



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

MESSIAS VITAL DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA LECTINA PRÓ-INFLAMATÓRIA
DE SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (Aublet)

FORTALEZA

2017

MESSIAS VITAL DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA LECTINA PRÓ-INFLAMATÓRIA
DE SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (Aublet)

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 obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientadora: Prof.^a 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)

- O48d Oliveira, Messias Vital de.
Determinação estrutural de uma lectina pró-inflamatória de sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet) /
Messias Vital de Oliveira. – 2017.
58 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. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. *Vatairea guianensis*. 2. Lectina. 3. Modelagem molecular. 4. Docking molecular. 5. Inflamação. I.
Título.

CDD 660.6

MESSIAS VITAL DE OLIVEIRA

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE UMA LECTINA PRÓ-INFLAMATÓRIA
DE SEMENTES DE *Vatairea guianensis* (Aublet)

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 obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dra. Kyria Santiago do Nascimento (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães (Membro)
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

“Se teus olhos forem bons, teu corpo terá luz. Porém, se teus olhos forem maus, todo o teu corpo será tenebroso [...]"

Mateus, 6:22-23

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ser meu amigo fiel nos trabalhos e prazeres desta vida terrena. Sendo também meu guia na tomada de decisões, que julgo difíceis, mas que o resultado é melhor do que o esperado.

À minha esposa Ana Paula Moreira e meu filho João Sasaque por fazerem parte da minha família, abençoada por Deus, e por me apoiarem a fazer a Pós-Graduação.

Aos demais familiares que também têm contribuído com minha formação pessoal: minha Mãe Dapaz Alves, meu pai João Alves (em memória) irmãos – Jônatas, Abner, Midiã, Débora, Adna Kelly e Estefânia. Assim como todos meus sobrinhos.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, assim como a minha Co-Orientadora, Prof^a. Dra. Kyria Santiago do Nascimento por me receberem no BioMol-Lab (desde 08/08/2016) e que com grande talento docente, têm me ensinado a respeitar a Todos; trabalhando sempre em equipe e motivando à conquista do trabalho pessoal.

Ao Prof. Dr. João Batista Cajazeiras, por todos os ensinamentos sobre os procedimentos básicos de Química de Proteínas bem como sua disponibilidade em me ajudar sempre que tenho precisado.

Aos colegas que me ajudaram na parte teórica bem como nos procedimentos de bancada dos projetos desenvolvidos no BioMol-Lab: Alfa, Simoni, Cleane, Ivanice, Clareane, André, Corneilles (Neto), Hadson, William, Marliane, Larissa, Morgana, Lucas e David. Em especial, a Vinícius Osterne por realizar os experimentos de Bioinformática e também, em parte, na escrita desta dissertação. A Cláudia Lóssio que tem contribuído em outros projetos. A Vanir Reis, Mayara Q. e Mayara T., por complementarem o nosso trabalho, certificando-me. E a minha colega de bancada Gleiciane Martins, sempre disposta na colaboração dos meus trabalhos, compartilhando as suas ideias e promovendo o Bem-Estar de todos nós.

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

Aos meus colegas de moradia: Alexandre pelo companheirismo e alegria de compartilhar tudo que sabe, além de instigar novos conhecimentos; Cássia e Rafael por completarem também essa parte.

Ao meu ex-orientador da especialização Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães que tem me ensinado a conviver na Pós-Graduação.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro durante todo o período de Mestrado.

Aos professores participantes da banca, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Amplamente distribuídas na natureza, as lectinas compreendem um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um domínio não catalítico capaz de seletivamente reconhecer carboidratos, e interagir de maneira reversível a açúcares livres ou glicanos presentes em glicoproteínas ou glicolipídeos, sem alterar suas estruturas. As lectinas mais estudadas são de origem vegetal, principalmente da família *Leguminosae*. Dentro desta família destacam-se as tribos *Phaseoleae*, *Vicieae* e *Dalbergieae* pertencentes à subfamília *Papilionoideae*. Dentre as lectinas da tribo *Dalbergieae*, podemos destacar uma lectina com afinidade de ligação a *N*-acetil-D-galactosamina/D-galactose extraída de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL) que apresentou efeito vasodilatador *in vitro* com mecanismo envolvendo óxido nítrico. Algumas lectinas desta mesma tribo já estão caracterizadas bioquimicamente, mas apenas as lectinas de *Pterocarpus angolensis*, *Centrolobium tomentosum*, *Platypodium elegans*, *Arachis hypogaea* e *Vatairea macrocarpa* têm suas estruturas. Os estudos estruturais de lectinas são utilizados como ferramentas para compreender de que forma essas proteínas se comportam nos vários processos fisiológicos. Para as lectinas que ainda não possuem suas estruturas cristalográficas resolvidas, a Bioinformática ganha destaque utilizando metodologias que realizam uma predição da estrutura tridimensional destas proteínas em complexo com os seus ligantes. Considerando que estudos estruturais com estas proteínas ainda são poucos, o presente trabalho teve por objetivo predizer a estrutura, estudar a afinidade e as interações da lectina de sementes de *Vatairea guianensis* em complexo com diferentes glicanos aplicando técnicas de bioinformática, como modelagem por homologia e *docking* molecular, além de investigar o seu efeito inflamatório *in vivo*. O modelo de VGL foi obtido por homologia com a lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) e demonstrou características comuns das lectinas de leguminosas e a análise da interação proteína-ligante revelou interações favoráveis com *N*-acetil-D-galactosamina, D-galactose e açúcares relacionados, bem como vários *N*- e *O*-glicanos, biologicamente relevantes. O teste *in vivo* edema de pata revelou que a VGL induz o efeito edematogênico envolvendo prostaglandinas, interleucinas e o domínio de reconhecimento a carboidratos da lectina. Conjuntamente, esses dados corroboram com trabalhos já reportados em que VGL interage com *N*- ou *O*-glicanos de moléculas alvo, particularmente nos que apresentam galactosídeos em sua estrutura, contribuindo para o efeito inflamatório da lectina.

Palavras-chave: *Vatairea guianensis*. Lectina. Modelagem molecular. *Docking* molecular. Inflamação.

ABSTRACT

Widely distributed in nature, lectins comprise a heterogeneous group of proteins of nonimmune origin, having at least one non-catalytic domain capable of selectively recognizing carbohydrates, and interacting reversibly to free sugars or glycans present in glycoproteins or glycolipids, without altering Structures. The most studied lectins are of vegetable origin, mainly of the family Leguminosae. Within this family stand out the tribes Phaseoleae, Viciae and Dalbergieae belonging to the subfamily Papilionoideae. Among the lectins of the Dalbergieae tribe, we can highlight a lectin with binding affinity to N-acetyl-D-galactosamine / D-galactose extracted from *Vatairea guianensis* (VGL) seeds that presented vasodilator effect in vitro with mechanism involving nitric oxide. Some lectins from this same tribe are already characterized biochemically, but only the lectins of *Pterocarpus angolensis*, *Centrolobium tomentosum*, *Platypodium elegans*, *Arachis hypogaea* and *Vatairea macrocarpa* have their structures. Structural studies of lectins are used as tools to understand how these proteins behave in the various physiological processes. For lectins that do not yet have their crystallographic structures resolved, Bioinformatics is highlighted using methodologies that predict the three-dimensional structure of these proteins in complex with their ligands. Considering that structural studies with these proteins are still few, the present work had the objective to predict the structure, to study the affinity and the interactions of the lectin of *Vatairea guianensis* seeds in complex with different glycans applying techniques of bioinformatics, like homology modeling and docking Molecular, in addition to investigating its inflammatory effect in vivo. The VGL model was obtained by homology with *Vatairea macrocarpa* (VML) lectin and demonstrated common characteristics of legume lectins and the analysis of protein-linker interaction revealed favorable interactions with N-acetyl-D-galactosamine, D-galactose and sugars. As well as various biologically relevant N- and O-glycans. The in vivo paw edema test revealed that VGL induces the edematogenic effect involving prostaglandins, interleukins and the lectin carbohydrate recognition domain. Together, these data corroborate with work already reported in which VGL interacts with N- or O-glycans of target molecules, particularly those with galactosides in their structure, contributing to the inflammatory effect of the lectin.

Keywords: *Vatairea guianensis*. Lectin. Molecular modeling. Molecular docking. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação estrutural das lectinas de plantas	17
Figura 2	– Classificação das lectinas quanto a famílias	19
Figura 3	– Estrutura tridimensional da lectina recombinante de sementes de <i>Dioclea grandiflora</i> (DGL)	20
Figura 4	– Mecanismo representativo da Biossíntese de Concanavalina A (ConA)	22
Figura 5	– Partes da <i>Vatairea guianensis</i> : flores, ramos e fruto	26
Figura 6	– Indução do edema de pata por VGL. A) Curso temporal e B) Área sob a curva	33
Figura 7	– Infiltrado de leucócitos polimorfonucleares induzidos por VGL. (A e C) salina, (B e D) VGL	34
Figura 8	– Efeito dos diferentes inibidores/mediadores inflamatórios na atividade inflamatória de VGL	34
Figura 9	– Teste imunohistoquímico para averiguar a presença de IL-1 β induzida por VGL	35
Figura 10	– Estrutura geral do monômero de VGL	36
Figura 11	– Contribuição do CRD para o efeito edematogênico de VGL	37
Figura 12	– Melhores posições de <i>docking</i> de VGL com os ligantes	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lectinas da tribo <i>Dalbergieae</i>	24
Tabela 2 – Resultados da pontuação de <i>Docking</i> e concentração inibitória mínima dos carboidratos testados na Atividade hemaglutinante de VGL	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AUC	Área sob a curva
ANOVA	Análise de variância
BC2L-C	Lectina de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CTL	Lectina de <i>Centrolobium tomentosum</i>
DRC	Domínio de Reconhecimento a Carboidratos
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GlicNAc	N-Acetilglicosamina
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
Lac/Celo	Lactose/celobiose
Man/Glic	Manose/glicose
M13	Mmanose- α 1,3-manose
MDM	Mmetil-dimanosídeo
MMA	α -metil-manosídeo
NAG	N-acetil-D-glicosamina
NeuNAc	Ácido acetilneuramínico
PDB	Protein Data Bank
PELa	Lectina de <i>Platypodium elegans</i>
pH	Logarítmo negativo da concentração de íons de hidrogênio
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Aglutinina de amendoim
s.c.	Subcutânea
SBA	Aglutinina de soja
VGL	Lectina de <i>Vatairea guianensis</i>
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
WGA	Lectina do gérmen de trigo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Histórico e Classificação de lectinas vegetais	16
3.1.1	<i>Lectinas de leguminosas</i>	20
3.1.2	<i>Lectinas da tribo Dalberbieae</i>	22
3.1.3	<i>Lectinas de sementes de Vatairea guianensis Aublet (VGL)</i>	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	Purificação da Lectina (VGL) de sementes de Vatairea guianensis Aublet .	28
4.2	Avaliação da atividade inflamatória em modelo de edema de pata	28
4.2.1	<i>Análise histológica</i>	29
4.2.2	<i>Imunohistoquímica</i>	29
4.2.3	<i>Análise estatística</i>	30
4.3	Determinação do template e predição da estrutura secundária da VGL	30
4.4	Homologia, modelagem e validação da VGL	30
4.5	<i>Docking</i> Molecular da VGL	31
4.6	<i>Docking</i> de <i>N-</i> e <i>O-</i> glicanos com VGL	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Avaliação da atividade inflamatória em modelo de edema de pata	33
5.2	Determinação do template e predição da estrutura secundária da VGL	35
5.3	Homologia, modelagem e validação da VGL	36
5.4	<i>Docking</i> Molecular da VGL	36
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO A - ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA BIOCHIMIE	51

1 INTRODUÇÃO

Amplamente distribuídas na natureza, as lectinas podem ser encontradas em plantas (inferiores e superiores), animais (invertebrados e vertebrados) microrganismos e até mesmo em vírus. Compreendem um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imune, que possuem pelo menos um domínio não catalítico que seletivamente reconhece carboidratos, se ligando de maneira reversível a açúcares livres ou glicanos presentes em glicoproteínas ou glicolipídeos, sem alterar suas estruturas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995 *apud* DA SILVA, 2017).

Os tipos de interações lectina/ligante são possíveis porque elas têm um domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) dentro de sua estrutura que contribui para uma característica representativa da maioria das lectinas: a capacidade de aglutinar eritrócitos. Devido a esta capacidade, elas também são conhecidas como aglutininas (GAJBHIYE e GONG, 2013) e são amplamente utilizadas em pesquisas, inclusive terapêuticas, pois fornecem especificidade apropriada aos seus glicanos e mostram resistência à degradação enzimática.

Estas moléculas desempenham um papel fundamental em muitos processos biológicos conhecidos, tais como comunicação, adesão e interação celular, mecanismos de defesa, resposta imunológica, fertilização e desenvolvimento (TEIXEIRA *et al.*, 2014; GABIUS, 1997), entre outros.

São bem descritas na literatura algumas propriedades dessas biomoléculas com atividade inseticida (MACEDO *et al.*, 2015; OHIZUMI *et al.*, 2009; ATALAH *et al.*, 2014), atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (FREIRE *et al.* 2003, BENJAMIN *et al.*, 1997, ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 2005), efeito vasodilatador em anéis de aorta (ASSEREUY *et al.*, 2009), e indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001), entre outros. Assim, estas proteínas são consideradas ferramentas importantes na biotecnologia (DA SILVA, 2015).

As lectinas mais estudadas são de origem vegetal, principalmente da família *Leguminosae*. Dentro desta família destacam-se as tribos *Phaseoleae*, *Vicieae* e *Dalbergieae* pertencentes a subfamília *Papilionoideae*. Podemos citar dentre as lectinas da tribo *Dalbergieae* as que têm afinidade com N-acetil-glicosamina e que apresentam importantes atividades anti-inflamatórias como as extraídas de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (NAPIMOGA *et al.*, 2007) e *Lonchocarpus araripensis* (PIRES *et al.*, 2011). No entanto, as que têm afinidade para galactose, como a de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML), possui propriedade pró-inflamatória. O efeito inflamatório dessa proteína ocorre por meio da ativação de macrófagos com liberação de citocinas (ALENCAR *et al.*, 2007). Lectinas do

gênero *Vatairea*, como a VML, reconhecem também o antígeno Tn (Ser-GalNAc/Thr-GalNAc) presentes em uma grande variedade das células neoplásicas. Estudos cristalográficos estruturais dessa lectina, tanto na sua forma nativa (SOUSA *et al.*, 2015) como recombinante (SOUSA *et al.*, 2016), demonstram a nível molecular a alta afinidade dessas proteínas por esse antígeno, candidatando-as como prováveis ferramentas para uso terapêutico ou em diagnóstico de vários tipos de câncer.

Outra lectina com afinidade de ligação por N-acetil-D-galactosamina/D-galactose extraída de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL) apresenta efeito vasodilatador *in vitro*, em aorta endotelial via óxido nítrico (SILVA *et al.*, 2012). Reportam-se algumas lectinas caracterizadas bioquimicamente dentro da tribo *Dalbergieae*, mas apenas as de sementes de *Pterocarpus angolensis* (LORIS, *et al.*, 2004), *Centrolobium tomentosum* (ALMEIDA, *et al.*, 2016), *Platypodium elegans* (BENEVIDES *et al.*, 2012), *Arachis hypogaea* (BANERJEE *et al.*, 1996) e *Vatairea macrocarpa* (SOUSA *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2016), tiveram suas estruturas resolvidas e consequente entendimento da estrutura/função.

Os estudos estruturais das lectinas servem como ferramentas para compreender de que forma essas proteínas comportam-se nos vários processos fisiológicos. Para as lectinas que ainda não tenham suas estruturas cristalográficas resolvidas, a Bioinformática ganha destaque utilizando metodologias que simulam o comportamento tridimensional destas lectinas com os seus ligantes relacionado diretamente com a atividade testada.

Considerando que estudos estruturais com estas lectinas ainda são poucos, o presente trabalho tem por objetivo estudar a afinidade e as interações da lectina de sementes de *Vatairea guianensis* por diferentes glicanos a partir de técnicas de Bioinformática, como *docking* e dinâmica molecular, além de investigar o seu efeito inflamatório.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo avaliar a estrutura/função de uma lectina obtida de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL) através de ferramentas de bioinformática bem como em modelos de inflamação.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar a lectina VGL de sementes de *Vatairea guianensis*;
- Determinar o efeito inflamatório da lectina em modelo de edema de pata;
- Fazer Análise Histológica e Imunohistoquímica dos tecidos testados contra o efeito inflamatório;
- Determinar a estrutura secundária da VGL;
- Simular interações por Dinâmica Molecular da VGL com vários glicanos;
- Simular interações por *Docking* Molecular da VGL com N e O-glicanos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Histórico e Classificação de lectinas vegetais

Como já citado, as lectinas são proteínas ubíquas e em sua grande maioria isoladas a partir de plantas. As lectinas vegetais podem ser encontradas em qualquer parte das plantas. Nas sementes, entretanto, é possível encontrar em uma concentração maior: até 10% do peso total da semente (LORIS, 2002; SHARON e LIS, 2004), o que torna vantajoso a sua obtenção para prosseguir com outros estudos como atividades biológicas e sua caracterização.

Reporta-se na literatura como primeiro caso de hemaglutinação de células causada por lectinas o experimento de Silas Weir Mitchel em 1860, onde observou que uma gota do veneno da cobra *Crotalus durissus* foi capaz de aglutinar sangue de pombo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Quanto as lectinas de plantas, o primeiro relato data de 1888 por Peter Hermann Stillmark o qual descreveu as propriedades aglutinantes da ricina, uma lectina tóxica extraída de sementes da *Ricinus communis* (mamona). Em 1972, Sharon e Lis listaram diferentes lectinas, iniciando a era moderna da lectinologia (BIES, LEHR, WOODLEY, 2004 *apud* OSTERNE, 2016).

Durante a Segunda Guerra Mundial, o interesse na tipagem de sangue para a transfusão de sangue resultou na descoberta de algumas lectinas específicas para vários tipos de sangue. Essas aglutininas foram assim denominadas "lectinas", um termo derivado da palavra latina "*legere*", que significa "escolher". As lectinas foram encontradas em quase todas as espécies de plantas estudadas e são particularmente abundantes nas sementes de leguminosas (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004; OLIVEIRA, 2004).

Estas proteínas formam um grupo heterogêneo de proteínas por serem diferentes entre si no que diz respeito às propriedades bioquímicas e físico-químicas, relação evolucionária, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas. As lectinas vegetais estão divididas em quatro classes principais de acordo com a sua estrutura e seu sítio de ligação a carboidratos (VAN DAMME *et al.*, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998). A Figura 1 ilustra cada classe e a descrição de cada uma delas.

A primeira classe é do tipo monovalente, apresentando um único sítio de ligação a carboidrato, sendo incapazes de causar aglutinação de células ou de precipitar glicoconjugados. São chamadas de **Merolectinas** e a heveína, obtida a partir do látex de *Hevea brasiliensis*, é um exemplo classicamente citado. (VAN DAMME *et al.*, 1998).

