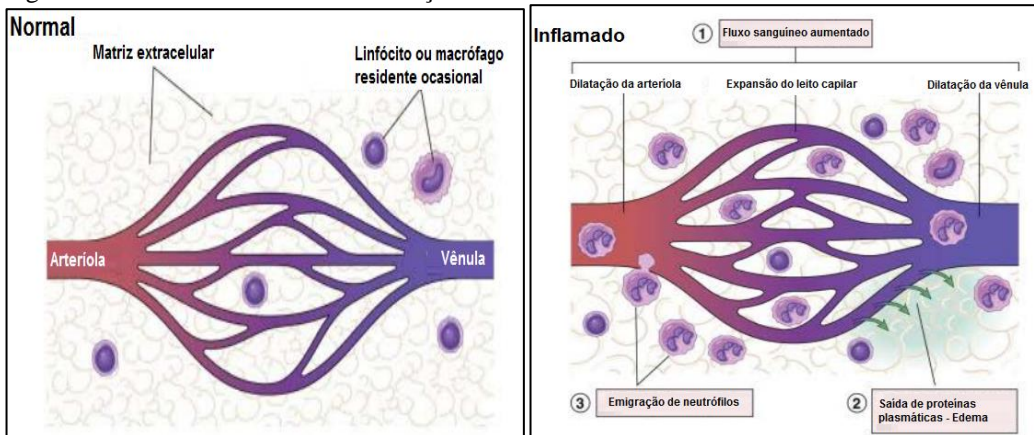
com o ligante. Portanto, essa aplicabilidade do *docking* é chamada de descoberta de novas drogas ou *drug discovery*, havendo diferentes exemplos da utilização dessa ferramenta para a descoberta de novas drogas medicinais, investigação de novas ferramentas para a busca de biomarcadores ou o entendimento do modo de interação entre proteínas e ligantes (DE RUYCK et al., 2016; ISMAYA et al., 2016; JARVIS et al., 2016; SOUSA et al., 2016a). A possibilidade de investigar uma grande quantidade de moléculas aliado ao rápido crescimento de bancos de dados como PDB e ZINC permitem a investigação crescente de novos compostos, a agilização e economia na pesquisa, pois somente compostos que apresentem potencial *in silico* serão testadas *in vitro* ou *in vivo* (SHOICHET, 2004).

#### 1.4 Processo inflamatório

O processo inflamatório é clinicamente caracterizado pelo surgimento do calor, dor, rubor, inchaço e perda da função da região afetada, sendo dividida em inflamações agudas e crônicas. A inflamação aguda apresenta menor duração podendo ser de algumas horas a alguns dias, enquanto a inflamação crônica é um processo longo, que pode levar de semanas a anos, em que ocorre a tentativa de reparo da região afetada, entretanto, o longo processo acaba por ocasionar a morte tecidual e a formação da fibrose (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2012).

A inflamação tem como objetivo proteger o organismo ao levar a destruição e eliminação do agente nocivo bem como do tecido afetado. Diversos eventos ocorrem durante a inflamação mediados por sinais químicos, dentre eles, a vasodilatação e o recrutamento de leucócitos são característicos da inflamação aguda (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A vasodilatação ocasiona o aumento da permeabilidade vascular através da contração e abertura de canais intercelulares nas células endoteliais e, assim, o extravasamento de fluido plasmático, além de causar o aumento do leito capilar, que promove o aumento da quantidade de sangue circulando no local afetado (Figura 5). Esses processos desencadeados pela vasodilatação ocasionam os sintomas da inflamação aguda: inchaço, dor, rubor e calor no local afetado (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997; MAJNO; PALADE, 1961).

Figura 5 - Processo inflamatório: alterações teciduais.

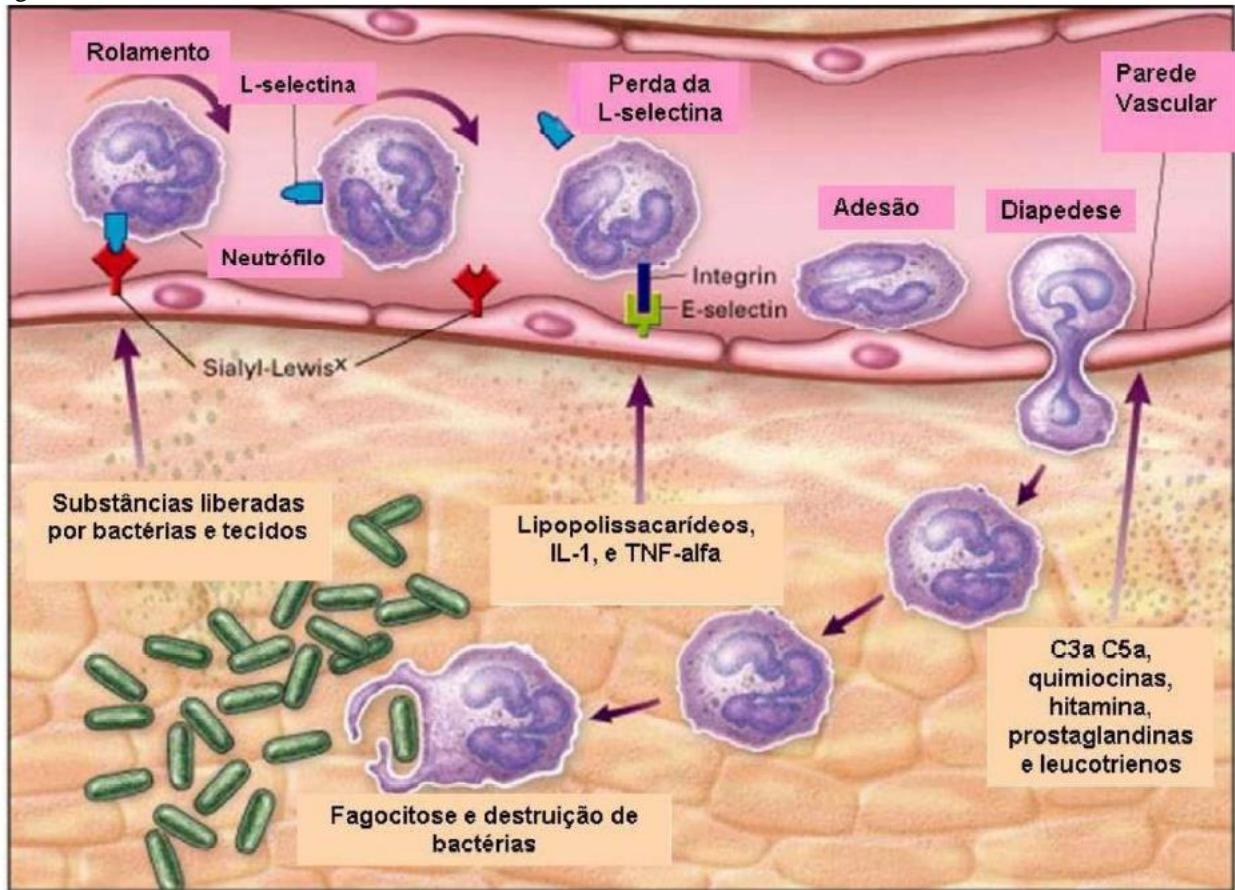


Fonte: Adaptado de Kumar; Abbas e Aster (2015)

O recrutamento de leucócitos para região afetada visa a identificação e eliminação de possíveis agentes nocivos que estejam presentes no local inflamado ou que possam vir a penetrar a região lesionada, além de sinalizar para o processo de morte celular e reparo do local afetado (PARHAM, 2012). Quatro passos ocorrem para que haja a migração dos leucócitos para a região afetada sendo eles: o rolamento sobre a parede do endotélio, adesão firme entre leucócitos e endotélio com o auxílio de selectinas, diapedese e migração para a região afetada. A função das selectinas é reduzir a velocidade de rolamento e ancorar os leucócitos no endotélio de forma a permitir que ocorra o achatamento do leucócito e a passagem para o espaço extravascular e migração para a região afetada. Essas proteínas são expressas na superfície celular em resposta aos sinais inflamatórios estando presentes no endotélio (E-selectina), plaquetas (P-selectina) e leucócitos (L-selectina) (Figura 5) (ALBELDA; SMITH; WARD, 1994; MULLER, 2003; TEDDER et al., 1995; VIDEM; STRAND, 2004). Ao final do reparo do tecido lesionado ou a substituição por tecido conjuntivo dá-se fim ao processo inflamatório (GILROY et al., 2004).



Figura 6- Recrutamento de leucócitos.



Fonte: Adaptado de Walzog e Gaehtgens (2000).

Lectinas de diferentes tribos apresentam atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatória dependendo da via pela qual a lectina é administrada, como a CRLI que apresenta atividade pró-inflamatória por via local e anti-inflamatória por via sistêmica (ROCHA et al., 2011). Outras lectinas apresentam atividade somente pró-inflamatórias, como *Centrolobium tomentosum*, *Canavalia oxyphylla*, *Dioclea reflexa* (CHAVES et al., 2016; PINTO-JUNIOR et al., 2016; SANTIAGO et al., 2014). Já outras lectinas apresentam atividade somente anti-inflamatória, como *Parkia platycephala*, *Albemoschus esculentus*, *Bauhinia monandra* e *Holothuria grisea* (CAMPOS et al., 2016; MOURA et al., 2013; SOUSA et al., 2016b; UMARO et al., 2016).

### 1.5 Câncer

Em 2012, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) houveram 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes, sendo a incidência 25% maior em homens do que em mulheres. Projeções para 2025 apontam que mais de 20 milhões de novos casos



no mundo. No Brasil, estima-se que em 2016-2017 haverá 600 mil novos casos de câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -INCA, 2016; STEWART, B. W., WILD, 2014).

O termo câncer refere-se a um conjunto de 100 tipos de patologias, em que o desenvolvimento dessa doença é marcado pela evolução progressiva das células em células cancerígenas através de diversas etapas que permitirão a sobrevivência, proliferação e disseminação das células cancerígenas. Essas células apresentam as seguintes características a medida em que ocorre o processo de transformação das células saudáveis: sinalização continua para a proliferação, evasão dos sinais supressores de crescimento, resistência a morte celular, imortalidade pela continua divisão celular, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase, reprogramação do metabolismo energético, evasão do sistema imune e padrão de glicosilação aberrante (CAVALLO et al., 2011; COLOTTA et al., 2009; HANAHAN; WEINBERG, 2011; MEANY; CHAN, 2011).

Esse conjunto de etapas de progressão para a formação de uma célula cancerígena é desencadeado inicialmente quando há um acúmulo de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) causado por diferentes fatores endógenos, como erros durante a replicação ou danos causados por Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) liberadas durante o metabolismo, ou exógenos, como agentes carcinogênicos. Além do acúmulo desses danos, outros fatores contribuem para o desenvolvimento do câncer, como falhas nos mecanismos de reparo, a ausência e mutação nos genes supressores de tumor, ativação dos genes responsáveis pela proliferação, os proto-oncogenes, e a desregulação dos fatores que controlam os mecanismos de morte celular: apoptose, necrose e autofagia (BERTRAM, 2000; HALL; JOHNSON, 1996; SHERR, 2004; SHERR; MCCORMICK, 2002; SU et al., 2015).

A apoptose é um processo celular em que ocorre morte celular programada através da ação de diferentes mecanismos de sinalização e caracterizado pela condensação e fragmentação nuclear, condensação e quebra do DNA cromossomal em fragmentos de 200 pares de base, ausência de ruptura da membrana plasmática e a da inflamação de células vizinhas. A necrose, por outro lado, induz a inflamação de células vizinhas a afetada e apresenta a ruptura da membrana plasmática. Além disso, ocorre a vacuolização do citoplasma e a ruptura do núcleo com quebra do DNA cromossomal em tamanhos distintos aos observados na apoptose (EDINGER; THOMPSON, 2004; LIN; BAEHRECKE, 2015). Apesar das células utilizarem a autofagia como mecanismo para reciclar nutrientes, remover componentes defeituosos ou como artifício para sobrevivência, a

autofagia também é responsável por levar a morte celular em uma coordenação ação com a apoptose. A autofagia é caracterizada pela formação de vesículas capazes de degradar componentes celulares e materiais citoplasmáticos ao se unirem com as enzimas digestivas do lisossomo (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004; THORBURN, 2008).

Com a ativação de fatores de crescimento e proliferação da célula cancerígena há uma grande demanda energética, portanto, a adaptação metabólica e a utilização da autofagia para a reciclagem de nutrientes e controle da geração de ROS são processos que garante a progressão do câncer (ÁVALOS et al., 2014; BHUTIA et al., 2003; LIN; SCOTT, 2012). Essa adaptação metabólica é caracterizada pela regulação da via glicolítica através da glicosilação aberrante do fator 1 de indução de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), que induz o aumento das concentrações de glicose e glutamina para suprir a demanda energética da célula independentemente da concentração de oxigênio (FERRER et al., 2014). Outro mecanismo utilizado pelas células cancerígenas para continuação do desenvolvimento e que também é afetado pela glicosilação aberrante é a indução da angiogênese através da glicosilação aberrante do fator de crescimento endotelial (VEGF). Assim com maior aporte sanguíneo, as células cancerígenas recebem uma maior quantidade de nutrientes e podem liberar os produtos do metabolismo (LYNCH et al., 2012).

A modificação sofrida por essas proteínas está relacionada com a atividade alterada de glicosiltransferase, que é responsável pela adição do carboidrato *N*-acetil-glicosamina a porção amida do resíduo de asparagina, sendo chamado de *N*-glicosilação, enquanto que o carboidrato *N*-acetil-D-galactosamina é ligado a hidroxila dos resíduos de serina ou treonina, sendo chamada de *O*-glicosilação. Ao alterar o padrão de glicosilação de proteínas, as células cancerígenas são capazes de alterar a função de diversas proteínas e, assim, regular a ativação, as interações proteína-proteína, a degradação, localização e a transcrição de outras proteínas (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001; HANOVER, 2001; HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; ZACHARA; HART, 2006).

A glicosilação aberrante nas células cancerígenas não se restringe somente a processos intracelulares. Na superfície celular ocorrem mudanças nos padrões de glicosilação de glicoproteínas e glicolipídios, que estão envolvidos nos mecanismos de crescimento e diferenciação celular (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001). Ramificações em *N*-glicanos do tipo  $\beta$ -1,6- acetil-glicosamina em glicoproteínas são típicas de células cancerígenas em estágio inicial além de regularem a invasão dessas células em outros tecidos, sendo característicos de gliomas (YAMAMOTO et al., 2000). Já modificações no padrão de glicosilação em glicolipídios contendo

o carboidrato ácido siálico são característicos de tumores epiteliais e neuroectodérmicos, como o glioma (BRUENING et al., 2000; HAKOMORI, 1989; MANFREDI et al., 1999; ZENG et al., 1999).

### 1.5.1 Glioma

Segundo dados da OMS mais de 237 mil casos de câncer que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC) foram registrados em 2015 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). Os gliomas são tumores malignos primários de rápido crescimento e com alta mortalidade que representam 40% dos casos de tumores no cérebro. Apesar da baixa incidência desse tipo de câncer, os gliomas afetam as células de suporte do SNC, as células da glia, sendo dividido em três subtipos, de acordo com o tipo celular o qual deu início ao processo tumoral: astrocitomas, oligodendrogliomas e ependiomas, além de serem classificados de acordo com grau de malignidade: I a IV, sendo o tipo IV o mais grave (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016; ENCISO-MORA et al., 2013).

Ao apresentar características de natureza invasiva, rápido crescimento, a não expressão de antígenos específicos e a capacidade de secretar imunossupressores, esse tipo de câncer possui mecanismos que dificultam o tratamento. Portanto, os meios convencionais de tratamento, como a radioterapia, cirurgias e quimioterapia, provaram ser ineficazes, levando a um tempo médio de vida para os pacientes diagnosticados de 15 meses, o que pouco mudou nos últimos 100 anos (BADIE; SCHATNER, 2001).

Dessa forma, a busca por novas ferramentas terapêuticas faz-se necessário, sendo as lectinas uma opção que apresenta a capacidade de reconhecer diferentes padrões de glicosilação aberrantes, fator que é característico de células de câncer, estando também presente em gliomas. Diferentes lectinas pertencentes a família das leguminosas, como as lectinas de *Canavalia virosa* (ConV), *Glycine max* (SBA), ConA e ConBr apresentam a capacidade de induzir a autofagia e apoptose e, assim, levar a morte de células malignas de diferentes tipos de câncer, como hepatocarcinoma, melanoma, leucemia e glioma (CHANG et al., 2007; DE MEJIA; BRADFORD; HASLER, 2003; FAHEINA-MARTINS et al., 2012; FU et al., 2012; LI et al., 2011; LIU et al., 2009; OSTERNE et al., 2017).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Caracterizar físico-quimicamente, determinar a estrutura tridimensional e avaliar as atividades pró-inflamatória, anti-inflamatória e antiglioma da lectina lactose específica de *Cymbosema roseum* (CRLII), bem como, avaliar a atividade antiglioma da lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRLI).

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a estabilidade da atividade de CRLII frente a diferentes condições de pH e temperatura e determinar a dependência de cofatores metálicos para a atividade de CRLII;
- Determinar a estrutura tridimensional de CRLII através de modelagem molecular;
- Determinar as interações entre a estrutura modelada de CRLII com os carboidratos *N*-acetil-D-galactosamina e  $\alpha$ -lactose por *docking* molecular;
- Avaliar o sítio de reconhecimento de carboidratos e o sítio de ligação a metais da estrutura modelada de CRLII pelo programa *LIGPLOT+*;
- Avaliar o potencial pró-inflamatório e anti-inflamatório de CRLII em modelo de edema de pata em *Rattus norvegicus*;
- Avaliar a viabilidade das células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 *in vitro* após tratamento com CRLI ou CRLII através da metodologia colorimétrica do MTT;
- Avaliar a morfologia das células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 por microscopia óptica após tratamento com CRLI ou CRLII;
- Avaliar os efeitos na migração das células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 após tratamento com CRLI ou CRLII;
- Avaliar os efeitos fisiológicos por marcação fluorescente com laranja de acridina, iodeto de propídio e Hoechst em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 após tratamento com CRLI ou CRLII.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos apresentam grau de pureza analítica.

#### 3.2 Purificação das lectinas de *Cymbosema roseum* CRLI e CRLII

A purificação das lectinas de *Cymbosema roseum* Benth foram realizadas de acordo com os protocolos adaptados de Rocha (2007, p 54) e Cavada e colaboradores(2006). As sementes foram coletadas na floresta amazônica no médio rio Negro e armazenadas até a purificação das lectinas. Inicialmente, as sementes foram descascadas e trituradas utilizando moedor elétrico (Cadence MDR301 Monovolt) até a obtenção de uma farinha fina. Em seguida, foi utilizado uma solução de extração de cloreto de sódio (NaCl) 0,15 M, cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 5 mM e cloreto de manganês (MnCl<sub>2</sub>)5 mM, na proporção de 1: 10 (p/v) de farinha e solução de extração e a mistura foi mantida em agitação *overnight* em temperatura ambiente. Esse extrato bruto foi então submetido a centrifugação (5810R-Eppendorf) a 10.000 X g durante 20 minutos a 4°C, o precipitado descartado e o sobrenadante filtrado em papel de filtro (Whatman).

Para a purificação de CRLI o sobrenadante foi aplicado e deixado em contato por uma hora em coluna de afinidade com matriz de Sephadex-G50 (GE Healthcare) previamente equilibrada com a solução de extração. As proteínas não retidas na matriz (P1) foram eluídas com a solução de extração e a fração retida (P2), que contém CRLI, foi eluída com glicose 0,1 M com NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM. Foram coletadas frações de 2 mL e o fluxo utilizado foi de 1 mL/min. As frações foram monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm (Ultrospec 2100- Amersham). As frações contendo a proteína de interesse foram dialisadas exaustivamente contra água destiladas e água ultrapura e liofilizadas. O grau de pureza de CRLI purificada será avaliada por SDS-PAGE e a proteína utilizada para a atividade citotóxica em células de glioma de rato da linhagem C6.

Para a purificação de CRLII o sobrenadante foi aplicado e deixado em contato por uma hora em coluna de afinidade com matriz Sepharose-4B-lactose (Sigma) previamente equilibrada com a solução de extração. As proteínas não retidas na matriz (P1) foram eluídas com a solução de extração e a fração retida (P2), que contém CRLII, foi eluída com  $\alpha$ -lactose 0,1 M com NaCl 0,15 M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM. Foram coletadas frações de 2 mL e o fluxo utilizado foi de 1

mL/min. As frações foram monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm (Ultrospec 2100- Amersham). As frações contendo a proteína de interesse foram dialisadas contra acetato de sódio 0,1M pH 4 para a remoção do carboidrato ligado ao CRD das lectinas, posteriormente, exaustivamente dialisado contra água destiladas e água ultrapura e liofilizadas. O grau de pureza de CRLII será avaliado por SDS-PAGE e a proteína utilizada para as atividades pró-inflamatória, anti-inflamatória e de citotoxicidade em células de glioma de rato da linhagem C6.

### *3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante com SDS*

Para avaliação das etapas de purificação uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada seguindo o protocolo descrito por Laemmli (1970) com algumas modificações. O gel de empilhamento foi preparado na concentração de 4 % de acrilamida em tampão tris-HCl pH 6,8; SDS 1 %; persulfato de amônio 0,1 % e tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,04 %. O gel de separação foi montado na concentração de 15 % de acrilamida (proporção de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8) preparado utilizando-se tampão tris-HCl 0,1 M pH 8,8 contendo SDS 1 %, persulfato de amônio 0,1 % e TEMED 0,04 %.

O tampão de amostra contendo tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,02 %, SDS 1 % e adicionado 3 $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol foi utilizado para solubilizar as proteínas em uma concentração final de 4 mg/mL, sendo aplicado 5  $\mu$ L por poço. Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 0,025 M pH 8,8; glicina 0,192 M; SDS 0,1 %. A corrida eletroforética foi realizada em cuba eletroforética para dois géis (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) utilizando uma fonte (EPS601-GE Healthcare) com amperagem constante de 25 mA, potência de 5 W e voltagem variando até 150 V(CHAN; XIA; NG, 2016). O marcador de massa molecular de ampla faixa de massa 225-10 kDa (Promega) foi utilizado para indicar a massa aparente das lectinas purificadas.

Após a corrida, as bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1:3,5:8 (v/v/v) e o excesso de corante removido através de sucessivas lavagens com água destilada aquecida (GRINTZALIS; GEORGIU; SCHNEIDER, 2015). Para o registro do gel foi utilizado o fotodocumentador (Bio-rad) e as imagens adquiridas com o auxílio do *software Image Lab v5.2.1*.

### 3.4 Caracterização físico-química da estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII

A atividade hemaglutinante foi realizada em placas de microtitulação e os eritrócitos de coelho foram preparados de acordo com o protocolo adaptado de Faria e colaboradores (2004). Brevemente, o sangue de coelho foi lavado com solução de NaCl 0,15 M e então tratado com a tripsina (concentração final 0,01 mg/mL), deixando em contato por 40 minutos a 37°C. Após o tratamento, o sangue foi novamente lavado com NaCl 0,15 M e suspenso para uma concentração final de 3% de eritrócitos (v/v) em NaCl 0,15 M.

Um teste de hemaglutinação preliminar foi realizado com o intuito de determinar a melhor concentração de CRLII a ser utilizada durante a caracterização físico-química. O liofilizado de CRLII foi solubilizado em tampão tris-HCl 0,1M pH7,6 com NaCl 0,15M, CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> 5 mM com concentração final de 1 mg/mL ou 0,5 mg/mL. A concentração de 0,5 mg/mL foi escolhida e o resultado de unidades de atividade hemaglutinante (UH) representada como 100% da atividade. A partir de então, novos testes foram realizados com o intuito de avaliar a estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII frente a dependência de cofatores metálicos e aos diferentes pH e temperaturas (CHATTERJEE et al., 2016).

#### 3.4.1 Estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII frente a diferentes condições de pH

Os tampões utilizados para a solubilização de CRLII em diferentes pHs foram: acetato de sódio 0,1M pHs 4,0; 5,0 e 6,0; tris-HCl 0,1M pH 7,0; 8,0 e glicina 0,1M pH 9,0; 10,0 e acrescidos dos sais NaCl 0,15M, CaCl<sub>2</sub> 5mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM. A atividade hemaglutinante foi realizada em duplicata através da diluição seriada de 50 µL da solução de lectina em 50 µL de tampão com adição final de 50 µL de eritrócito tratados de coelho 3% em todos os poços. Ao final, a placa foi deixada por 30 minutos a 37°C com mais 30 minutos em temperatura ambiente, sendo avaliado o título de hemaglutinação. O título de hemaglutinação obtido foi comparado ao controle e expresso em porcentagem.

#### 3.4.2 Estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII frente a diferentes temperaturas

Com o intuito de analisar os efeitos da temperatura na estabilidade da atividade de CRLII, a lectina foi solubilizada em tris-HCl 0,1M pH 7,6 com NaCl 0,15M, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e MnCl<sub>2</sub> 5 mM em sete alíquotas diferentes. Essas alíquotas foram aquecidas em banho seco a 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C (ThermoCell HB-202, Bioer), sendo resfriadas a temperatura ambiente para

então haver a realização da atividade hemaglutinante. A atividade hemaglutinante foi realizada em duplicata através da diluição seriada de 50 µL da solução de lectina em 50 µL de tampão com adição final de 50 µL de eritrócito tratados de coelho 3% em todos os poços. Ao final, a placa é deixada por 30 minutos a 37°C com mais 30 minutos em temperatura ambiente, sendo avaliado o título de hemaglutinação, que foi comparado ao controle e expresso em porcentagem.

#### 3.4.3 Dependência de cofatores metálicos e estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII

Para avaliação da dependência de cofatores metálicos e a alteração na atividade hemaglutinante de CRLII foi utilizado o quelante de metais ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 25mM solubilizado em tampão tris-HCl 0,1M pH 7,6. Essa solução foi utilizada para solubilizar CRLII 30 minutos antes da realização da atividade hemaglutinante. A atividade hemaglutinante foi realizada em duplicata através da diluição seriada de 50 µL da solução de lectina em 50 µL de tampão com adição final de 50 µL de eritrócito tratados de coelho 3% em todos os poços. Ao final, a placa é deixada por 30 minutos a 37°C com mais 30 minutos em temperatura ambiente, sendo avaliado o título de hemaglutinação, que foi comparado ao controle e expresso em porcentagem.

