



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

VANIR REIS PINTO JÚNIOR

ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE DLYL, UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth, E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO
CITOTÓXICO CONTRA GLIOMA

FORTALEZA

2019

VANIR REIS PINTO JÚNIOR

ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE DLYL, UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth, E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO
CITOTÓXICO CONTRA GLIOMA

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

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Coorientadora: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

FORTALEZA

2019

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)

- P732a Pinto Júnior, Vanir Reis.
Análise da estrutura cristalográfica de DlyL, uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth, e avaliação do seu efeito citotóxico contra glioma / Vanir Reis Pinto Júnior. – 2019.
119 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. DlyL. 2. Estrutura tridimensional. 3. Docking molecular. 4. N-glicanos. 5. Glioma. I. Título.
CDD 660.6
-

VANIR REIS PINTO JÚNIOR

ANÁLISE DA ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA DE DLYL, UMA LECTINA DE
SEMENTES DE *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth, E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO
CITOTÓXICO CONTRA GLIOMA

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

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Gil de Aquino Farias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz André Cavalcante Brizeno
Universidade Christus (UNICHRISTUS)

Dra. Maria Gleiciane de Queiroz Martins
Centro Universitário INTA (UNINTA)

Dra. Mayara Torquato Lima da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a vida e pelas vitórias e bençãos que tem me proporcionado.

Aos meu pais, Vanir Reis Pinto e Maria do Socorro Viana Reis, por todo o amor, companheirismo, educação, saúde, e por todos os momentos de felicidade que tivemos juntos, essa é mais uma conquista que dedico a vocês, não só por terem me dado a vida, mas também por sempre se importarem com minha educação e essa vitória é um reflexo disso. Amo vocês.

Agradecimento especial a minha namorada, Mayara Queiroz de Santiago, que sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e tristes, por sempre ser companheira, amorosa e carinhosa. Nós nos formamos juntos, do Ensino Médio até o Mestrado, seguindo a mesma profissão, e sou muito feliz de ter você ao meu lado, tanto na vida pessoal, quanto a profissional, te amo muito, e que venham mais conquistas para nós.

Agradeço a toda minha grande família que tem me apoiado em vários momentos de minha vida, proporcionando ótimos momentos quando estamos juntos, grande abraço para todos. Um agradecimento especial a minha Avó Paterna, Glycia Haydée Reis Pinto, e meu padrinho Wilson Reis Pinto, por todo amor e apoio em vários momentos difíceis, sem vocês isso não seria possível, amo muito vocês.

A minha Tia Ivonete Viana e Silva, por todo apoio que você me deu na minha educação, que sempre acreditou em mim, nunca esquecerei da senhora, sempre estará no coração de todos.

Aos todos meus amigos, em especial Vinicius Osterne e Adolph Barreto, pelos momentos de diversão e companheirismo, formamos uma boa equipe juntos, tanto nos momentos de diversão, como também no trabalho.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada e Profa. Dra, Kyria Santiago do Nascimento, por ter me dado a oportunidade de iniciar minha carreira científica, por todo apoio e conhecimento proporcionado e pela ótima orientação durante a Graduação até o Doutorado.

A todos os colegas do BioMol-LAB, que me deram suporte em toda jornada, trocando informações, conhecimento e momentos de descontração.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Unir-se é um bom começo, manter a união é um progresso, e trabalhar em conjunto é a vitória.”

Henry Ford

RESUMO

As lectinas são uma classe de proteínas ou glicoproteínas de ligação a carboidratos com diversas especificidades e funções. A determinação e caracterização das estruturas tridimensionais dessas proteínas são fundamentais para a compreensão de seus efeitos biológicos. Estudos recentes exploraram o potencial anticâncer das lectinas de Diocleinae (da família *Leguminosae*), avaliando seu efeito antiproliferativo e sua capacidade de induzir a morte das células de glioma por apoptose e autofagia. Neste trabalho, a estrutura tridimensional da lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) complexada com Xman (5-bromo-6-cloro-3-indolil- α -D-manopiranosídeo) foi determinada por cristalografia de raios-X. Além disso, as interações com os *N*-glicanos relevantes foram avaliadas por *docking* molecular. DlyL apresentou o motivo *jellyroll*, e o sítio de ligação à metais (MBS) e o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) foram determinados e caracterizados. As simulações de *docking* molecular indicaram que o DlyL interage favoravelmente com os *N*-glicanos presentes na superfície de células, especialmente os do tipo complexo e híbrido, diferentemente das lectinas de Diocleinae estudadas anteriormente. DlyL também mostrou potencial antitumoral contra células de glioma C6 de rato, prejudicando a migração celular, induzindo autofagia e morte celular via ativação da caspase 3. Esses resultados indicam que pequenas diferenças estruturais entre as lectinas de Diocleinae podem, por sua vez, resultar em modulação diferencial dos processos de autofagia e apoptose celular.

Palavras-chaves: DlyL. Estrutura tridimensional. *Docking* molecular. *N*-glicanos. Glioma.

ABSTRACT

Lectins are a class of carbohydrate-binding proteins or glycoproteins with diverse specificities and functions. The determination and characterization of the three-dimensional structures of these proteins are keys to understanding their biological effects. Recent studies have explored the anticancer potential of Diocleinae lectins (from *Leguminosae* family), evaluating their antiproliferative effect and their ability to induce glioma cell death via apoptosis and autophagy. In this work, the three-dimensional structure of *Dioclea lasiophylla* seed lectin (DlyL) complexed with Xman (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- α -d-mannopyranoside) was determined by X-ray crystallography. Moreover, interactions with relevant N-glycans were evaluated by molecular docking. DlyL presented the jellyroll motif, and both metal binding site (MBS) and carbohydrate-recognition domain (CRD) were determined and characterized. Molecular docking simulations indicated that DlyL interacts favorably with N-glycans present in cell surfaces, especially those of the complex and hybrid types, unlike previously studied Diocleinae lectins. DlyL also showed antitumor potential against rat C6 glioma cells impairing cell migration, inducing autophagy and cell death via activation of caspase 3. These results indicate that small structural differences among Diocleinae lectins can, in turn, result in differential modulation of autophagy and cell apoptosis processes.