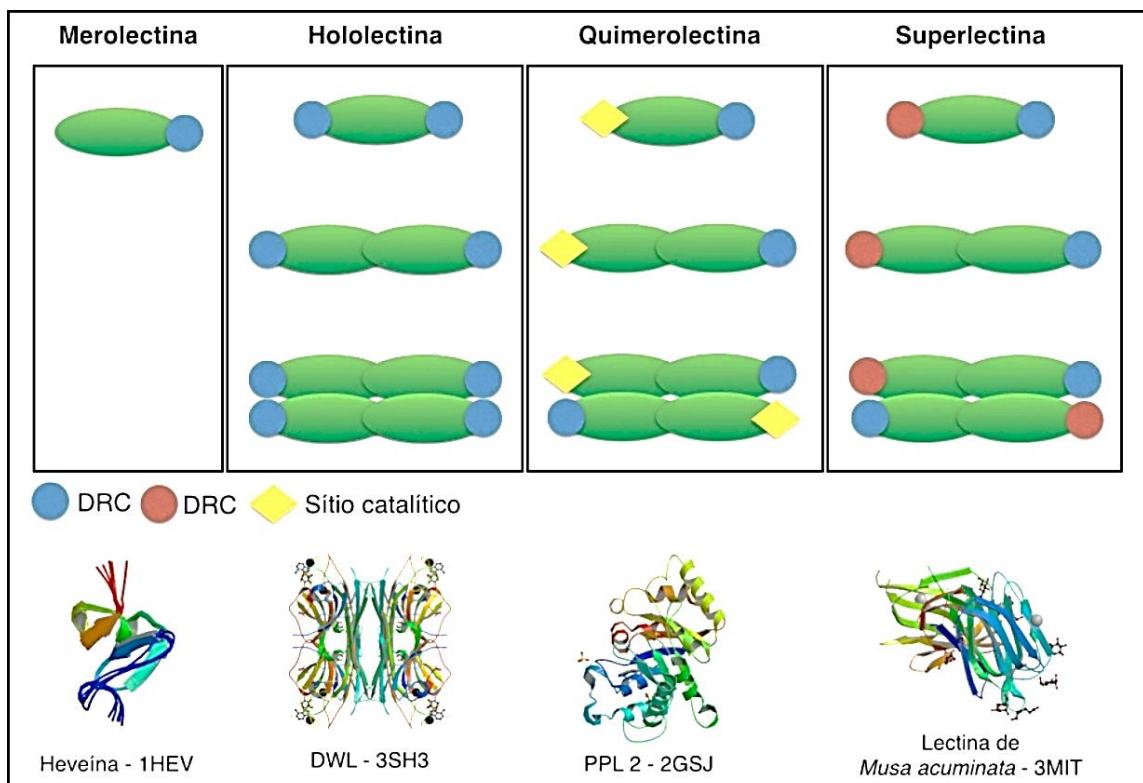
A segunda classe apresenta dois ou mais sítios idênticos de ligação a carboidratos, podendo assim estabelecer ligações cruzadas entre células e glicoconjugados e,

eventualmente, precipitando-os. Um exemplo dessa classe, denominada de **Hololectinas**, é a lectina de *Dioclea wilsonii* (DWL) (RANGEL *et al.*, 2011).

Na terceira classe, além dos domínios de ligação a carboidrato, existe um ou mais domínios independentes e de função biológica distinta (ex: atividade enzimática). Essa classe é denominada de **Quimerolectinas**. Podemos citar como exemplo a PPL2, uma lectina obtida a partir de sementes de *Parkia platycephala*, que apresenta de forma independente um domínio ligante a quitina e outro com atividade endoquitinásica (CAVADA *et al.*, 2006).

Por último temos a classe das proteínas que têm pelo menos dois domínios distintos de ligação a carboidratos, entretanto, diferentemente das hololectinas essas proteínas são hábeis a reconhecer diferentes sacarídeos (VAN DAMME *et al.*, 1998). São chamadas de **Superlectinas** e, como exemplo, podemos citar a lectina do bulbo da tulipa (*Tulipa gesneriana*), TxLCI, que é formada por dois domínios de ligação a carboidrato, reconhecendo manose e N-acetil-D-galactosamina, respectivamente; e a lectina da banana (*Musa acuminata*), que possui dois sítios distintos de reconhecimento a laminaribiose e xilose- β 1,3-manose- α -O-metil em domínios distintos (MEAGHER *et al.*, 2005 *apud* DE SOUSA, 2014).

Figura 1 - Classificação estrutural das lectinas de plantas.



Fonte: Osterne (2016). Imagem adaptada de VAN DAMME *et al.*, 1998. DRC: Domínio de Reconhecimento a Carboidratos.

De acordo com Peumans e Van Damme (1998) *apud* OSTERNE (2016) é conhecido outro tipo de divisão das lectinas em famílias baseando-se em suas relações de sequência e evolutivas, subdivididas em: lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose, lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos, proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2, proteínas relacionadas a jacalina, lectinas de *Amaranthaceae* e lectinas do floema de *Cucurbitaceae*.

O grupo das **lectinas de leguminosas** é as mais estudadas contendo alta similaridade estrutural e de sequência. A estrutura da lectina manose específica de *Cymbosema roseum* (CRL I) é mostrada na Figura 2A (OSTERNE 2016).

Outro grupo de lectinas bastantes similares encontradas nas famílias de *Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Orchidaceae*, *Liliaceae* e *Bromeliaceae* são as **Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose**. Estruturalmente, essas lectinas são formados por 1 a 4 subunidades de aproximadamente 12 kDa e são específicas exclusivamente por manose (PEREIRA *et al.*, 2014; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Algumas atividades biológicas relatadas para esse grupo de proteínas são as atividades antiviral (KAUR *et al.*, 2007) e inseticida (DAS *et al.*, 2013, MONDAL *et al.*, 2012). Na figura 1B. tem-se a estrutura da lectina manose-específica de *Gastrodia elata*.

Quanto ao grupo de **Lectinas ligantes a quitina homóloga a heveína** possuem especificidade por N-acetil-glicosamina e sua principal característica é a presença de domínios heveínicos (referência a heveína, uma merolectina ligante a quitina extraída do látex da *Hevea brasiliensis*) (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2015). A Figura 2C mostra a lectina de gérmen de trigo (WGA), a principal representante desse grupo possuindo quatro domínios estruturalmente semelhante a Heveína (PORTILLO-TÉLLEZ *et al.*, 2011).

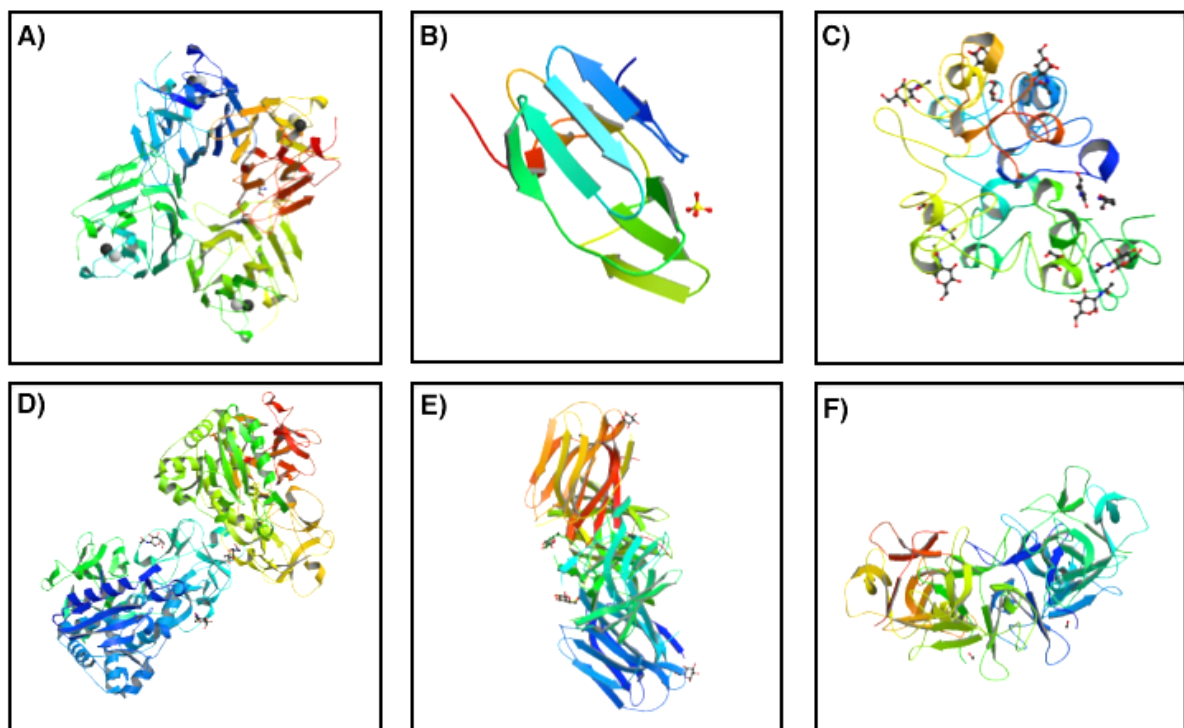
Existe ainda uma classe de **Proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2** (As RIPs tipo 2) formadas por duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B unidas por pontes dissulfeto). A cadeia A possui um domínio adenosina glicosidase com forte atividade de inativação dos ribossomos de procariotos e eucariotos animais. Já a cadeia B permite a ligação dessas proteínas aos carboidratos da superfície das células (SCHROT; WENG; MELZIG, 2015). Já é bem conhecido a Ricina e a Abrina (Figura 2D) extraídas de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*, respectivamente como exemplos desse grupo.

Outra família representante de **lectinas** são as **relacionadas a jacalina** presentes em sementes de *Artocarpus integrifolia* (jaca), por isso o uso do nome. Baseado na especificidade por carboidratos, essas lectinas são classificadas em dois grupos: as ligantes a galactose e as ligantes a manose. Lectinas pertencentes a esse grupo (Figura 2E) são encontradas em espécies de *Moraceae* e *Convovulaceae* (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Outro representante de lectinas classificadas de acordo com a família não se assemelha com nenhuma outra proteína dos outros grupos, tanto para a sequência primária de aminoácidos como consequente estrutura tridimensional. São o grupo das **Lectinas de Amaranthaceae**. Seu representante principal é a Amarantina (Figura 1E), lectina extraída de *Amaranthus caudatus*. As lectinas extraídas de plantas desse gênero são todas ligantes a N-acetil-galactosamina (KAUR *et al.*, 2006; PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Por último temos as **Lectinas do floema de Cucurbitaceae** uma pequena família de lectinas ligantes a quitina que ocorrem no floema de algumas plantas da família *Cucurbitaceae*. Estruturalmente esse grupo contém lectinas diméricas compostas de duas subunidades idênticas de 24 kDa. Essas lectinas possuem grande similaridade sequencial entre si mas são muito diferentes de outras lectinas de plantas (LANOO; VAN DAMME, 2014; PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Até o momento não se tem estruturas resolvidas de lectinas de floema de *Cucurbitaceae*.

Figura 2 - Classificação das lectinas quanto a famílias.



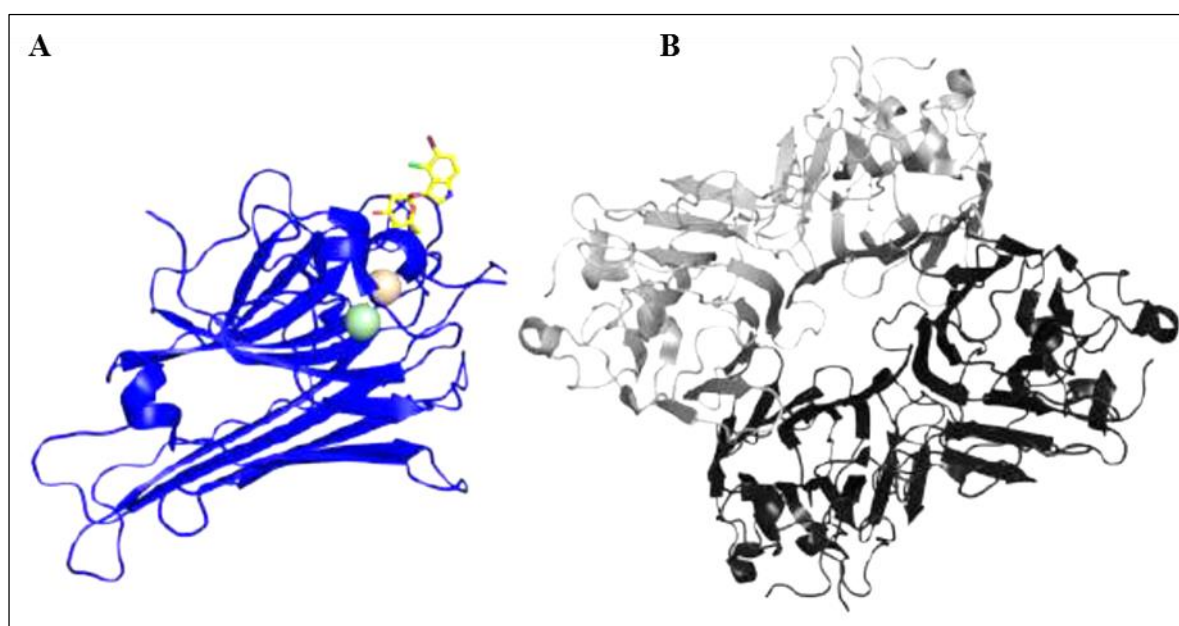
Fonte: Osterne (2016). Estrutura tridimensional de lectinas de cada grupo. A) CRL I (PDB 3A0K), B) Lectina manose-específica de *Gastrodia elata* (PDB 1XDG), C) WGA (2UVO), D) Abrina (PDB 2ZR1), E) Jacalina (PDB 1UGW), F) Amarantina (PDB 1JLY).

3.1.1 Lectinas de leguminosas

Dividida em três subfamílias distintas, sendo elas: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* e *Mimosoideae* as leguminosas representam o grupo de plantas com suas lectinas mais bem estudadas e reportadas na literatura. Dessas três a que mais é reportada com estudos de caracterização são as da subfamília *Papilionoideae*, em especial da tribo *Phaseolae* (PINTO-JUNIOR 2016).

Estruturalmente as lectinas de leguminosas são geralmente compostas por duas ou quatro subunidades, iguais ou diferentes, com massa molecular em torno de 27 kDa, compostas geralmente de uma cadeia polipeptídica simples com cerca de 250 aminoácidos. Essas cadeias geralmente podem unem-se formando dímeros, combinando-se e formando tetrameros mediados por ligações não covalentes como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Figura 3). Cada uma destas subunidades apresenta um único sítio de ligação a carboidratos, além de um ou mais sítio de ligação a íons metálicos, podendo ainda apresentar uma ou duas glicosilações (SHARON & LIS, 1989 *apud* DE SOUSA 2014).

Figura 3. Estrutura tridimensional da lectina recombinante de sementes de *Dioclea grandiflora* (DGL).



Fonte: DE SOUSA, 2014. (PDB ID 2JE9) (NAGANO et al., 2008). A – Estrutura monomérica da DGL (sanduíche β / motivo *jellyroll*) representada em cartoon (azul). Íons cálcio e manganês estão representados como esferas (bege e verde, respectivamente), enquanto o ligante xman (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -d-manose) está representado em sticks (amarelos). B – Estrutura tetramérica da DGL. Os dímeros canônicos estão diferencialmente representados em cinza e preto.

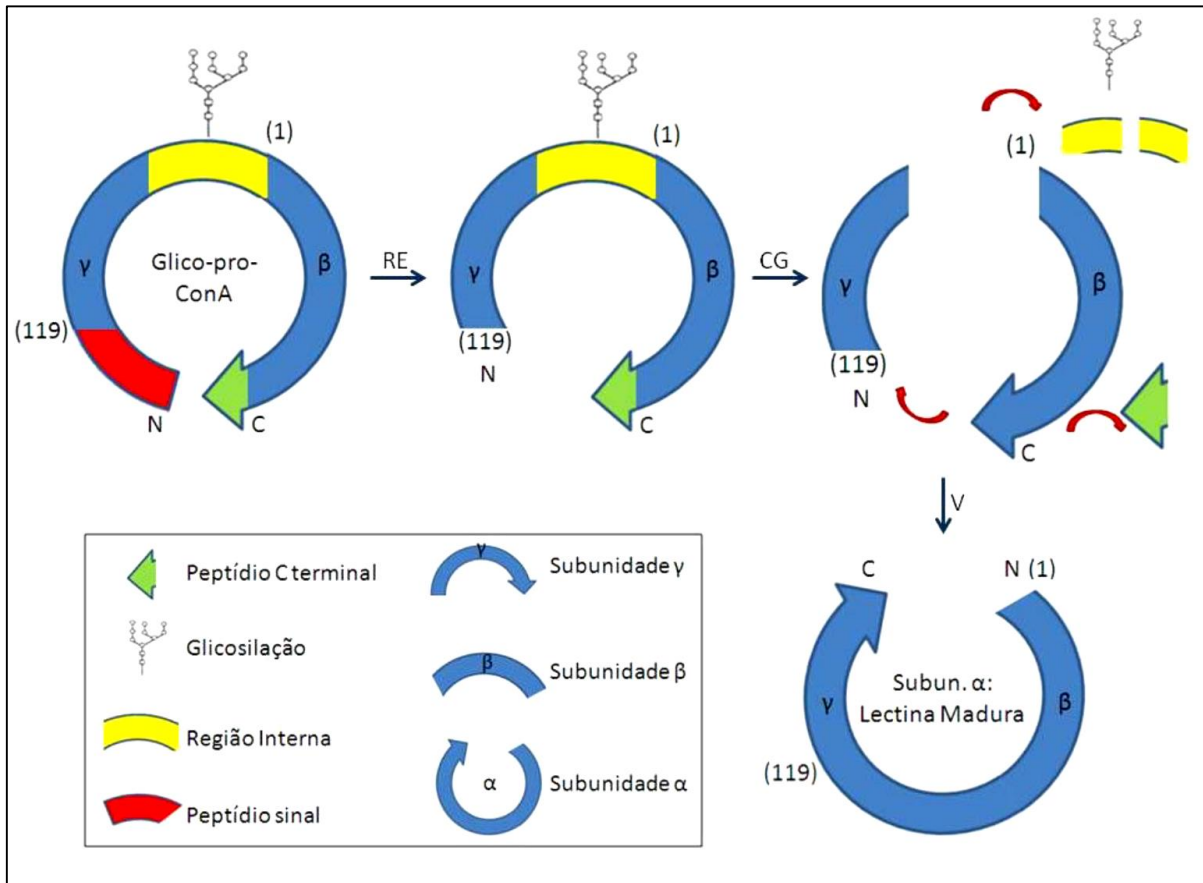
A estrutura tridimensional das lectinas de leguminosas são caracterizadas pela presença do motivo proteico “*jellyroll*”, também encontrado em outras proteínas e frequentemente associado ao processo de reconhecimento de carboidratos (KEITEL *et al.*, 1993; VARELA *et al.*, 1997).

Esse motivo possui uma folha β (anterior) parcialmente estendida de seis fitas e uma folha β curvada de sete fitas (posterior), antiparalelas e unidas entre si por alças de tamanhos variados, formando um sanduíche β (LORIS *et al.*, 1998), estabilizado pela presença de dois núcleos hidrofóbicos (BANERJEE *et al.*, 1996). A primeira observação deu-se pela estrutura da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), sendo a mais extensamente observada dentre as lectinas. Mesmo com alta similaridade entre as lectinas de leguminosas, pequenas alterações nas sequências de aminoácidos podem resultar em modificações relevantes na forma de associação entre os monômeros (SINHA *et al.*, 2007).