#### 3.5 Modelagem molecular de CRLII

Para a determinação da estrutura tridimensional de CRLII por modelagem computacional é necessário o modelo tridimensional de uma proteína que possua a sequência de aminoácidos com maior homologia possível ao de CRLII. Para isso, a sequência de aminoácidos de CRLII foi obtida a partir do banco de dados de Recurso Universal de Proteínas (Universal Protein Resource UniProt). De posse dessa sequência (P86795), uma análise de similaridade foi realizada entre a sequência de aminoácidos de CRLII e a estrutura primária de proteínas do Banco de Dados de Proteínas (PDB), sendo utilizado a ferramenta Escore de Posição Específica – Ferramenta básica de Pesquisa de Alinhamento Local (PSI-BLAST), que proporciona um meio de detectar relações distantes entre proteínas, para a busca dessas sequências (ALTSCHUL et al., 1997; BHAGWAT; ARAVIND, 2007). As proteínas com maiores similaridades foram selecionadas para alinhamento múltiplo através do programa *ClustalOmega* (SIEVERS et al., 2011) e o resultado do alinhamento foi representado através do uso do *ESPrpt* 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014).



Ao identificar a sequência com maior similaridade ao de CRLII foi realizada uma busca pela estrutura tridimensional dessa proteína no Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank PDB). O programa *MODELLER* v9.16 foi utilizado para a modelagem da estrutura tridimensional de CRLII utilizando como modelo a proteína com maior homologia de sequência de aminoácidos a CRLII e com melhor resolução no PDB (ESWAR et al., 2001).

Para a seleção inicial das melhores estruturas modeladas, dentre as vinte geradas pelo programa, foram utilizados os parâmetros de função objetiva (molpdf) e de Energia Discreta Otimizada de Proteína (Discrete Optimized Protein Energy DOPE) do *MODELLER* (ESWAR et al., 2001). Esses parâmetros medem a energia de cada modelo gerado e, aquele com menor valor é considerado a estrutura mais próxima da realidade. Aqueles modelos com os menores valores de molpdf e DOPE foram submetidas a validação pelo servidor Swiss-Model (Protein Structure and Model Assessment Tools) (BENKERT; KÜNZLI; SCHWEDE, 2009). O modelo com os melhores valores de *QMEAN* (valores mais próximos de 1) (BENKERT; TOSATTO; SCHOMBURG, 2008), *Z-score* (valores mais próximos de zero) (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011) e com a melhor qualidade estereoquímica determinada pela ferramenta *PROCHECK* (LASKOWSKI et al., 1993) foi o escolhido para representar a estrutura tridimensional de CRLII. O programa *Pymol* v 1.7.4.5 (Schrödinger, LLC) foi utilizado para geração das figuras. Além disso, o servidor *Verify\_3D* foi aplicado para determinar a compatibilidade da estrutura tridimensional modelada com a estrutura primária de CRLII, sendo necessário a obtenção de pelo menos 80% dos aminoácidos com valor de escore igual ou superior a 0.2 (BOWIE; LTCY; EISENBERG, 1991; LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992). Por fim, as interações entre a proteína e os metais foram determinadas com o uso do programa *LIGPLOT+* (LUSCOMBE; LASKOWSKI; THORNTON, 1997).

### *3.6 Docking molecular da estrutura de CRLII com os carboidratos N-acetil-D-galactosamina e $\alpha$ -lactose*

O *docking* molecular da estrutura modelada de CRLII com os carboidratos *N*-acetil-D galactosamina e  $\alpha$ -lactose foi realizado com o programa *CLC Drug Discovery Workbench* v. 3.01 (CLC Bio, Boston, MA, USA). Uma sobreposição com a lectina modelo e CRLII foi realizada para determinar a localização do sítio de reconhecimento a carboidratos utilizando o programa *WinCoot* v0.8.2 (EMSLEY et al., 2010). De posse dessa localização, foi realizada uma minimização de

energia dos complexos através de 1000 passos de *steepest descent* e 100 passos de *conjugate gradient* com o programa *Chimera* v1.11.2 (PETTERSEN et al., 2004). Após essa etapa os parâmetros de raio de 10 Å<sup>3</sup> ao redor do sítio de reconhecimento a carboidratos e 5000 iterações foram utilizados para o *docking* e os valores de escores obtidos expressos em unidades arbitrárias, onde valores mais negativos indicam uma interação mais forte. As interações entre a proteína e o ligante foram determinadas com o uso do programa LIGPLOT+ (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) e as imagens do *docking* foram feitas com o programa PyMol.

### 3.7 Atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória de CRLII em modelo de edema de pata

Com objetivo de avaliar a capacidade pró-inflamatória e anti-inflamatória da lectina CRLII foi utilizado o modelo experimental de edema de pata. Ratos fêmeas adultos Wistar de 150-250 g procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceara (UFC) foram mantidos em ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12h e temperatura 24 (±2) °C, comida e água à vontade. Os experimentos foram conduzidos na Universidade Estadual do Ceará (UECE) no Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação (LAFFIN) de acordo com os princípios para uso de animais na pesquisa e aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE - n° 10130208-8/40). Antes do início do experimento, os animais foram aclimatados por uma hora e todas as soluções utilizadas durante o experimento foram solubilizadas em solução salina estéril (NaCl 0,9%).

#### 3.7.1 Atividade pró-inflamatória de CRLII

Os animais foram divididos em quatro grupos compostos por 6 animais por grupo: controle negativo (solução salina) e CRLII em três diferentes concentrações: 0,01; 0,1 e 1 mg/Kg. Para a avaliação do efeito pró-inflamatório, o edema de pata foi induzido por injeção subcutânea intraplantar da lectina CRLII em um volume de 0,1 mL/ 100g de peso animal e o controle apenas a solução salina. O edema foi mensurado utilizando um pletismômetro (LE 7500- PanLab) comparando-se o volume de líquido deslocado antes (tempo zero) e depois da injeção. A medição de volume deslocado para os animais testes foram realizadas após 30 minutos da aplicação e a cada uma hora até a quinta hora da aplicação (LANDUCCI et al., 1995). Os resultados foram expressos como um aumento no volume da pata durante o experimento subtraído do volume inicial medido

no tempo zero para cada grupo e os gráficos representados como curva dose-resposta (mL), que permite visualizar o aumento do edema com o decorrer do tempo e como a área sob a curva (unidades arbitrárias), que permite visualizar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) e analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerado os valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0.05$  utilizando o programa Graphpad Prism v5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA).

### 3.7.2 Atividade anti-inflamatória de CRLII

Para a avaliação do efeito anti-inflamatório de CRLII, os animais foram divididos em três grupos: controle positivo (carragenina tipo IV), controle negativo (solução salina) e CRLII mais carragenina, sendo compostos por 6 animais por grupo. Avaliou-se a capacidade dessa lectina em reduzir o edema causado pela ação da carragenina. Portanto, os animais foram tratados por via endovenosa com CRLII na concentração de 1mg/Kg do animal 30 minutos antes da injeção subcutânea na pata traseira com carragenina (300 $\mu$ g/pata). Os grupos controle foram tratados apenas com solução salina ou carragenina (CIRINO et al., 1989; LANDUCCI et al., 1995; SEIBERT et al., 1994). As medições do volume deslocado para os animais testes foram realizadas após 30 minutos da aplicação de carragenina e a cada uma hora até a quinta hora da aplicação. A redução do edema foi mensurada utilizando um pletismômetro (PanLab, LE 7500-Spain) comparando-se o volume de líquido deslocado antes (tempo zero) e depois dos tratamentos de cada grupo. Os resultados foram expressos como curva dose-resposta (mL), que permite visualizar o aumento do edema com o decorrer do tempo e a área sob a curva (unidades arbitrárias), que permite visualizar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M e analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerado os valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0.05$  utilizando o programa Graphpad Prism v5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA).

### 3.7.3 Avaliação da participação do CRD na atividade anti-inflamatória de CRLII

Com o intuito de verificar a participação do sítio de reconhecimento a carboidrato (CRD) no processo anti-inflamatório foi realizada a inibição com  $\alpha$ -lactose 0,1 M por 60 minutos a 37 °C antes da aplicação endovenosa de CRLII. Após esse período, a solução de carregenina foi injetada e o mesmo protocolo para a atividade anti-inflamatória seguido.

A redução do edema foi mensurada utilizando um pletismômetro (PanLab, LE 7500-Spain) comparando-se o volume de líquido deslocado antes (tempo zero) e depois dos tratamentos de cada grupo. Os resultados foram expressos como curva dose-resposta (mL), que permite visualizar o aumento do edema com o decorrer do tempo e a área sob a curva (unidades arbitrárias), que permite visualizar as diferenças entre os grupos. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M e analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerado os valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0.05$  utilizando o programa Graphpad Prism v5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA).

### 3.8 Efeitos de CRLI e CRLII em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6

As lectinas CRLI e CRLII foram diluídas em tampão ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazina etanosulfônico (HEPES) 25mM pH 7,0 na concentração estoque de 1mg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas antes de cada experimento a partir da diluição em HEPES da solução estoque e adicionadas em cada poço correspondente para que as concentrações finais da lectina fossem de 10, 30, 50 e 100  $\mu$ g/mL (KNAUT, 2016).

As células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 foram mantidas em garrafas de cultura de células de 25 cm<sup>3</sup> (Kasvi) sendo suplementadas com o meio de cultivo modificado Dulbecco-Eagle (Dulbecco Modified Eagle Medium- DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF) e os antibióticos penicilina 100 unidades/ml e estreptomicina 100 mg/ml e mantidas em estufa (Ultrasafe HF 212 UV- Biosystems) a 37°C em atmosfera umidificada de 95% de oxigênio (O<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (KNAUT, 2016; TRENTIN; ALVAREZ-SILVA, 1998). Todas as soluções utilizadas foram previamente aquecidas em banho-maria a 37°C antes de entrarem em contato com as células, todos os materiais e soluções previamente autoclavados ou filtrados e todos os procedimentos realizados em câmara de fluxo laminar de segurança classe II (Bio Seg 12-Veco).

Um dia antes de cada experimento, o meio de cultura era retirado e a garrafa de cultura de células lavada com tampão fosfato salino 0,01M pH 7,4 (PBS) e retirado o PBS. Após isso,

1,5mL de tripsina/EDTA 0,125% (v/v) em tampão PBS 0,01M pH 7,4 foi adicionado e a garrafa de cultura de células colocada em estufa por 5 minutos a 37°C para individualizar e suspender as células. Para a inativação da tripsina 1 mL de SBF 10% foi adicionado e as células passadas para um tubo cônico tipo Falcon (Kasvi) sendo centrifugadas a 1200 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos (CT-0603, Parsec). Em seguida, as células foram suspendidas em 2mL de meio de cultura e contadas em câmara de Neubauer (Kasvi) (KNAUT, 2016). De posse da concentração inicial de células, o plaqueamento foi realizado de acordo com a concentração de células e quantidade de poços por placa necessários para cada tipo de experimento (POSSER et al., 2007). Após o plaqueamento, as placas foram colocadas na estufa e deixadas por 24h antes do tratamento com as lectinas.

### 3.8.1 Análise da viabilidade das células da linhagem C6 pelo teste colorimétrico do MTT após tratamento com CRLI ou CRLII

A viabilidade das células da linhagem C6 foi analisada pelo teste colorimétrico com o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) através do ensaio de redução em que as desidrogenases mitocondriais em células viáveis reduzem o MTT em cristais de formazana, portanto, a redução da quantidade de cristais formados indica uma redução na viabilidade celular. Para esse ensaio foram utilizados quatro grupos: controle (tampão HEPES) e tratamentos 10, 30, 50 e 100 µg/mL. Cada grupo tem uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas.

As células da linhagem C6 foram plaqueadas um dia antes do ensaio na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em uma placa de 96 poços (100 µL/poço). Após 24h, houve a troca do meio de cultura e o tratamento com as lectinas CRLI ou CRLII por 24h e 48h. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4 (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, HEPES 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM). Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100 µL dimetil sulfóxido puro (DMSO) por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana formados (MOSMANN, 1983). A absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas (Infinite M200-Tecan). Os resultados de absorbância obtidos foram expressos em porcentagem de viabilidade, sendo o controle considerado 100%.

Os resultados foram analisados usando a versão Graphpad Prism v5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os valores obtidos foram avaliados por análise de variância de um sentido (one way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos. Além disso, foi realizado uma análise de variância de dois sentidos (two way ANOVA) para avaliar a relação entre os tempos 24 e 48h e os grupos testados.

### 3.8.2 Análise dos efeitos na morfologia das células da linhagem C6 após tratamento com CRLI ou CRLII

Objetivando a análise dos efeitos morfológicos causados pela ação de CRLI ou de CRLII nas concentrações de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após tratamento por 24 e 48 horas, as células da linhagem C6 foram observadas em microscópio óptico de luz a fim de visualizar a redução no tamanho e a alteração da forma sofrida por essas células. As imagens foram registradas pela câmera (Eclipse T2000-U, Nikon) (CUI et al., 2016).

### 3.8.3 Efeitos na migração de células de glioma da linhagem C6 após tratamento com CRLI ou CRLII

O desenho esquemático do ensaio de migração consistiu de 5 grupos: controle e concentrações finais 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para CRLI e CRLII. Para as duas lectinas testadas, o experimento possui duas repetições biológicas e cada grupo apresenta duas triplicatas. As células foram plaqueadas na concentração de  $50 \times 10^3$  por poço em uma placa de 48 poços (200 $\mu\text{L}$ /poço) (Kasvi). Para o início do experimento houve a remoção de meio de cultura de cada poço e a realização de um risco utilizando a ponta de uma ponteira de 200 $\mu\text{L}$ . Após o risco, cada poço foi lavado com PBS para remover as células fracamente aderidas. Posteriormente, um novo meio de cultura foi adicionado e as lectinas CRLI ou CRLII foram adicionadas de modo que as concentrações finais fossem de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e no grupo controle apenas HEPES foi adicionado (AROUÍ et al., 2016). As imagens foram capturadas em triplicatas para as duas triplicatas de cada grupo pela câmera (Eclipse T2000-U, Nikon) acoplada ao microscópio óptico de luz invertido nos tempos 0h, 24h e 48h após o tratamento com as lectinas.

A redução da largura do risco feito durante o experimento foi utilizada como parâmetro para a avaliação da capacidade de migração e crescimento das células. Portanto, o programa ImageJ v1.x foi utilizado para medir a largura do risco em três pontos distintos para cada foto

(SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Os resultados foram expressos em médias de porcentagem de redução da largura do risco para cada repetição biológica para os tempos 0, 24 e 48h. Os valores das médias obtidas para os tempos 24 e 48h foram subtraídas da média do tempo 0h e o cálculo estatístico realizado pela análise de variância de dois sentidos (two away ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados como estatisticamente significativos e utilizado o programa Graphpad Prism v5.0 para os cálculos estatísticos e desenho dos gráficos (La Jolla, Califórnia, EUA).

#### 3.8.4 Avaliação dos efeitos fisiológicos nas células da linhagem C6 por marcação fluorescente com laranja de acridina, iodeto de propídio e Hoechst após tratamento com CRLI ou CRLII por 24h

Para observar os efeitos fisiológicos de CRLI e CRLII, após tratamento por 24h, no padrão de morte celular. Para o desenho experimental desse ensaio há cinco grupos: controle (tampão HEPES) e tratamentos 10, 30 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  para as duas lectinas. Cada grupo tem uma repetição biológica com duas triplicatas.

Os autofagossomos são vesículas ácidas presentes em células que estão sofrendo autofagia. O marcador laranja de acridina (LA) é capaz de atravessar a membrana do autofagossomo e emitir fluorescência vermelha quando em meio ácido, enquanto que emite fluorescência verde outros componentes celulares, como núcleo. As células da linhagem C6 foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma concentração de  $50 \times 10^3$  células por poço (200  $\mu\text{L/poço}$ ). Após 24 horas, as lectinas foram adicionadas nas concentrações finais de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  e controle adicionado o tampão HEPES. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 3,7% a 37°C e coradas com LA 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 20 minutos ao abrigo da luz (PRATT; ROY; ANNABI, 2012). As células foram visualizadas nos comprimentos de onda de 470 nm de excitação e 525 nm de emissão em microscópio óptico de luz invertido e registrado pela câmera acoplada (Eclipse T2000-U, Nikon).

Com a utilização do iodeto de propídio (IA) é possível identificar a morte celular por necrose, uma vez que esse marcador somente consegue atravessar a membrana nuclear quando ela está permeável, ou seja, danificada, ao intercalar com qualquer fragmento de DNA e emitir fluorescência vermelha. Já a utilização do Hoechst é possível identificar a morte celular por apoptose através da fluorescência azul, redução do tamanho e fragmentação do conteúdo nuclear,

uma vez que estando com o núcleo intacto há a coloração uniforme do núcleo. (KABIR et al., 2013; ROY et al., 2016). As células da linhagem C6 foram plaqueadas em placa de 48 poços (200  $\mu$ L/poço) nas mesmas condições e concentrações do ensaio com o LA. Após o tratamento por 24h, as células foram lavadas com PBS, incubadas sequencialmente em tampão de ligação (HEPES 0,01, NaCl 140 mM e CaCl<sub>2</sub> 25 mM, pH 7,4) contendo Hoechst 1  $\mu$ g/mL e IA 14  $\mu$ g/mL durante 15 minutos ao abrigo da luz (SINGH et al., 2016). As células foram visualizadas nos comprimentos de onda 488 nm de excitação e 560 em microscópio óptico de luz invertido e as fotos registradas pela câmera (Eclipse T2000-U, Nikon).



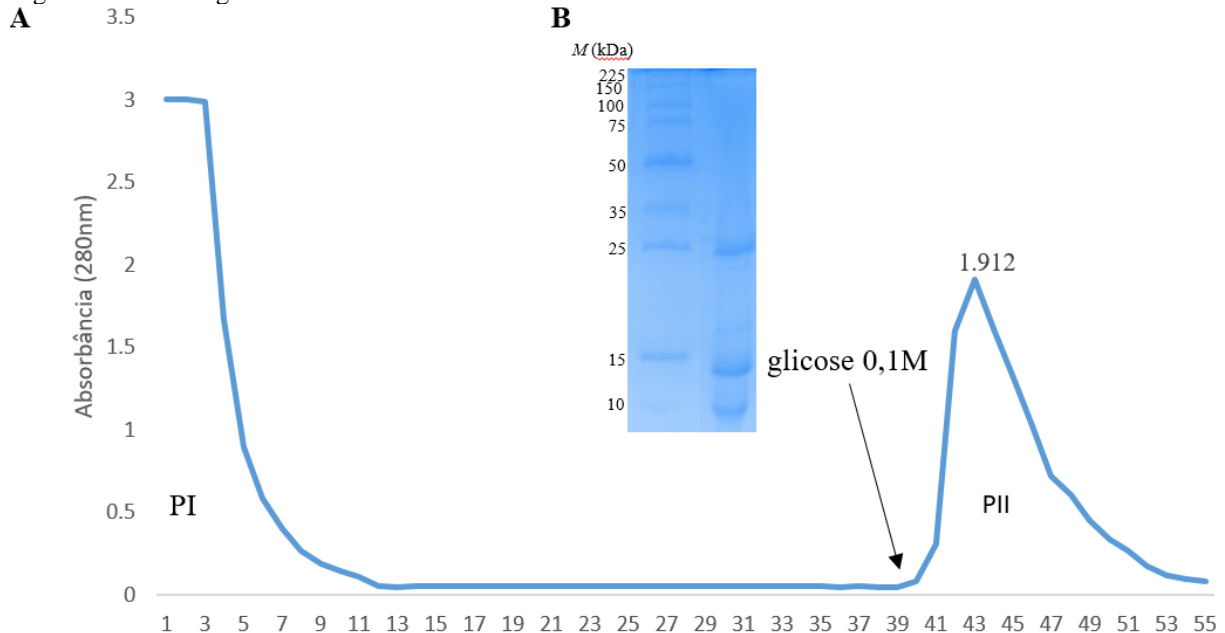
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Purificação e SDS-PAGE de CRLI e CRLII

A lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRLI) foi purificada em um único passo cromatográfico por afinidade com matriz Sephadex G-50 utilizando glicose 0,1M para a eluição do único pico retido (PII), que contém a CRLI (Figura 7A).

A eletroforese em gel de poliacrilamida 15% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) revelou que a amostra coletada de PII apresenta três bandas de massas aparentes em torno de 25, 14 e 12 kDa (Figura 7B). Apesar da presença dessas três bandas, CRLI está pura, pois elas correspondem as cadeias alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ), respectivamente, e são resultantes da permutação circular, fenômeno comum nas lectinas pertencentes a subtribo *Diocleinae* e anteriormente descrito para CRLI (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; CAVADA et al., 2006).

Figura 7 - Cromatograma e SDS-PAGE de CRLI.

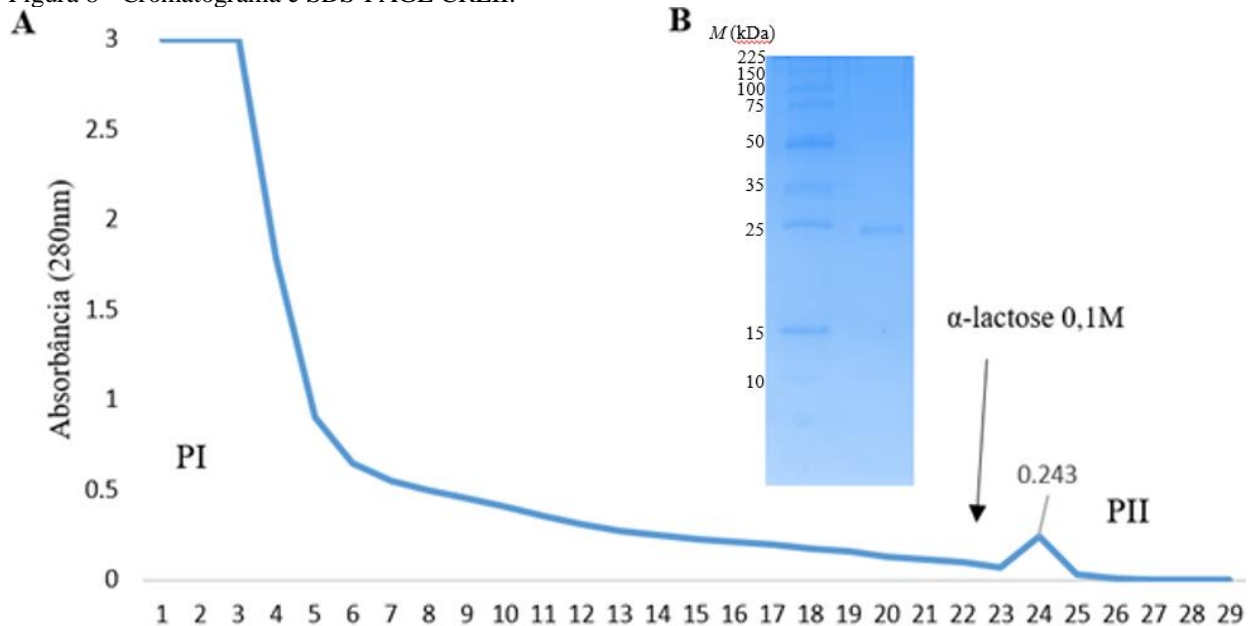


Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Perfil de eluição do extrato bruto das sementes de *C.roseum* aplicado em cromatografia de afinidade Sephadex G-50. O pico não retido foi eluído com a solução de extração (NaCl 0,15M, CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> 5mM) e o pico retido PII, que contém CRLI, foi eluído com a solução de extração adicionada de glicose 0,1 M. Foram coletadas frações de aproximadamente 2 mL e monitorado pelo espectrofotômetro a 280 nm. (B) Perfil eletroforético de CRLI. Coluna 1: Marcador molecular e coluna 2: CRLI.

A lectina lactose específica de *Cymbosema roseum* (CRLII) foi purificada em uma única etapa cromatográfica pela matriz de afinidade Sepharose-4B-lactose utilizando  $\alpha$ -lactose 0,1M para a eluição do único pico retido (PII), que contém a CRLII (Figura 8A).

O SDS-PAGE de CRLII apresenta uma banda de massa molecular aparente de 25 kDa correspondente a CRLII (Figura 8B). Diferentemente do que o observado para CRLI e outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, CRLII não sofre permutação circular, portanto, não apresenta as bandas correspondentes as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  (CAVADA et al., 1998; CORREIA et al., 2011; MOREIRA et al., 1983; RIJKEN et al., 1997; ROCHA et al., 2009). Estudos com sequências de lectinas dessa subtribo tem mostrado que esse processo não ocorre em algumas dessas lectinas, dessa forma, as diferenças de afinidade apresentadas por lectinas isoladas de uma mesma semente podem ser explicadas (PÉREZ, 1998; PEREZ; HERNANDEZ; MORA, 1990).

Figura 8 - Cromatograma e SDS-PAGE CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Perfil de eluição do extrato bruto das sementes de *C.roseum* aplicado em cromatografia de afinidade Sepharose-4B-lactose. O pico não retido foi eluído com a solução de extração (NaCl 0,15M, CaCl<sub>2</sub> e MnCl<sub>2</sub> 5mM) e o pico retido (PII), que contém CRLII foi eluído com a solução de extração adicionada de  $\alpha$ -lactose 0,1 M. Foram coletadas frações de aproximadamente 2 mL e monitorado pelo espectrofotômetro a 280 nm. (B) Perfil eletroforético de CRLII. Coluna 1: Marcador molecular e coluna 2: CRLII.