É bem relatado na literatura que algumas lectinas de leguminosas, como da subtribo *Diocleinae*, exibem uma oligomerização dependente de pH (CALVETE *et al.*, 1999; NAGANO *et al.*, 2008), o que pode influenciar diretamente nas atividades biológicas dessas lectinas, uma vez que essas proteínas são capazes de se ligar a receptores glicosilados presentes na superfície das membranas de forma mais eficiente na forma tetramérica (DELATORRE *et al.*, 2006).

Pode-se acrescentar ainda que as lectinas desse grupo, quando sintetizadas no retículo endoplasmático (RE), são produzidas na forma de pré-pro-lectinas, compostas por um peptídeo sinal (20 a 30 resíduos de aminoácidos) na região N-terminal, duas cadeias peptídicas (β e Υ), uma cadeia intermediária que será glicosilada no RE e um peptídeo sinal na região C-terminal. Após a clivagem do peptídeo sinal na região N-terminal, a pré-pro-proteína é reprocessada no Complexo de Golgi, onde uma endopeptidase é responsável pela remoção do peptídeo sinal na região C-terminal e da cadeia intermediária, tornando-se deglicosilada e funcionalmente ativa. As cadeias β e Υ são então religadas em uma posição invertida em relação ao precursor (Figura 4) (CARRINGTON *et al.*, 1985 *apud* DA SILVA, 2015).

Figura 4. Mecanismo representativo da Biossínese de Concanavalina A (ConA).



Fonte: DA SILVA, 2015. Adaptado de CARRINGTON, 1985. Sumário dos eventos de processamento convertendo a proconcanavalina A glicosilada (pré-pro-conA) em lectina madura. Extremidades amino e carboxi terminal da lectina madura estão indicados por N e C, respectivamente, e o número em parênteses refere-se a resíduos da concanavalina A madura. Durante o processamento na planta, a pro-proteína glicosilada inativa é deglicosilada resultando no surgimento da atividade de ligação a carboidrato. A ação de uma endopeptidase que cliva o nonapeptídeo carboxiterminal e o espaçador da deglicosilação está mostrado em verde e amarelo, respectivamente. Resíduos 118 e 119 são ligados enzimaticamente. Splicing então resulta em uma transposição do arranjo linear dos domínios protéicos γ e β . RE: retículo endoplasmático, CG: complexo de golgi, V: vacúolo.

3.1.2 Lectinas da tribo Dalbergieae

A tribo *Dalbergieae*, pertencente à família *Leguminosae* (Fabaceae), subfamília *Papilionoideae*, compreende 48 gêneros e 1.200 espécies aproximadamente. Esta subfamília recentemente foi reorganizada em diversos clados de acordo com os estudos de filogenia molecular, sendo a tribo *Dalbergieae* correspondente a um clado monofilético denominado de Dalbergióide, no qual foram incluídos alguns gêneros, como *Arachis*, *Adesmia* e *Aeschynomene* (BRUNEAU *et al.*, 2013; CARDOSO *et al.*, 2013; LAVIN *et al.*, 2001 *apud* DA SILVA, 2017).

As espécies pertencentes ao clado Dalbergióide têm nódulos radiculares do tipo aeschynomenóides como principal característica (BRUNEAU *et al.*, 2013), que são ausentes em espécies do gênero *Andira* e *Vatairea*, permitindo a reorganização destas em clados

externos, como sugerido por CARDOSO e colaboradores (2013). Entretanto, a relação entre estes gêneros ainda permanece obscura em estudos de filogenia molecular (BRUNEAU *et al.*, 2013), levando diversos autores a considerarem os gêneros *Andira* e *Vatairea* ainda como pertencentes a tribo *Dalbergieae*.

Quanto as lectinas, é reportado na literatura 16 proteínas pertencentes a esta tribo, sendo a maioria membros da subfamília *Papilionoideae* (MANN *et al.*, 2001). Os resultados até então obtidos para a tribo *Dalbergieae* sugerem a existência de pelo menos dois grupos de lectinas, que podem ser categorizados de acordo com suas diferentes especificidades: Primeiro, especificidade com glicose/manose (maioria), constituídas por uma única cadeia polipeptídica, contendo um único sítio de glicosilação e um peptídeo sinal, sem evidente existência de processamento pós-traducional; segundo, compartilham características de especificidade por galactose e seus derivados, como é o caso do gênero *Vatairea*, constituídas pelo menos de três cadeias polipeptídicas (α , β e γ) e dois sítios de glicosilação (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Além das lectinas do gênero *Vatairea*, uma lectina obtida da espécie *Arachis hypogaeae* (LOTAN *et al.*, 1975) pode também ser inserida nesse grupo, embora apresente características diferenciadas, como a presença de apenas duas cadeias polipeptídicas (α e β) e um processamento pós-traducional semelhante a lectina convanavalina A, como demonstrado por YOUNG e colaboradores (1991).

Lectinas de exemplares da tribo *Dalbergieae* foram purificadas e caracterizadas quanto a sua especificidade e atividades biológicas. A Tabela 1 está atualizada conforme Da Silva (2017) e Almeida (2016).

Tabela 1. Lectinas da tribo *Dalbergieae*.

Espécie	Especificidade	Referência
<i>Andira fraxinifolia</i>	Man/Glc	RANGEL <i>et al.</i> , 2009
<i>Andira Pisonis</i>	Man/Glc	LÓSSIO <i>et al.</i> , 2014
<i>Andira surinamensis</i>	Man/Glc	NOBRE, 2012
<i>Andira anthelmia</i>	Man/Glc	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2015
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Gal	LOTAN <i>et al.</i> , 1975
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Alpha MM	SINGH; DAS, 1994
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Lac/ Celo	SINGH; DAS, 1994
<i>Centrolobium microchaete</i>	Man/Glc	VASCONCELOS, 2015
<i>Centrolobium tomentosum</i>	Man/Glc	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2014
<i>Lonchocarpus araripensis</i>	GlcNac	PIRES <i>et al.</i> , 2008
<i>Lonchocarpus capassa</i>	Gal/GalNac	JOUBERT <i>et al.</i> , 1986
<i>Lonchocarpus. Sericeus</i>	GlcNac	ALENCAR <i>et al.</i> , 1999
<i>Machaerium acutifolium</i>	GlcNac	BEZERRA <i>et al.</i> , 2003
<i>Platymiscium floribundum</i>	Man/Glc	PEREIRA-JÚNIOR <i>et al.</i> , 2012
<i>Platypodium elegans</i> Vogel	Man/Glc	BENEVIDES <i>et al.</i> , 2012
<i>Pterocarpus angolensis</i>	Man/Glc	LORIS <i>et al.</i> , 2003
<i>Pterocarpus rotundifolius</i>	Man/Glc	MARONDEDZE <i>et al.</i> , 2004
<i>Vatairea guianensis</i> Aubl	Gal/GalNac	SILVA <i>et al.</i> , 2012
<i>Vatairea macrocarpa</i> (Bent.) Ducke	Gal/GalNac	CAVADA <i>et al.</i> , 1998

Fonte: Elaborado pelo autor. Man: manose; Glc: glicose; Gal: galactose; Alfa MM: Alfa Metil Manosídeo; Lac: Lactose; Celo: Celobiose; GlcNac: N-acetilglicosamino; GalNac: N-acetilgalactosamino.

Apesar da tribo *Dalbergieae* apresentar um número considerável de lectinas caracterizadas, apenas quatro lectinas apresentam estruturas tridimensionais determinadas: a lectina de *Pterocarpus angolensis* (PAL), *Platypodium elegans* recombinante (PELa) (BENEVIDES *et al.*, 2012; LORIS *et al.*, 2003) e a lectina de *Centrolobium tomentosum* (CTL), todas manose/glicose específicas; e a lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML), específica à galactose e seus derivados (SOUSA *et al.*, 2015).

Estudos relatam as lectinas do gênero *Arachis*, como as primeiras relatadas na literatura para a tribo *Dalbergieae*. Na espécie *Arachis hypogaea* é possível isolar uma lectina das sementes específica a galactose e seus derivados (PNA) (LOTAN *et al.*, 1975) com grande potencial biotecnológico. Ensaio de inibição com a lectina PNA nativa, bem como com o seu precursor expresso em *Escherichia coli*, demonstraram a maior afinidade desta

lectina pelo dissacarídeo Gal(β 1-3) GalNAc, principal constituinte dos antígenos T e Tn (LOTAN *et al.*, 1975; RODRIGUEZ-ARANGO *et al.*, 1992).

Os antígenos T/Tn estão principalmente presentes na superfície de células tumorais malignas e timócitos imaturos (SHARMA; VIJAYAN; SUROLIA, 1996), o que torna a PNA uma potencial ferramenta utilizada como marcador para a histoquímica do câncer (SOUSA *et al.*, 2015), como demonstrado pela sua atual comercialização em complexação com diferentes corantes por diferentes empresas (GeneTex©; Sigma-Aldrich©; Vector Laboratories©).

Estudos apontam uma lectina de *Lonchocarpus sericeus* (LSL), capaz de diminuir a resposta inflamatória e a colonização bacteriana em um quadro de peritonite infecciosa em ratos (ALENCAR *et al.*, 2005), além da diminuição da migração leucocitária e hipernocicepção mecânica (NAPIMOGA *et al.*, 2007). Outra lectina deste gênero, *Lonchocarpus araripensis* (LAL), demonstrou possuir ação antinociceptiva em camundongos (AMORIM, 2016), atividade anti-inflamatória em modelos de edema de pata e peritonite em ratos (PIRES *et al.*, 2008).

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

No gênero *Vatairea*, a lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) têm demonstrado, em alguns trabalhos, os diferentes efeitos biológicos causados: indução de infiltração de leucócitos em edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2007), liberação de mediadores quimiotáticos por macrófagos (ALENCAR *et al.*, 2007), aumento da resistência vascular renal, filtração glomerular e fluxo urinário (MARTINS *et al.*, 2005), migração de neutrófilos *in vivo* (ALENCAR *et al.*, 2007) e indução de comportamento tipo depressivo, aumentando a expressão de proteínas relacionadas à inflamação e reatividade glial (GONÇALVES, 2013). Além disso, VML se destaca devido a sua notável capacidade de reconhecer antígenos Tn (DAM *et al.*, 2007), demonstrada através da resolução de sua estrutura tridimensional em complexação com este ligante (SOUSA *et al.*, 2015 *apud* DA SILVA, 2017) o que evidencia mais estudos com espécies desse mesmo gênero para efeito comparativo e produção de fármacos com potencial biotecnológico.

3.1.3 Lectinas de sementes de *Vatairea guianensis* Aublet (VGL)

A espécie *Vatairea guianensis* Aublet (Figura 5) é nativa da região amazônica, conhecida como faveira, fava de empigem, faveira de empigem, fava bolacha, fava mutum, faveiro e angelim do igapó. É uma árvore que mede em torno de 8 a 25 metros de altura, comum em áreas de florestas sazonalmente inundáveis, raramente encontrada em terra firme e com frutificação geralmente no período de junho (SILVA, 2011).

Figura 5. Partes da *Vatairea guianensis*: flores, ramos e fruto.



Fonte: *La Chaussette Rouge*, (2017) e TRAMIL (2017). A: Flores, folhas e ramos; B: Frutos secos e C: Ramos com frutos.

FILOGENIA:

Família *Leguminosae* (Fabaceae)

Subfamília *Papilionoideae*

Tribo *Dalbergieae* DC.

Gênero *Vatairea*

Espécie *Vatairea guianensis* Aublet.

O conhecimento etnofarmacológico relata que o suco do fruto (Figura 5B), assim como a infusão das cascas do caule e raiz são utilizados, pela medicina tradicional, para curar empigem e outras dermatoses no Brasil, Venezuela e Guiana Francesa. Já conhecido em

regiões do médio e baixo Amazonas que populações dessa região usam a semente contra diversos tipos de micoses superficiais (DA SILVA, 2013).

Estudos fitoquímicos relatam a presença de classes bioativas no extrato etanólico das sementes de *V. guianensis*: tanino, antocianinas, antocianidinas, flavanóides, xantonas, esteroides, triterpenóides, saponinas e quinonas (FERREIRA, SANTOS e VIANA, 2004).

Quanto a presença de lectina em sementes de *Vatairea guianensis*, o primeiro estudo relata sua especificidade por D-galactose e derivados; nomeada de (VGL), é uma glicoproteína capaz de reconhecer glicoconjugados da superfície de diferentes linhagens de células cancerígenas do cólon humano (ISÍDRIO, 2002).

Estudos mais recente relatam a sua especificidade a galactose/N-Acetil-galactosamina, sendo diferenciada de acordo com seu perfil eletroforético em uma proteína composta por uma dupla banda de 30-32 kDa, denominada de cadeia α , e duas bandas menores de 18 e 15 kDa respectivamente correspondentes a cadeia β e γ (SILVA *et al.*, 2012). Estudos com a VGL demonstraram a capacidade desta lectina em induzir a inflamação de maneira aguda em ensaios de edema de pata e peritonite, associada à elevação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, sua potencial atividade neuroprotetora frente a neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro* em hipocampus de ratos (JACQUES, 2012), bem como seu efeito relaxante *in vitro* em aortas endotelizadas de ratos, envolvendo a participação do óxido nítrico e do sítio de reconhecimento a carboidratos da lectina (SILVA *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Purificação da Lectina (VGL) de sementes de *Vatairea guianensis* Aublet

O processo de purificação procedeu-se de acordo com a metodologia de Silva *et al.* (2012). As sementes maduras de *V. guianensis* (coletadas em Manaus, Amazonas-Brasil) foram trituradas em moinho de café até a obtenção de um pó fino. As proteínas solúveis foram extraídas em tampão glicina-HCl 100 mM, pH 2,6, contendo 150 mM de NaCl (1:10 p/v) à temperatura ambiente sob agitação contínua durante 4 horas. Posteriormente o extrato foi centrifugado a 10 000 x *g* durante 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio para obtenção da fração 0-60%. Após 12 horas de contato em repouso, a suspensão foi centrifugada. O precipitado foi ressuspenso e dislisado contra NaCl 150 mM. A fração foi submetida a cromatografia de afinidade em matriz de goma de guar previamente equilibrada com NaCl 150 mM. Após a remoção do material não retido (P1) com a mesma solução de equilíbrio, a lectina foi eluída com 100 mM de D-galactose (P2). A cromatografia foi realizada com fluxo de 1 mL/min e frações de 3 mL foram coletadas. A eluição foi monitorada por espectrofotometria em comprimento de onda de 280. O P2, que corresponde a lectina purificada (VGL) foi dialisado contra água destilada, liofilizado e armazenado em frascos hermeticamente fechados.

4.2 Avaliação da atividade inflamatória em modelo de edema de pata

Para avaliação do efeito inflatório, a VGL foi administrada nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/kg em ratos Wistar (150 e 200 g) por administração subcutânea (s.c.). Os controles receberam solução salina estéril (0,1 mL/100 g de massa corporal). Todos os procedimentos experimentais foram realizados conforme os princípios éticos e legais aprovados pelo Comitê de Ética para uso de animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA No. 10130208-8 / 40).

O edema da pata foi medido em hidropletismômetro imediatamente antes da injeção da lectina (tempo zero) e de 0,5 a 72 horas depois. Sendo expresso como a diferença entre o volume deslocado pelas patas imediatamente antes da indução (tempo zero) e nos tempos de 30 min-24 h após o estímulo e expresso em mL ou área sob a curva (ASC) pelo método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995).

A participação de mediadores inflamatórios no efeito da lectina foi avaliado tratando os animais com os seguintes medicamentos farmacológicos Inibidores: óxido nítrico sintase (N-Nitro-L-arginina Éster metílico / L-NAME; 25 mg / kg; Intravenosa), ciclooxigenase (Indometacina, 5 mg/kg, subcutâneo) e interleucina-1 β (Talidomida, 45

mg/kg, intraperitoneal) 30 minutos antes da administração da VGL (1 mg/Kg; s.c.) (FEITOSA *et al.*, 2002).

A participação do domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina (CRD) foi avaliada pela injeção da dose mais ativa da VGL (1 mg/kg) após incubação (30 min/37 °C) com açúcar Galactose (0,1 M). A galactose foi individualmente incubada nas mesmas condições que o controle.

4.2.1 Análise histológica

Para averiguação das alterações fisiológicas e/ou celulares, os tecidos da pata foram removidos 6 horas após a administração de VGL (1 mg/kg), fixados com 10% de formalina tamponada durante 24 horas, incorporados em parafina, cortados em fatias de 5 µm de espessura, corados com hematoxilina & eosina (HE) e analisada por microscopia óptica acoplado com Sistemas de aquisição de imagem (*ScopePhoto; Image Manager 50*).

A intensidade da inflamação do tecido foi classificada de acordo com a seguinte pontuação: 0. Tecido normal (sem alteração distinta, 0%), ausência de infiltrado inflamatório; 1. Mudanças discretas nos tecidos (início de mudanças, até 30%), ligeiro infiltrado inflamatório; 2. Mudança moderada do tecido (alterações em partes, 31 e 60%), inflamação moderada infiltrar; e 3. Mudanças no severa no tecido (mudanças generalizadas, 61 e 100%), infiltrado inflamatório severo.

4.2.2 Imunohistoquímica

Quanto ao teste imunohistoquímico, fragmentos do tecido da pata foram seccionados numa espessura de 3 µm e colocados em lâminas silanizadas e processados conforme descrito no seguinte protocolo: as amostras foram desparafinadas, sujeitas para reidratação e recuperação do antígeno usando tampão citrato (pH 6,0), incubada (10 min; r.t.) com 6% de H₂O₂ e metanol (1:1) e lavados com tampão TRIS pH 7.6 para inativação dos peroxidases endógenas. As amostras foram re-incubadas durante 1 hora (temperatura ambiente) com o anticorpo primário (Ab) contra IL-1β (monoclonal; Abcam "AB9787"; 1: 100), lavou-se e incubou-se novamente (30 min; r.T.) com Imunoglobulina biotinizada (Ig; DAKO E0468) e estreptavidina (DAKO P0397). O cromógeno de diaminobenzidina (DAKO K3469) foi aplicado durante 10 minutos, e a hematoxilina de Mayer foi utilizada para contra-coloração. As amostras foram desidratadas (etanol e xileno) e coberto com um suporte de suporte permanente. Seções paralelas foram tratados com IgG de controle em vez do anticorpo primário.

Para avaliação imunohistoquímica semi-quantitativa, seções foram selecionados aleatoriamente em 5 campos (aumento de 400x) em áreas de maior concentração de células imunomarcadas localizadas em tecido conectivo ou epitelial. A porcentagem de células com expressão citoplasmática ou nuclear foi classificada da seguinte forma: (0) ausência de células positivas; (1 - leve) 1-33% de células positivas; (2 - moderado) 34-66% de células positivas; (3 intensas) 67-100% de células positivas (adaptadas de CHAUDHARY *et al.*, 2012).

4.2.3 Análise estatística

Para a avaliação dos dados *in vivo* foram apresentados como média \pm SEM, determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados histopatológicos e imunohistoquímicos foram expressos como mediana (máximo e mínimo) e analisados pelo teste de Mann-Whitney.