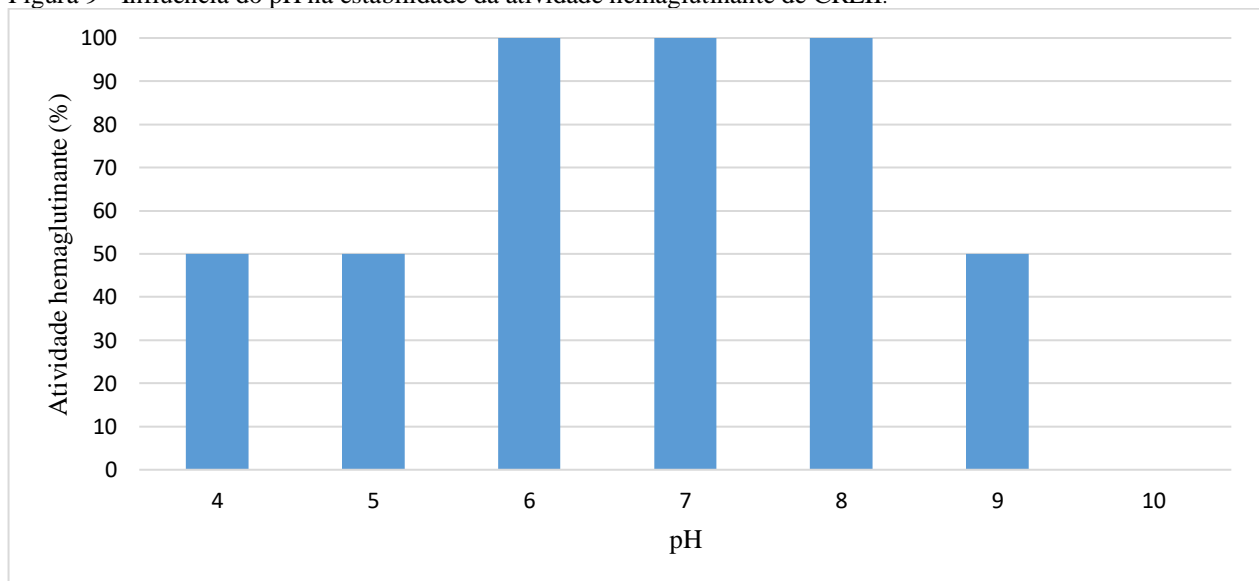
#### 4.2 Caracterização físico-química da estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII

A estabilidade e atividade de uma proteína estão estreitamente relacionados com as condições físico-químicas do meio em que essa proteína se encontra (BECKTEL; SCHELLMAN,

1987; DILL; SHORTIE, 1991; JAENICKE, 1991). Dessa forma, a determinação do pH e temperatura ideais e a dependência de cofatores metálicos são fatores essenciais para a manutenção da atividade de CRLII fornece informações importantes que auxiliam no planejamento de outros experimentos.

CRLII apresenta atividade ótima entre os pH 6-8, enquanto em pH mais ácidos de 4-5 e pH básico 9 há a redução em 50% da atividade hemaglutinante. Já no pH 10, CRLII perde completamente sua capacidade de aglutinar eritrócitos (Figura 9). CRLII é capaz de manter 50% de sua atividade em valores de pH 4-9, enquanto outras lectinas de leguminosas, como *Canavalia virosa* (ConV) e *Platymiscium floribundum* (PFL) que apresentam uma menor relação entre a variação de pH e estabilidade da atividade (OSTERNE et al., 2014; PEREIRA-JUNIOR et al., 2012).

Figura 9 - Influência do pH na estabilidade da atividade hemaglutinante de CRLII.

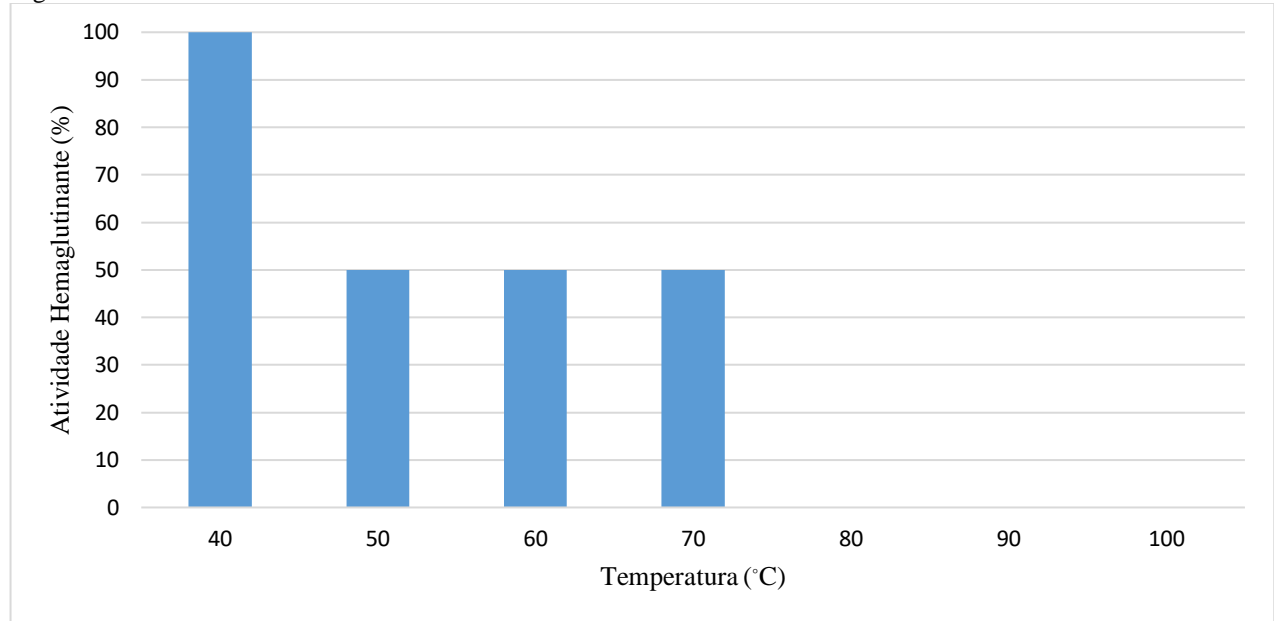


Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores de unidades atividade hemaglutinante (UH) foram expressos em porcentagem de atividade hemaglutinante em relação ao controle.

Em relação a temperatura, CRLII apresenta atividade ótima em temperaturas brandas que varia da temperatura ambiente até 40°C. De 50 °C a 70 °C ocorre redução na atividade para 50% e a partir de 80 °C há a perda total da atividade (Figura 10). CRLII apresenta menor termoestabilidade do que outras lectinas da família das leguminosas, como a lectina de *Canavalia virosa* (ConV) e *Platymiscium floribundum* (PFL) ou mesmo lectinas de outras famílias, como a lectina do floema de *Cucumis sativus* (CPL) que mantêm atividade total até altas temperatura como

60 °C (NAREDDY; BOBBILI; SWAMY, 2016a; OSTERNE et al., 2014; PEREIRA-JUNIOR et al., 2012).

Figura 10 - Termoestabilidade de CRLII.



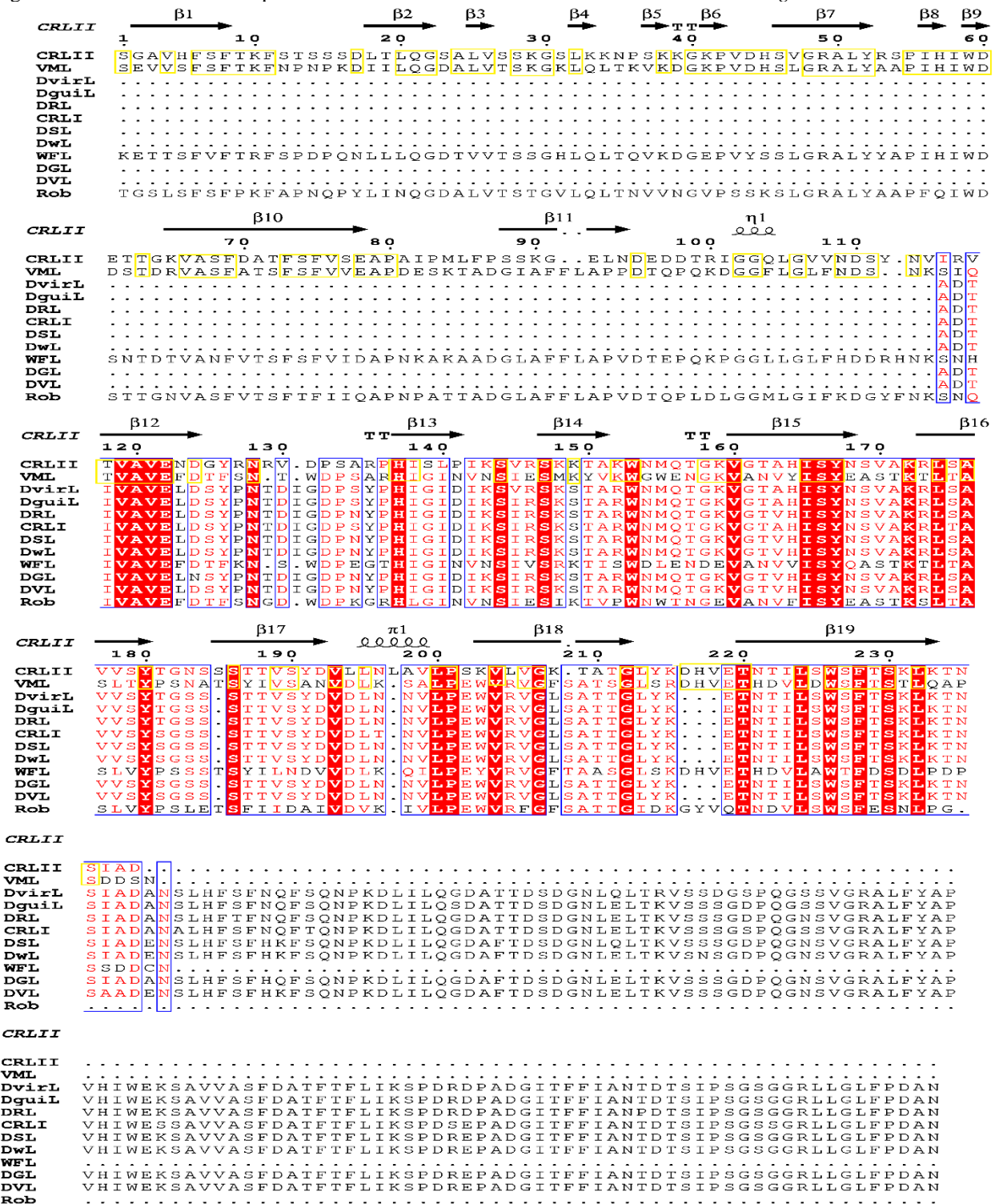
Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores de unidades atividade hemaglutinante (UH) foram expressos em porcentagem de atividade hemaglutinante em relação ao controle.

Com relação a dependência de cofatores metálicos para a manutenção da atividade hemaglutinante, CRLII não perde a atividade quando tratada com o quelante de metais EDTA. Esse resultado é pouco comum em lectinas de leguminosas, que necessitam de cofatores metálicos para a atividade, entretanto, isso já foi observado em outras lectinas dessa família, como *Canavalia catartica* (Con C), *Canavalia virosa* (ConV) e *Platymiscium floribundum* (PFL) (LORIS et al., 1998; NAREDDY; BOBBILI; SWAMY, 2016b; OSTERNE et al., 2014; PEREIRA-JUNIOR et al., 2012; SHARON; LIS, 1990; SUSEELAN et al., 2007).

#### 4.3 Modelagem molecular de CRLII

A busca por sequências similares a de CRLII (P86795) no banco de dados do PDB e o alinhamento dessas sequências revelou que CRLII possui baixa similaridade com outras proteínas da tribo *Phaseoleae*, enquanto, apresenta maior similaridade com outras lectinas das tribos *Dalbergiae*, *Robinieae* e *Millettieae* que têm especificidade aos carboidratos  $\alpha$ -lactose e *N*-acetil-D-galactosamina, respectivamente (Figura 11) (CAVADA et al., 1998; KUROKAWA; TSUDA; SUGINO, 1976; RABIJNS et al., 2001).

Figura 11 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de CRLII com lectinas da família *Leguminosae*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Alinhamento da sequência de aminoácidos de CRLII com lectinas da subtribo *Diocleinae* e família *Leguminosae* usando o programa *ESPrift* 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). Legenda:  $\beta$  folhas beta,  $\pi$  alfa hélices e  $\eta$  loop. *Cymbosema roseum* lactose específica (CRLII), *Vatairea macrocarpa* (VML), *Dioclea virgata* (DvirL), *Dioclea guianensis* (DguiL), *Dioclea rostrata* (DRL), *Cymbosema roseum I* (CRLI), *Dioclea sclerocarpa* (DSL), *Dioclea wilsonii* (DwL), *Wisteria floribunda* (WFL) *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea violacea* (DVL),

*Robinia pseudoacacia* (**Rob**). Quadros amarelos representam resíduos de aminoácidos idênticos entre CRLII e VML, quadros azuis com preenchimento vermelho e letras brancas representam resíduos de aminoácidos idênticos entre todas as proteínas, quadro azuis com letras vermelhas representam resíduos de aminoácidos de CRLII idênticos aos resíduos da maioria das proteínas e quadros azuis com letra preta representam resíduos de aminoácidos de CRLII diferentes da maioria das demais proteínas.

CRLII e a lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) apresentam escore máximo de 196 e similaridade em 49%, enquanto, *Dioclea virgata* (DvirL), a segunda lectina com maior escore de 156. Portanto, avaliando os escores máximos obtidos e as porcentagens de similaridade (Tabela 1) gerados pelo alinhamento das sequências similares a de CRLII foi possível determinar que VML apresenta os melhores resultados. Dessa forma, ela foi escolhida para ser utilizada como modelo tridimensional para a determinação da estrutura de CRLII. As diferenças observadas no alinhamento da sequência de CRLII em relação ao anteriormente reportado deve-se ao fato de que a sequência utilizada correspondia apenas a 80% da sequência total de CRLII, além de que houve um aumento na quantidade de estruturas e sequências depositadas nos bancos de dados do PDB e Uniprot (ROCHA et al., 2009).

Tabela 1 – Lectinas com maior similaridade a CRLII (continua).

Lectina	Escore máximo	Similaridade	Identificação Uniprot	Identificação PDB
<i>Vatairea macrocarpa</i> (VML)	196	49%	P81371	4U2A
<i>Dioclea virgata</i> (DvirL),	156	78%	P58907	3RRD
<i>Dioclea guianensis</i> (DguiL),	156	77%	P81637	1H9P
<i>Dioclea rostrata</i> (DRL)	152	76%	P58908	2ZBJ
<i>Cymbosem roseum I</i> (CRLI),	151	75%	P86184	3A0K

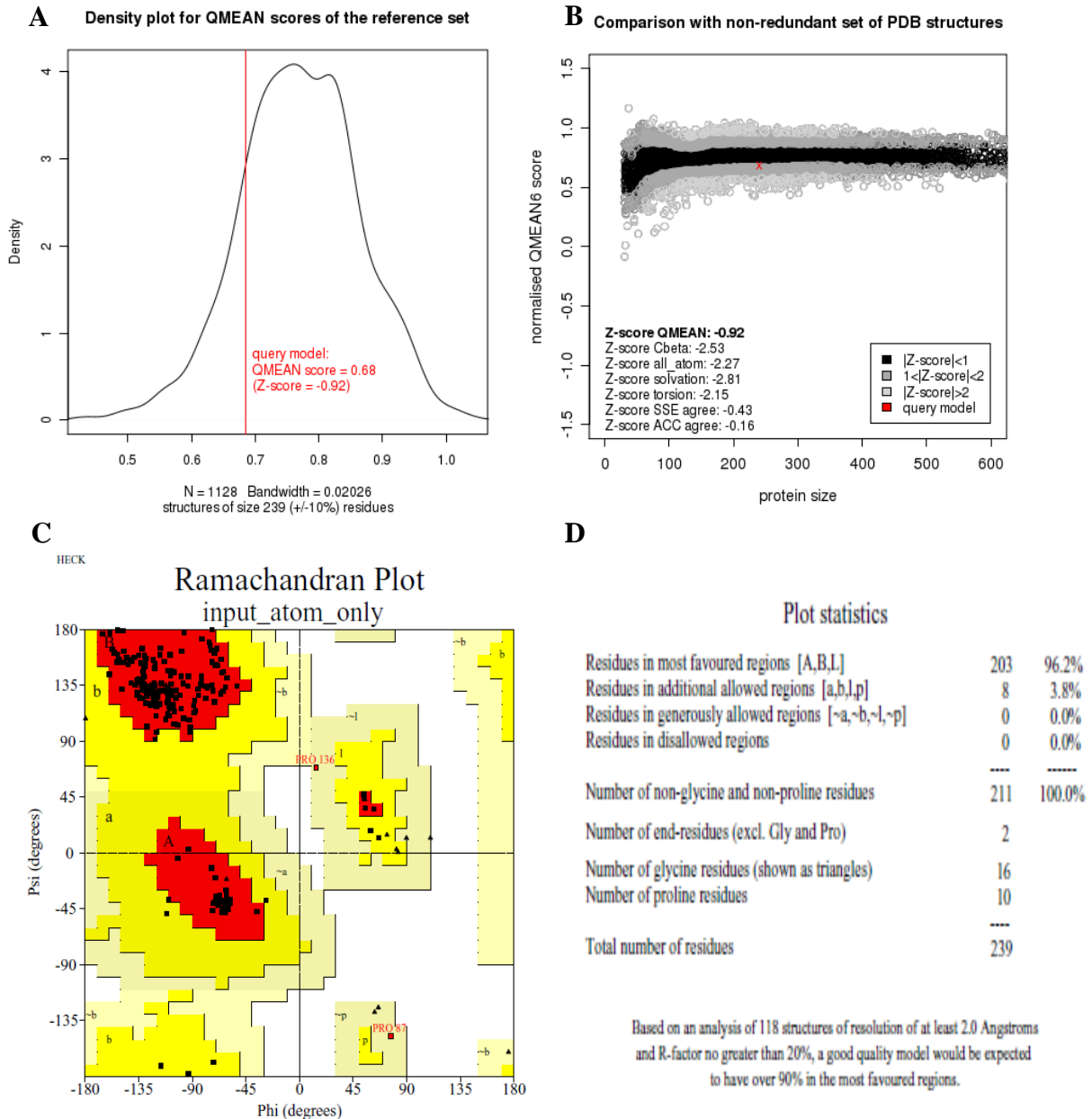
Tabela 1 – Lectinas com maior similaridade a CRLII (conclusão).

<b>Lectina</b>	<b>Escore máximo</b>	<b>Similaridade</b>	<b>Identificação Uniprot</b>	<b>Identificação PDB</b>
<i>Dioclea sclerocarpa</i> (DSL)	151	83%	B3EWJ2	4NOT
<i>Dioclea wilsonii</i> (DwL)	151	75%	P86624	3SH3
<i>Wisteria floribunda</i> (WFL)	149	94%	Patente 20150329602	5KXB
<i>Dioclea grandiflora</i> (DGL)	149	83%	P08902	1DGL
<i>Dioclea violacea</i> (DVL)	149	83%	P58909	2GDF
<i>Robinia pseudoacacia</i> (Rob)	140	97%	Q41159	1FNY

Fonte: Elaborado pelo autor.

Utilizando o programa *MODELLER* juntamente com a sequência de aminoácidos de CRLII e VML e a estrutura tridimensional de VML foram gerados 20 modelos possíveis para CRLII. Aqueles modelos com os menores valores de molpdf e DOPE foram submetidos ao servidor *SWISS-MODEL*, sendo selecionado um único modelo com os melhores valores de *QMEAN* (valores mais próximos de 1), *Z-score* (valores mais próximos de zero) e com a melhor qualidade estereoquímica determinada pela ferramenta *PROCHECK*. O modelo selecionado apresenta os valores de *Z-score* -0.92 e *QMEAN* 0.68. Em relação ao gráfico de Ramachandran, 96,2% dos resíduos de aminoácidos estão em regiões favoráveis e 3,8% em regiões permitidas (Figura 12). Por fim, a avaliação com o servidor *Verify\_3D* revelou que 84,52% da estrutura primária de CRLII está relacionada a estrutura tridimensional modelada.

Figura 12- Parâmetros utilizados para a escolha do melhor modelo para representar a estrutura tridimensional de CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Imagem gerada pelo SWISS-MODEL com os valores de  $Z$ -score -0.92 e  $QMEAN$  0.684 para o melhor modelo de CRLII. (B) Gráfico comparando o valor de  $Z$ -score obtido pela melhor estrutura tridimensional de CRLII com os melhores valores de  $Z$ -score para as estruturas depositadas no PDB, estando os melhores valores de  $Z$ -score, ou seja, mais próximos de 1, representados em preto e estando o valor obtido pelo modelo de CRLII representado com “x” vermelho. (C) Gráfico de Ramachandran para as coordenadas do modelo de CRLII em que as regiões em vermelho, amarelo e laranja representam regiões favoráveis e permitidas. (D) Valores obtidos pela estrutura tridimensional de CRLII na análise do gráfico de Ramachandran pelo PROCHECK com 96,2% de regiões favoráveis e 3,8% de regiões permitidas.

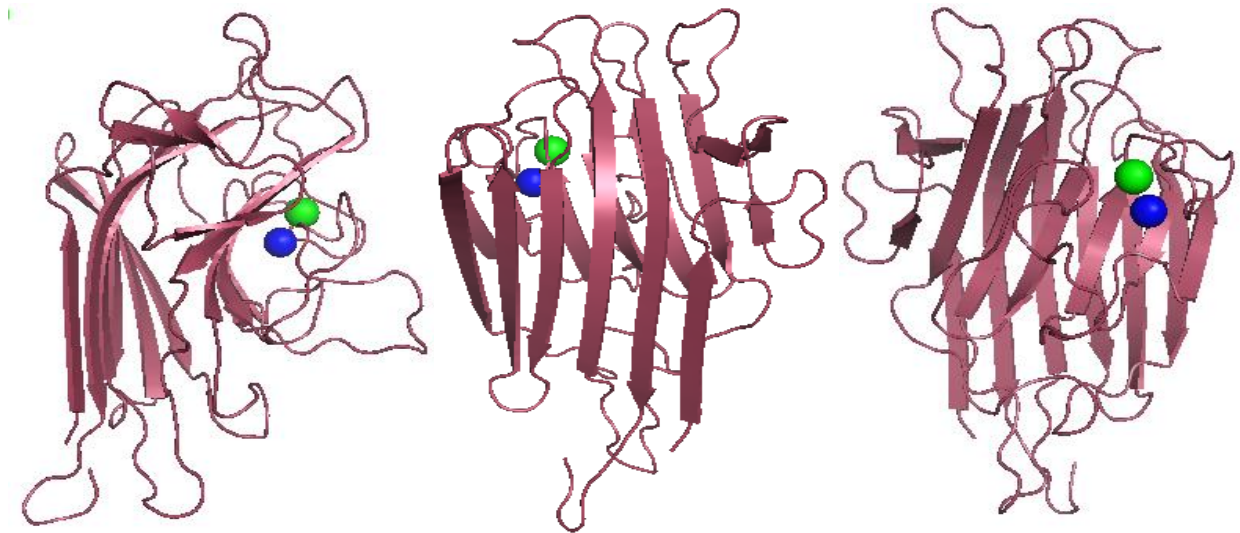
Diferentemente de outras lectinas que já tiveram estrutura modelada, como a lectina de *Canavalia bonariensis* (CaBo) e a recombinante de *Dioclea grandiflora* (pDGL), não há



disponibilidade de uma proteína modelo com alta similaridade para CRLII como houve para as lectinas CaBo e *pDGL* e que poderia afetar a qualidade do modelo gerado para CRLII (DE SOUSA et al., 2016; SILVA et al., 2016). Entretanto, apesar dessa baixa similaridade foi possível gerar uma estrutura tridimensional para CRLII em que todos os parâmetros avaliados apresentam valores dentro dos padrões aceitáveis para boas estruturas. Essa qualidade do modelo gerado também é demonstrada pela análise do resultado de *Z-score*, em que é comparado o valor do modelo de CRLII gerado com os melhores valores de *Z-score* para as estruturas depositadas no PDB, estando o modelo de CRLII (demarcado com “x”) muito próximo a região em preto com as melhores estruturas (Figura 12B). Resultados similares em que a baixa similaridade entre a proteína alvo e a proteína utilizada como modelo não interferiram na geração de uma estrutura tridimensional com boa qualidade também foram obtidos para outras lectinas, como a *Sophora japônica* (SJL) (YADAV et al., 2016a).