4.3 Determinação do *template* e predição da estrutura secundária da VGL

A sequência VGL foi obtida do *Universal Protein Resource* (Uniprot) (ID: P86893). O modelo para homologia foi obtido sob comparação utilizando a ferramenta BLASTp com banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) e parâmetros padrões. As proteínas mais similares com VGL foram escolhidos e classificados com base na sua resolução e parâmetros geométricos. A predição da estrutura secundária foi realizada usando servidor PsiPro, um sistema automatizado para a previsão da estrutura secundária (BUCHAN *et al.*, 2013). A estrutura secundária foi aplicada como um dos fatores de validação para a seleção do modelo de homologia.

4.4 Homologia, modelagem e validação da VGL

A estrutura 3D de VML complexada com o antígeno Tn (PDB ID: 4U36) foi obtida do PDB como a estrutura modelo. O modelo de homologia de VGL foi construído utilizando o software MODELLER v.9.16 (WEBB, SALI, 2016). As estruturas da VGL e VML foram alinhadas usando o módulo *salign*, seguido por otimização manual. Inicialmente, foram gerados cem modelos que foram classificados com base na função de pontuação objetiva do Modeller (Molpdf) e *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE). Vários modelos com menor *molpdf* e DOPE foram selecionados e submetidos à validação de propriedades estereoquímicas como diagrama de Ramachandran, sobreposições estéricas, parâmetros de desvio do carbono beta, rotâmeros e desvios dos ângulos de ligação usando a ferramenta PROCHECK (LASKOWSKI, 1993). A aceitabilidade da cadeia lateral foi obtida pelo

servidor Verify3D (LUTHY, BOWIE e EISENBERG, 1992). QMEAN e os escores-Z também foram avaliados pela ferramenta *Protein Structure and Assessment* (BENKERT, BIASINI e SCHWEDE, 2011; BENKERT, TOSATTO e SCOMBURG, 2008). O modelo com os melhores valores em todas as validações foi selecionado e aplicado nas análises subsequentes. Os desenhos moleculares foram preparados com *PyMol* (Shrodinger, LLC).

4.5 Docking Molecular da VGL

O acoplamento ou *docking* molecular foi utilizado para verificar a capacidade de interação da VGL com vários açúcares (*N*-acetyl-D-galactosamine, α -methyl-D-galactoside, α -D-galactose, α -Lactose, α -D-glucose, *N*-acetyl-D-glucosamine, *N*-acetyl-D-mannosamine, α -methyl-D-glucoside, Sucrose, α -methyl-D-mannoside, α -D-mannose e α -L-fucose). As estruturas minimizadas dos sacarídeos foram baixadas do banco de dados PubChem. Simulações foram realizadas pelo software CLC Drug Discovery Workbench (CLC Bio; Boston, MA, EUA), um software que usa um modo de precisão padrão para determinar a ligação favorável. A localização do CRD da VGL foi obtida por superposição com VML.

Como parâmetros de *docking*, o raio de ligação ajustado para 10 Å³ em torno do CRD de VGL e o número de iterações definido para 5000. O algoritmo PLANTSPLP foi aplicado para calcular o escore de ancoragem (KORB, STUTZLE e EXNER, 2009), de modo que valores mais negativos indicam uma interação mais forte e as melhores posições para cada ligante foram selecionados com base em ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. LIGPLUS (WALLACE, LASKOWSKI e THORNTON, 1995) e PyMol foram aplicados para gerar diagramas de interação 2D e representações moleculares, respectivamente. O resultado para a interação com o GalNAc foi comparado com o da estrutura cristalográfica de VML (PDB ID: 4U2A).

4.6 Docking de *N*- e *O*-glicanos com VGL

A estrutura VGL também foi submetida a *docking* molecular com vários *N* e *O*-glicanos comumente encontrados em glicoproteínas. As estruturas dos glicanos foram obtidas de vários trabalhos científicos (BROCKHAUSEN, SCHACHTER e STANLEY, 2009; PARKER *et al.*, 2013) e construído com a ferramenta de criação de carboidratos Glycam-Web (GLYCAN-WEB, 2017) onde todos os glicanos foram submetidos a minimizações de energia usando o AMBER 12 (CASE *et al.*, 2012) com o campo de força GLYCAM_06j-1 (KIRSCHNER, 2008) via Glycam-Web incorporado em módulos. Ausência de ligação de hidrogênio e suas correções foram realizadas pelo módulo de preparação de ligantes do software Hermes V.1.8.2. As simulações de *docking* foram realizadas com o GOLD v. 5.5

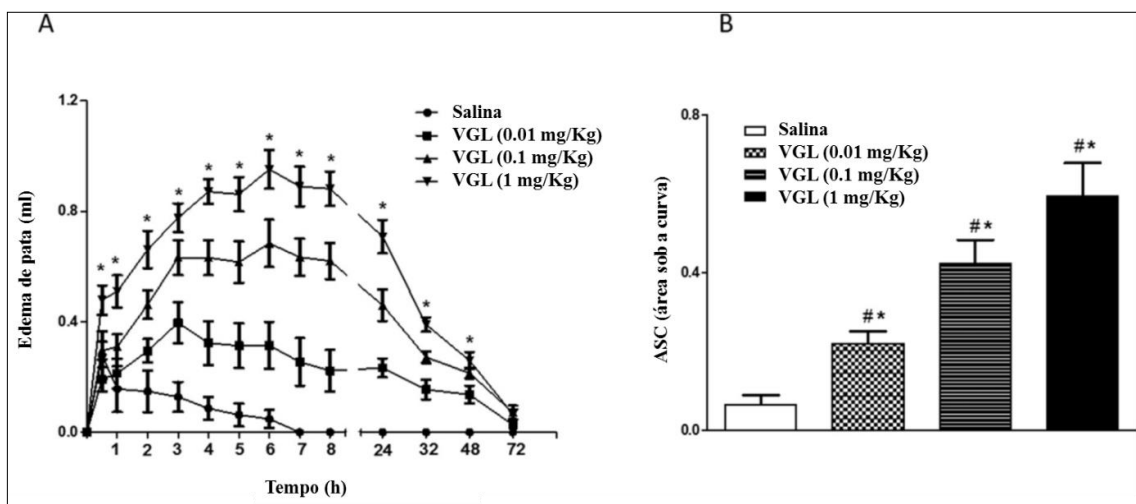
(CCDC, Cambridge, Inglaterra), que implementa um algoritmo genérico para encaixar ligantes nos sítios de ligação das proteínas explorando uma grande variedade de ligantes com flexibilidade parcial da proteína (JONES *et al.*, 1997). VGL foi preparada para a simulação através da remoção de moléculas de solvente e ligantes. O sítio de ligação foi definido no centro do domínio de reconhecimento de carboidratos e todos os átomos compreendendo 12 Å de raio. Os parâmetros de docking foram: tamanho da população 100, pressão de seleção de 1.1, número de operações de 10.000, número de ilhas de 5, tamanho de nicho de 2 e frequência de cruzamento de 95. Para todos os ligantes, foram geradas 20 poses e filtradas pelo ponto de ancoragem, geometria do oligossacarídeo, ligações de hidrogênio e coerência das interações hidrofóbicas. Foi realizada a validação comparando interações da VGL-Galactose com complexo e remoção de poses com estirões geométricos sérios. PLANTSPLP foi escolhido como função de pontuação (KORB, STUTZLE e EXNER, 2009) e VGL-Galactose A pontuação foi usada como comparação. Todas as outras opções foram programa padrão. As figuras complexas de VGL-glicanos foram geradas em PyMol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade inflamatória em modelo de edema de pata

Os resultados da atividade inflamatória de VGL em modelo de edema de pata em ratos mostraram efeito dose dependente durante 48 horas (Figura 6A) nas concentrações de 0,01 mg/Kg ($0,21 \pm 0,03$ ASC); 0,1 mg / Kg ($0,42 \pm 0,06$ ASC) e 1 mg/Kg ($0,59 \pm 0,08$ ASC) em comparação com a solução salina ($0,06 \pm 0,02$ ASC) (Figura 6B). Entre 4 e 8 horas, VGL mostrou máxima eficácia, iniciando o efeito edematogênico 30 minutos após a administração na dose de 1 mg/Kg. Nessa mesma concentração, a lectina induziu infiltrado polimorfonuclear ao longo do tempo, acentuando-se às 6 horas [VGL: mediana 3 (3,3) *; $P \frac{1}{4} 0,0022$ vs. solução salina: mediana 0 (0,1)] (Figura 7).

Figura 6. Indução do edema de pata por VGL. A) Curso temporal e B) Área sob a curva.

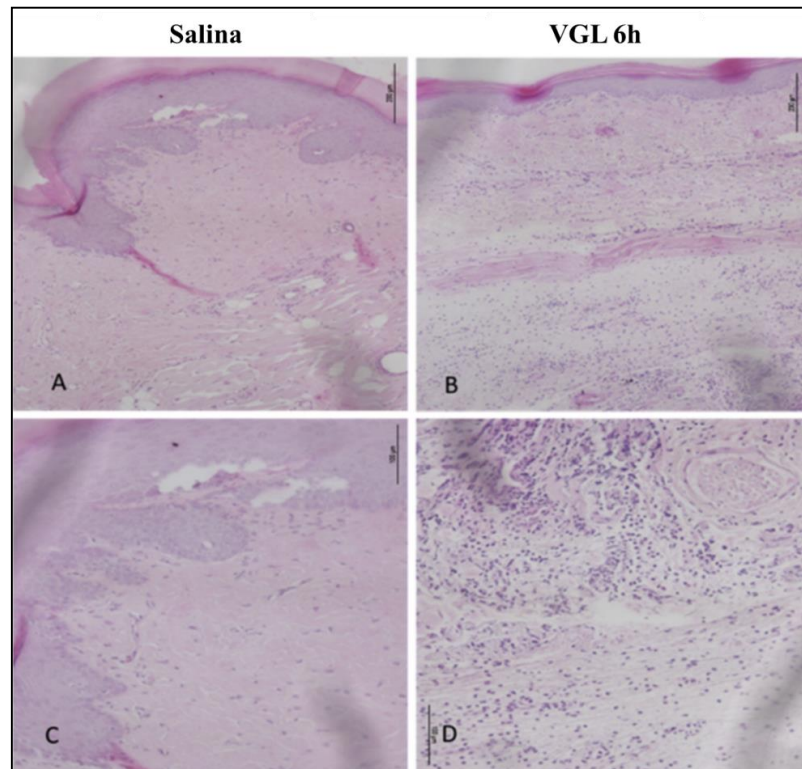


Fonte: Marques *et al.*, 2017. Médias \pm S.E.M. (n = 5 – 6). *p < 0.05 comparado com a salina. #p < 0.05 comparados entre as doses.

Estes resultados corroboram com o processo inflamatório agudo elicitado pela lectina extraída de sementes do mesmo gênero, *Vatairea macrocarpa* (VML), uma proteína homóloga que provocou efeito edematogênico agudo acompanhado de infiltração de leucócitos (ALENCAR *et al.*, 2004). O tratamento prévio dos animais com inibidores e mediadores inflamatórios (Figura 8) indicaram a participação de prostaglandinas visto que a aplicação da indometacina (inibidor da enzima COX que catalisa a síntese de prostaglandinas) reduziu por 37% o efeito edematogênico. Em contrapartida a aplicação do L-NAME (Inibidor da enzima NOS que catalisa a síntese da NO) não foi capaz de alterar o efeito edematogênico da lectina, apesar do importante efeito vasodilatador do NO. Esses dados contradizem o efeito vasodilatador de VGL nos experimentos realizados *in vitro*, a qual se mostrou dependente de NO para seu efeito vasorelaxante (SILVA *et al.*, 2012). No entanto, isso pode ser explicado

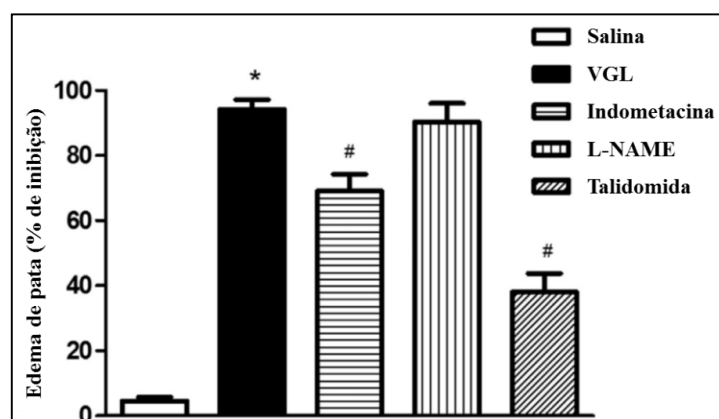
pelas diferentes isoformas de NOS expressas nos vasos não inflamados (NOS endoteliais) e vasos inflamados da pata (NOS induzíveis) (SALVEMINI *et al.*, 1996). Já a talidomida inibiu o edema em 62%, corroborando com os resultados obtidos pela imunocoloração de IL-1 β , revelada às 6 horas nos tecidos epiteliais e conectivos: epitélio [solução salina: 2 (1,2) vs. VGL: 3 (2,3) *]; tecido conjuntivo [Solução salina: 0 (0,1) vs. VGL: 3 (2,3) *] (Figura 9).

Figura 7. Infiltrado de leucócitos polimorfonucleares induzidos por VGL. (A e C) salina, (B e D) VGL.



Fonte: Marques *et al.*, 2017. VGL (1 mg/kg, s.c.) e solução salina injetados intraplantar. Análise histológica realizada às 6 horas após inoculação de VGL.

Figura 8. Efeito dos diferentes inibidores/mediadores inflamatórios na atividade inflamatória de VGL.

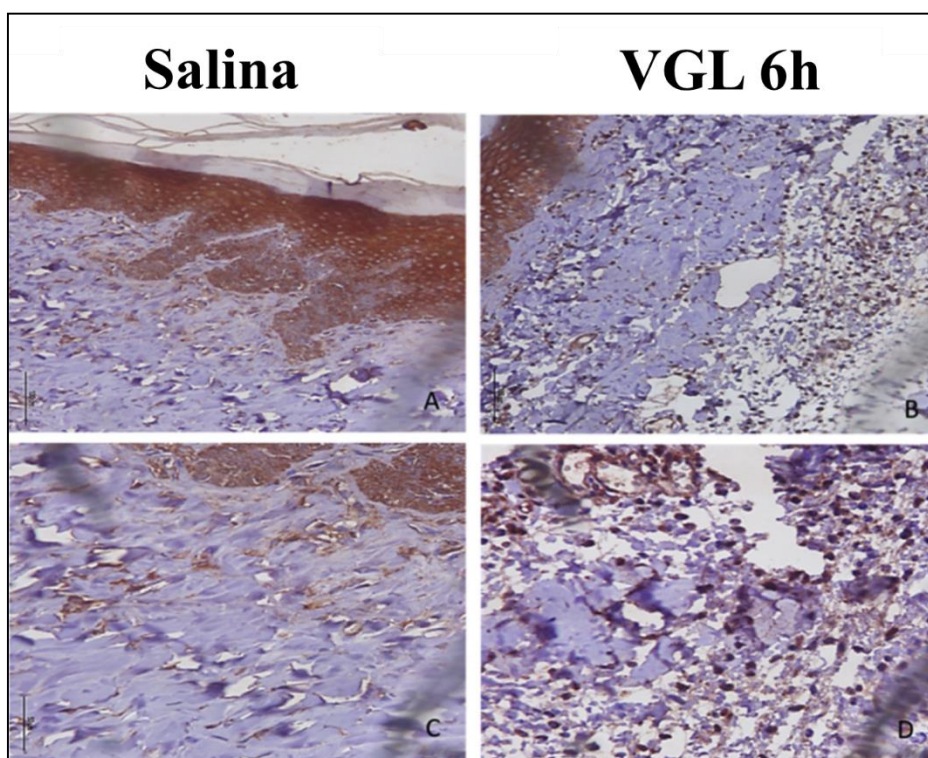


Fonte: Marques *et al.*, 2017. VGL (1 mg/kg; s.c.). Indomethacin (5 mg/kg, s.c.). L-NAME (30 mg/kg; i.v.). Talidomida (45 mg/kg; i.p.). *p < 0.05 comparado coma salina. #p < 0.05 comparado com VGL.

Esses dados estão de acordo com a função das prostaglandinas e IL-1 β , ambos mediadores da inflamação aguda, que induzem a vasodilatação e conseqüentemente dano tecidual (JONES *et al.*, 1997). Foi observado o mesmo efeito com a VML em inflamação aguda com a participação de prostaglandinas e interleucinas (ALENCAR *et al.*, 2004).

Quanto a participação do Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (CRD) no efeito inflamatório, a literatura mostra que lectinas de leguminosas isoladas das tribos *Phaseoleae* (BROCKHAUSEN, SCHACHTER e STANLEY, 2009; PARKER *et al.*, 2013) e *Dalbergieae* (ALENCAR *et al.*, 1999; PIRES *et al.*, 2016 e ALENCAR *et al.*, 2004), têm demonstrado inibição parcial ou total da atividade da lectina quando aplicada juntamente com o açúcar após incubação (ASSREUY *et al.*, 1997) como discutido mais adiante.

Figura 9. Teste imunohistoquímico para averiguar a presença de IL-1 β induzida por VGL.



Fonte: Marques *et al.*, 2017. VGL (1 mg/kg; s.c.). Solução salina foi injetada intraplantar. Teste imunohistoquímico de IL-1 β do tecido conjuntivo coletado às 6 horas após a aplicação de VGL.

5.2 Determinação do *template* e predição da estrutura secundária da VGL

A comparação da sequência por meio da ferramenta BLAST demonstrou que VGL possui 93% de identidade com sequência da VML (4U36), por isso VML foi escolhida como modelo para os testes de modelagem por homologia usando o MODELLER 9.16. A predição da estrutura secundária resultou em uma prevalência de estruturas de folhas- β e *loops* com ausência de α -hélices. Este resultado está de acordo com dados previamente relatados na literatura para outras lectinas (Figura 10).

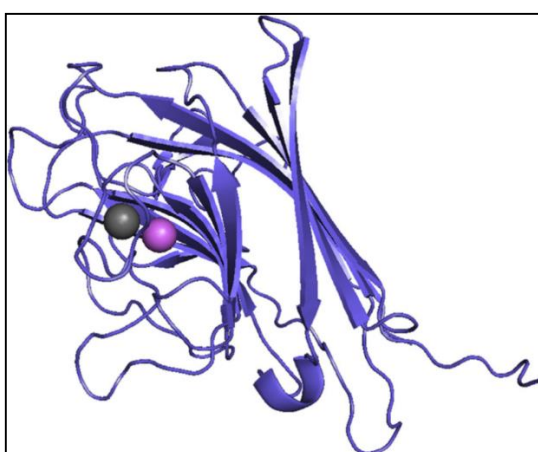
5.3 Homologia, modelagem e validação da VGL

As análises das ferramentas PROCHECK e Verify3D demonstraram que o modelo da VGL estava comparável com uma estrutura cristalográfica e, desse modo, adequada para os testes subsequentes. O monômero de VGL consistiu de um motivo β -sanduíche (*jellyroll*), possuindo uma folha β (anterior) parcialmente estendida com seis fitas e uma folha β (posterior) curvada de sete fitas, antiparalelas e unidas entre si por alças de tamanhos variados, característico de uma lectina de leguminosa. O monômero apresenta ainda um único CRD estabilizado por dois cátions divalentes, cálcio e manganês, ambos os presentes no sítio de ligação a metal (MBS) próximo ao CRD.