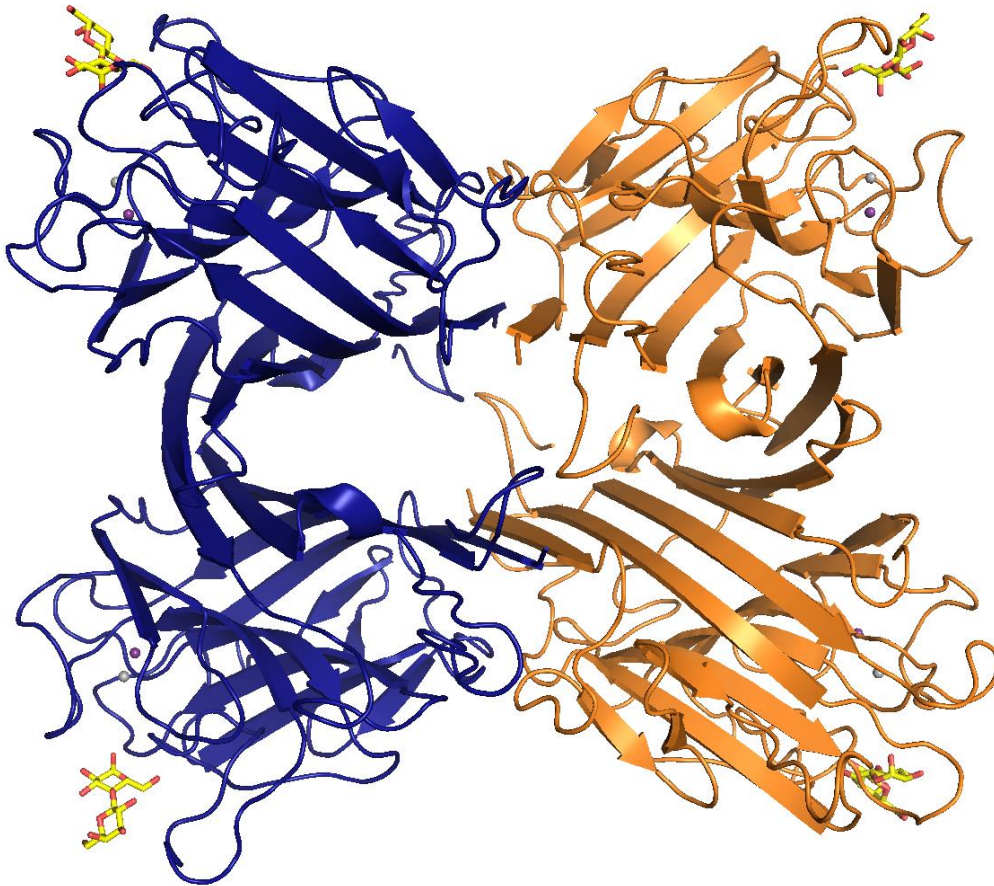
Com 239 aminoácidos, um sítio de reconhecimento a carboidrato, um sítio de ligação a metais por monômero e a presença do motivo *jelly-roll* (Figura 13 e 14), o modelo gerado para CRLII possui características comuns com as lectinas pertencentes a subtribo *Diocleinae* (CAVADA et al., 2001).

Figura 13 – Monômero de CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. Monômero de CRLII (vinho) em diferentes posições: lateral (esquerda), frontal (centro) traseira (direita). Cátions divalentes manganês (azul) e cálcio (verde).

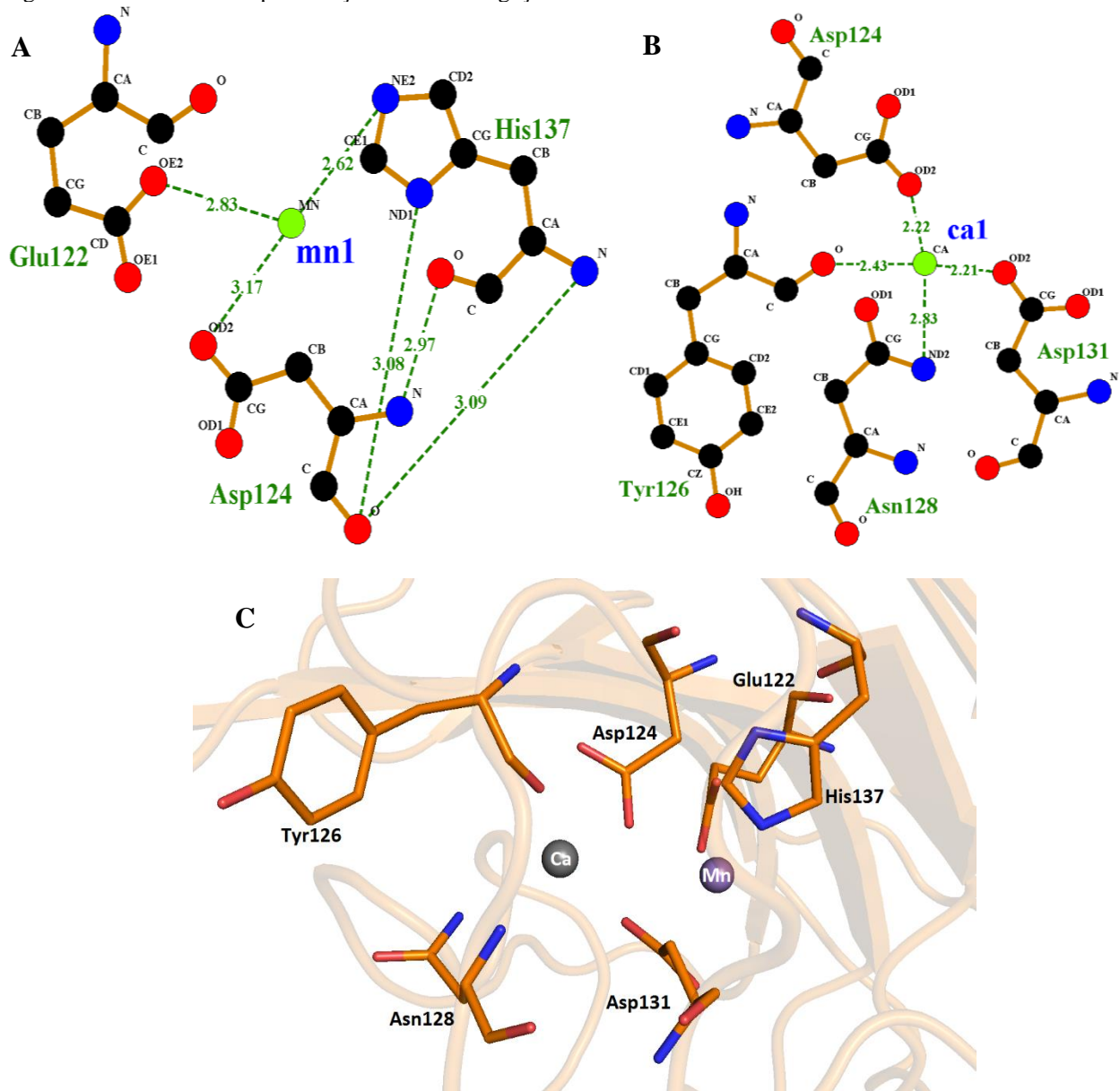
Figura 14 – Estrutura quaternária de CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. Carboidrato  $\alpha$ -lactose representado em traços e os metais em esferas, sendo o manganês em azul e o cálcio em cinza.

Em relação ao sítio de ligação a metais, o manganês é coordenado pelos resíduos: Glu122, His137 e Asp124 (Figura 15A), enquanto o cálcio é coordenado pelos resíduos: ASP124, Tyr126, Asn128 e Asp131 (Figura 15B). Assim como observado nas lectinas VML, WFL e Rob, CRLII apresenta alguns dos resíduos de aminoácidos conservados que fazem parte do sítio de ligação a metais: Glu122, Asp124, Asn128 e His137, como demonstrado pelo alinhamento da sequência dessas lectinas (Figura 11) (CALVETE et al., 1998).

Figura 15 – LIGPLOT e representação do sítio de ligação a metais de CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) LIGPLOT da coordenação do manganês pelos resíduos: GLU122, HIS137, ASP124. (B) LIGPLOT da coordenação do cálcio pelos resíduos: ASP124, TYR126, ANS128 e ASP131. (C) As esferas representam os cátions divalentes cálcio (cinza) manganês (roxo) no sítio de ligação a metais.

#### 4.4 Docking molecular de CRLII e os carboidratos *N*-acetil-*D*-galactosamina e $\alpha$ -lactose

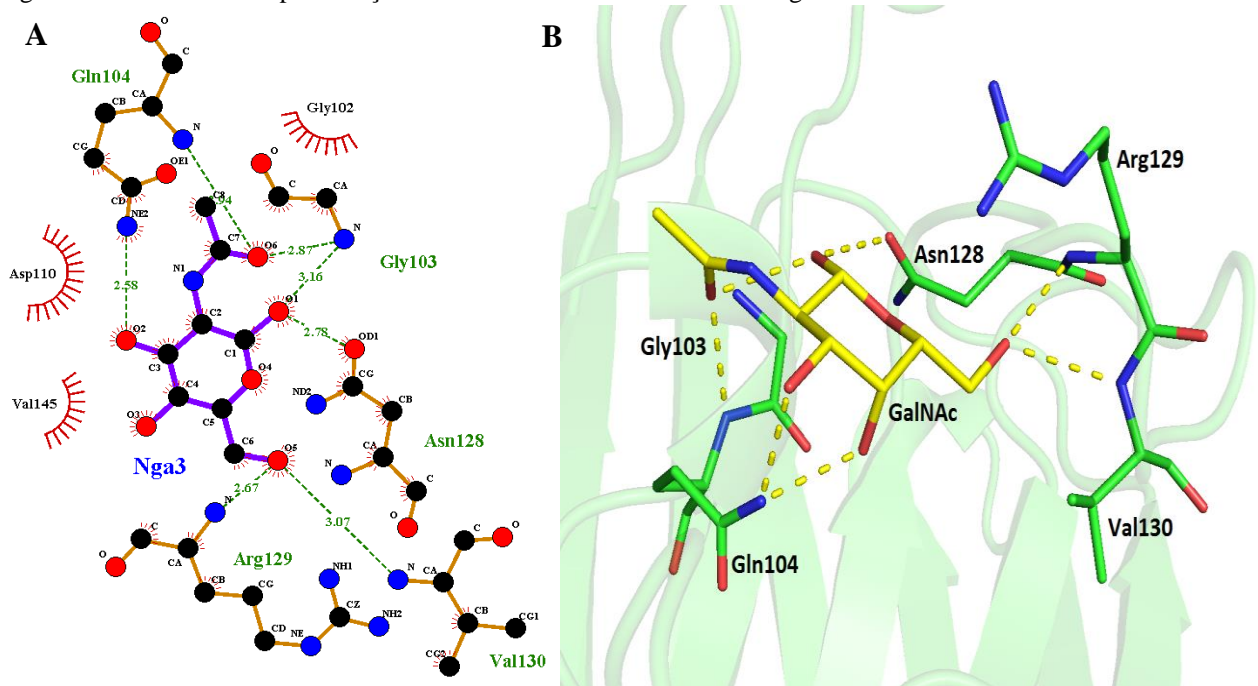
O *docking* molecular da estrutura de CRLII com os carboidratos  $\alpha$ -lactose e *N*-acetil-*D*-galactosamina revelou os valores de -31,70 e -32,81, respectivamente, sendo o valor mais negativo indicativo de uma ligação mais forte. Como esperado e demonstrado anteriormente,

CRLII apresenta maior afinidade para o carboidrato *N*-acetil-D-galactosamina (ROCHA et al., 2009).

A análise do sítio de reconhecimento a carboidrato (CRD) utilizando o LIGPLOT+ demonstrou que os resíduos de aminoácidos do CRD que interagem com o carboidrato *N*-acetil-D-galactosamina são: Gly103, Gly104, Asn128, Arg129 e Val130 (Figura 16), e para  $\alpha$ -lactose: Ile101, Gly103, Gly104, Asn128 e Arg129 (Figura 17). Dentre esses resíduos CRLII possui em comum com as lectinas VML, WFL e Rob o resíduo conservado em Asn128, como demonstrado pelo alinhamento da sequência dessas lectinas (Figura 11) (CALVETE et al., 1998).

Os dados de *docking* e análise dos sítios de ligação a metais e de reconhecimento a carboidratos comprovam que a estrutura modelada de CRLII foi satisfatória e apresenta uma boa qualidade, pois, além de ter passado em todos os parâmetros de avaliação da modelagem, apresenta resíduos de aminoácidos que participam da coordenação de metais e carboidratos, assim como demonstrado para a lectina VML e que também estão conservados em outras lectinas (WFL e Rob) com estrutura primária similar a CRLII.

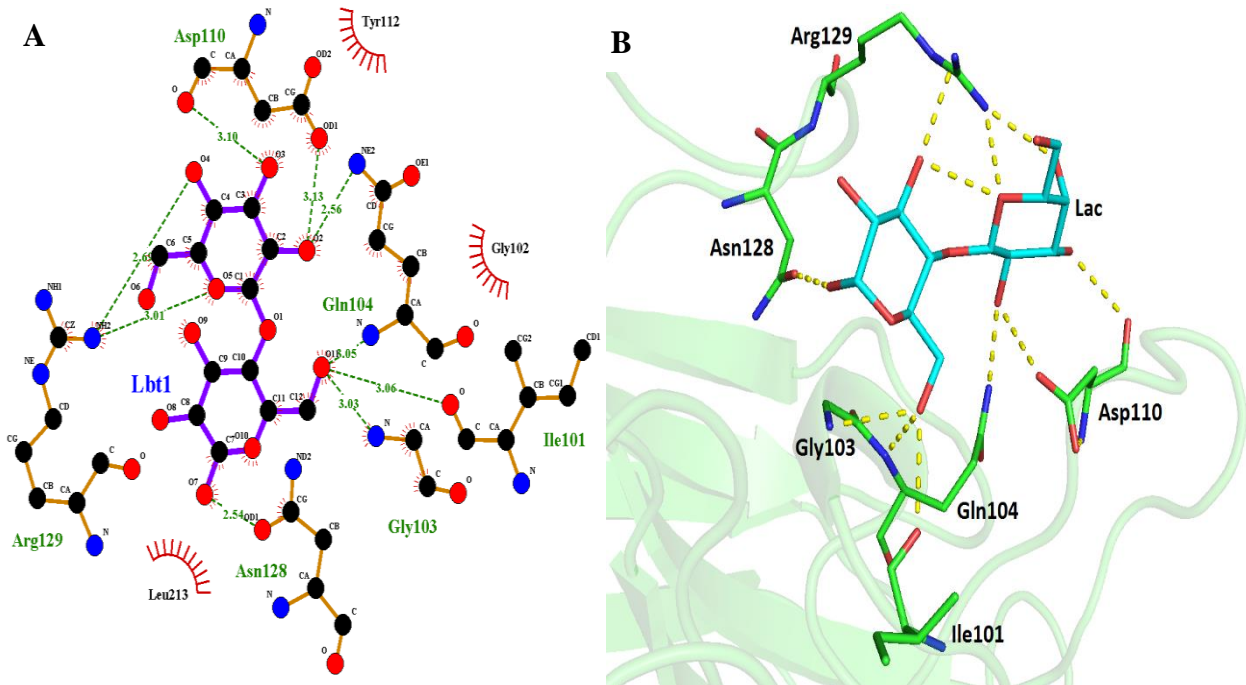
Figura 16 - LIGPLOT e representação do CRD de CRLII com *N*-acetil-D-galactosamina.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) LIGPLOT das interações entre os aminoácidos do sítio de reconhecimento a carboidrato (CRD) de CRLII e o carboidrato *N*-acetil-D-galactosamina. (B) Representação do CRD de CRLII e o carboidrato *N*-acetil-D-galactosamina. Os aminoácidos que interagem com o carboidrato e o ligante estão representados em forma de traços estando os carbonos dos aminoácidos em verde e para o ligante em amarelo.



Figura 17 - LIGPLOT e representação do CRD de CRLII com  $\alpha$ -lactose.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) LIGPLOT das interações entre os aminoácidos do sítio de reconhecimento a carboidrato (CRD) de CRLII e o carboidrato  $\alpha$ -lactose. (B) Representação do CRD de CRLII e o carboidrato  $\alpha$ -lactose. Os aminoácidos que interagem com o carboidrato e o ligante estão representados em forma de traços estando os carbonos dos aminoácidos em verde e para o ligante em azul claro.

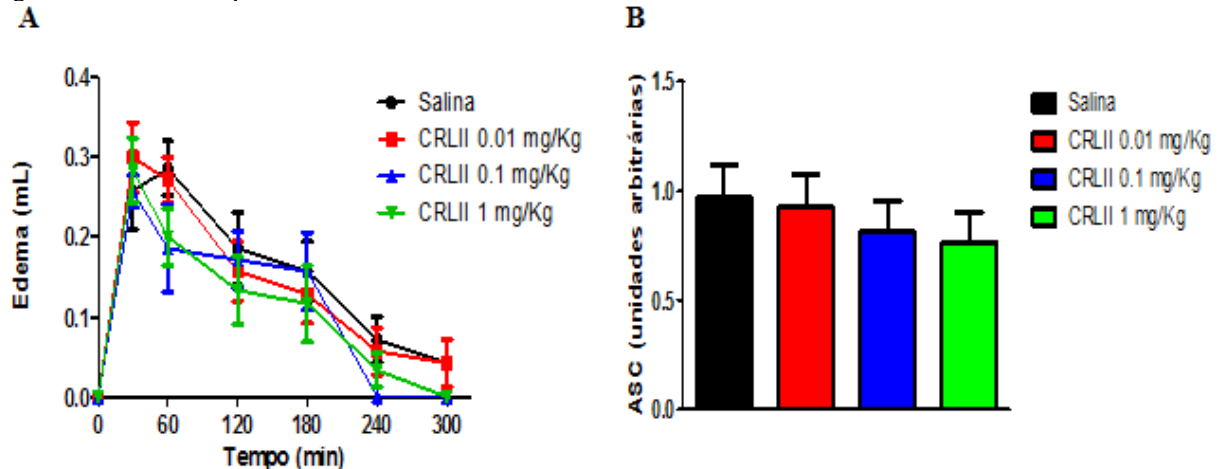
#### 4.5 Atividade pró-inflamatória e anti-inflamatória da lectina CRLII pelo modelo de edema de pata

Apesar da grande semelhança na estrutura primária apresentada pelas lectinas da subtribo *Diocleinae*, elas não apresentam um consenso com relação a capacidade pró-inflamatória ou anti-inflamatória, até mesmo quando têm afinidade pelo mesmo carboidrato. Essa divergência de capacidade também pode ser em relação a via pela qual a lectina é administrada, como no caso de CRLI, ConBr e DGL que apresentam atividade pró-inflamatória por via local e anti-inflamatória por via sistêmica. Portanto, a necessidade de avaliar a capacidade pró-inflamatória e anti-inflamatória de CRLII é evidente, uma vez que não há um padrão claro de resposta para essas atividades biológicas nessa subtribo (AUTHOR, 1997; BATISTA et al., 2011; BENTO et al., 1993; ROCHA et al., 2011).

Com o intuito de testar a capacidade pró-inflamatória de CRLII, essa lectina foi injetada por via subcutânea intraplantar em três concentrações: 0,01; 0,1 e 1 mg/Kg do animal. Foi observado que a lectina não apresenta a capacidade de induzir inflamação e, conseqüentemente,

causar o edema de pata em nenhuma das concentrações testadas permanecendo estatisticamente igual ao controle (Figura 18). Diferentemente do resultado para CRLII, VML, que também possui afinidade pelos mesmos tipos de carboidratos e possui similaridade com CRLII, apresenta atividade pró-inflamatória no modelo de edema de pata com efeito tempo e dose dependentes, principalmente, durante a primeira hora (ALENCAR et al., 2004).

Figura 18 – Atividade pró-inflamatória de CRLII.

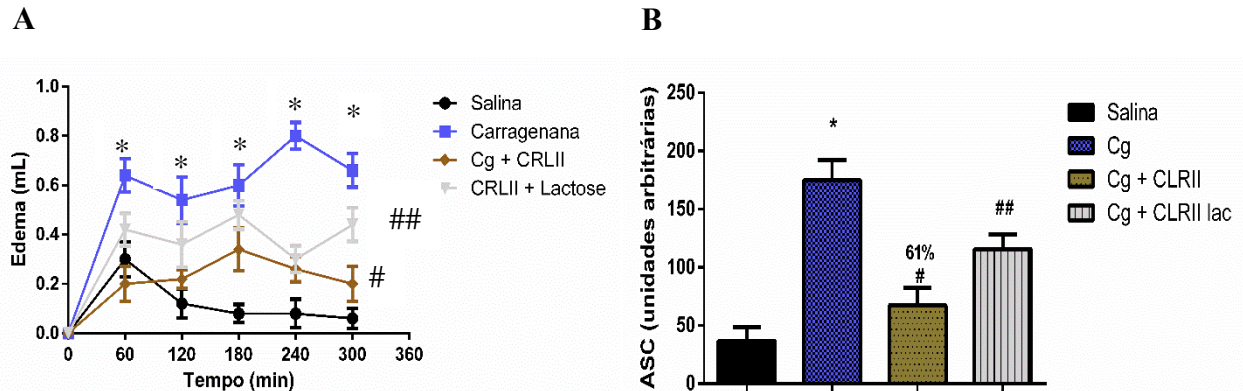


Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Curva dose-resposta para a atividade pró-inflamatória de CRLII. (B) Gráfico de área sob a curva para a atividade pró-inflamatória de CRLII. Ratos fêmeas adultos Wistar de 150-250 g com 6 animais por grupo foram injetados com a lectina CRLII nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/Kg ou solução salina em um volume de 0,1 mL/ 100g por peso animal por via local subcutânea intraplantar. As medições do volume deslocado causado pelo edema foram realizadas após 30 minutos da aplicação e a cada uma hora até a quinta hora da aplicação utilizando pletismômetro. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M e no gráfico de dose-resposta expresso em mililitros e área sob a curva calculado. Os dados foram analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, considerando os valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

A injeção de carragenina (300  $\mu$ g/pata; s.c.) provocou edema de pata nos animais a partir da primeira hora (Cg:  $0,64 \pm 0,06$  ml vs salina:  $0,30 \pm 0,07$ ), o qual se manteve elevado até a quinta hora (Cg:  $0,66 \pm 0,06$  ml vs salina:  $0,06 \pm 0,04$ ). CRLII (1 mg/Kg) inibiu o curso temporal do edema de pata promovido pela carragenina em todos os tempos avaliados, mostrando maior inibição na quarta hora (CRLII:  $0,26 \pm 0,05$  ml vs. Cg:  $0,8 \pm 0,05$  ml). O grupo tratado com a lectina associada à lactose teve sua atividade inflamatória diminuída principalmente na quinta hora, quando comparada ao grupo tratado somente com CRLII (CRLII + lactose:  $0,44 \pm 0,06$  ml vs. CRLII:  $0,2 \pm 0,07$  ml), portanto, a atividade anti-inflamatória de CRLII é dependente do CRD (Figura 19). É interessante ressaltar que a presença da atividade anti-inflamatória dissociada da pró-inflamatória é comum em lectinas purificadas de algas, como *Pterocladia capillacea* (PcL)

e *Caulerpa cupressoides* (CcL), que apresentam menor capacidade anti-inflamatória que CRLII, e *Hypnea cervicornis* (HCA), que apresenta atividade similar, diferentemente do que o observado para as lectinas de subtribo *Diocleinae* (BITENCOURT et al., 2008; SILVA et al., 2010; VANDERLEI et al., 2010).

Figura 19 – Atividade anti-inflamatória de CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) Curva dose-resposta para a atividade anti-inflamatória de CRLII. (B) Gráfico de área sob a curva para a atividade anti-inflamatória de CRLII. Legenda: Os símbolos utilizados (\*,# e ##) indicam diferenças estatísticas entre os grupos analisados, portanto, CRLII apresenta efeito anti-inflamatório e sua atividade é dependente do CRD. Ratos fêmeas adultos Wistar de 150-250 g com 6 animais por grupo foram tratados por via endovenosa com solução salina ou com CRLII na concentração de 1mg/Kg do animal ou com CRLII encubada previamente por uma hora com  $\alpha$ -lactose para avaliar a participação do CRD nessa atividade. Após 30 minutos, o indutor de edema carragenina (Cg) (300 $\mu$ g/pata) foi injetado por via subcutânea na pata traseira nos animais previamente tratados com CRLII. As medições foram realizadas comparando-se o volume de líquido deslocado entre os ratos testes e controles com 30 minutos após a injeção de Cg até a quinta hora a cada hora utilizando pletismômetro. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  E.P.M e área sob a curva calculada. Os dados foram analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, considerando os valores estatisticamente significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

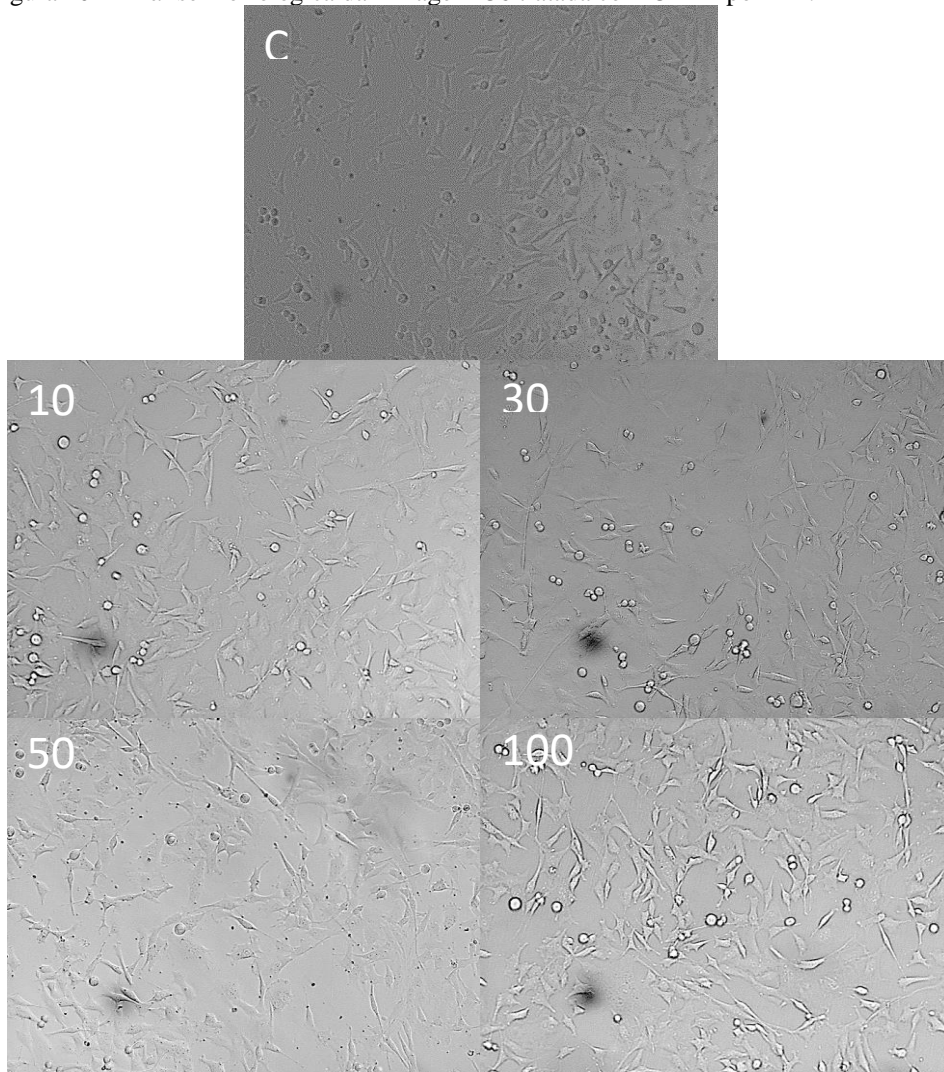
#### 4.6 Efeitos de CRLII na morfologia e viabilidade em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h

A capacidade de lectinas em reconhecer diferentes tipos de carboidratos tem sido utilizada como ferramenta na busca por padrões de glicosilação aberrante em células cancerígenas para a descoberta e detecção de biomarcadores que possam indicar a presença do câncer em estágios iniciais ou para distinguir tipos de câncer (JIN et al., 2016; KIM; YOO; KO, 2009). Diferentes estudos têm reportado a capacidade de lectinas lactose específica em serem usadas na busca de biomarcadores, como no caso da lectina WFL (HAJI-GHASSEMI et al., 2016; MATSUDA et al., 2010; YAMASAKI et al., 2014).

Apesar da existência de estudos demonstrando a capacidade de lectinas galactose específicas com potencial para o tratamento de câncer e glioma, como no caso da lectina de *Viscum álbum* (ML1) e *Arachis hypogea* (PNA), respectivamente, ainda não há estudos em relação as lectinas da subtribo *Diocleinae* com especificidade aos carboidratos lactose/galactose (LENARTZ et al., 1995, 1997; MARTH; DAXENBICHLER, 1988). Portanto, a capacidade de CRLII em reduzir a viabilidade de células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 foi testada.

As células não demonstraram alteração morfológicas com o tratamento de 24 horas com CRLII em nenhuma das concentrações estudadas quando analisadas por microscopia óptica de luz (Figura 20).

Figura 20 – Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLII por 24h.

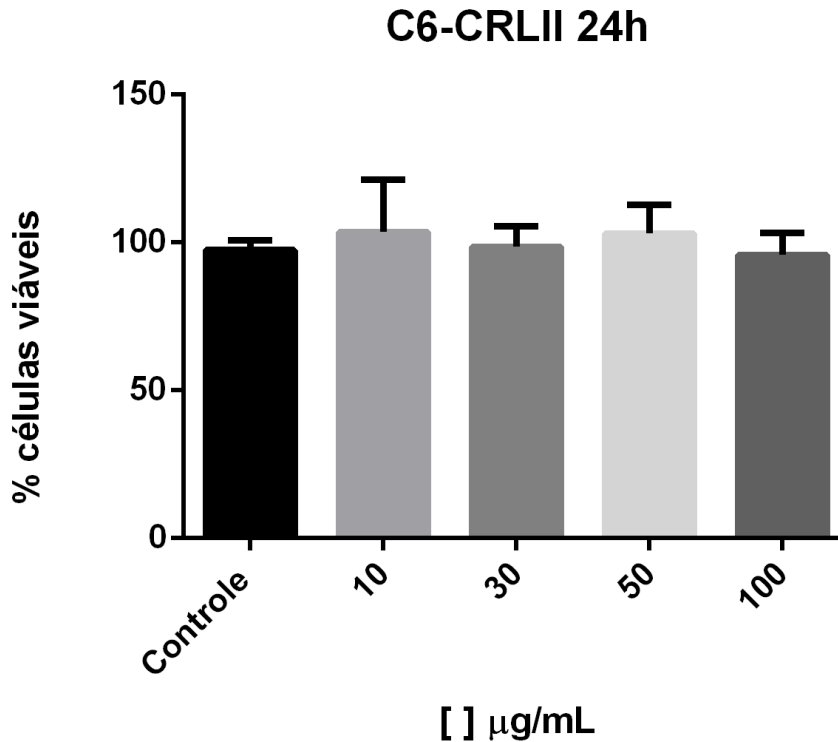


Fonte: Elaborado pelo autor. As células foram visualizadas utilizando microscópio óptico. Fotos demonstrando a morfologia de C6 após o tratamento com CRLII por 24h para o controle (C) e as concentrações finais de 10,30,50 e 100 µg/mL.



A análise estatística do teste de redução de viabilidade das células da linhagem C6 reforça o resultado observado nas fotos em que CRLII não apresenta a capacidade de reduzir a viabilidade em 24 horas de tratamento em nenhuma das concentrações testadas (Figura 21).

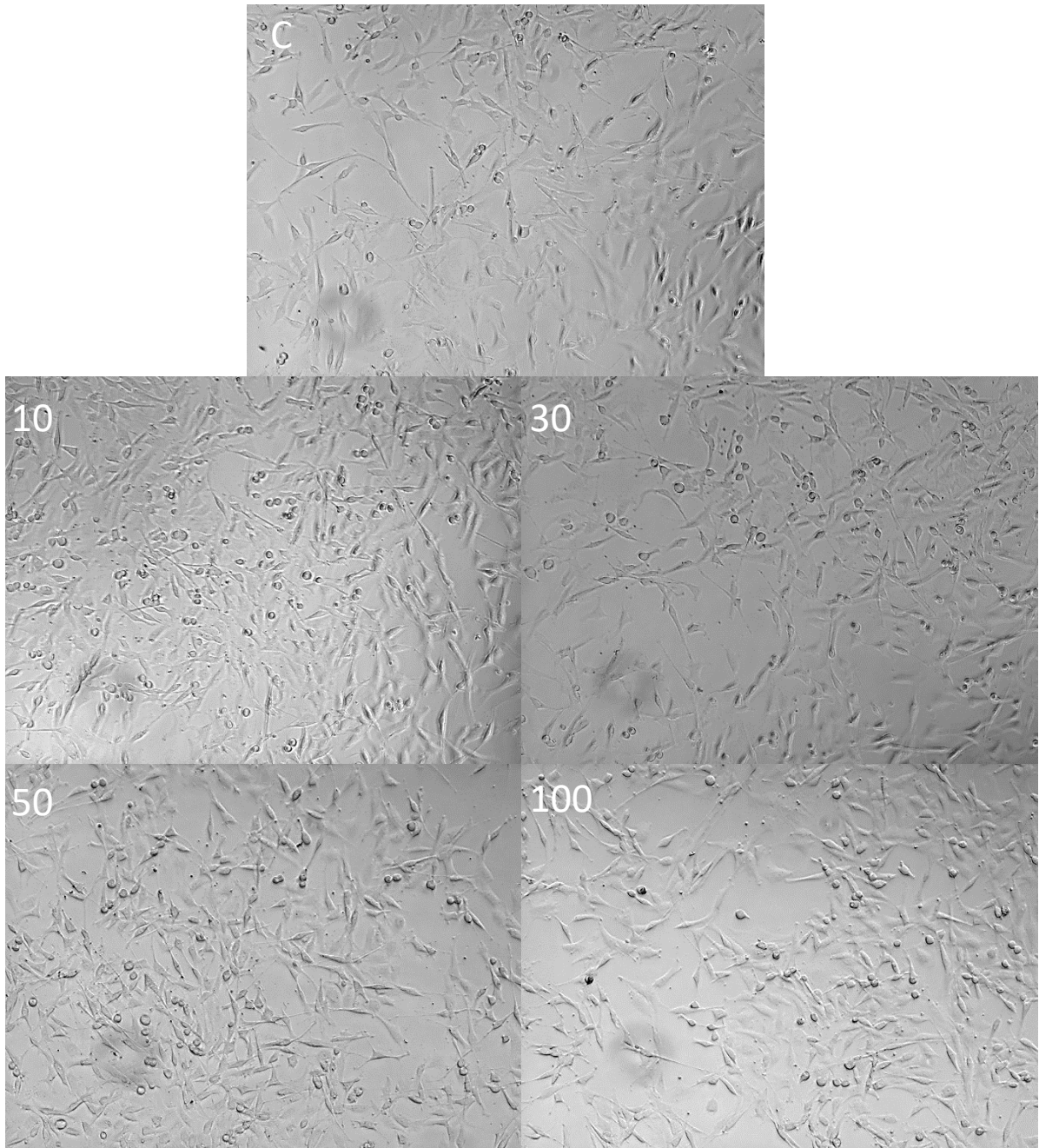
Figura 21 – Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLII por 24h.



Fonte: Elaborado pelo autor. Em uma placa de 96 poços com concentração  $5 \times 10^3$  células por poço (100 µL/poço) foram tratadas por 24h com CRLII nas concentrações finais de 10,30,50 e 100 µg/mL cada grupo tendo uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100 µL DMSO por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância de um sentido (one way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

Com relação a morfologia das células da linhagem C6 quando tratados por 48 horas com CRLII não há alteração em nenhuma das concentrações testadas (Figura 22).

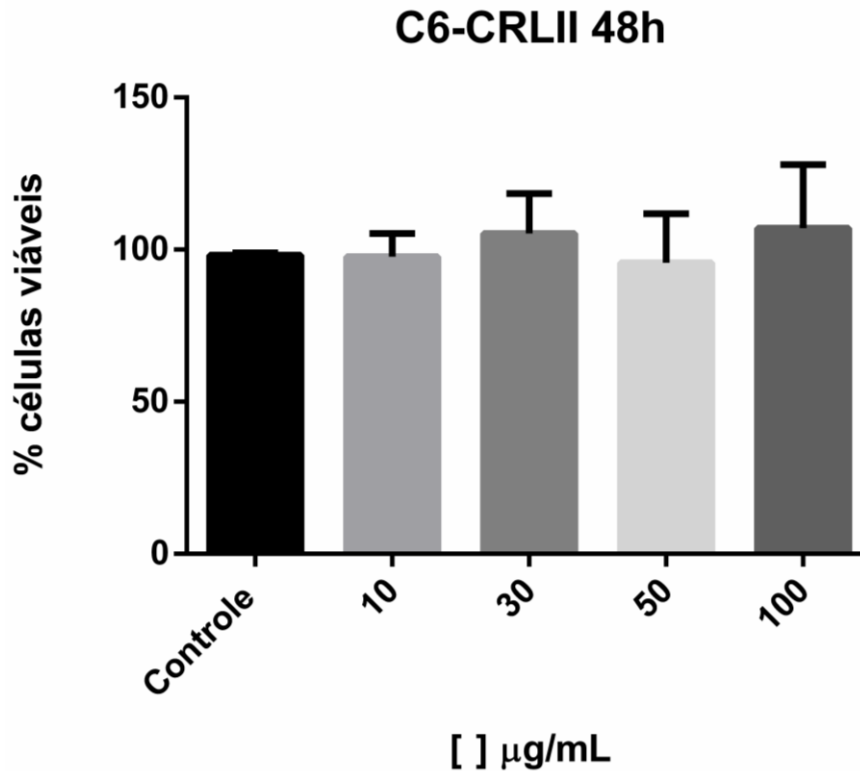
Figura 22 - Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLII por 48h.



Fonte: Elaborado pelo autor. As células foram visualizadas utilizando microscópio óptico. As células foram visualizadas utilizando microscópio óptico. Fotos demonstrando a morfologia de C6 após o tratamento com CRLII por 48h para o controle (C) e as concentrações finais de 10,30,50 e 100 µg/mL.

Com 48 horas de tratamento, CRLII não é capaz de causar a redução da viabilidade de C6 em nenhuma das concentrações testadas, assim como observado para 24 horas e demonstrado pela estatística (Figura 23).

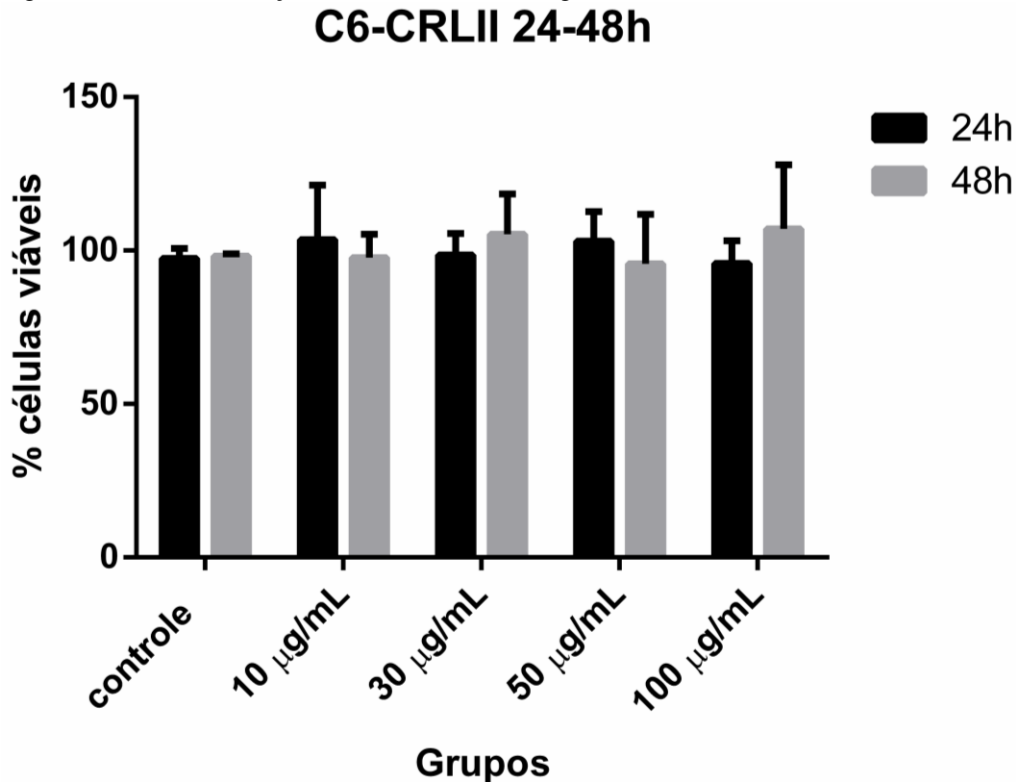
Figura 23 - Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLII por 48h.



Fonte: Elaborado pelo autor. Em uma placa de 96 poços com concentração  $5 \times 10^3$  células por poço (100 µL/poço) foram tratadas por 48h com CRLII nas concentrações finais de 10,30,50 e 100 µg/mL cada grupo tendo uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100 µL DMSO por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana. A absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância de um sentido (one way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

A comparação entre os tempos 24 e 48 horas para os grupos controle, 10, 30, 50 e 100 µg/mL demonstra que não há diferença estatística entre esses grupos quando levado em consideração os períodos avaliados (Figura 24). Portanto, independentemente da concentração que foi testada até o período de 48 horas, CRLII não é capaz de causar a redução da viabilidade ou alterar a morfologia das células de C6.

Figura 24 - Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLII em 24 e 48h.

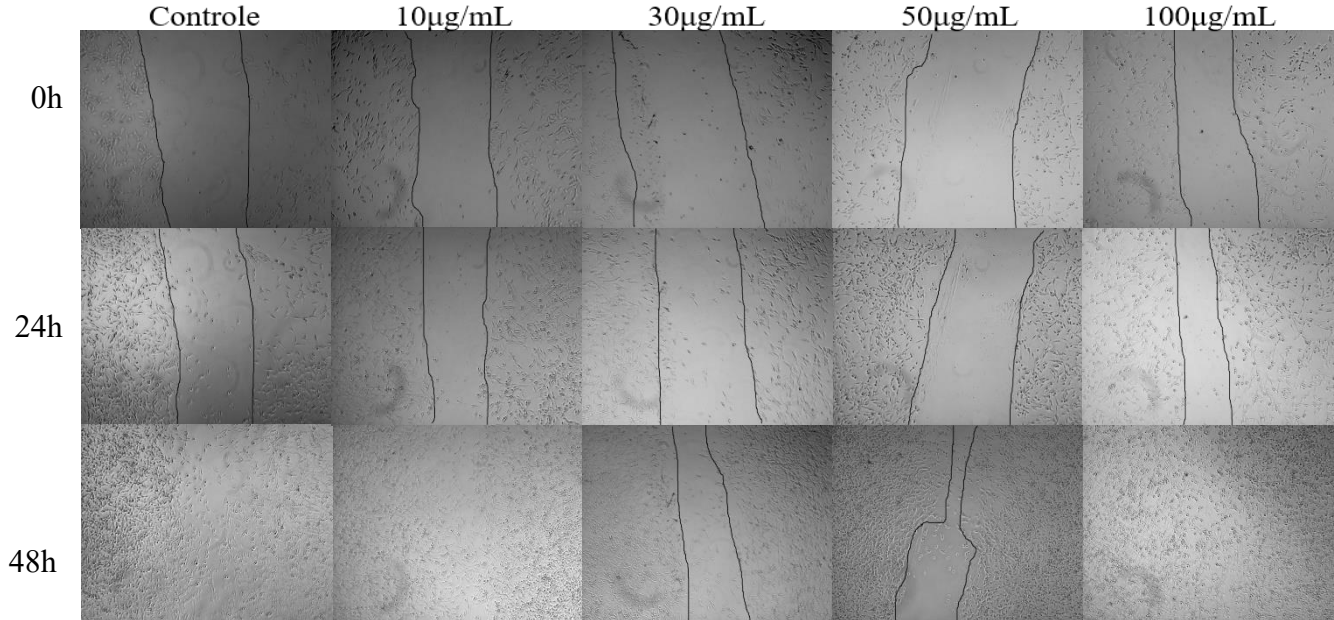


Fonte: Elaborado pelo autor. Em uma placa de 96 poços com concentração  $5 \times 10^3$  células por poço (100 µL/poço) foram tratadas por 24h e 48h com CRLII nas concentrações finais de 10,30,50 e 100 µg/mL cada grupo tendo uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100 µL DMSO por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

#### 4.7 Efeitos de CRLII na migração em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h

Com relação ao efeito de CRLII na migração das células da linhagem C6 é possível perceber que há um fechamento do risco com o decorrer do tempo, ou seja, CRLII não tem efeito sobre a migração de C6 em nenhuma das concentrações testadas (Figura 25).

Figura 25 – Imagens da análise do efeito de CRLII na migração da linhagem C6 nos tempos 0, 24 e 48h.



Fonte: Elaborado pelo autor. As células foram plaqueadas na concentração de  $50 \times 10^3$  por poço em uma placa de 48 poços (200µL/poço). Cada grupo apresenta duas repetições biológicas com duas triplicatas. Para o início do experimento houve a remoção de meio de cultura de cada poço e a realização de um risco utilizando a ponta de uma ponteira de 200µL. Após o risco, cada poço foi lavado com PBS 10% para remover as células fracamente aderidas. Posteriormente, um novo meio de cultura foi adicionado e as lectina CRLII foi adicionada com as concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL e no grupo controle apenas HEPES foi adicionado. As imagens foram capturadas em triplicatas para as duas triplicatas de cada grupo nos tempos 0h, 24h e 48h após o tratamento com a lectina.

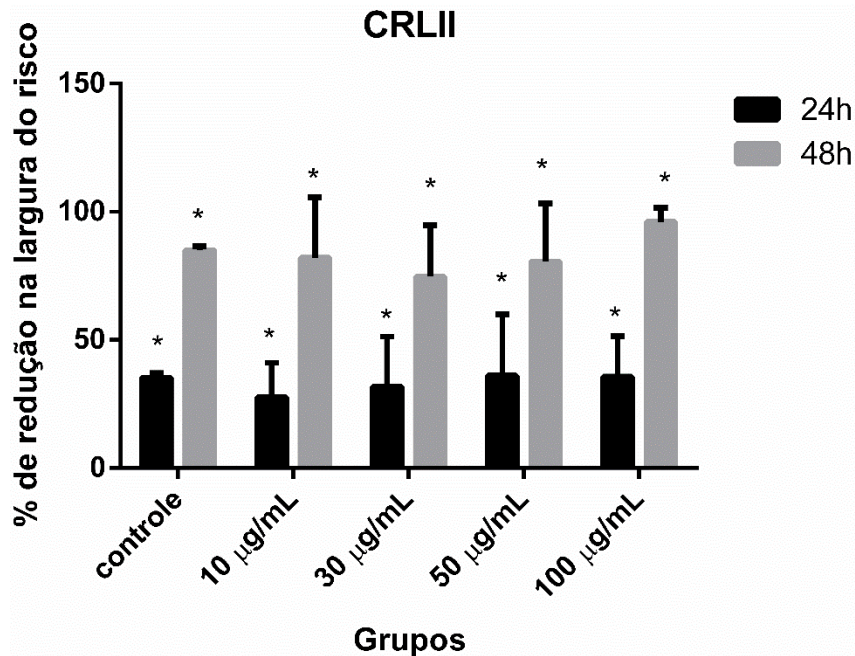
A análise estatística revela que não há diferenças entre o controle e os tratamentos 10,30,50 e 100 µg/mL ou entre cada grupo em ambos os tempos de 24 e 48 horas. Entretanto, há diferença entre os grupos quando é levado em consideração o curso temporal (24 a 48h) (Figura 26). Portanto, é possível afirmar que CRLII não tem efeito sobre a migração das células da linhagem C6 e que, independentemente das concentrações que foram testadas, o fechamento do risco é contínuo para todos os grupos.

Esse resultado de migração está em acordo com que foi observado para o teste de viabilidade de da linhagem C6 uma vez que, não havendo a redução na viabilidade, é esperado que essas células continuem a se multiplicar e migrar, ocasionando o fechamento do risco com o passar do tempo.

É possível que CRLII esteja mimetizando a ação das galectinas, proteínas expressas em glioma e responsáveis pela migração e malignidade desse tipo de câncer. Portanto, ao invés de reduzir a migração, CRLII pode estar favorecendo a migração, embora, não haja uma diferença

estatística entre controle e tratamentos (JUNG et al., 2008; LEFRANC; BROTCCHI; KISS, 2005; STRIK et al., 2001).

Figura 26 – Análise do efeito de CRLII na migração celular da linhagem C6.



Fonte: Elaborado pelo autor. O símbolo (\*) representa a diferença estatística entre os grupos analisados, portanto, há diferenças entre os grupos controle, 10, 30, 50 e 100 µg/mL de 24h com os mesmos grupos em 48h. As células foram plaqueadas na concentração de  $50 \times 10^3$  por poço em uma placa de 48 poços (200µL/poço). Para o início do experimento houve a remoção de meio de cultura de cada poço e a realização de um risco utilizando a ponta de uma ponteira de 200µL. Cada grupo apresenta duas repetições biológicas com duas triplicatas. Após o risco, cada poço foi lavado com PBS para remover as células fracamente aderidas. Posteriormente, um novo meio de cultura foi adicionado e as lectina CRLII foi adicionada com as concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL e no grupo controle apenas HEPES foi adicionado. As imagens foram capturadas em triplicatas para as duas triplicatas de cada grupo nos tempos 0h, 24h e 48h após o tratamento com a lectina. A redução da largura do risco feito durante o experimento foi utilizada como parâmetro para a avaliação da capacidade de migração e crescimento das células. Os resultados foram expressos em médias de porcentagem de redução da largura do risco e analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados como estatisticamente significativos.

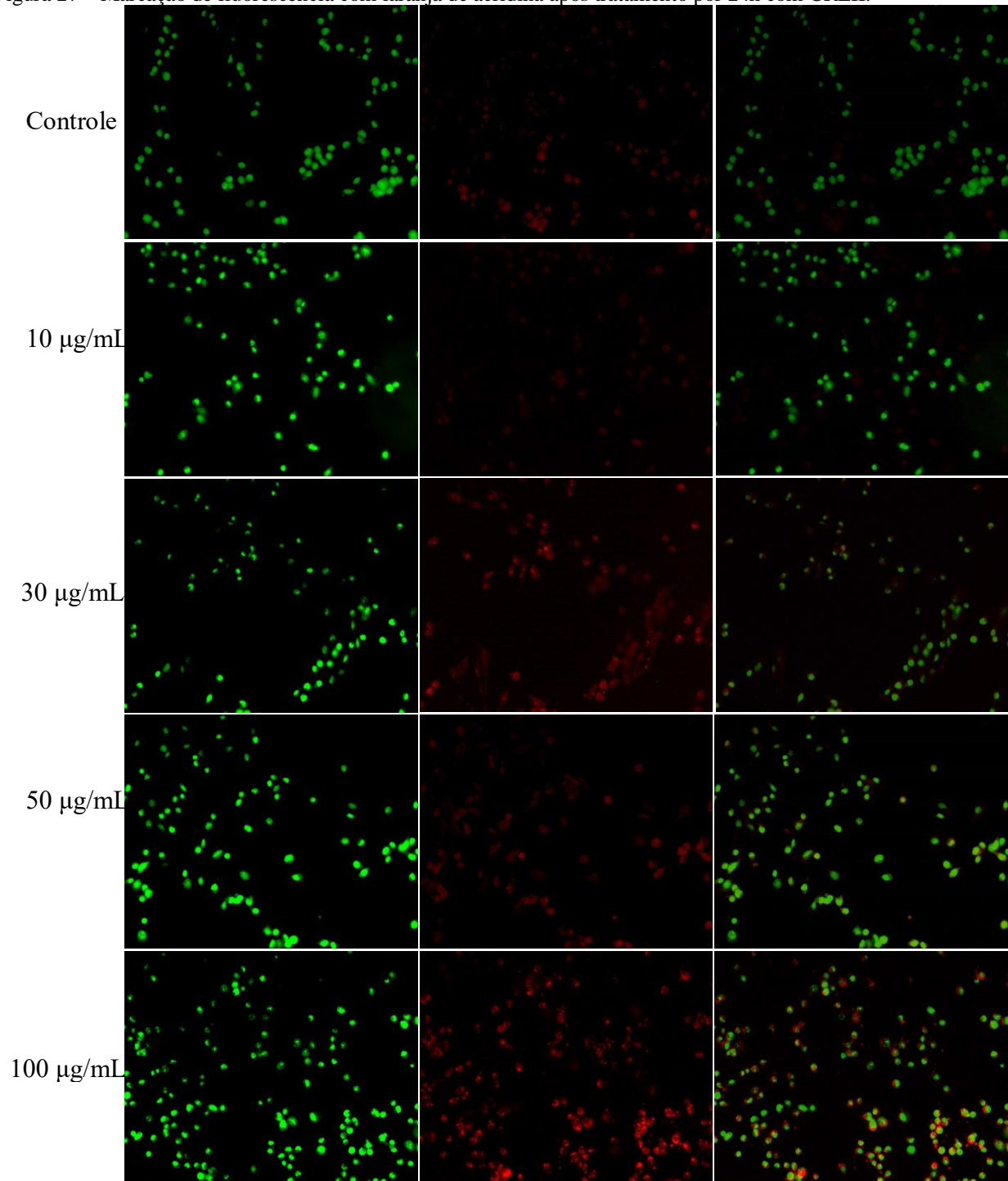
#### 4.8 Análise dos efeitos fisiológicos de CRLII nas células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 por fluorescência com laranja de acridina, iodeto de propídio e Hoechst quando tratadas por 24h

Com o intuito de avaliar as alterações fisiológicas sofridas pelas células da linhagem C6 após tratamento com CRLII foram utilizados os corantes fluorescentes laranja de acridina, iodeto de propídio e Hoechst para marcar indicadores da autofagia, necrose e apoptose, respectivamente.