A oligomerização tetramérica de VGL foi experimentalmente determinada por Silva *et al.* (2012). O tetrâmero é composto de dois dímeros dispostos de forma oposta formando uma grande cavidade central que é, por sua vez, formado por interações entre os *loops* mais externos das seis folhas- β de cada monômero, gerando uma interface canônica. Outras lectinas, como VLLB4, PHA e SBA, também apresentam este tipo de oligomerização (BRINDA, SUROLIA e VISHVESHWARA, 2005).

Semelhantemente a VML, o CRD e o MBS são conservados em VGL. O CRD é uma região exposta a superfície proteica formada por quatro *loops*, enquanto que o MBS tem o íon cálcio coordenado por Phe127, Asp125, Asp132, e o íon manganês por Glu123, Asp125, Asp132 e His137.

Figura 10. Estrutura geral do monômero de VGL.



Fonte: Marques *et al.*, 2017. As esferas representam íon cálcio (em cinza) e íon manganês (em roxo).

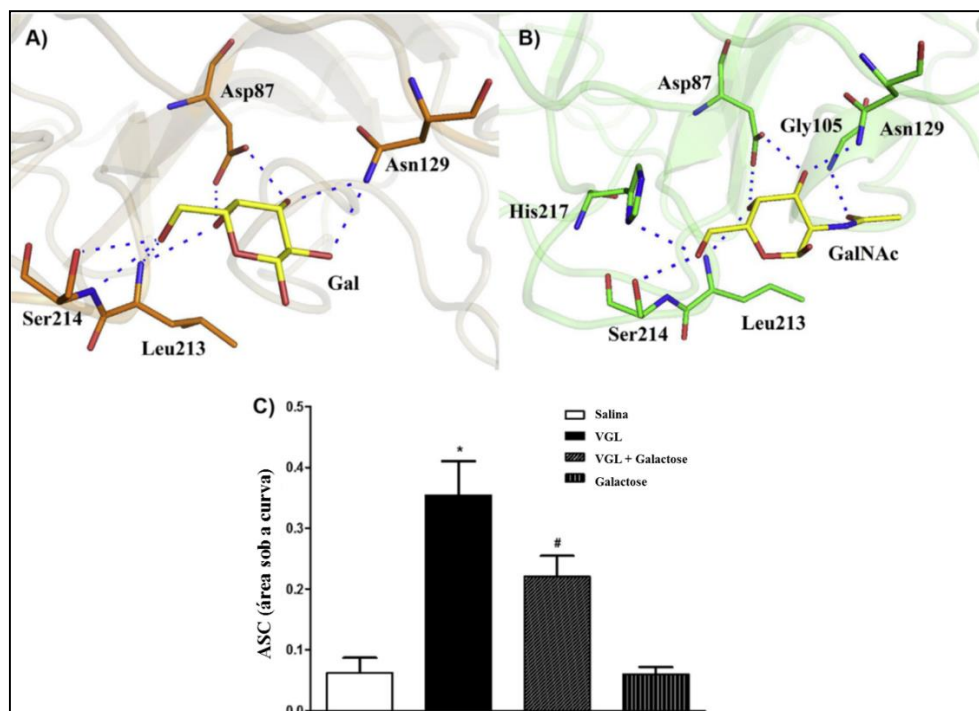
5.4 Docking Molecular da VGL

Em relação ao docking molecular, verificou-se interações favoráveis de VGL com GalNAc (-50.11), Gal (-42.80), α -metil-D-galactosídeo (-43.11) e α -Lactose (-43.45)

confirmando os ensaios de inibição por açúcar realizados por Silva *et al.* (2012). As comparações experimentais e as pontuações dos dados são mostrados na Tabela 2. Assim como em outras lectinas, a ligação com açúcares é mediada por forças de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio.

As interações estabelecidas entre o modelo da VGL e a galactose (Figura 11A) mostra que o açúcar foi estabilizado por pontes de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos Asn87, Asn129, Leu213 e Ser214 com os átomos de oxigênio O2, O3, O4 e O6 do carboidrato e por interações hidrofóbicas com os resíduos Gly104, Phe127, Gly212 e His217 estabilizando o resíduo de galactose no CRD. Já a *N*-acetil-D-galactosamina complexada no CRD foi estabilizada por uma rede de pontes de hidrogênio entre Asp87, Gly105, Asn129, Leu213, Ser214 e His217 com os átomos de oxigênio O3, O4, O5 e O6 presentes no açúcar. Enquanto os resíduos de aminoácidos Gly104, Phe106, Phe127, Trp131 e Gly212 interagiram hidrofobicamente (Figura 11B).

Figura 11. Contribuição do CRD para o efeito edematogênico de VGL.



Fonte: Marques *et al.*, 2017. Representação do CRD de VGL em complexo com (a) D-galactose e (b) *N*-acetil-D-galactosamina. Em azul, interações polares. (C) Inibição de VGL em edema de pata (1 mg/Kg; s.c.) por galactose (0,1 M). Média \pm S.E.M. (N = 5 e 6). * P < 0,05 vs. solução salina #p < 0,05 vs. VGL.

Tabela 2. Resultados da pontuação de *Docking* e concentração inibitória mínima dos carboidratos testados na Atividade hemaglutinante de VGL.

	Pontuação ^a	MIC ^b (mM) ^e
Carboidratos		
<i>N</i> -acetil-D-galactosamina	-50.11	1.0
α -metil-D-galactosídeo	-43.11	NT ^c
α -Lactose	-43.45	2.0
α -D-galactose	-42.80	8.2
α -D-glicose	-39.26	NI ^d
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	-39.03	NI
<i>N</i> -acetil-D-manosamina	-39.00	NT
α -metil-D-glicosídeo	-38.68	NT
Sacarose	-38.01	NI
α -metil-D-manosídeo	-36.87	NT
α -D-manose	-35.66	NI
α -L-fucose	-34.03	NI
<i>N</i>-glicanos		
CMPLX1	-53.65	
CPLX2	-35.03	
HBRD1	9.60	
HBRD2	-52.28	
MAN5	-33.06	
MAN9	-39.03	
<i>O</i>-glicanos		
Antígeno Tn	-52.00	
Antígeno T	-44.08	
Excore 1	-50.85	
Excore 2	-53.60	
Excore 3	-32.00	
Excore 4	-51.14	

Fonte: Marques *et al.*, 2017. ^a Pontuação de Moldock (MDS) = $E_{inter} + E_{intra}$, onde E_{inter} é a energia de interação da proteína com o ligante. ^b MIC: Mínima Concentração Inibitória. ^c NT: Não Testado. ^d NI: Não inibiu as concentrações testadas. ^e Silva *et al.* (2012).

Um maior número de interações da lectina com GalNAc em relação a Gal foi sugerido em estudos anteriores (SILVA *et al.* 2012). Dados reportados na literatura mostram uma forte ligação da lectina extraída de sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML) com galactosídeos (SOUSA *et al.*, 2015 e SOUSA *et al.*, 2016). Quanto a sobreposição da

estrutura da VGL com a estrutura da VML, ambas, complexadas com GalNAc não se verificou diferenças grandes no posicionamento dos ligantes no CRD.

Estes resultados demonstram a eficiência dos testes de Bioinformática para VGL. De fato, as experiências com animais indicaram inibição parcial (40%) da VGL, no efeito edematogênico ($0,35 \pm 0,05$ AUC) quando associada com galactose ($0,22 \pm 0,03$ AUC) (Figura 11C). Essa inibição parcial pode ser explicada pelo envolvimento de outros sítios da lectina, como o sítio de ligação a metal ou a cavidade hidrofóbica (DAM *et al.*, 1998 e LORIS *et al.*, 1994). Alternativamente, a lectina pode ter afinidade maior para *N*- e *O*-glicanos, presentes na membrana celular.

Também foi realizado docking com 13 glicanos: 6 *N*- e 7 *O*-glicanos, escolhidos com base em sua relevância e prevalência em glicoproteínas. Entre os *N*-glicanos complexos que apresentam o grupo galactosil na porção terminal, VGL apresentou interações favoráveis com o glicanos CPLX1 (Escore: -53.65) (Figura 12A), mas a adição do ácido siálico reduziu drasticamente o escore (Escore: -35.03) devido ao capeamento do grupo galactosil. Da mesma forma, *N*-glicanos híbridos que apresentam galactose na região terminal interagiram fortemente com VGL (HBRD2: -52.28) diferentemente do que ocorre com a sua contraparte sializada (HBRD1: 9,60). Não surpreendentemente, *N*-glicanos *high-mannose* não interagiram fortemente com VGL.

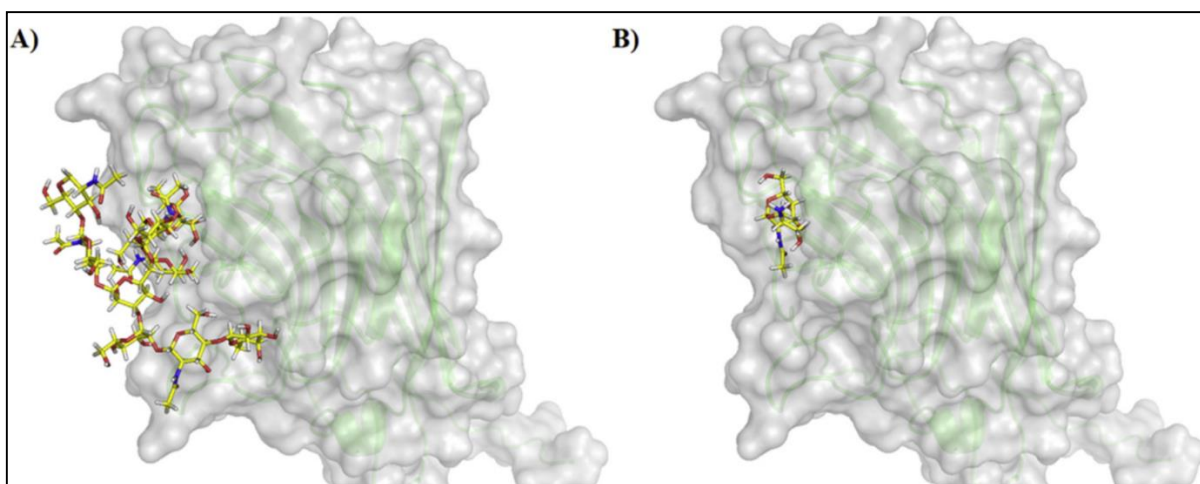
As sequências de açúcar encontradas em glicoproteínas geralmente compartilham um núcleo comum, no caso de *N*-glicanos Man α 1-6 (Man α 1-3) Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr (PINHO e REIS, 2015) classificados em três tipos: *high-mannose* que contém apenas resíduos de manose ligados ao núcleo, como os Man5 e Man9 usados no presente estudo. Man5 é precursor de vários glicanos, enquanto Man9 é encontrado em várias glicoproteínas, incluindo receptores de insulina, HIV GP120 (STANLEY, SCHACHTER e TANIGUCH, 2009; CORNFIELD, 2005 e MITOMA *et al.*, 2006) e outros possíveis alvos terapêuticos.

Em *N*-glicanos complexos, os quais começam por *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), ligados ao núcleo, é comum a subsequente adição de resíduos de galactose com ligação β 1-4 denominada *N*-acetilactosamina (LacNAc). As cadeias Poli-LacNAc são encontradas em glicanos de vários tipos de células e podem servir de alvo para inserção de porções específicas de grupos glicosil (STANLEY, SCHACHTER e TANIGUCH, 2009). Por outro lado, a formação de GalNAc β 1-4GlcNAc também é presente em várias estruturas (GUZMAN-ARANQUEZ, 2010). O Glicano complexo CPLX1 apresenta LacNAc e GalNAc β 1-4GlcNAc fucosilados, enquanto CPLX2 possui estrutura semelhante ao CPLX1 com a porção terminal galactosil coberto por ácido siálico.

N-glicanos híbridos possuem ramificações com resíduos de manose e outros com ligação GlcNAc (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017). O glicano HBRD1 apresenta um ramo com resíduos de manose e outro ramo com ácido siálico ligado ao LacNAc, enquanto que o HBRD2 possui estrutura similar com grupo galactosil não ligado por ácido siálico.

Entre os *O*-glicanos, o *docking* revelou que, semelhante a VML (SOUSA *et al.*, 2015 e SOUSA *et al.*, 2016), a VGL interage com os antígenos associados a tumor como T e Tn (-52,00 e -44,08), como mostrado na figura 12B, indicando uma possível aplicação na pesquisa contra o câncer.

Figura 12. Melhores posições de *docking* de VGL com os ligantes.



Fonte: Marques *et al.*, 2017. VGL complexada com A) Glicol CPLX1 e B) Antígeno Tn.

O-glicanos estão presentes em modificações pós-traducionais em de proteínas de mamíferos. Normalmente, esses glicanos estão ligados via *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a um resíduo serina ou treonina. Entre os glicanos testados, o antígeno Tn (GalNAc α Ser/Thr) e T (Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr) foram escolhidos com base na sua importância em estudos contra o câncer e sua prevalência (BROCKHAUSEN, SCHACHTER e STANLEY, 2009; YAO, XIE e LI, 2008; CROCI *et al.*, 2014). Outros glicanos escolhidos como o Excore1 pode ser encontrado em muitas glicoproteínas e mucinas, Excore2 é encontrado em glicoproteínas de células e tecidos específicos, Excore3 e Excore4 são encontrados em mucinas bem como tecidos secretores de mucina (BEZERRA *et al.*, 2014 e SPARROW *et al.*, 2008).

A maioria das atividades biológicas desencadeadas por lectinas ocorrem devido a interação entre proteínas e alvos moleculares glicosilados (SIROIS *et al.*, 2007 e MARINÑO *et al.*, 2010). Em conjunto, esses resultados sugerem que a VGL é capaz de se ligar à *O*-glicanos como mostra as simulações de *docking*. Enquanto para *N*-glicanos, a lectina liga-se preferencialmente aos que possuem galactose como resíduo terminal. É provável que o alvo molecular da VGL, a fim de provocar o efeito edematogênico, é uma proteína glicosilada com galactosil em suas regiões terminais ou tipos comuns de *O*-glicanos.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo a estrutura tridimensional da lectina extraída de sementes de *Vatairea guianensis* (VGL) foi determinada e apresentou alta similaridade com a lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML). Os testes com VGL mostraram sua capacidade de provocar efeito edematogênico, com envolvimento de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, IL-1 β e o CRD. Testes *in silico* demonstraram a capacidade de ligação da VGL com galactosídeos e *N*- e *O*-glicanos relevantes, corroborando com a hipótese de que a interação da VGL com alvos moleculares glicosilados é um dos principais fatores responsáveis por seus efeitos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; BENEVIDES, A. H. R. G.; DE MOURA, T. R.; DE SOUSA, R. B.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, n. 4, p. 275–282, 2007.
- ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A. M. S.; CRIDDLE, D. N. *et al.* *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein Pept. Lett.** v. 11(2), p. 195–200, 2004.
- ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M. S. *et al.*, Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediat. Inflamm.** v. 8(2) p. 107-113, 1999.
- ALENCAR, V. B.; ALENCAR, N. M.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. L.; BRITO, G. A.; ARAGÃO, K. S.; BITTENCOURT, F. S.; PINTO, V. P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R. A.; CAVADA, B. S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, p. 1805–1814, 2005.
- ALMEIDA, A. C. **Caraterização estrutural e biológica de uma lectina de sementes de *Centrolobium tomentosum* GUILL. EX BENTH.** 109 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- AMORIM, R. M. F. *et al.* The leguminous lectin of *Lonchocarpus araripensis* promotes antinociception via mechanisms that include neuronal inhibition of Na⁺ currents. **Inflammation Research**, v. 65, n. 9, p. 701–708, 2016.
- ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; de SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Antiinflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, p. 1-10, 1997.
- ASSREUY, A. M.; FONTENELE, A. R.; PIRES, A. F.; FERNANDES, D. C.; RODRIGUES N. V. F. C.; BEZERRA, E. H. S.; MOURA, T. R.; DO NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.**, v. 380, p. 509–521, 2009.
- ATALAH, B. A.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects, **Plant Science**, v. 221–222, p. 21-28, 2014.
- BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A. Conformation, protein-carbohydrate interactions and novel subunit association in the refined peanut lectin-lactose complex. **J.Mol.Biol.** v. 259, p. 281-196. 1996.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. In Vivo Lymphocyte Activation and Apoptosis by lectins of the *Diocleinae* Subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 96 (5), p. 673-678, 2001.
- BENEVIDES, R. G.; GANNE, G.; SIMOES, R. C.; SCHUBERT, V.; NIEMIETZ, M.; UNVERZAGT, C.; CHAZALET, V.; BRETON, C.; VARROT, A.; CAVADA, B. S.;

- IMBERTY, A. A Lectin from *Platypodium elegans* with Unusual Specificity and Affinity for Asymmetric Complex N-Glycans, **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 26352-26364, 2012.
- BENJAMIN, C. F.; FIGUEIREDO, R. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; BARJA-FIDALGO, C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 30, p. 873-881, 1997.
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T.; Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics** v. 27, p. 343-350, 2011.
- BENKERT, P.; KUNZLI, M.; SCHWEDE, T. QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Res.** v. 37, p. 510-514, 2009.
- BENKERT, P.; TOSATTO, S. C. E.; SCHOMBURG, D. QMEAN: a comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins** v. 71, p. 261-277, 2008.
- Bezerra, G. A.; Viertlmayr, R.; Moura, T. R. *et al.* Structural studies of an anti-inflammatory lectin from *Canavalia boliviana* seeds in complex with dimannosides. **PLoS One** v. 9(5), p. 1-12, e97015, 2014.
- BIES, C., LEHR, C., WOODLEY, J.F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425–435, 2004.
- BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting history and applications. **Advanced Drug Delivery Review** 56, p. 425-435, 2004.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.
- BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochem. J.** v. 39, p. 1-15, 2005.
- BROCKHAUSEN, I.; SCHACHTER, H.; STANLEY, P.; Chapter 9: O-GalNAc glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, *et al.* (Eds.), **Essentials of Glycobiology, second ed.** Cold Spring Harbor, New York, 2009.
- BRUNEAU, A. *et al.* Legume phylogeny and classification in the 21st century : progress , prospects and lessons for other species-rich clades Legume phylogeny and classification in the 21st century : Progress , prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217–248, 2013.
- BUCHAN, D. W. A.; MINNECI, F.; NUGENT, T. C. O. *et al.*, Scalable web services for the PSIPRED protein analysis Workbench. **Nucleic Acids Res.** v. 41, p. 340-348, 2013.
- CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of *Diocleinae* lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375. 1999.
- CARDOSO, D. *et al.* Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 58–75, 2013.

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

CASE, D. A.; DARDEN, T. A.; CHEATHAM, T. E. *et al.*, AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.

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

CHAUDHARY, M.; GADBAIL, A. R.; VIDHALE, G.; MANKARGADBAIL, M. P. *et al.* Comparison of myo fibroblasts expression in oral squamous cell carcinoma, verrucous carcinoma, high risk epithelial dysplasia, low risk epithelial dysplasia and normal oral mucosa. **Head Neck Pathol.** v. 6(3), p. 305-313, 2012.

CORNFIELD, A. P. Structure/function of O-glycans. In: encyclopedia of genetics, genomics. **Proteomics Bioinformatics** v. 3(3), cap. 5:65, 2005.

CROCI, D. O.; CERLIANI, J. P.; DALOTTO-MORENO, T. *et al.* Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. **Cell** v. 156(4), p. 744-758, 2014.

DA SILVA, H. C. Caracterização estrutural e biológica das lectinas de sementes de *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth e *Vatairea guianensis* Aublet. 2013. 138 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

DA SILVA, I. B. **Caracterização estrutural de uma lectina nociceptiva obtida de sementes da espécie *Platypodium elegans* Vog.** 2017. 106 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2017.

DA SILVA, M. T. L. **Determinação de estrutura primária e avaliação preliminar dos efeitos inflamatórios de uma lectina de *Canavalia bonariensis* Lindl.** 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2015.

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

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B. *et al.* Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 12082-12088, 1998.

DAS, A. *et al.* Characterization of a Highly Potent Insecticidal Lectin from *Colocasia esculenta* Tuber and Cloning of Its Coding Sequence. **Ajps**, v. 04, p. 408-416, 2013.

DE SOUSA, B. L. **Caracterização estrutural das formas silvestre e recombinante de uma lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* Benth e análise das suas bases moleculares de ligação ao antígeno Tn.** 2014. 121 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Vegetal) – Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, 2014.

DELATORRE, P. *et al.* Crystal structure of a lectin from *Canavalia maritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **J. Struct. Biol.**, v. 154, p. 280-286, 2006.

FEITOSA, R. F. G.; MELCÍADES, G. B.; ASSREUY, A. M. S. *et al.* The pharmacological profile of ovalbumin-induced paw o edema in rats. **Mediat. Inflamm.** v. 11(3), p. 155-163, 2002.

FERREIRA, M. C.; SANTOS, M. A. C.; VIANA, E. P. Relatório Técnico, IEPA/BASA. **Estudo botânico / ecológico e análise qualitativa de espécies medicinais extrativas utilizadas na produção de fitoterápicos e / ou fitocosméticos pelo IEPA**, 2004.

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

GABIUS, H. J. Animal lectins. **Eur. J. Biochem.** v. 243; p. 543–76, 1997.

GAJBHIYE, V.; GONG, S. Lectin functionalized nanocarriers for gene delivery. **Biotechnology Advances**, 31, p. 552-562, 2013.

Glycan-Web, carbohydrate builder. Disponível em:

<<http://glycam.org/tools/moleculardynamics/oligosaccharide-builder/build-glycan?id=1>>. 2017. Acesso em: 18 maio 2017.

GONÇALVES, F. M. VML, uma lectina com afinidade por galactose isolada das sementes de *Vatairea macrocarpa*, pode induzir respostas neurotóxicas. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

ISÍDRIO, R. **Caracterização bioquímica e especificidade fina da lectina de sementes de *Vatairea guianensis***. 2002. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

JACQUES, A. V.; **Avaliação do efeito neuroprotetor de lectinas frente à neurotoxicidade glutamatérgica**. 2012. 104 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.** v. 267, p. 727-748, 1997.

KAUR, A. *et al.* Purification of 3 monomeric monocot mannose-binding lectins and their evaluation for antipoxviral activity: potential applications in multiple viral diseases caused by enveloped viruses. **Biochem. Cell Biol.**, v. 85, p. 88-95, 2007.

KAUR, N. *et al.* A Novel Antiproliferative and Antifungal Lectin from *Amaranthus viridis* Linn Seeds. **Protein Pept. Lett**, v. 13, p. 897-905, 2006.

KEITEL, T.; SIMON, O.; BORRIS, R.; HAINEMANN, U. Synthesis of 4-methylumbelliferyl- β -d-glucan oligosaccharides as specific chromophoric substrates of (1-3), (1-4)- β -d-glucan 4-glucanohydrolases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90 p. 5287-5291, 1993.

KIRSCHNER, K. N.; YONGYE, A. B.; TSCHAMPEL, S. M. *et al.*, GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. **Carbohydrates, J. Comput.** v. 29(4), p. 622-655, 2008.

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. **J. Chem. Inf. Model.** v. 49, p. 84-96, 2009.

LA CHAUSSETTE ROUGE. *Vatairea guianensis* (bois dartre). Disponível em: <<http://www.lachaussetterouge.fr/2015/03/vatairea-guianensis-bois-dartre.html>>. Acesso em: 25 agosto 2017.

LANDUCCI, E.C.T. *et al.* Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 578-583, 1995.

LANOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front. Plant. Sci.**, v. 5, p. 1-16, 2014.

LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S. *et al.*, PROCHECK: a program to check the stereo chemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.** v. 26 p. 283-291, 1993.

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

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 637-674, 1998.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Bioch Bioph Acta**, v. 1572, p. 198-208, 2002.

LORIS, R.; CASSET, F.; BOUCKAERT, J. *et al.* The monosaccharide binding site of lentil lectin: an X-ray and molecular modelling study. **Glycoconj. J.** v. 11(6), p. 507-517, 1994.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Bioch Bioph Acta**, v. 1383, p. 9-36. 1998.

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

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

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

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v. 20, p. 2014-2033, 2015.

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

- MARIÑO, K.; BONES, J.; KATTLA, J. J. *et al.* A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. **Nat. Chem. Biol.** v. 6(10), p. 713-723, 2010.
- MARTINS, A. M. C. *et al.* Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 10, p. 1329–33, 2005.
- MEAGHER, J. L. *et al.* Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiol.** v. 15, p. 1033-42, 2005.
- MITOMA, J.; PETRYNIAK, B.; HIRAOKA, N. *et al.* Extended core 1 and core 2 branched O-glycans differentially modulate sialyl Lewis X-type L-selectin ligand activity. **J. Biol. Chem.** v. 278(11), p. 9953-9961, 2003.
- MONDAL, H.A. *et al.* Exploring the Insecticidal Potentiality of *Amorphophallus paeonifolius* Tuber Agglutinin in Hemipteran Pest Management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 780-790, 2012.
- NAGANO, C.S.; CALVETE, J.J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B.S; SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependence dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochem. J.** v. 409, p. 417-28. 2008.
- NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; NAPIMOGA, J. T.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int Immunopharmacol**, Uberaba, v. 7(6), p. 824-835, 2007.
- NASCIMENTO *et al.* Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 29, p. 248-252, 2015.
- OHIZUMI, Y.; GAIDAMASHVILI, M.; OHWADA, S.; MATSUDA, K.; KOMINAMI, J.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; HIRABAYASHI, J.; NAGANUMA, T.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **J Agric Food Chem.** v. 57(7), p. 2896-902, 2009.
- OSTERNE, V. J. S. **Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anticâncer.** 2016. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2016.
- PARKER, B. L.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; SOLIS, N. *et al.* Site-specific glycan-peptide analysis for determination of N-glycoproteome heterogeneity. **J. Proteome Res.** v. 12(12), p. 5791-5800, 2013.
- PEREIRA JÚNIOR, F. N. **Caracterização estrutural parcial e biológica de uma lectina de sementes de *Dioclea reflexa* Hook.** 2014. 103 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347–352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of *O*-linked glycans. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, p.209-58, 1998.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nat. Rev. Cancer** v. 15(9), p. 540-555, 2015.

PINTO-JUNIOR, V. R. **Análise estrutural de uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. e avaliação do seu efeito vasor SHARON elaxante, inflamatório e nociceptivo.** 2016. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) – Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Universidade Federal do Ceará, 2016.

PINTO-JUNIOR, V. R.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S. *et al.* Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds: crystal structure, molecular docking and dynamics. **Int. J. Biol. Macromol** v. 98, p. 12-23, 2017.

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

PIRES, A. F. **Lectinas isoladas de sementes de Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae): modelo para estudos de relações estrutura/função de proteínas.** 150 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Estadual do Ceará, 2011.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V.; SOARES, P. M. *et al.*, A novel *N*-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflamm. Res.** v. 65 (1), p. 43-52, 2016.

PORTILLO-TÉLLEZ, M.C. *et al.* Folding and Homodimerization of Wheat Germ Agglutinin. **Biophysical Journal**, v. 101, p. 1423-1431, 2011.

RANGEL, T. B. A. Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules**, v.16, p. 5087–5103, 2011.

RODRIGUEZ-ARANGO, E. *et al.* Cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli* of the eDNA encoding a precursor of peanut agglutinin. **DNA Sequence**, v. 307, n. 2, p. 185–189, 1992.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S. *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.** v. 4, p. 829-838, 1996.

SCHROT, J.; WENG, A.; MELZIG, M. Ribosome-Inactivating and Related Proteins. **Toxins**, v. 7, p.1556-1615, 2015.

SHARMA, V.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor- associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 35, p. 21209–21213, 1996.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. **Biochem. Soc. Trans.**, 36 (6) p. 1457-1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, 14 (11), p. 53-62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins, Chapman and Hall**. London. 126 p., 1989.

SILVA, C. T. L. **Avaliação biológica dos extratos obtidos das sementes de *Vatairea guianensis* (Aublet)**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SILVA, H. C.; NAGANO, C. S.; SOUZA L. A. G.; NASCIMENTO, K. S.; ISÍDRO, R.; DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SAMPAIO, A. H.; ASSREUY, A. M. S.; PIRES, A. F.; DAMASCENO, L. E. A.; MARQUES-DOMINGOS, G. F. O.; CAVADA, B. S. Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, v. 47(12), p. 2347-2355, 2012.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 17, p. 498–505. 2007.

SIROIS, S.; TOUAIBIA, M.; CHOU, K. C. *et al.* Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine. **Curr. Med. Chem.** v. 14(30), 3332-3342, 2007.

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

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, 2016.

SPARROW, L. G.; LAWRENCE, M. C.; GORMAN, J. J. *et al.* N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure. **Proteins** v. 71(1), p. 426-439, 2008.

STANLEY, P.; SCHACHTER, H.; TANIGUCHI, N. Chapter 8: N-Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, *et al.* (Eds.), **Essentials of Glycobiology, second ed.** Cold Spring Harbor, New York, 2009.

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

TRAMIL. **Program of Applied Research to Popular Medicine in the Caribbean.**

Disponível em: <<http://www.tramil.net/en/plant/vatairea-guianensis>>. Acesso em: 25 agosto 2017.

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

VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; SMEETS, K.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDNA clones. **Plant Physiology**. v. 07(3), p. 833-843, 1995.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. Distribution and Evolution of the Lectin Family in Soybean (*Glycine max*). **Molecules**, v. 20, p.2868-2891, 2015.

VARELA, P.F.; ROMERO, A.; SANZ, L.; ROMAO, M.J.; TÖPFER-PETERSEN, E.; CALVETE, J.J. The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminalplasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. **J. Mol. Biol.** v. 274, p. 635-649, 1997.

VARKI, A.; ETZLER, M. E.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D. **Discovery and classification of glycan-binding proteins** (cap. 26). *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2009).

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

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44(4), p. 385-403, 2004.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagram of protein-ligand interactions. **Protein Eng.** v. 8, p.127-134, 1995.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Curr. Protoc Protein Sci.** v. 86 2.9.1-2.9.37, 2016.

YAO, H.; XIE, X.; LI, Y. Legume lectin FRIL preserves neural progenitor cells in suspension culture in vitro. **Clin. Dev. Immunol** v. 2008, 531317, 2008.

ANEXO A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA BIOCHIMIE

Biochimie 140 (2017) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Contribution of the carbohydrate-binding ability of *Vatairea guianensis* lectin to induce edematogenic activity



Gabriela F.O. Marques^{a,1}, Vinicius J.S. Osterne^{b,1}, Livia M. Almeida^a,
 Messias V. Oliveira^{b,2}, Luiz A.C. Brizeno^a, Vanir R. Pinto-Junior^b, Mayara Q. Santiago^b,
 Antonio H.B. Neco^b, Mario R.L. Mota^c, Luiz A.G. Souza^d, Kyria S. Nascimento^b,
 Alana F. Pires^a, Benildo S. Cavada^{b,*}, Ana M.S. Assreuy^{a,**}

^a Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Av. Pamjiana, 1700, 60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Mr. Hull s/n Building 907, 60445-970, Fortaleza, CE, Brazil

^c Department of Dental Clinic, Division of Oral Pathology, Federal University of Ceará, R. Alexandre Baraúna, 949, 60430-160, Fortaleza, CE, Brazil

^d Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2017

Accepted 9 June 2017

Available online 16 June 2017

Keywords:

Vatairea guianensis

Lectin

Molecular modeling

Molecular docking

Inflammation

ABSTRACT

Vatairea guianensis lectin (VGL), Dalbergiae tribe, is a N-acetyl-galactosamine (GalNAc)/Galactose (Gal) lectin previously purified and characterized. In this work, we report its structural features, obtained from bioinformatics tools, and its inflammatory effect, obtained from a rat paw edema model. The VGL model was obtained by homology with the lectin of *Vatairea macrocarpa* (VML) as template, and we used it to demonstrate the common characteristics of legume lectins, such as the jellyroll motif and presence of a metal-binding site in the vicinity of the carbohydrate-recognition domain (CRD). Protein-ligand docking revealed favorable interactions with N-acetyl-D-galactosamine, D-galactose and related sugars as well as several biologically relevant N- and O-glycans. *In vivo* testing of paw edema revealed that VGL induces edematogenic effect involving prostaglandins, interleukins and VGL CRD. Taken together, these data corroborate with previous reports showing that VGL interacts with N- and/or O-glycans of molecular targets, particularly in those presenting galactosides in their structure, contributing to the lectin-inflammatory effect.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Widely distributed among living organisms and viruses, lectins are proteins or glycoproteins capable of forming complexes with molecules and biological structures containing saccharides [1]. Since lectins can reversibly bind to carbohydrates, these molecules play major roles in cell communication, such as that occurring in the inflammatory process via glycodecoding in the structure of soluble and integral cell membrane glycoconjugates [2].

Among lectins, those purified from leguminous plants are

widely studied. This group comprises a large family of closely related lectins with similarity in physicochemical and structural properties, but significant differences in their biological activities [3]. Some lectins of the Dalbergiae tribe (Fabaceae, Papilionoideae) have now been purified and characterized. Moreover, the structures of *Pterocarpus angolensis* [4], *Centrolobium tomentosum* [5], *Platypodium elegans* [6], *Arachis hypogaea* [7] and *Vatairea macrocarpa* [8,9] lectins have already been solved. Those lectins possessing binding affinity for N-acetyl-glucosamine present anti-inflammatory property, such as the lectin of *Lonchocarpus sericeus* [10–12] and *Lonchocarpus araripensis* [13]. However, those lectins with binding affinity for galactose, such as *Vatairea macrocarpa* lectin, present inflammatory property [14–16]. In addition, the inflammatory effect of *V. macrocarpa* lectin occurs via activation of macrophages with release of cytokines [16].

The N-acetyl-D-galactosamine/D-galactose-specific lectin of *Vatairea guianensis* (VGL) is a homotetrameric glycoprotein with

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: messiasigma@gmail.com (M.V. Oliveira), bscavada@ufc.br (B.S. Cavada), anassreuy@gmail.com (A.M.S. Assreuy).¹ Equal contribution.² Participated in the new docking experiments and in paper writing.

two *N*-glycosylations at Asn111 and Asn183. It was purified by affinity chromatography and possesses a molecular mass of 120 kDa. VGL presents *in vitro* vasodilator effect, inducing relaxation in endothelialized aorta via nitric oxide [17]. We aimed to gain a better understanding of VGL-saccharide binding (CRD) in the context of VGL biological effects. To accomplish this, we modeled the three-dimensional structure of VGL and focused on its *in vivo* vasodilator effects on a rat paw edema model.

2. Materials and methods

2.1. Lectin isolation

VGL was isolated from *Vatairea guianensis* seeds by ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel column), followed by affinity chromatography (guar gum) [17]. The pure protein was diluted in sterile saline (0.9% NaCl) before biological assays.

2.2. Rat paw edema model

VGL (0.01, 0.1 and 1 mg/kg) was administered by subcutaneous (s.c.) route in Wistar rats (150–200 g) as inflammatory stimulus. Controls received sterile saline (0.1 mL/100 g body mass). The experimental protocols were approved by our Institutional Ethical Committee (UECE No. 10130208-8/40).

Paw edema was measured by hydroplethysmometry immediately before VGL injection (zero time), and from 0.5 to 72 h thereafter and was expressed as the variation in paw volume (mL) or area under curve (arbitrary units) [18] compared to zero time.

The participation of inflammatory mediators in the lectin effect was evaluated by treating the animals with the following pharmacological inhibitors: nitric oxide synthase (*N*-Nitro- ι -arginine methyl ester/ ι -NAME; 25 mg/kg; intravenous), cyclooxygenase (indomethacin; 5 mg/kg; subcutaneous) and interleukin-1 β (thalidomide; 45 mg/kg; intraperitoneal) [19] 30 min before VGL administration (1 mg/Kg; s.c.).

The participation of the lectin carbohydrate-recognition domain (CRD) was evaluated by the injection of the most active dose of VGL (1 mg/kg) after incubation (30 min/37 °C) with its binding sugar galactose (0.1 M). Galactose was individually incubated at the same conditions as control.

2.3. Histological analysis

Paw tissues were removed 6 h after VGL (1 mg/kg) administration, fixed with 10% buffered formalin for 24 h, embedded in paraffin, cut into 5- μ m thick slices, stained with hematoxylin & eosin (HE) and analyzed by light microscopy coupled to image acquisition systems (ScopePhoto; Image Manager 50). The intensity of tissue inflammation was graded according to the following scores: 0. normal tissue (no distinguishable change, 0%), absence of inflammatory infiltrate; 1. discrete tissue changes (initiation of changes, up to 30%), slight inflammatory infiltrate; 2. moderate tissue changes (patent changes, 31–60%), moderate inflammatory infiltrate; and 3. severe tissue changes (widespread changes, 61–100%), severe inflammatory infiltrate.

2.4. Immunohistochemistry

Fragments of paw tissue were sectioned to a thickness of 3 μ m, placed on silanized slides and processed as described in the following protocol. Samples were deparaffinized, subjected to rehydration and antigen-recovery using citrate buffer (pH 6.0), incubated (10 min; r.t.) with 6% H₂O₂ in methanol (1:1) and washed with TRIS pH 7.6 (TRIS) in order to inactivate endogenous

peroxidases. Samples were re-incubated for 1 h (r.t.) with the primary antibody (Ab) against IL-1 β (monoclonal; Abcam "AB9787"; 1:100), washed and further incubated (30 min; r. t.) with biotinylated immunoglobulin (Ig; DAKO E0468) and streptavidin (DAKO P0397). Diaminobenzidine chromogen (DAKO K3469) was applied for 10 min, and Mayer's hematoxylin was used for counterstaining. Samples were dehydrated (ethanol and xylene) and cover-slipped with permanent Mounting medium. Parallel sections were treated with control IgG instead of the primary Ab.

For semi quantitative immunohistochemical evaluation, sections were randomly selected in 5 fields (400x magnification) in areas of greater concentration of immunostained cells located in connective or epithelial tissue. The percentage of cells with cytoplasmic or nuclear expression was scored as follows: (0) no positive cells; (1 - mild) 1–33% positive cells; (2 - moderate) 34–66% positive cells; (3 - intense) 67–100% positive cells (adapted from Minal Chaudhary et al. 2012) [20].