A marcação por laranja de acridina indica um aumento da autofagia nos grupos de 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  quando comparado ao controle, entretanto, esse aumento não ocasiona a morte celular, pois não há redução da viabilidade nesses grupos ou redução na migração (Figura 27).

Figura 27 – Marcação de fluorescência com laranja de acridina após tratamento por 24h com CRLII.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Marcação em verde indica a cromatina das células, em vermelho marcação de vesículas ácidas presentes nas células e indicativas de autofagia e marcações em laranja a sobreposição das cores

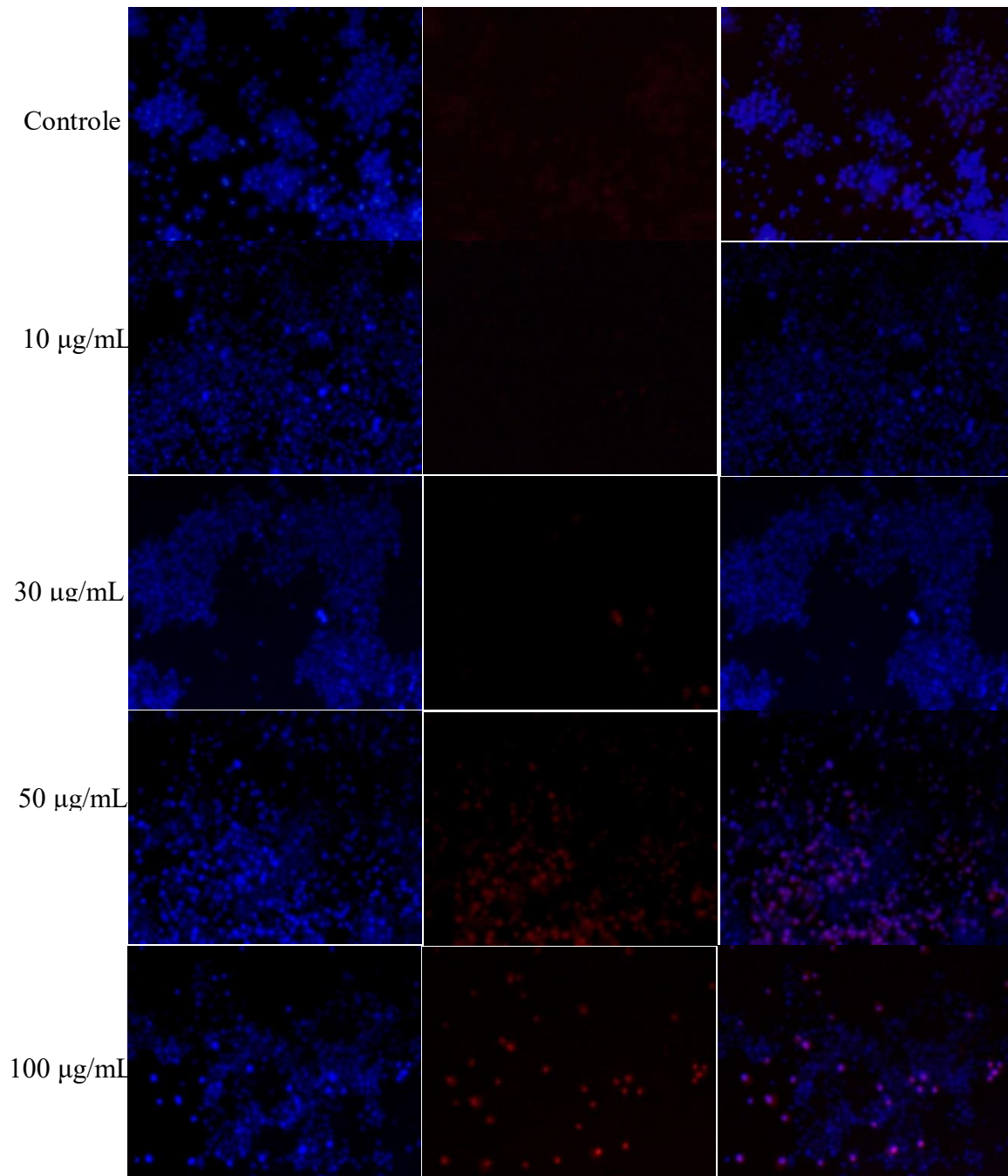
anteriores indicando quais células apresentam autofagia. As células C6 foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma concentração de  $50 \times 10^3$  células por poço (200  $\mu\text{L}$ /poço). Cada grupo apresenta uma repetição biológica com duas triplicatas. Após 24 horas do tratamento com CRLII concentrações finais de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 3,7% a  $37^\circ\text{C}$  e coradas com LA 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 20 minutos ao abrigo da luz. As células foram visualizadas nos comprimentos de onda de 470 nm de excitação e 525 nm de emissão em microscópio óptico de luz invertido e registrado pela câmera acoplada.

Com relação a marcação com iodeto de propídio, os grupos 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentam indicadores de células necróticas, sendo mais intenso para as duas concentrações maiores (Figura 28). Apesar da capacidade de CRLII induzir a necrose nas concentrações mais elevadas, isso não parece ser suficiente para reduzir a viabilidade ou a migração celular da linhagem C6, como evidenciado pelas figuras 24 e 26.

Apesar da presença da marcação para necrose e autofagia nos tratamentos 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ , CRLII não foi capaz de reduzir a viabilidade nem a migração das células da linhagem C6. Entretanto, apesar desse resultado CRLII pode apresentar atividade contra outros tipos de câncer, como o de mama, assim como as lectinas PNA e ML1, ou ser utilizada para a busca de novos marcadores moleculares de câncer, como a lectina WFL, ou na detecção do câncer, uma vez que o antígeno Tn, que tem o glicano *N*-acetil-galactosamina, está presente em diferentes tipos de câncer e é um marcador para a metástase (BAPU et al., 2016; HAJI-GHASSEMI et al., 2016; LENARTZ et al., 1995, 1997; MARTH; DAXENBICHLER, 1988; MATSUDA et al., 2010; WANG et al., 2000; YAMASAKI et al., 2014).



Figura 28 - Marcação de fluorescência com iodeto de propídio e Hoechst após tratamento por 24h com CRLII.



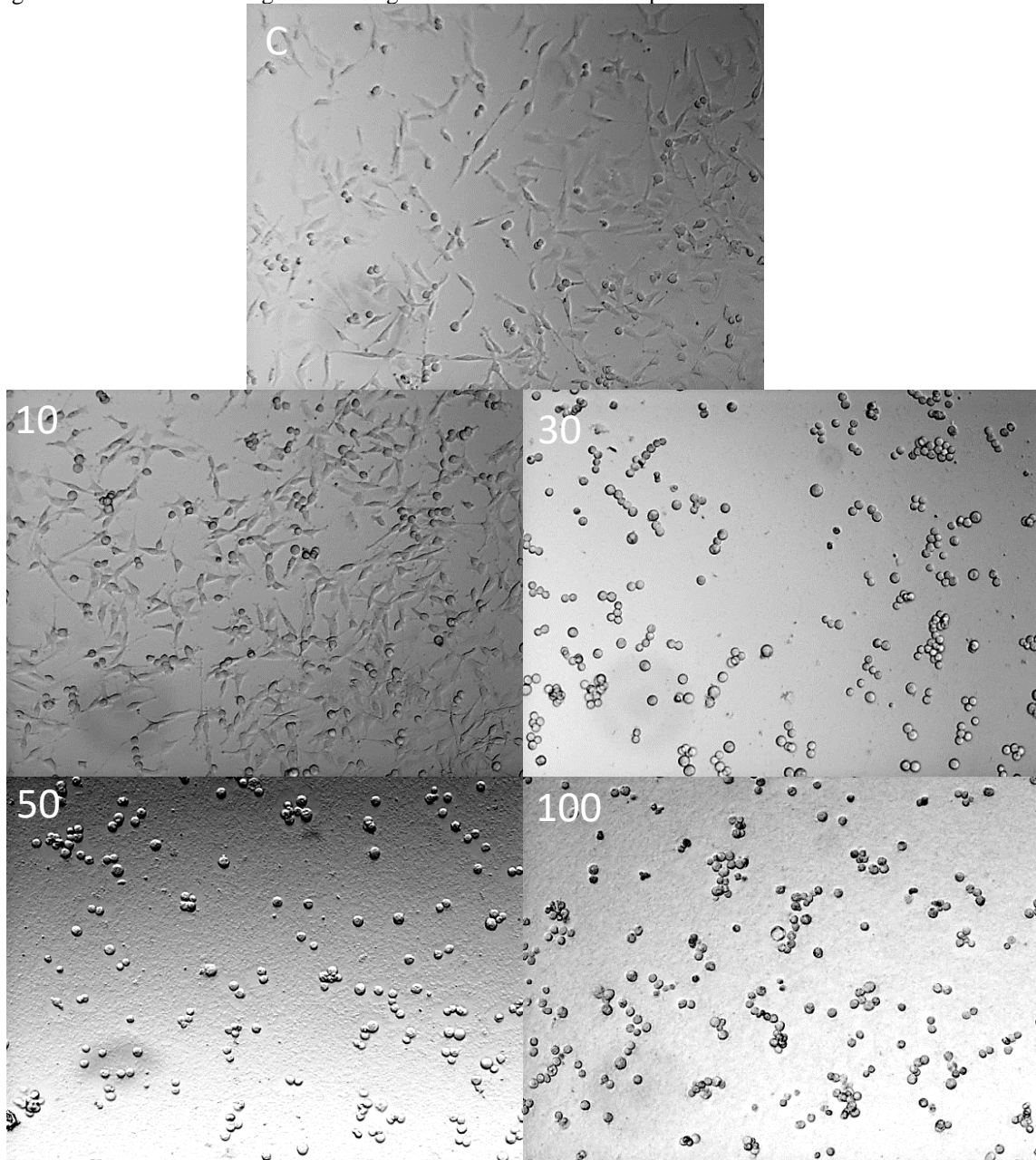
Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Marcação em azul indica o núcleo das células (Hoechst), em vermelho marcação de vesículas ácidas presentes nas células e indicativas de necrose e marcações em roxo a sobreposição das cores anteriores. As células C6 foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma concentração de  $50 \times 10^3$  células por poço ( $200 \mu\text{L}/\text{poço}$ ). Cada grupo apresenta uma repetição biológica com duas triplicatas. Após 24 horas do tratamento com CRLII concentrações finais de 10, 30, 50 e  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Após o tratamento por 24h, as células foram lavadas com PBS, incubadas sequencialmente em tampão de ligação (HEPES 0,01M, NaCl 140 mM e  $\text{CaCl}_2$  25 mM, pH 7,4) contendo Hoechst  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  e iodeto de propídio (PI)  $14 \mu\text{g}/\text{mL}$  durante 15 minutos ao abrigo da luz. As células foram visualizadas nos comprimentos de onda de excitação e 560nm em microscópio óptico de luz invertido e as fotos registradas pela câmera.

#### 4.9 Efeitos de CRLI na morfologia e viabilidade em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h

Diferentemente das lectinas lactose ou galactose específicas que foram pouco investigadas quanto a capacidade de alterar a morfologia e reduzir a viabilidade de células cancerígenas, as lectinas glicose/manose da subtribo *Diocleinae* apresentam uma maior quantidade de estudos, como no caso da ConBr, ConV e ConA, que foram testadas em vários modelos de câncer, como em células de câncer colorretal, hepatoma, melanoma e glioblastoma (GONDIM, 2014; KISS et al., 1997; LEI; CHANG, 2009; LIU et al., 2009; OSTERNE et al., 2017; PRATT; ANNABI, 2014).

CRLI causa alterações morfológicas nas quais as células da linhagem C6 deixam de apresentar uma forma mais alongada e passam a apresentar uma forma esférica, opaca e de tamanho reduzido, geralmente indicativos de morte celular, nas concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL (Figura 29) (ZIEGLER, 2004). Para confirmar os sinais de morte celular observados na morfologia, os métodos colorimétricos pelos corantes LA, IA e Hoescht e de viabilidade por MTT fornecem mais evidências da ocorrência da morte celular.

Figura 29 - Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLI por 24h.

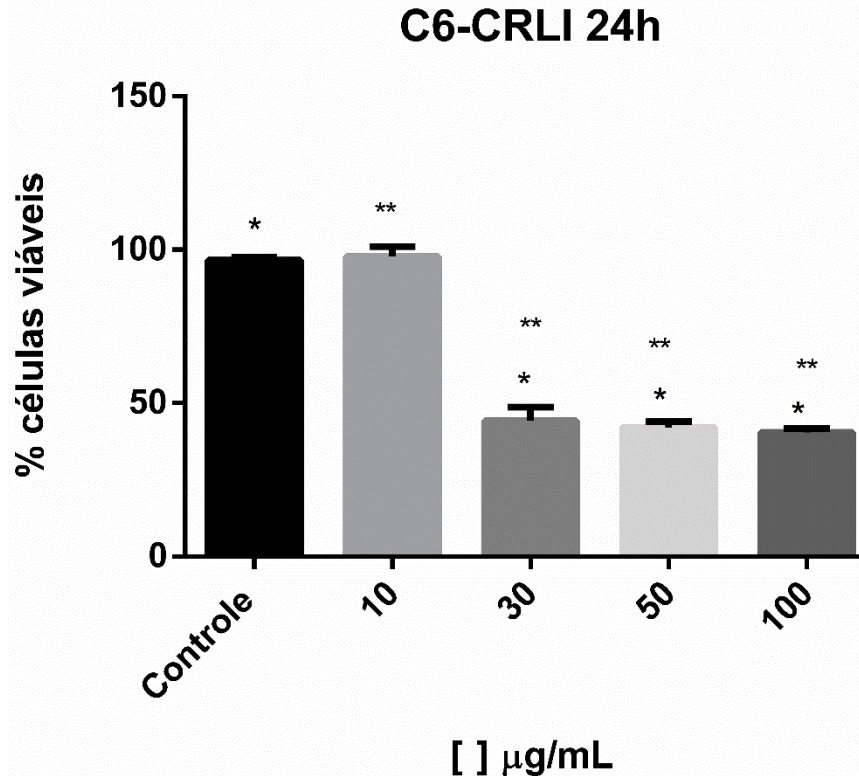


Fonte: Elaborado pelo autor. Fotos demonstrando a morfologia de C6 após o tratamento com CRLI por 24h para o controle (C) e as concentrações finais de 10,30,50 e 100 µg/mL.

A análise da viabilidade das células da linhagem C6 por MTT quando tratadas com CRLI por 24 horas confirma os resultados observados de alteração na morfologia para as concentrações 30, 50 e 100 µg/mL. Nessas concentrações, CRLI é capaz de reduzir a viabilidade em pelo menos 50% quando comparada ao controle, entretanto, a concentração de 10 µg/mL não

apresenta a mesma capacidade, sendo estatisticamente semelhante ao controle e, portanto, diferente das demais concentrações (Figura 30).

Figura 30 - Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLI por 24h.

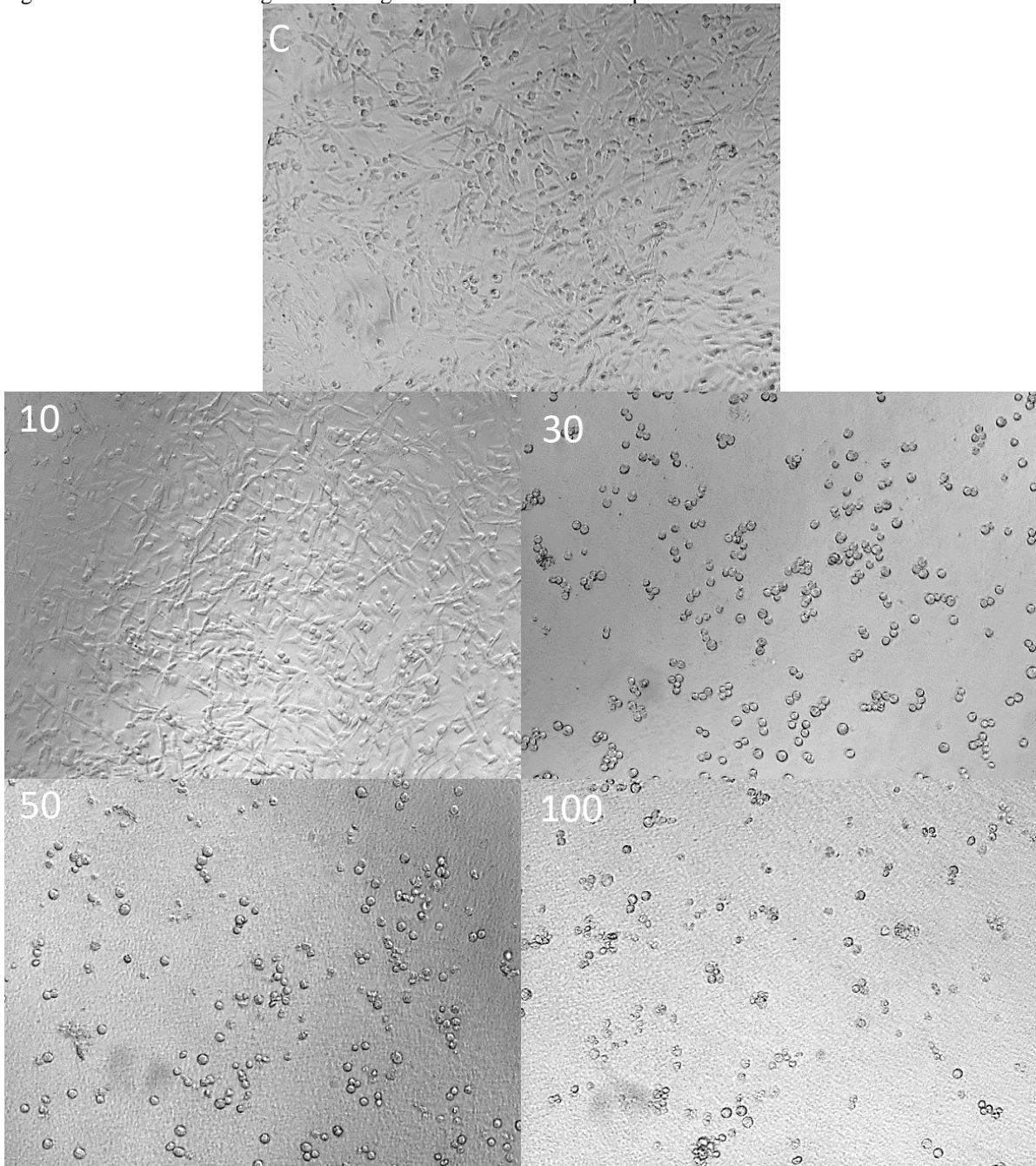


Fonte: Elaborado pelo autor. O símbolo (\*) representa a diferença estatística entre os grupos analisados, portanto, há diferenças entre o grupo controle e as concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL no tratamento com 24h. O símbolo (\*\*) representa a diferença estatística entre os grupos analisados, portanto, há diferenças entre o grupo 10 µg/mL e as concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL. Em uma placa de 96 poços com concentração  $5 \times 10^3$  células por poço (100 µL/poço) foram tratadas por 24h com CRLI nas concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL cada grupo tendo uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100 µL DMSO por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorvância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância de um sentido (one way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

Assim como demonstrado em 24 horas, CRLI continua a exercer efeitos sobre a morfologia das células da linhagem C6 nas concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL, apresentando as mesmas características de redução no tamanho, opacidade e alteração da forma para circular. Além disso, é possível perceber uma alteração na superfície lisa para uma rugosa no poço nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, o que pode ser caracterizado como restos celulares e matriz extracelular degradada, assim, fornecendo mais evidências da morte celular mediada pela ação de CRLI (Figura 31) (BURSCH et al., 2000; ZIEGLER, 2004).



Figura 31 - Análise morfológica da linhagem C6 tratada com CRLI por 48h.

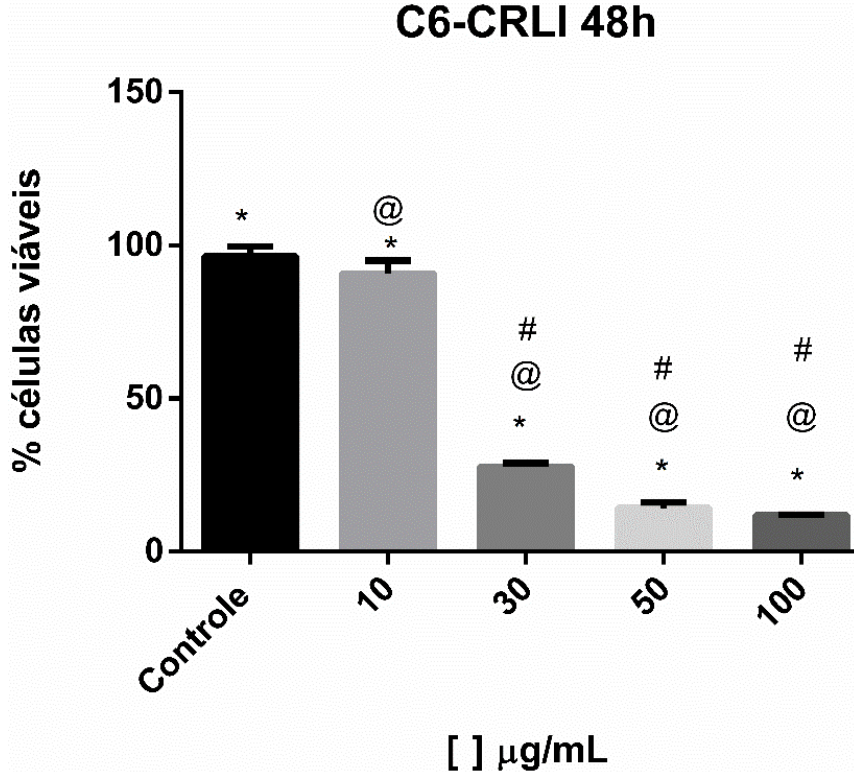


Fonte: Elaborado pelo autor. Fotos demonstrando a morfologia de C6 após o tratamento com CRLI por 48h para o (C) e as concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL.

Apesar de aparentemente a concentração de 10 µg/mL não ocasionar efeitos sobre a morfologia das células da linhagem C6, essa concentração é capaz de reduzir a viabilidade, embora em menor intensidade do que as demais concentrações, que são capazes de reduzir em pelo menos

75%. As concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  são estatisticamente ainda mais eficazes do que a concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  em reduzir a viabilidade (Figura 32).

Figura 32 - Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLI por 48h.

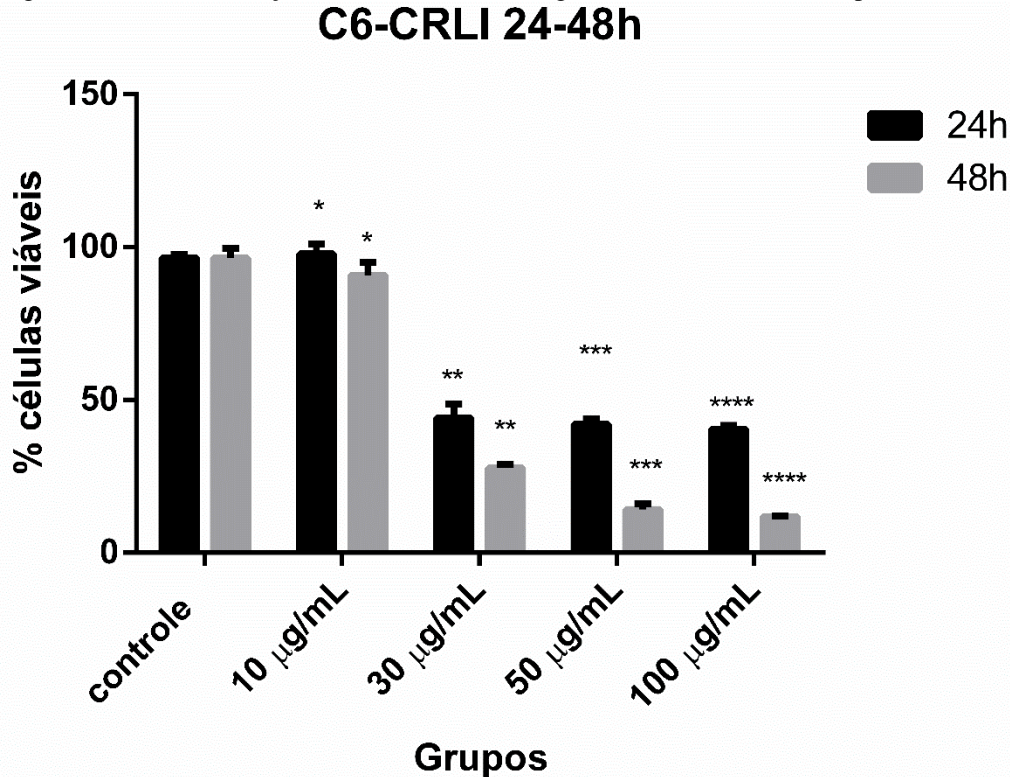


Fonte: Elaborado pelo autor. O símbolo (\*) representa a diferença estatística entre o grupo controle e as demais concentrações com 48h. O símbolo (@) representa a diferença estatística entre a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  e as demais concentrações com 48h. O símbolo (#) representa a diferença estatística entre as concentrações de 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  com 48h. Em uma placa de 96 poços com concentração  $5 \times 10^3$  células por poço (100  $\mu\text{L/poço}$ ) foram tratadas por 24h com CRLI nas concentrações finais de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  cada grupo tendo uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100  $\mu\text{L}$  de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100  $\mu\text{L}$  DMSO por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana. A absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância de um sentido (one way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

A comparação entre os tempos de 24 e 48 horas revela que o efeito de CRLI em reduzir a viabilidade das células da linhagem C6 é dependente do tempo de tratamento, pois, para todas as concentrações testadas, há diferença estatística entre os tempos de 24 e 48 horas (Figura 33). Diferentemente do que observado para CRLII que não apresenta a capacidade em reduzir a

viabilidade de C6 em nenhuma das concentrações testadas ou tempos, como evidenciado pela figura 26.

Figura 33 - Teste de redução de viabilidade da linhagem C6 tratadas com CRLI por 24 e 48h.



Fonte: Elaborado pelo autor. O símbolo (\*) significa a diferença estatística entre o grupo 10 µg/mL quando são comparados nos tempos de 24 e 48h. O símbolo (\*\*) significa a diferença estatística entre o grupo 30 µg/mL quando são comparados nos tempos de 24 e 48h. O símbolo (\*\*\*) significa a diferença estatística entre o grupo 50 µg/mL quando são comparados nos tempos de 24 e 48h. O símbolo (\*\*\*\*) significa a diferença estatística entre o grupo 100 µg/mL quando são comparados nos tempos de 24 e 48h. Em uma placa de 96 poços com concentração  $5 \times 10^3$  células por poço (100 µL/poço) foram tratadas por 24h e 48h com CRLI nas concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL cada grupo tendo uma repetição biológica (número de placas) com quatro triplicatas. Decorrido o tempo de tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas durante uma hora a 37 °C com 100 µL de MTT 0,5 mg/ml diluído em tampão HEPES-salino com glicose 1mM pH 7,4. Após esse período, foi retirado o meio contendo o MTT e adicionado 100 µL DMSO por 30 minutos a 37 °C para solubilizar os cristais de formazana formados. A absorbância foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm em leitor de placas e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e avaliados pela análise de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo considerados os valores de  $p < 0,05$  como estatisticamente significativos.

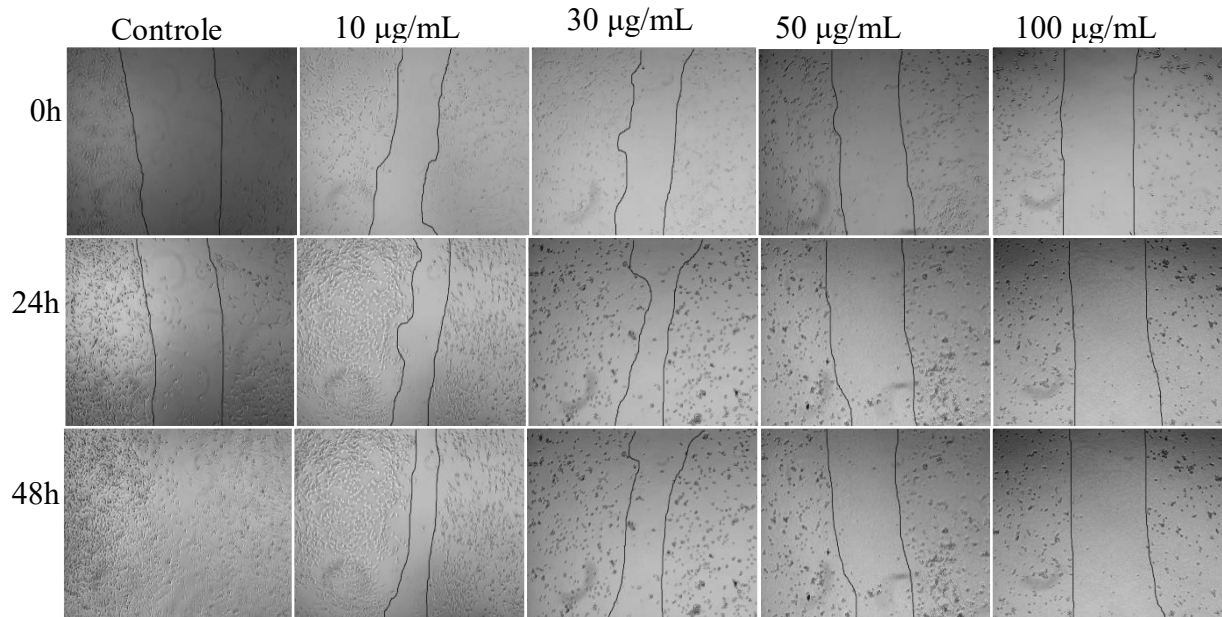
#### 4.10 Efeitos de CRLI na migração e crescimento em células de glioma de rato da linhagem C6 quando tratadas por 24 e 48h

Em relação a capacidade de CRLI em reduzir a migração das células da linhagem C6 é possível perceber que as concentrações de 30, 50 e 100 µg/mL possuem um maior sucesso em



evitar o fechamento do risco realizado no tempo zero, principalmente, com relação as concentrações maiores (Figura 34). Apesar da concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  apresentar um pequeno efeito na redução de viabilidade da linhagem de C6 com 48 horas, isso não parece influenciar na redução da migração dessas células, enquanto nas demais a redução na viabilidade compromete a migração.

Figura 34 – Imagens da análise do efeito de CRLI na migração da linhagem C6 nos tempos 0,24 e 48h.



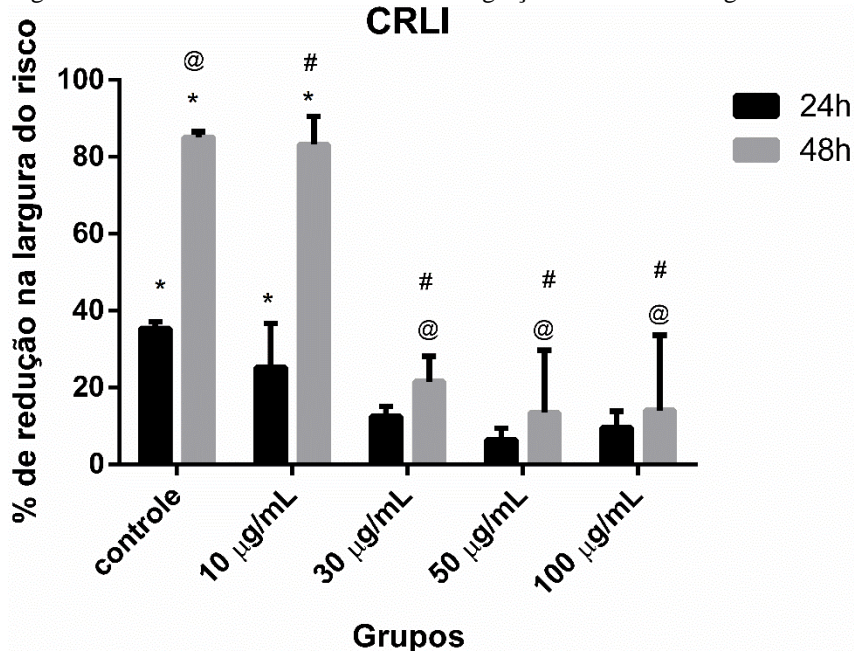
Fonte: Elaborado pelo autor. As células foram plaqueadas na concentração de  $50 \times 10^3$  por poço em uma placa de 48 poços (200 $\mu\text{L}$ /poço). Cada grupo apresenta duas repetições biológicas com duas triplicatas. Para o início do experimento houve a remoção de meio de cultura de cada poço e a realização de um risco utilizando a ponta de uma ponteira de 200 $\mu\text{L}$ . Após o risco, cada poço foi lavado com PBS para remover as células fracamente aderidas. Posteriormente, um novo meio de cultura foi adicionado e as lectina CRLI foi adicionada com as concentrações finais de 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  e no grupo controle apenas HEPES foi adicionado. As imagens foram capturadas em triplicatas para as duas triplicatas de cada grupo nos tempos 0h, 24h e 48h após o tratamento com a lectina.

A análise estatística do fechamento do risco nesse experimento evidencia que a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  não foi capaz de impedir o fechamento e que há o aumento do fechamento com o decorrer do tempo, portanto, estatisticamente semelhante aos controles e diferente das demais concentrações. Apesar dos tratamentos de 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentarem um pequeno aumento do fechamento do risco, esse aumento é bem menor do que o evidenciado para o controle e a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, nesses tratamentos não há diferença estatística entre os tempos 24 e 48 horas, portanto, não há um aumento real do fechamento do risco, o que evidencia que mesmo aquelas células que conseguiram migrar entre o período 0 a 48 horas,



acabaram perdendo a viabilidade, como é característico para essas concentrações, não havendo um aumento estatisticamente significativo do fechamento do risco (Figura 35).

Figura 35 - Análise do efeito de CRLI na migração celular da linhagem C6.



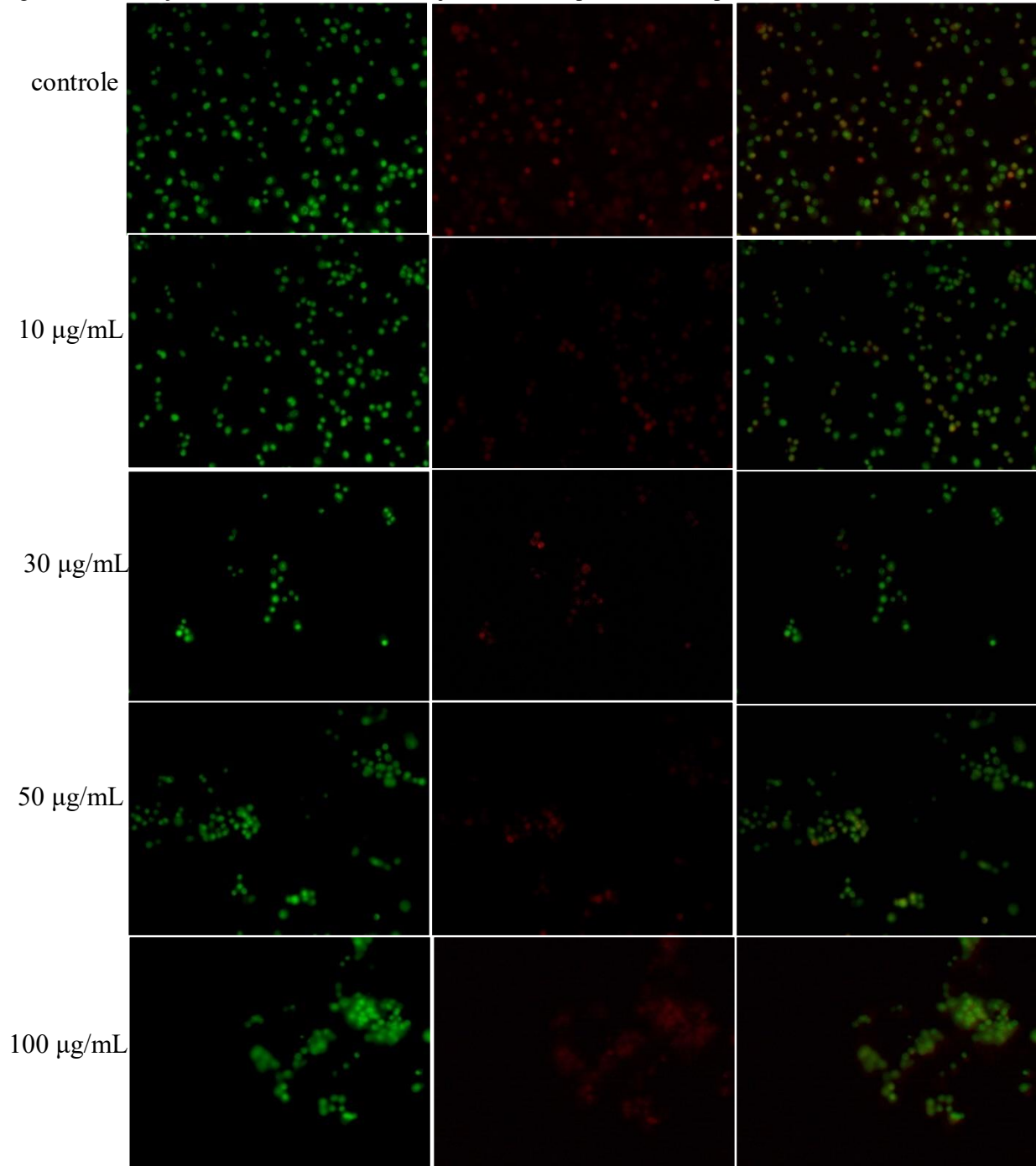
Fonte: Elaborado pelo autor. O símbolo (\*) representa a diferença estatística entre os grupos controle e 10 µg/mL quando comparados entre 24h e 48h. O símbolo (@) representa a diferença estatística entre os grupos controle, 30,50 e 100 µg/mL em 48h. O símbolo (#) representa a diferença estatística entre os grupos controle 10,30,50 e 100 µg/mL em 48h. As células foram plaqueadas na concentração de  $50 \times 10^3$  por poço em uma placa de 48 poços (200µL/poço). Cada grupo apresenta duas repetições biológicas com duas triplicatas. Para o início do experimento houve a remoção de meio de cultura de cada poço e a realização de um risco utilizando a ponta de uma ponteira de 200µL. Após o risco, cada poço foi lavado com PBS para remover as células fracamente aderidas. Posteriormente, um novo meio de cultura foi adicionado e as lectina CRLI foi adicionada com as concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL e no grupo controle apenas HEPES foi adicionado. As imagens foram capturadas em triplicatas para as duas triplicatas de cada grupo nos tempos 0h, 24h e 48h após o tratamento com a lectina. A redução da largura do risco feito durante o experimento foi utilizada como parâmetro para a avaliação da capacidade de migração e crescimento das células. Os resultados foram expressos em médias de porcentagem de redução da largura do risco e analisados pelo teste de variância de dois sentidos (two way ANOVA) seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni sendo os valores de  $p < 0,05$  considerados como estatisticamente significativos.

#### 4.11 Análise dos efeitos de CRLI nas células C6 por fluorescência quando tratadas por 24h

Com o objetivo de avaliar qual tipo de morte celular é induzida pela ação de CRLI, as marcações fluorescentes por laranja de acridina, Hoechst e iodeto de propídio foram utilizadas. A avaliação pela marcação com laranja de acridina revela que a autofagia, apesar de presente em todos os tratamentos, não é a responsável por induzir a morte celular da linhagem C6, pois em relação ao controle poucas células são marcadas (Figura 36). Diferentemente, ConA que também

apresenta especificidade a glicose/manose, induz a morte celular por apoptose e autofagia (LI et al., 2011; PRATT; ROY; ANNABI, 2012).

Figura 36 - Marcação de fluorescência com laranja de acridina após tratamento por 24h com CRLI.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Marcação em verde indica a cromatina das células, em vermelho marcação de vesículas ácidas presentes nas células e indicativas de autofagia e marcações em laranja a sobreposição das cores anteriores indicando quais células apresentam autofagia. As células C6 foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma concentração de  $50 \times 10^3$  células por poço (200 µL/poço). Cada grupo apresenta uma repetição biológica com duas triplicatas. Após 24 horas do tratamento com CRLI concentrações finais de 10, 30, 50 e 100 µg/mL, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 3,7% a 37°C e coradas com LA 10 µg/ml durante 20 minutos ao

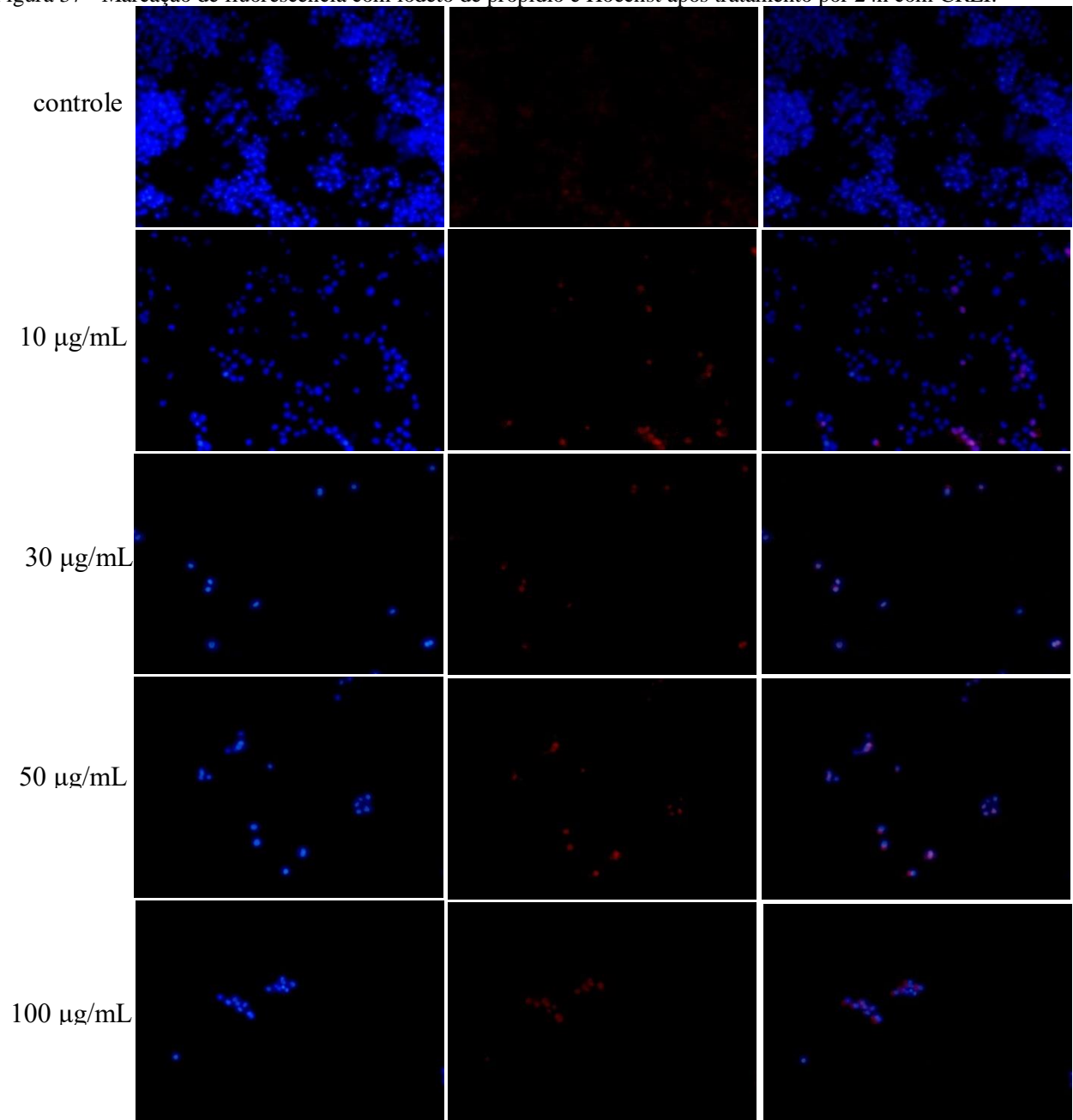
abrigo da luz. As células foram visualizadas nos comprimentos de onda de 470 nm de excitação e 525 nm de emissão em microscópio óptico de luz invertido e registrado pela câmera acoplada.

A marcação com Hoechst e iodeto de propídio revelam que a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  possui algumas poucas marcações para a morte celular por necrose quando comparado ao controle (Figura 36). Apesar da pouca quantidade de células com perda de viabilidade em 24 horas, esse efeito é cumulativo, ocasionando a diferença estatística entre o controle e o tratamento de 10  $\mu\text{g/mL}$  presente no tempo de 48 horas e entre os tempos de 24 e 48 horas para esse mesmo tratamento, como evidenciado pelas figuras 31 e 32, respectivamente.

Em relação as demais concentrações, a marcação pelo Hoechst e iodeto de propídio evidenciam a morte celular pelos mecanismos de apoptose e necrose, respectivamente. É possível perceber que há diferença entre as células marcadas do controle e dos tratamentos de 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  pela marcação com Hoechst, pois há a redução do tamanho do núcleo, o que indica a apoptose (KABIR et al., 2013; ROY et al., 2016). Além da apoptose, a marcação em vermelho do iodeto de propídio indica que há presença de necrose na grande maioria das células nas concentrações de 30, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 37). Dessa forma, a apoptose e a necrose são processos importantes que desencadeiam a redução da viabilidade celular da linhagem C6 além de serem processos que estão interconectados (NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Por apresentar uma ação rápida (efeitos com 24 horas), ocasionar o rompimento e aparecimento de restos celulares e degradação de matriz extracelular em 48 horas e estar presente em todas as concentrações testadas é razoável afirmar que a necrose é o principal processo que leva a morte celular da linhagem C6 ao ser tratada com CRLI (KRYSKO et al., 2008).

É possível que a indução da necrose pela ação de CRLI esteja relacionada com a interação com a metaloproteinase de matriz tipo I (MT1-MMP), que ocasiona a redução da expressão do transportador de glicose-6-fosfato incorporado ao retículo endoplasmático (G6PT), induzem a morte celular por necrose (BELKAID et al., 2007). Outro mecanismo de ação possível para a indução morte das células da linhagem C6 pode estar relacionado com a interação entre CRLI e MT1-MMP e a via de sinalização pró-inflamatória mediada por ciclo-oxigenase 2 (COX-2), uma vez que CRLI apresenta atividade pró-inflamatória (ROCHA et al., 2011; SINA et al., 2010).

Figura 37 - Marcação de fluorescência com iodeto de propídio e Hoechst após tratamento por 24h com CRLI.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Marcação em azul indica o núcleo das células (Hoescht), em vermelho marcação de vesículas ácidas presentes nas células e indicativas de necrose e marcações em roxo a sobreposição das cores anteriores indicando quais células apresentam necrose. As células C6 foram plaqueadas em placas de 48 poços a uma concentração de  $50 \times 10^3$  células por poço (200  $\mu$ L/poço). Cada grupo apresenta uma repetição biológica com duas triplicatas. Após 24 horas do tratamento com CRLI concentrações finais de 10, 30, 50 e 100  $\mu$ g/mL. Após o tratamento por 24h, as células foram lavadas com PBS, incubadas sequencialmente em tampão de ligação (HEPES 0,01, NaCl 140 mM e  $\text{CaCl}_2$  25 mM, pH 7,4) contendo Hoechst 1  $\mu$ g/mL e iodeto de propídio (PI) 14  $\mu$ g/mL durante 15 minutos ao abrigo da luz. As células foram visualizadas nos comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 560nm em microscópio óptico de luz invertido e as fotos registradas pela câmera.

## 5 RESUMO DOS RESULTADOS

A realização desse trabalho permitiu a caracterização físico-química, construção da estrutura tridimensional, análise dos sítios de ligação a metais e de reconhecimento a carboidrato e descoberta da atividade anti-inflamatória para a lectina lactose específica de *Cymbosema roseum* (CRLII), bem como, a atividade antiglioma da lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRLI). CRLII apresentou atividade hemaglutinante (A.H.) ótima em solução tampão com pH entre 6 e 8 e termoestabilidade até 40°C. A modelagem da estrutura de CRLII revelou-se de boa qualidade e confirmou as semelhanças encontradas entre as estruturas primárias de CRLII e as lectinas galactose/lactose *Vatairea macrocarpa* (VML), *Robinia pseudoacacia* (Rob) e *Wisteria floribunda* (WFL) pertencentes as subtribos *Dalbergiae*, *Robinieae* e *Millettieae*, respectivamente, ao apresentar resíduos conservados nos sítios de ligação a metais e de reconhecimento a carboidrato (CRD). Em relação as atividades biológicas, CRLII apresenta atividade anti-inflamatória via CRD mostrando maior efeito na quarta hora e não tem atividade pró-inflamatória, diferindo de CRLI que apresenta ambas as atividades quando administrada por diferentes vias. Nos testes em células de glioma de *Rattus norvegicus* da linhagem C6, CRLII não demonstrou capacidade de reduzir a viabilidade, a migração ou causar alterações na morfologia e fisiologia nas células testadas. Já CRLI reduziu a viabilidade em até 75% dependendo do tempo de tratamento e a migração das células da linhagem C6, evidenciando necrose e apoptose como mecanismos de morte celular nas concentrações testadas de 30, 50 e 100 µg/mL.

## 6 CONCLUSÃO

A lectina lactose específica de *Cymbosema roseum* (CRLII) apresentou atividade hemaglutinante ótima em solução tampão com pH levemente ácido ou básico, termoestabilidade em temperaturas brandas, atividade anti-inflamatória, estrutura modelada e não demonstrou nenhum efeito sobre as células da linhagem C6. A lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRLI) foi capaz de induzir a morte celular por necrose e apoptose, levando a perda de viabilidade celular de C6. Todavia, essas lectinas apresentam novas perspectivas de estudos com relação a investigação da utilização de CRLII em outros tipos de câncer ou para a descoberta de novos marcadores moleculares, e a investigação dos alvos moleculares e mecanismos pelos quais CRLI atua no glioma.