2.5. Statistical analysis

The *in vivo* data were presented as mean \pm SEM, and the statistical analysis was performed by ANOVA, followed by Bonferroni's test. P values < 0.05 were considered significant. Histopathological and immunohistochemical data were expressed as median (maximum and minimum) and analyzed by Mann-Whitney test.

2.6. Template determination and secondary structure prediction

VGL sequence was downloaded from the Universal Protein Resource (Uniprot) (ID: P86893). The template for homology modeling was obtained from BLASTp search on the Protein Data Bank (PDB) with default parameters. Proteins most similar to VGL were chosen and ranked based on their resolution and geometric parameters.

Secondary structure prediction was carried out using PsiPro server, an automated system for secondary structure prediction [21]. The secondary structure was applied as one of the validation factors for homology model selection.

2.7. Homology modeling and validation

The 3D structure of VML in complex with Tn antigen (PDB ID: 4U36) was downloaded from PDB as the template structure. The homology model of VGL was built with MODELLER v.9.16 [22]. VGL and VML structures were aligned using salign module, followed by manual optimization. Initially, a hundred models were generated and ranked based on the Modeller objective score function (molpdf) and Discrete Optimized Protein Energy (DOPE) scores. Several models with lower molpdf and DOPE were selected and submitted to validation of stereochemical properties like Ramachandran plot, steric overlaps, C β deviation parameters, rotamers, and bond angle deviations using PROCHECK [23]. Side-chain acceptability was obtained by the Verify3D server [24]. QMEAN and Z-scores were also assessed by Protein Structure and Assessment tools [25–27]. The model having the best values in all validations was selected and applied in the subsequent analyses. Molecular drawings were prepared with PyMol (Shrodinger, LLC).

2.8. Molecular docking

Molecular docking was applied to verify the VGL ability to interact with several sugars. In order to perform the dockings, energy minimized saccharides structures were downloaded from PubChem [28]. Simulations were carried out with CLC Drug Discovery Workbench (CLC Bio; Boston, MA, USA), a software that uses

a standard precision mode to determine the favorable binding poses and detect several flexible ligand conformations, while holding the protein as a rigid structure. The location of VGL CRD was obtained by superposition with VML using. As docking parameters, the binding radius set to 10 \AA^3 around VGL CRD and the number of iterations set to 5000. The PLANTSPLIP algorithm was applied to calculate docking score [29], where more negative values indicate stronger interaction, and the best poses for each ligand were selected based on hydrogen bonds and hydrophobic interactions. UGLOT+ [30] and PyMol were applied to generate the 2D interaction plots and molecular representations, respectively. The result for GalNAc pose was compared to that in the VML crystal structure (PDB ID: 4U2A).

2.9. N- and O-glycans docking

VGL structure was also submitted to molecular docking with several N- and O-glycans commonly found in glycoproteins. Glycan structures were obtained from several scientific works [31–33] and built with the carbohydrate builder tool of Glycam-Web [34]. All glycans were submitted to energy minimizations using AMBER 12 [35] with GLYCAM_06j-1 force field [36] via Glycam-Web built in modules. Missing hydrogen atoms and bond type corrections were performed by ligand preparation module of Hermes v. 1.8.2. Glycan structures representations are shown in Fig. 5.1. Docking simulations were performed with GOLD v. 5.5 (Genetic Optimization for Ligand Docking – CCDC, Cambridge, England). GOLD implements a generic algorithm to dock ligands into protein binding sites exploring a great range of ligands conformations with partial protein flexibility [37]. VGL was prepared for docking by removal of solvent and ligand molecules. Binding site was defined in center of carbohydrate-recognition domain and all atoms comprising 12 \AA of radius. Docking parameters were: population size of 100, selection pressure of 1.1, number of operations of 10,000, number of islands of 5, niche size of 2 and crossover frequency of 95. For all ligands, 20 poses were generated and filtered by docking score, oligosaccharide geometry, hydrogen bonds and hydrophobic interactions coherence. Further validation was performed by comparing interactions with those from VGL-Galactose complex and removing poses with serious geometric strains. PLANTSPLIP was chosen as score function [29] and VGL-Galactose score was used as comparison. All other options were program

default. VGL-glycans complexes figures were generated in PyMol.

3. Results and discussion

VGL induced a time- and dose-dependent paw edema that lasted 48 h (Fig. 1a) at 0.01 mg/Kg ($0.21 \pm 0.03 \text{ AUC}$); 0.1 mg/Kg ($0.42 \pm 0.06 \text{ AUC}$) and 1 mg/Kg ($0.59 \pm 0.08 \text{ AUC}$) compared to saline ($0.06 \pm 0.02 \text{ AUC}$) (Fig. 1b). At 1 mg/Kg, VGL showed maximal efficacy (4–8 h), initiating edematogenic effect 30 min after administration (Fig. 1a). VGL at 1 mg/Kg also induced polymorphonuclear infiltrate along the edema time-course, which was accentuated at 6 h [VGL: median 3 (3.3)*; $p = 0.0022$ vs. saline: median 0 (0.1)] (Fig. 2). These results corroborate the typical acute inflammatory process demonstrated by the macroscopic evaluation shown in Fig. 1 and are in accordance with previous studies performed with the homologous lectin VML that elicited acute edematogenic activity accompanied with leukocyte infiltration [15].

Pharmacological modulation, as performed by treating animals with inhibitors of inflammatory mediators before VGL injection, implied the participation of prostaglandins in the *in vivo* vasodilator effect (edema) of VGL since indomethacin (inhibitor of the enzyme cyclooxygenase that catalyzes the synthesis of prostaglandins caused moderate (37%) inhibitory effect. In contrast, L-NAME (inhibitor of the enzyme NOS that catalyzes the synthesis of NO) did not modify the lectin edematogenic effect, despite the important vasodilator effect of NO. These data seem to contradict the vasodilator effect of VGL as previously shown *in vitro* [17]. However, this could be explained by the different NOS isoforms expressed in the noninflamed vessels (endothelial NOS) and the vessels in inflamed paw tissues (inducible NOS) [38]. In addition to the implication of prostaglandins, also a vasodilator mediator, we demonstrated an important participation of interleukins since thalidomide inhibited the edema induced by VGL by 62% (Fig. 3). Corroborating the results obtained by pharmacological modulation, IL-1 β immunostaining was revealed at 6 h in the epithelial and connective tissues (fibroblasts and inflammatory cells): epithelium [saline: 2 (1.2) vs. VGL: 3 (2.3)*]; connective tissue [saline: 0 (0.1) vs. VGL: 3 (2.3)*] (Fig. 4). These data are in line with the role of prostaglandins and IL-1 β , both mediators of cellular origin, in acute inflammation inducing vasodilatation and tissue damage [39], as well as the demonstrated effect of VML on acute models of inflammation with the participation of prostaglandins

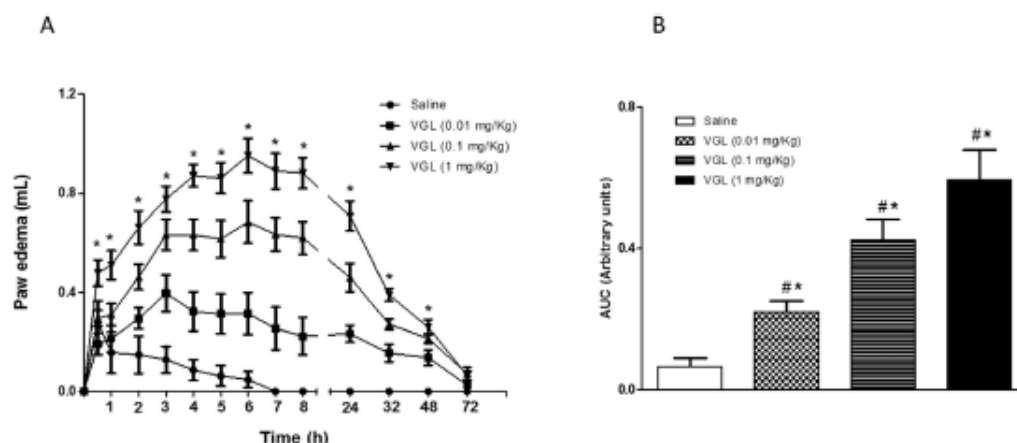


Fig. 1. VGL induces dose- and time-dependent paw edema. VGL (0.01, 0.1, 1 mg/kg; s.c.) or saline was injected intraplantar, and edema was measured before (zero time) and from 0.5 to 72 h after VGL. (a) Time course and (b) area under curve (AUC). Mean \pm S.E.M. ($n = 5-6$). * $p < 0.05$ vs. saline; # $p < 0.05$ vs. VGL at all doses.

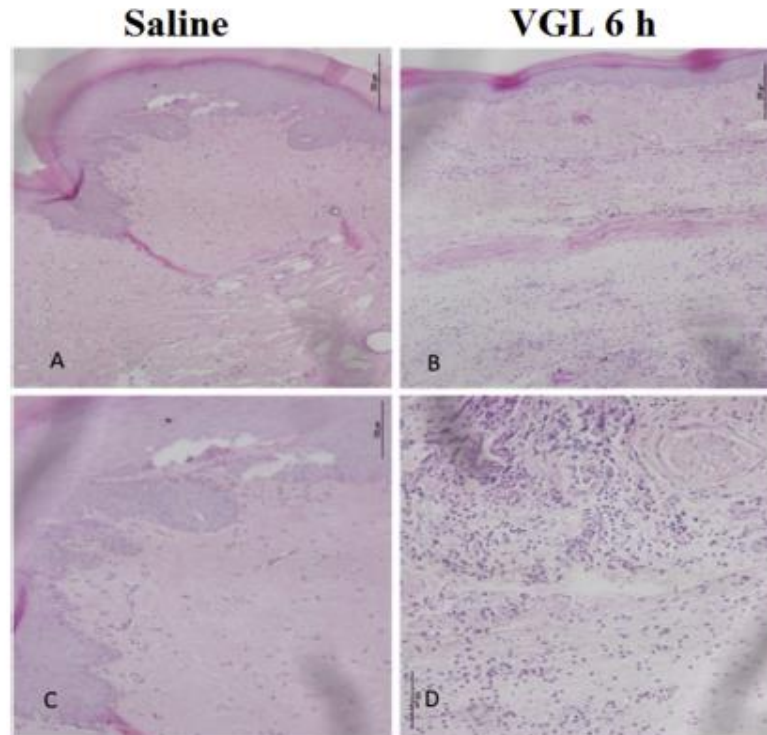


Fig. 2. VGL induces paw edema with polymorphonuclear leukocyte infiltrate. VGL (1 mg/kg; s.c.) or saline was injected intraplantar, and histological analysis was performed at 6 h. (a,c) Saline, (b,d) VGL.

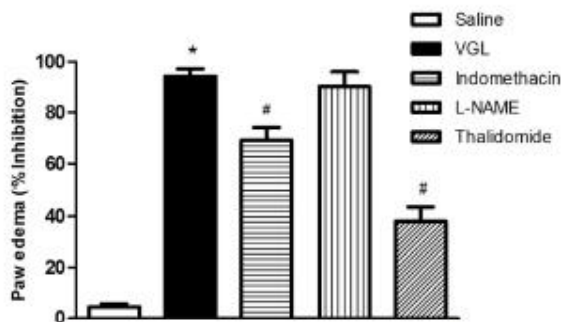


Fig. 3. The paw edema induced by VGL involves prostaglandins and interleukins. VGL (1 mg/kg; s.c.) was injected in the paw of naive or treated animals 30 min before indomethacin (5 mg/kg, s.c.), L-NAME (30 mg/kg; i.v.) or thalidomide (45 mg/kg; i.p.). Mean \pm S.E.M. (n = 5–6). *p < 0.05 vs. saline; #p < 0.05 vs. VGL.

and interleukins [15].

Importantly, classical literature has implicated the participation of the carbohydrate-recognition domain (CRD) in the inflammatory effects of leguminous lectins isolated from the tribes Phaseoleae [32,33] and Dalbergieae [10,13,15], demonstrated by the partial or total inhibition of the lectin activity by its binding sugar [40].

The protein BLAST analysis of VGL sequence demonstrated 93% identity with VML sequence (4U36) and because of this, VML was chosen as the template for homology modeling of VGL using the MODELLER 9.16 suite. Secondary structure prediction resulted in a

prevalence of β -sheet structures and loops with absence of α -helix (Fig. S2). This result agrees with previously reported data for other lectins. VGL monomer is shown in Fig. 5.

Reliability of the VGL model obtained by homology modeling was assessed by various validation parameters. For the chosen model, PROCHECK analysis showed that local and global stereochemical parameters had favorable values. Ramachandran plot indicated that 100% of the residues are in favorable and allowed regions of the graph. The QMEAN global and QMEAN z-score, as obtained by the protein assessment tools, were 0.755 and -0.156 , both within the range of high-quality models. Compatibility of the amino acid sequence and three-dimensional structure was obtained by the Verify3D program, in which 92.89% of the residues were compatible, suggesting that the side-chain environment is acceptable. Also, the superposition between the best model and the template resulted in a root mean square deviation (RMSD) of 0.143, indicating reliable prediction. Altogether, these analyses demonstrated that the VGL model was comparable to those of experimental structures, indicating that the modeled structure was adequate for the subsequent tests. VGL monomer was shown to be typical of legume lectin fold, consisting of a β -sandwich presenting the jellyroll motif with an antiparallel β -sheet of six strands partially extended and another curved antiparallel β -sheet of seven strands interconnected by loops of variable length. The monomer presents a single CRD stabilized by two divalent cations: calcium and manganese, both present in the metal bind site (MBS) in the vicinity of CRD.

Tetrameric biological assembly of VGL was experimentally determined by Silva and colleagues [17]. Tetramer is composed of

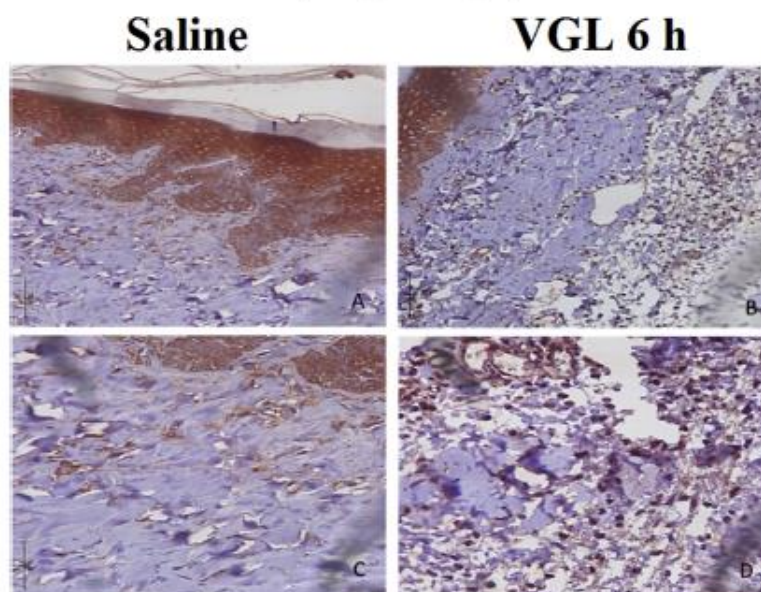


Fig. 4. IL-1 β plays an important role in VGL-induced paw edema. VGL (1 mg/kg; s.c.) or saline was injected intraplantar, and immunohistochemistry for IL-1 β in epithelial and connective paw tissues fragment was performed at 6 h. (a,c) Saline, (b,d) VGL.

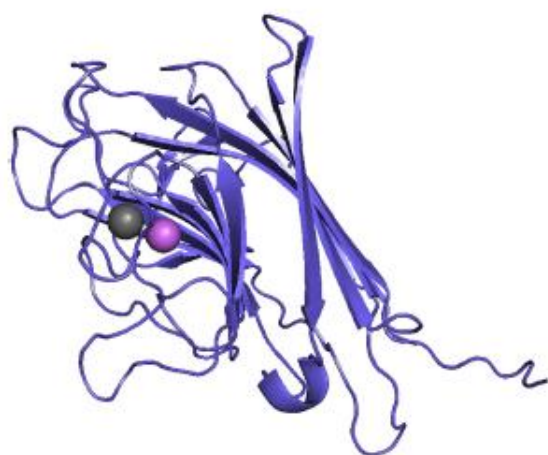


Fig. 5. Overall structure of VGL monomer. VGL chain is shown in cartoon representation colored in blue. Spheres represent calcium ion (in gray) and manganese ion (in purple).

two dimers oppositely arranged to form large central cavity which is, in turn, formed by interactions between the outermost loops of the six-stranded β -sheets of each monomer, generating a type 2 canonical interface. Other lectins, such as VLLB4, PHA and SBA, also present this kind of oligomerization [41].

Similar to VML, CRD and metal binding sites (MBS) are conserved in VGL. Carbohydrate-recognition domain is an exposed region in protein surface formed by four loops (see more details in molecular docking section), and for MBS, calcium ion is coordinated by Phe127, Asp125, Asp132, while the manganese ion is coordinated by Glu123, Asp125, Asp132 and His137 (Fig. S3).

The results demonstrated that VGL presents favorable interactions with GalNAc and D-galactose, corroborating previous inhibition assays [17]. Like other lectins, the binding with sugars is mediated by Van der Waals, hydrophobic and hydrogen interactions [4,5,8].

The results demonstrated that VGL presents favorable interactions with GalNAc (Score: -50.11), Gal (Score: -42.80), α -methyl-D-galactoside (-43.11) and α -Lactose (-43.45) corroborating with previous sugar inhibition assays performed by Silva and colleagues [17]. Comparison of scores and experimental data is shown in Table 1, and indicates the lectin specificity for galactosides.

The set of interactions established between the VGL model and galactose is shown in Fig. 6a. The galactose residue was stabilized by a network of H-bonds and hydrophobic interactions. The amino acid residues Asn87, Asn129, Leu213 and Ser214 interact by H-bonds with oxygen atoms O2, O3, O4 and O6 from carbohydrate structure. Gly104, Phe127, Gly212 and His217 residues are responsible for hydrophobic interactions which stabilize the galactose residue in the CRD. The *N*-acetyl-D-galactosamine residue complexed in the CRD was stabilized by a network of H-bonds connecting Asp87, Gly105, Asn129, Leu213, Ser214 and His217 residues to oxygen atoms O3, O4, O5 and O6 present in the molecule. Hydrophobic interactions involving the amino acid residues Gly104, Phe106, Phe127, Trp131 and Gly212 also contribute to the binding of lectin with this carbohydrate (Fig. 6b). The larger number of interactions with GalNAc in relation to Gal was suggested in previous study [17] and was confirmed here. Previous results demonstrated the strong binding of *Vatairea macrocarpa* lectin (VML) with galactosides [8,9]. As shown in Fig. S4, superposition of VGL with the structure of VML complexed with GalNAc demonstrated remarkable similarity of ligand binding validating the docking experiments.

These results demonstrated the efficiency of homology modeling and molecular docking for VGL. In fact, the animal

Table 1
Docking score results and minimum inhibitory concentration of carbohydrates on VGL hemagglutination activity.

Carbohydrate	Score ^a	MIC ^b (mM) ^c
Carbohydrate		
<i>N</i> -acetyl- α -galactosamine	-50.11	1.0
α -methyl- α -galactoside	-43.11	NT ^d
α -Lactose	-43.45	2.0
α - <i>D</i> -galactose	-42.80	8.2
α - <i>D</i> -glucose	-39.26	NI ^e
<i>N</i> -acetyl- α -glucosamine	-39.03	NI
<i>N</i> -acetyl- α -mannosamine	-39.00	NT
α -methyl- <i>D</i> -glucoside	-38.68	NT
Sucrose	-38.01	NI
α -methyl- α -mannoside	-36.87	NT
α - <i>D</i> -mannose	-35.66	NI
α - <i>L</i> -fucose	-34.03	NI
<i>N</i>-glycans		
CPLX1	-53.65	
CPLX2	-35.03	
HBRD1	9.60	
HBRD2	-52.28	
MAN5	-33.06	
MAN9	-39.03	
<i>O</i>-glycans		
Tn antigen	-52.00	
T antigen	-44.08	
Excure 1	-50.85	
Excure 2	-53.60	
Excure 3	-32.00	
Excure 4	-51.14	

^a MolDock score (MDS) = $E_{\text{bind}} + E_{\text{HSA}}$, where E_{bind} is the ligand protein interaction energy.

^b MIC: minimum inhibitory concentration.

^c NT: not tested.

^d NI: not inhibitory on tested concentrations.

^e Data from Silva and colleagues [17].

experiments indicated partial inhibition (40%) of VGL edematogenic effect (0.35 ± 0.05 AUC) in response to the association of VGL and galactose (0.22 ± 0.03 AUC) (Fig. 6c). This partial inhibition could be explained by the involvement of other binding sites on the molecule, such as metal or hydrophobic cavity [42,43]. Alternatively, the lectin would have high affinity for *N*- and *O*-glycans, present in the cell membrane, despite of the high galactose concentration used in the reversion assay. Attempting to confirm VGL capacity of interactions with glycoproteins a total of 13 glycans, 6 *N*- and 7 *O*-glycans, were chosen for docking based primarily on its relevance and relative high presence in glycoproteins. Best docking poses and scores are shown in Fig. S5 and Table 1 respectively. Among *N*-glycans, complex type presenting galactosyl terminal moieties demonstrated favorable interactions with the lectin (CPLX1 score: -53.65) (Fig. 7A) but the addition of a sialic acid moiety reduced the score drastically (CPLX2 Score: -35.03) due to galactosyl capping. Similarly, hybrid *N*-glycans presenting galactose in terminal region interact strongly with VGL (HBRD2 Score: -52.28) differently to that occurs with its sialylated counterpart (HBRD1 Score: 9.60). Unsurprisingly high-mannose type did not show important interactions in CRD.

Sugar sequences found in glycoproteins normally share a common core, in case of *N*-glycans Man α 1–6 (Man α 1–3)Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1–Asn-X-Ser/Thr [44] and are classified in three types: high-mannose, in which only mannose residues are attached to the core, like man5 and man9 used in the present study. Man5 is precursor of several high-mannose glycans, while man9 is found in a number of glycoproteins including insulin receptor and HIV gp120 [31,45,46], other potential therapeutic targets.

Complex type *N*-glycans, in which branches initiated by *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) are attached to the core, being not uncommon the subsequent addition of galactose residues in β 1–4

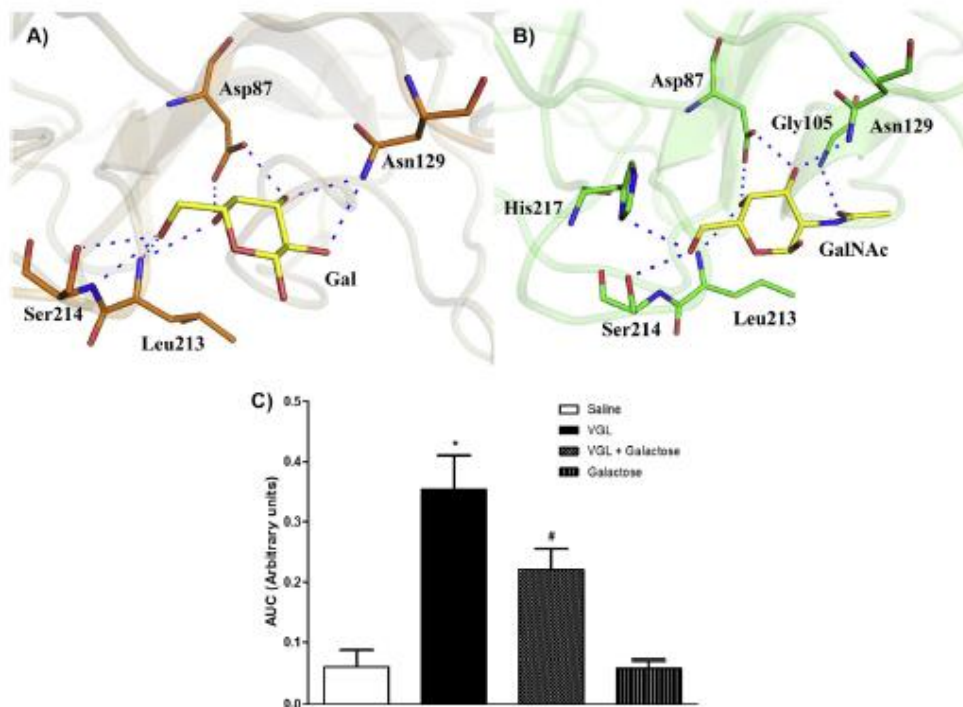


Fig. 6. CRD mediates VGL edematogenic effect. Representation of carbohydrate-recognition domain of VGL in complex with (a) α -galactose and (b) *N*-acetyl- α -galactosamine. Blue dashes represent polar contacts. (c) Inhibition of VGL-induced edema (1 mg/kg; s.c.) by galactose (0.1 M). Mean \pm S.E.M. (n = 5–6). * p < 0.05 vs. saline # p < 0.05 vs. VGL.

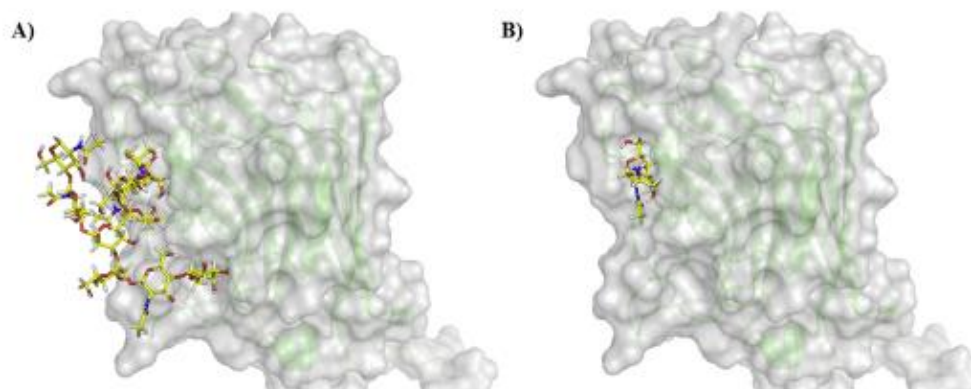


Fig. 7. Best docking poses of VGL complexed with A) CPLX1 glycan and B) Tn antigen.

bond with GlcNAc, named N-acetylglucosamine (GlcNAc). Poly-LacNAc chains are found in glycans in various cell types and may serve as scaffold for insertion of specific glycosyl moieties [31]. Alternatively, formation of GalNAc β 1–4GlcNAc branches are also present in several structures [47]. Complex glycan CPLX1 presents LacNAc and fucosylated GalNAc β 1–4GlcNAc branches, while CPLX2 has similar structure to CPLX1 with LacNAc galactosyl terminal capped by a sialic acid.

Hybrid N-glycans have branches with unsubstituted mannose residues and others with GlcNAc linkage [48], HBRD1 glycan presents the mannose residues branch and a sialic acid capped LacNAc branch, while HBRD2 have similar structure with uncapped galactosyl moiety.

Among O-glycans, docking revealed that, similar to VML [8,9], VGL possibly interacts with tumour-associated antigens T and Tn (Scores: –52.00 and –44.08), best pose of Tn antigen is shown in Fig. 7B, indicating a possible application in cancer research. Results also revealed very favorable interactions with O-glycans extended cores with exception of extended core 3.

O-glycans are important post-translational modification of mammalian proteins. Usually these glycans are linked via N-acetylglucosamine (GlcNAc) moiety to a serine or threonine residue [32]. Among the tested glycans, Tn antigen (GalNAcSer/Thr) and T antigen (Gal β 1–3GalNAcSer/Thr) were chosen based on its importance in cancer studies and prevalence as cores of O-glycans [32,49,50]. Other chosen sugars include Excore1 that contains sialic acid capped LacNAc branch and are found in many glycoproteins and mucins, excore2 that contains a branching GlcNAc attached to core 1 and are found in both glycoproteins in specific cells and tissues, excore3 and excore4 that contains some LacNAc branches and are found in mucins of certain mucin-secreting tissues [51–53].

Most of biological activities triggered by lectins occur due to interaction between proteins and molecular targets via glycosyl residues [54–57] and together, these results suggest that VGL is capable of binding to O-glycans due to favorable docking scores and interactions suggestive of high specificity for this glycan type, while for N-glycans, the lectin binds to preferentially those possessing galactose as terminal residue. It is likely that the molecular target of VGL in order to elicit the edematogenic effect is a glycosylated protein presenting galactosyl moieties on its terminal regions or common types of O-glycans.

4. Conclusion

The theoretical three-dimensional structure of *Vatairea*

guianensis lectin (VGL) presents high similarity with *Vatairea macrocarpa* lectin (VML). VGL elicited edematogenic activity, involving prostaglandins, IL-1 β and CRD. *In silico* tests demonstrated the binding capacity of VGL with galactosides and important N- and O-glycans, corroborating with the hypothesis that VGL interaction with glycosylated molecular targets are one of the main factors responsible for its *in vivo* effects.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

All procedures performed in animals were in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted – UECE Institutional Ethical Committee (UECE No. 10130208-8/40).

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). B.S.C., K.S.N., and A.M.S.A. are senior investigators of CNPq. David Martin helped with the English editing of the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.008>.

References

- [1] H.S. Gabius, S. Gabius, *Glycoscience: Status and Perspectives*, WILEY-VCH Verlag, 1997.
- [2] A.G. Rothfuchs, E. Roffe, A. Gibson, et al., Mannose-binding lectin regulates host resistance and pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*, *PLoS One* 7 (11) (2012) e47835.
- [3] B.S. Cavada, T. Barbosa, S. Arruda, et al., Revisiting proteins: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins, *Curr. Protein Pept. Sci.* 2 (2) (2001) 123–135.

- [4] A. Loris, A. Imberly, S. Beeckmans, et al., Crystal structure of *Pterocarpus angolensis* lectin in complex with glucose, sucrose, and turanose, *J. Biol. Chem.* 278 (18) (2003) 16297–16303.
- [5] A.C. Almeida, V.J.S. Osterne, M.Q. Santiago, et al., Structural analysis of *Centrobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (596) (2016) 73–83.
- [6] R.G. Benevides, G. Ganne, R.C. Simões, et al., A lectin from *Platygodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans, *J. Biol. Chem.* 287 (31) (2012) 26352–26364.
- [7] R. Banerjee, S.V. Mande, V. Ganesh, et al., Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 227–231.
- [8] B.L. Sousa, J.C. Silva-Filho, P. Kumar, et al., High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 59 (2015) 103–110.
- [9] B.L. Sousa, J.C. Silva-Filho, P. Kumar, et al., Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: a new tool for cancer research, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 72 (2016) 27–39.
- [10] N.M.N. Alencar, E.H. Teixeira, A.M.S. Assreuy, et al., Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment, *Mediat. Inflamm.* 8 (2) (1999) 107–113.
- [11] N.M.N. Alencar, C.F. Cavalcante, M.P. Vasconcelos, et al., Antiinflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis, *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (7) (2005) 919–922.
- [12] M.H. Napimoga, B.S. Cavada, N.M. Alencar, et al., *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hyperalgesia by inhibiting cytokine and chemokines production, *Int. Immunopharmacol.* 7 (6) (2007) 824–835.
- [13] A.F. Pires, N.V. Rodrigues, P.M. Soares, et al., A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice, *Inflamm. Res.* 65 (1) (2016) 43–52.
- [14] N.M.N. Alencar, A.M.S. Assreuy, V.B. Alencar, et al., The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (12) (2003) 1674–1681.
- [15] N.M.N. Alencar, A.M.S. Assreuy, D.N. Criddle, et al., *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration, *Protein Pept. Lett.* 11 (2) (2004) 195–200.
- [16] N.M.N. Alencar, A.M.S. Assreuy, A. Havt, et al., *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators, *Nahrungsmittelforschung Arch. Pharmacol.* 374 (4) (2007) 275–282.
- [17] H.C. Silva, C.S. Nagano, L.A.G. Souza, et al., Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect, *Process Biochem.* 47 (12) (2012) 2347–2355.
- [18] E.C. Landucci, E. Antunes, J.L. Donato, et al., Inhibition of carrageenan-induced rat paw oedema by conatopin, a polypeptide complexed with phospholipase A2, *Br. J. Pharmacol.* 114 (3) (1995) 578–583.
- [19] R.F.G. Feitosa, G.B. Melgades, A.M.S. Assreuy, et al., The pharmacological profile of ovalbumin-induced paw oedema in rats, *Mediat. Inflamm.* 11 (3) (2002) 155–163.
- [20] M. Chaudhary, A.R. Gadgil, G. Vidhale, M.P. MankarGadgil, et al., Comparison of myofibroblasts expression in oral squamous cell carcinoma, verrucous carcinoma, high risk epithelial dysplasia, low risk epithelial dysplasia and normal oral mucosa, *Head Neck Pathol.* 6 (3) (2012) 305–313.
- [21] D.W.A. Buchan, F. Minneci, T.C.O. Nugent, et al., Scalable web services for the PSIPRED protein analysis Workbench, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 340–348.
- [22] B. Webb, A. Sali, Comparative protein structure modeling using MODELLER, *Curr. Protoc. Protein Sci.* 86 (2016), 2.9.1–2.9.37.
- [23] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, et al., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283–291.
- [24] R. Lüthy, J.J. Bowie, D. Eisenberg, Assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Nature* 356 (1992) 83–85.
- [25] P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models, *Bioinformatics* 27 (2011) 343–350.
- [26] P. Benkert, M. Kunzli, T. Schwede, QMEAN server for protein model quality estimation, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 510–514.
- [27] P. Benkert, S.C.E. Tosatto, D. Schomburg, QMEAN: a comprehensive scoring function for model quality assessment, *Proteins* 71 (2008) 261–277.
- [28] The Pubchem Project <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2017 (Accessed 18 May 2017).
- [29] O. Korb, T. Stützel, T.E. Exner, Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 84–96.
- [30] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, IUGLIPLOT: a program to generate schematic diagram of protein-ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127–134.
- [31] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi, Chapter 8: N-Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, et al. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, second ed., Cold Spring Harbor, New York, 2009.
- [32] I. Brodtkausen, H. Schachter, P. Stanley, Chapter 9: O-GalNAc glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, et al. (Eds.), *Essentials of Glycobiology*, second ed., Cold Spring Harbor, New York, 2009.
- [33] B.L. Parker, M. Thaysen-Andersen, N. Solis, et al., Site-specific glycan-peptide analysis for determination of N-glycoproteome heterogeneity, *J. Proteome Res.* 12 (12) (2013) 5791–5800.
- [34] Glycan-Web, carbohydrate builder, <http://glycam.org/tools/molecular-dynamics/oligosaccharide-builder/build-glycan?id=1>, 2017 (Accessed 18 May 2017).
- [35] D.A. Case, T.A. Darden, T.E. Cheatham, et al., AMBER 12, University of California, San Francisco, 2012.
- [36] K.N. Kirschner, A.B. Yongye, S.M. Tschampel, et al., GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field, *Carbohydrates, J. Comput.* 29 (4) (2008) 622–655.
- [37] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, et al., Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 727–748.
- [38] D. Salvemini, Z.Q. Wang, P.S. Wyatt, et al., Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 4 (1996) 829–838.
- [39] S. Nikolau, J. Bauditz, P. Gionchetti, et al., Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear neutrophils and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation, *Gut* 42 (1998) 470–476.
- [40] A.M.S. Assreuy, M.D. Shibuya, G.J. Martins, et al., Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans, *Mediat. Inflamm.* 6 (1997) 201–210.
- [41] K.V. Brinda, A. Surofia, S. Vishveshwara, Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins, *Biochem. J.* 39 (2005) 1–15.
- [42] J.K. Dam, B.S. Cavada, T.B. Grangeiro, et al., Diodeinase lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12082–12088.
- [43] R. Loris, F. Casset, J. Bouckaert, et al., The monosaccharide binding site of lentil lectin: an X-ray and molecular modelling study, *Glycoconj. J.* 11 (6) (1994) 507–517.
- [44] S.S. Priho, C.A. Reis, Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications, *Nat. Rev. Cancer* 15 (9) (2015) 540–555.
- [45] A.P. Cornfield, Structure/function of O-glycans, in: *encyclopedia of genetics, genomics, Proteomics Bioinformatics* 3 (3) (2005), 5:65.
- [46] J. Mitoma, B. Pełczyński, N. Hiraoka, et al., Extended core 1 and core 2 branched O-glycans differentially modulate sialyl Lewis X-type L-selectin ligand activity, *J. Biol. Chem.* 278 (11) (2003) 9953–9961.
- [47] A. Guzman-Aranquez, P. Arques, Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface, *Ocul. Surf.* 8 (1) (2010) 8–17.
- [48] V.R. Pinto-Junior, M.Q. Osterne VJS Santiago, et al., Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds: crystal structure, molecular docking and dynamics, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 12–23.
- [49] H. Yao, X. Xie, Y. Li, Legume lectin FRL preserves neural progenitor cells in suspension culture in vitro, *Clin. Dev. Immunol.* 2008 (2008) 531317.
- [50] D.O. Croci, J.P. Gerliani, T. Dalotto-Moreno, et al., Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors, *Cell* 156 (4) (2014) 744–758.
- [51] G.A. Bezerra, R. Viertelmayr, T.R. Moura, et al., Structural studies of an anti-inflammatory lectin from *Canavalia boliviana* seeds in complex with dimannosides, *PLoS One* 9 (5) (2014) e97015.
- [52] E. Bieberich, Synthesis, processing, and function of N-glycans in N-glycoproteins, *Adv. Neurobiol.* 9 (2015) 47–70.
- [53] L.G. Sparrow, M.C. Lawrence, J.J. Gorman, et al., N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure, *Proteins* 71 (1) (2008) 426–439.
- [54] S. Sirois, M. Touaibia, K.C. Chou, et al., Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine, *Curr. Med. Chem.* 14 (30) (2007) 3332–3342.
- [55] D.H. Van den Eijnden, A.P. Neelaman, H. Bakker, et al., Novel pathways in complex-type oligosaccharide synthesis. New vistas opened by studies in invertebrates, *Adv. Exp. Med. Biol.* 435 (1998) 3–7.
- [56] B. Schiller, A. Hykollari, S. Yan, Complicated N-linked glycans in simple organisms, *Biol. Chem.* 393 (8) (2012) 661–673.
- [57] K. Mariño, J. Bones, J.J. Kattila, et al., A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze, *Nat. Chem. Biol.* 6 (10) (2010) 713–723.