## REFERÊNCIAS

- ABHINAV, K. V.; SAMUEL, E.; VIJAYAN, M. Archeal lectins: An identification through a genomic search. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 84, n. 1, p. 21–30, 2016.
- ABREU, T. M. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. **Planta Medica**, v. 82, n. 7, p. 596–605, 2016.
- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical journal**, v. 96, n. 3, p. 23contd–5c, 1965.
- ALBELDA, S. M.; SMITH, C. W.; WARD, P. A. Adhesion molecules and inflammatory injury. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, p. 504–512, 1994.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Vatairea macrocarpa lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and peptide letters**, v. 11, n. 2, p. 195–200, 2004.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Types of brain and spinal cord tumors in adults**. Disponível em: <Types of brain and spinal cord tumors in adults>. Acesso em: 13 nov. 2016.
- AROUI, S. et al. Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma. **Chemico-Biological Interactions**, v. 244, p. 195–203, 2016.
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, p. 396–399, 1965.
- AUB, J.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 50, p. 613–619, 1963.
- AUTHOR, C. Anti-inflammatory effect of glucose  $\pm$  mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. v. 6, 1997.
- ÁVALOS, Y. et al. Tumor Suppression and Promotion by Autophagy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.
- BADIE, B.; SCHARTNER, J. Role of microglia in glioma biology. **Microscopy Research and Technique**, v. 54, n. 2, p. 106–113, 2001.
- BANERJEE, R. et al. Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. **J. Mol. Biol.**, v. 259, p. 281–296, 1996.
- BAPU, D. et al. N-acetylgalactosamine glycans function in cancer cell adhesion to endothelial cells: A role for truncated O-glycans in metastatic mechanisms. **Cancer Letters**, v. 375, n. 2, p. 367–374, 2016.
- BATISTA, T. et al. Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from

- the Seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules**, v. 9818, n. June, p. 5087–5103, 2011.
- BECKTEL, W. J.; SCHELLMAN, J. A. Protein Stability Curves. **Biopolymers**, v. 26, n. 1, p. 1859–1877, 1987.
- BELKAID, A. et al. Necrosis induction in glioblastoma cells reveals a new “bioswitch” function for the MT1-MMP/G6PT signaling axis in proMMP-2 activation versus cell death decision. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 4, p. 332–340, 2007.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343–350, 2011.
- BENKERT, P.; KÜNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, p. 510–514, 2009.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S. C. E.; SCHOMBURG, D. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins**, v. 71, n. 1, p. 261–277, 2008.
- BENTO, C. A. M. et al. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. v. 38, 1993.
- BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167–223, 2000.
- BHAGWAT, M.; ARAVIND, L. PSI-BLAST Tutorial. In: BERGMAN, N. (Ed.). . **Comparative Genomics: volumes 1 and 2**. Totowa New Jersey: Human Press, 2007.
- BHUTIA, S. K. et al. Autophagy: Cancer’s Friend or Foe? **Advances in Cancer Research**, v. 118, p. 61–95, 2003.
- BITENCOURT, F. D. S. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology**, v. 377, n. 2, p. 139–148, 2008.
- BOUCKAERT, J. et al. The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 26, p. 19778–19787, 2000.
- BOWIE, J. U.; LTCY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164–170, 1991.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins ( Lectins ) I Geology and Coal Resources of the Cen- tralia-Chehalis District , Lewis and Thurston Counties , Washington. **Science**, v. 119, n. 3091, p. 1954, 1954.
- BRUENING, W. et al. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. **Cancer Research**, v. 59, n. 19, p. 6670–6676, 2000.
- BURSCH, W. et al. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. **Journal of cell science**, v. 113, p. 1189–1198, 2000.
- CALVETE, J. J. et al. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. **FEBS Letters**, v. 425, n. 2, p. 286–292, 1998.



- CAMPOS, J. K. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62–68, 2016.
- CARNEIRO, RÔ. F. et al. L-rhamnose-binding lectin from eggs of the Echinometra lucunter: Amino acid sequence and molecular modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 78, p. 180–188, 2015.
- CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, p. 64–67, 1985.
- CAVADA, B. S. et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of Vatairea macrocarpa Duke. **Phytochemistry**, v. 49, n. 3, p. 675–680, 1998.
- CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.
- CAVADA, B. S. et al. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from Cymbosema roseum seeds. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystalization Communications**, v. 62, n. 3, p. 235–237, 2006.
- CAVALLO, F. et al. 2011: The immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, n. 3, p. 319–326, 2011.
- CHAN, Y. S.; XIA, L.; NG, T. B. White kidney bean lectin exerts anti-proliferative and apoptotic effects on cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 335–345, 2016.
- CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering**, v. 14, n. 11, p. 857–866, 2001.
- CHANG, C. P. et al. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 286–296, 2007.
- CHATTERJEE, B. et al. A novel L-fucose-binding lectin from Fenneropenaeus indicus induced cytotoxicity in breast cancer cells. **Journal of Biochemistry Advance Access published October 9, 2009**, 2016.
- CHAVES, A. et al. Structural analysis of Centrolobium tomentosum seed lectin with in flammatory activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 596, p. 73–83, 2016.
- CHRISPEELS, M. J. et al. Characterization of the Endoplasmic Reticulum-associated Precursor of Concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 22, p. 10021–10024, 1986.
- CIRINO, G. et al. Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw edema test. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 9, p. 3428–3432, 1989.
- COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, p. 1073–1081, 2009.
- CORREIA, J. L. A. et al. Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin

extracted from the seeds of dioclea sclerocarpa ducke. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9077–9089, 2011.

CUI, F. et al. Grifola frondosa Glycoprotein GFG-3a Arrests S phase, Alters Proteome, and Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 68, n. 2, p. 267–279, 2016.

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

DE RUYCK, J. et al. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Adv. Appl. Bioinform. Chem.**, v. 9, p. 1–11, 2016.

DE SOUSA, B. L. et al. Structure prediction and functional analysis of a non-permutated lectin from Dioclea grandiflora. **Biochimie**, v. 131, p. 54–67, 2016.

DELATORRE, P. et al. Structure of a lectin from Canavalia gladiata seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, v. 7, n. 52, p. 1–9, 2007.

DILL, K. A; SHORTIE, D. DENATURED STATES OF PROTEINS. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 60, p. 795–825, 1991.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 663–669, 2004.

EHRlich, V. P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. I. Ueber Ricin. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, v. 17, p. 976–979, 1891a.

EHRlich, V. P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II. Ueber Abrin. **Deutsche medizinische Wochenschrift**, v. 17, p. 1218–1219, 1891b.

EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 4, p. 486–501, 1 abr. 2010.

ENCISO-MORA, V. et al. Deciphering the 8q24.21 association for glioma. **Human Molecular Genetics**, v. 22, n. 11, p. 2293–2302, 2013.

ERIKA, V. et al. Molecular modeling of lectin- like protein from Acacia farnesiana reveals a possible anti- inflammatory mechanism in carrageenan induced inflammation. v. 2013, 2013.

ESCHENBURG, S. et al. Primary Structure and Molecular Modeling of Mistletoe Lectin I from Viscum album. v. 372, n. 247, p. 367–372, 1998.

ESWAR, N. et al. **Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER**. [s.l: s.n.]. v. 50

FAHEINA-MARTINS, G. V. et al. Antiproliferative effects of lectins from Canavalia ensiformis and Canavalia brasiliensis in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012.

FARIA, R. A. et al. Biochemical and chemical partial characterization of Bauhinia forficata Link seeds. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 54, n. 3, p. 349–353, 2004.

FAYE, L.; CHRISPPEELS, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of

- Concanavalin A in jack-bean. **Planta**, v. 170, n. 2, p. 217–224, 1987.
- FERRER, C. M. et al. O-GlcNAcylation Regulates Cancer Metabolism and Survival Stress Signaling via Regulation of the HIF-1 Pathway. **Molecular Cell**, v. 54, n. 5, p. 820–831, 2014.
- FU, L. L. et al. Identification of microRNA-regulated autophagic pathways in plant lectin-induced cancer cell death. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 5, p. 477–485, 2012.
- GARDÈRES, J. et al. Purification and partial characterization of a lectin protein complex, the clathrilectin, from the calcareous sponge *Clathrina clathrus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 200, p. 17–27, 2016.
- GILROY, D. W. et al. INFLAMMATORY RESOLUTION : NEW OPPORTUNITIES FOR DRUG DISCOVERY. **Nature Reviews**, v. 3, p. 401–416, 2004.
- GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.
- GONDIM, A. C. S. **Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLL e DSL**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2014.
- GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, n. 3–4, p. 245–277, 2001.
- GRINTZALIS, K.; GEORGIOU, C. D.; SCHNEIDER, Y. J. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. **Analytical Biochemistry**, v. 480, p. 28–30, 2015.
- HAJI-GHASSEMI, O. et al. Molecular Basis for Recognition of the Cancer Glycobiomarker, LacdiNAc (GalNAc[ $\beta$ 1→4]GlcNAc), by *Wisteria floribunda* Agglutinin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 46, p. 24085–24095, 2016.
- HAKOMORI, S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. **Advances in cancer research**, v. 52, p. 257–331, 1989.
- HALL, M.; JOHNSON, R. T. the Role of Dna Repair in the Prevention of Cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 17, p. 235–383, 1996.
- HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HANOVER, J. A. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 11, p. 1865–1876, 2001.
- HART, G. W.; HOUSLEY, M. P.; SLAWSON, C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1017–1022, 2007.
- HERMAN, E. M.; SHANNON, L. M. I.; CHRISPPEELS, M. J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, v. 165, p. 23–29, 1985.
- HOLTJE, H.-D.; FOLKERS, G. **Introduction to comparative protein modeling**. 5. ed.

Weinheim, New York: VHC Verlagsgesellschaft VHC Publishers, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -IBGE. **Produção de cereais, leguminosas e oleaginosas**. Disponível em:

<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201609\\_7.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201609_7.shtm)>.

Acesso em: 6 nov. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -INCA. **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

ISMAYA, W. T. et al. In silico study to develop a lectin-like protein from mushroom agaricus bisporus for pharmaceutical application. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 1, p. 203–217, 2016.

JAENICKE, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. **Eur. J. Biochem. FEBS**, v. 20271, n. 4, p. 5–728, 1991.

JARVIS, C. et al. Antivirulence Isoquinolone Mannosides: Optimization of the Biaryl Aglycone for FimH Lectin Binding Affinity and Efficacy in the Treatment of Chronic UTI.

**ChemMedChem**, v. 11, n. 4, p. 367–373, 2016.

JIN, Y. et al. Identification of GlcNAcylated alpha-1-antichymotrypsin as an early biomarker in human non-small-cell lung cancer by quantitative proteomic analysis with two lectins. **British journal of cancer**, v. 114, n. 5, p. 532–44, 2016.

JUNG, T.-Y. et al. Role of galectin-1 in migration and invasion of human glioblastoma multiforme cell lines. **Journal of neurosurgery**, v. 109, n. August, p. 273–284, 2008.

KABIR, S. R. et al. Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest in vivo in mice. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1288–1296, 2013.

KIM, Y.-S.; YOO, H. S.; KO, J. H. Implication of aberrant glycosylation in cancer and use of lectin for cancer biomarker discovery. **Protein and peptide letters**, v. 16, n. 5, p. 499–507, 2009.

KISS, R. et al. In vitro influence of Phaseolus vulgaris, Griffonia simplicifolia, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. **Gut**, v. 40, n. 2, p. 253–61, 1997.

KNAUT, J. L. **Avaliação do efeito citotóxico de lectinas extraídas de leguminosas sobre células de gliomas C6**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC, 2016.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205–221, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 9th. ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.

KUROKAWA, T.; TSUDA, M.; SUGINO, Y. Purification floribunda and Characterization Seeds of a Lectin from Westeria floribunda seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 18, p. 5686–5693, 1976.

LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, 1970.

- LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: Structure, signalling and functional roles. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 674–682, 1997.
- LANDSTEINER, K. Origins and syntheses of blood group genetics. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 14, p. 1132–1134, 1901.
- LANDUCCI, E. C. et al. Inhibition of carrageenin-induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. **British journal of pharmacology**, v. 114, n. 3, p. 578–583, 1995.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. November, p. 283–291, 1993.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot + : Multiple Ligand À Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, p. 2778–2786, 2011.
- LEFRANC, F.; BROTTI, J.; KISS, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 10, p. 2411–2422, 2005.
- LEI, H.-Y.; CHANG, C.-P. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of biomedical science**, v. 16, n. 1, p. 10, 2009.
- LENARTZ, D. et al. Immunoprotective activity of the galactoside-specific lectin from mistletoe after tumor destructive therapy in glioma patients. **Anticancer research**, v. 16, n. 6B, p. 3799–3802, 1995.
- LENARTZ, D. et al. Efficiency of treatment with galactoside-specific lectin from mistletoe against rat glioma. **Anticancer research**, v. 18, n. 2A, p. 1011–1014, 1997.
- LI, W. WEN et al. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 2, p. 282–286, 2011.
- LIAO, J. H. et al. A Multivalent Marine Lectin from *Crenomytilus grayanus* Possesses Anti-cancer Activity through Recognizing Globotriose Gb3. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 14, p. 4787–4795, 2016.
- LIENER, I. E. Seed Hemagglutinins. **Economic Botany**, v. 18, n. 1, p. 27–33, 1963.
- LIN, G. G.; SCOTT, J. G. Autophagy in Tumorigenesis and Energy Metabolism: Friend by Day, Foe by Night. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.
- LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy , cell death , and cancer. **Molecular and Cellular Oncology**, v. 2, n. 3, p. 8, 2015.
- LIU, B. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1–2, p. 1–6, 2009.
- LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2405–2419, 2004.

LOPES, F. C. et al. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 38, p. 935–41, 2005.

LORIS, R. et al. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998.

LUSCOMBE, N. M.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. NUCPLOT: A program to generate schematic diagrams of protein-nucleic acid interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 24, p. 4940–4945, 1997.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

LYNCH, T. P. et al. Critical role of O-linked B-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 14, p. 11070–11081, 2012.

MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation I. The Effect of Histamine and Serotonin on Vascular Permeability: An Electron Microscopic Study. **Vascular**, n. 2, p. 571–605, 1961.

MÄKELÄ, O. **STUDIES IN HEMAGGLUTININS OF LEGUMINOSAE SEEDS**. Helsinki: University of Helsinki, 1957.

MANFREDI, M. G. et al. Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. **Cancer Research**, v. 59, n. 20, p. 5392–5397, 1999.

MARIKOVSKY, Y.; INBAR, M. Distribution and concanavalin malignant. **Experimental Cell Research**, v. 89, p. 359–367, 1974.

MARTH, C.; DAXENBICHLER, G. Peanut Agglutinin Inhibits Proliferation of Cultured Breast Cancer Cells. **Oncology**, v. 45, p. 47–50, 1988.

MATSUDA, A. et al. Wisteria floribunda agglutinin-positive mucin 1 is a sensitive biliary marker for human cholangiocarcinoma. **Hepatology**, v. 52, n. 1, p. 174–182, 2010.

MAXWELL, R. H. The Genus *Cymbosema* (Leguminosae): Notes and Distribution. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 57, n. 2, p. 252–257, 1970.

MEANY, D. L.; CHAN, D. W. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. **Clinical proteomics**, v. 8, n. 1, p. 7, 2011.

MITCHELL, W. S. **Researches upon the venom of the rattlesnake : with an investigation of the anatomy and physiology of the organs concerned**. XII-Article ed. Washington: Smithsonian contributions to knowledge, 1860.

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

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

- MOURA, R. DA M. et al. Holothuria grisea agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 656–658, 2013.
- MULLER, W. A. Leukocyte – endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 326–333, 2003.
- NAGANO, C. S. et al. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **The Biochemical journal**, v. 409, n. 2, p. 417–28, 2008.
- NAREDDY, P. K.; BOBBILI, K. B.; SWAMY, M. J. Purification, Physico-chemical Characterization and Thermodynamics of Chitooligosaccharide Binding to Cucumber (Cucumis sativus) Phloem Lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 35, 2016a.
- NAREDDY, P. K.; BOBBILI, K. B.; SWAMY, M. J. Purification, Physico-chemical Characterization and Thermodynamics of Chitooligosaccharide Binding to Cucumber (Cucumis sativus) Phloem Lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–10, 2016b.
- NAYEEM, A.; SITKOFF, D.; KRISTEK, S. A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 15, n. 4, p. 808–824, 2006.
- NICOLSON, G. L. Difference in Topology of Normal and Tumour Cell Membrane shown by Different Surface Distributions of Ferritin-conjugated Concanavalin A. In: REISFELD, R. A. (Ed.). **Functional and Structural Nature of Biomembranes II**. II ed. New York, NY: MSS Information Corp., 1973. p. 214.
- NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 3448–3459, 2013.
- NIO-KOBAYASHI, J. Tissue- and cell-specific localization of galectins,  $\beta$ -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. **Anatomical Science International**, p. 1–12, 2016.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 462–466, 1960.
- OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 361–370, 2004.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, O. **Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide : Brain, nervous system**. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection\\_pop=224900&Text-p=World&selection\\_cancer=2230&Text-c=Brain%252C+nervous+system&pYear=3&type=0&window=1&submit=%25C2%25A0Execute](http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=224900&Text-p=World&selection_cancer=2230&Text-c=Brain%252C+nervous+system&pYear=3&type=0&window=1&submit=%25C2%25A0Execute)>. Acesso em: 13 nov. 2016.
- OSTERNE, V. J. S. et al. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from Canavalia virosa seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342–3353, 2014.

- OSTERNE, V. J. S. et al. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 271–282, 2017.
- PARHAM, P. **The Immune System**. 3rd. ed. New York, NY: Garland Science, 2012.
- PEREIRA-JUNIOR, F. N. et al. Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine- specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, v. 25, n. 8, p. 443–449, 2012.
- PÉREZ, G. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 843–853, 1998.
- PEREZ, G.; HERNANDEZ, M.; MORA, E. Isolation and Characterization of a Lectin From the Seeds of *Dioclea lehamanni*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1745–1749, 1990.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.
- PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 134–141, 2016.
- PIRES, A. F. et al. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research**, v. 65, n. 1, p. 43–52, 2016.
- POLANSKI, A.; KIMMEL, M. **Bioinformatics**. Berlin: Springer, 2007.
- POSSER, T. et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38MAPK and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 6, p. 407–414, 2007.
- POWELL, A. E.; LEON, M. A. Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen concanavalin A. **Experimental Cell Research**, v. 62, n. 2–3, p. 315–325, 1970.
- PRATT, J.; ANNABI, B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 5, p. 917–924, 2014.
- PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, v. 22, n. 9, p. 1245–1255, 2012.
- RABIJNS, A. et al. Structure of a legume lectin from the bark of *Robinia pseudoacacia* and its complex with N-acetylgalactosamine. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 44, n. 4, p. 470–478, 2001.
- RAJA, I. et al. Isolation and characterization of mannose - binding lectin gene from leaves of *Allium ascalonicum* ( Shallot ) and its putative role in insect resistance. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 2, p. 245–255, 2016.



- RAVAL, S. et al. A database analysis of jacalin-like lectins: Sequence-structure-function relationships. **Glycobiology**, v. 14, n. 12, p. 1247–1263, 2004.
- RIJKEN, D. C. et al. Purification and Partial Characterization of a lectin from the seeds of *dioclea guianensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 580, n. 2, p. 140–153, 1997.
- ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 320–324, 2014.
- ROCHA, B. **CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E CRISTALOGRAFIA DE RAIOS X DE LECTINAS DA FAMÍLIA LEGUMINOSAE**. [s.l: s.n.].
- ROCHA, B. A. M. et al. Purification, characterization, and preliminary x-ray diffraction analysis of a lactose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 3, p. 383–393, 2009.
- ROCHA, B. A. M. et al. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 806–816, 2011.
- ROMERO, J. M. et al. Impact of human galectin-1 binding to saccharide ligands on dimer dissociation kinetics and structure. **Glycobiology Advance**, n. 72, p. 1–29, 2015.
- ROY, D. et al. Epididymal protein ASF is a d-galactose-specific lectin with apoptotic effect on human breast cancer cell line MCF7. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 84, p. 208–220, 2016.
- SAIJO, S. Roles of C-Type Lectin Receptors in Inflammatory Response. In: MASAYUKI, M.; KIYOSHI, T. (Eds.). **Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation**. Japan: Springer, 2016. p. 702.
- SANTIAGO, M. Q. **Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina extraída de sementes de *Canavalia oxyphylla standl.* & l. o. Williams**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.
- SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla Standl.* **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, p. 117–123, 2014.
- SCHNEIDER, C. A; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 363–367, 2005.
- SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. A method for integrative structure determination of protein-protein complexes. **Bioinformatics**, v. 28, n. 24, p. 3282–3289, 2012.
- SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 12013–7, 1994.

- SHANMUGAVEL, S. et al. Isolation and analysis of mannose/trehalose/maltose specific lectin from jack bean with antibruchid activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 1–14, 2016.
- SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, n. 6, p. 221–226, 1993.
- SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.
- SHARON, N. Lectins: past, present and future <sup>1</sup>. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 6, p. 1457–1460, 2008.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: Cell-Agglutinating and Sugar-Specific Proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949–959, 1972.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins-a large family of homologous proteins. **The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, n. 14, p. 3198–3208, 1990.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.
- SHERR, C. J. Principles of Tumor Suppression. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 235–246, 2004.
- SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell**, v. 2, n. 2, p. 103–112, 2002.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.
- SHOBA, S. P.; ROSE, B. Characterization of naturally occurring agglutinin in the crab *Varuna litterata*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 4, n. 2, p. 115–118, 2016.
- SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862–865, 2004.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.
- SILVA, L. M. C. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 33, n. 5, p. 830–835, 2010.
- SILVA, M. et al. Structural Characterization , Docking and Dynamics Simulations of *Canavalia Bonariensis* Lectin. v. 3, p. 1–8, 2016.
- SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. . MODELAGEM MOLECULAR DE PROTEÍNAS-ALVO POR HOMOLOGIA ESTRUTURAL. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 1, p. 15–26, 2007.
- SINA, A. et al. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK $\gamma$ /NF- $\kappa$ B-dependent pathway. **Journal of Cell Communication and**

**Signaling**, v. 4, n. 1, p. 31–38, 2010.

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, R. et al. Two chitotriose-specific lectins show anti-angiogenesis, induces caspase-9-mediated apoptosis and early arrest of pancreatic tumor cell cycle. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2016.

SINGH, R. S.; WALIA, A. K.; KANWAR, J. R. Protozoa lectins and their role in host–pathogen interactions. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 1018–1029, 2016.

SOUSA-FILHO, L. M. et al. Biochemical Profile, Biological Activities, and Toxic Effects of Proteins in the *Rhinella schneideri* Parotoid Gland Secretion. **Journal of experimental zoology**, p. 511–523, 2016.

SOUSA, B. L. et al. Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: A new tool for cancer research. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 72, p. 27–39, 2016a.

SOUSA, R. et al. International Immunopharmacology Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosan-induced temporomandibular joint in inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and  $\text{tnf-}\alpha$  and  $\text{il-1}\beta$  suppression. **International Immunopharmacology**, v. 38, p. 313–323, 2016b.

SOWDHAMINI, R. et al. CAMPASS: a database of structurally aligned protein superfamilies. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1087–94, 1998.

STEWART, B. W., WILD, C. P. **World Cancer Report 2014**. Lyon: [s.n.].

STRIK, H. M. et al. Galectin-3: Cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 53, n. 1, p. 13–20, 2001.

SU, Z. et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. the Identification of the Hemagglutinin of. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227–237, 1936.

SUSEELAN, K. N. et al. Characterization of Con C, a lectin from *Canavalia cathartica* Thouars seeds. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 528–535, 2007.

SYED, P. et al. Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. **Proteomics**, v. 16, n. 8, p. 1257–1265, 2016.

TEDDER, T. F. et al. The selectins : vasculas adhesion molecules. **Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 9, n. 10, p. 866–873, 1995.

THE PLANT LIST. **The Plant List**. Disponível em:  
<<http://www.theplantlist.org/browse/A/Leguminosae/>>. Acesso em: 6 nov. 2016.

THORBURN, A. Apoptosis and autophagy: Regulatory connections between two supposedly different processes. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2008.

- TRENTIN, A G.; ALVAREZ-SILVA, M. Thyroid hormone regulates protein expression in C6 glioma cells. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 31, n. 10, p. 1281–4, 1998.
- UMARO, A. et al. International Journal of Biological Macromolecules 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.
- VANDERLEI, E. S. O. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1113–1118, 2010.
- VARROT, A.; BASHEER, S. M.; IMBERTY, A. Fungal lectins: Structure, function and potential applications. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 5, p. 678–685, 2013.
- VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in Neutrophil Surface-Receptor Expression After Stimulation with FMLP , Endotoxin , Interleukin-8 and Activated Complement Compared to Degranulation. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 25–33, 2004.
- WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: the path to a new understanding of acute inflammation. **News in Physiological Science**, v. 15, n. 3, p. 107–113, 2000.
- WANG, H. et al. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 32, n. 3, p. 365–372, 2000.
- WANGKANONT, K. et al. Structures of *Xenopus* embryonic epidermal lectin reveal a conserved mechanism of microbial glycan recognition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 11, p. 5596–5610, 2016.
- WAWRA, S. et al. The fungal specific  $\beta$ -glucan binding lectin FGB1 alters susceptibility to cell wall stress and prevents glucan-triggered immunity in plants. **Nature Communications**, v. 7, 2016.
- WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural Basis of Lectin-Carbohydrate. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 65, p. 441–473, 1996.
- WILLIAMS, A; WESTHEAD, D. R. Sequence relationships in the legume lectin fold and other jelly rolls. **Protein engineering**, v. 15, n. 10, p. 771–4, 2002.
- XIANG, Z. Advances in homology protein structure modeling. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 7, n. 3, p. 217–27, 2006.
- YADAV, P. et al. Structural-functional insights and studies on saccharide binding of *Sophora japonica* seed lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 75–84, 2016a.
- YADAV, R. et al. Biophysical Studies on Calcium and Carbohydrate Binding to Carbohydrate Recognition Domain of Gal / GalNAc Lectin from *Entamoeba histolytica* : Insights into Host Cell Adhesion. **Journal of Biochemistry Advance**, p. 1–26, 2016b.
- YAMAMOTO, H. et al.  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas:

implications for a role in regulating invasivity. **Cancer Res**, v. 60, p. 134–142, 2000.

YAMASAKI, K. et al. Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. **Hepatology**, v. 60, n. 5, p. 1563–1570, 2014.

ZACHARA, N. E.; HART, G. W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 5–6, p. 599–617, 2006.

ZENG, G. et al. Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. **Biochemistry**, v. 38, n. 27, p. 8762–8769, 1999.

ZIEGLER, U. Morphological Features of Cell Death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 124–128, 2004.