Keywords: DlyL. Three-dimensional structure. Molecular docking. N-glycans. Glioma.

LISTA DE FIGURAS

| | | | |
|-----------|---|--|----|
| Figura 1 | – | Representação da classificação estrutural dos quatro tipos de lectinas de plantas..... | 24 |
| Figura 2 | – | Classificação das lectinas vegetais..... | 25 |
| Figura 3 | – | Conformação de um monômero de lectina de leguminosa (<i>jellyroll</i>)..... | 31 |
| Figura 4 | – | Representação esquemática do processo de permutação circular de lectinas do tipo ConA..... | 39 |
| Figura 5 | – | Fotos da inflorescência e de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i> | 40 |
| Figura 6 | – | Representação da estrutura dos glicanos que foram utilizados no <i>docking</i> molecular..... | 48 |
| Figura 7 | – | Avaliação da purificação de DlyL. A) Perfil cromatográfico; B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE..... | 53 |
| Figura 8 | – | Representação em cartoon da sobreposição entre DlyL (em azul), DvirL (PDB id: 3RS6, em vermelho) e DguiL (PDB id: 1H9P, em verde)..... | 56 |
| Figura 9 | – | Região de alça entre os resíduos 114-125 de DlyL com o mapa de densidade de elétrons (2mFo-dFc) contornado em 1σ . As cadeias polipeptídicas superpostas são representadas na representação cartoon com DlyL (em azul), DvirL (em vermelho) e DguiL (em verde)..... | 57 |
| Figura 10 | – | A) Interações interdiméricas no tetrâmero de DlyL. A cavidade central é indicada com caixa vermelha e a região periférica com caixa verde. B) Interações na cavidade central; C) Interações em regiões periféricas..... | 58 |
| Figura 11 | – | A) Interações interdiméricas no tetrâmero de DlyL. A cavidade central é indicada com caixa vermelha e a região periférica com caixa verde. B) Interações na cavidade central; C) Interações em regiões periféricas..... | 59 |
| Figura 12 | – | Alinhamento de lectinas da subtribo Diocleinae..... | 60 |
| Figura 13 | – | A) monômero DlyL na representação cartoon; B) sítio de ligação à metais de DlyL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) de 3σ em torno de Ca^{2+} (esfera verde), Mn^{2+} (esfera roxa) e moléculas de água (esferas | |

| | | |
|-----------|--|----|
| | vermelhas); C) domínio de reconhecimento à carboidratos de DlyL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) de 3σ em torno do Xman. A molécula X-man está na representação de esqueleto carbônico com carbonos coloridos em amarelo..... | 61 |
| Figura 14 | – Representações LIGPLOT de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de coordenação em torno de A) Ca^{2+} , B) Mn^{2+} e C) Xman..... | 62 |
| Figura 15 | – Sítio de ligação à metais de DlyL com as interações de coordenação em torno dos íons cálcio e manganês..... | 63 |
| Figura 16 | – Representação da estabilização de resíduos de CRD pelo íon cálcio. As esferas representam o íon cálcio (em verde) e a molécula de água (em vermelho)..... | 65 |
| Figura 17 | – DlyL complexada com N-glicanos a partir dos resultados de docking. As cadeias polipeptídicas são representadas na representação de cartoon e em superfície cinza. Os glicanos estão na representação de esqueletos carbônicos. DlyL complexada com A) Complexo1, B) Híbrido1, C) Man5..... | 66 |
| Figura 18 | – DlyL complexada com N-glicanos a partir dos resultados de docking. As cadeias polipeptídicas são representadas na representação de cartoon e em superfície cinza. Os glicanos estão na representação de esqueletos carbônicos. DlyL complexada com A) Complexo2; B) Híbrido 2; C) Man3; D) Man9..... | 67 |
| Figura 19 | – O tratamento com DlyL altera a morfologia das células de glioma C6. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo (HEPES; controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por 3, 6, 12, 24 ou 48 h, seguidas de análise da morfologia celular. As células foram avaliadas pelo microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U por microscopia óptica (10 \times), e as imagens são representativas de três experimentos independentes realizadas em triplicata. As barras brancas representam 100 μm | 70 |

- Figura 20 – DlyL altera a viabilidade e morfologia celular. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo (HEPES; controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 ou 48 h. (A) é uma imagem representativa de quatro experimentos independentes realizados em triplicata, e mostra a morfologia celular, avaliada por microscopia óptica, em resposta à exposição à DlyL (24 e 48 h). As células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (10 \times). (B) mostra a viabilidade celular medida pelo ensaio MTT após tratamento com DlyL por 24 h e 48 h, respectivamente. Os dados são expressos como uma porcentagem de controle (considerado 100%), e os valores são apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. **** $p < 0,0001$, em comparação ao controle..... 71
- Figura 21 – DlyL altera o nível de ERO, mas não modificou o potencial da membrana mitocondrial. As células de glioma C6 foram expostas (3 e 6 h) ao veículo (HEPES; controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (A) e (B) mostram níveis de ERO avaliados pelo corante fluorescente di-hidrorodamina (DCF-DA) após 3 e 6 h de tratamento, respectivamente. (C) e (D) mostram o potencial mitocondrial avaliado por sonda fluorescente de éster etílico (TMRE) após 3 e 6 h de tratamento, respectivamente. Os dados são expressos como uma porcentagem de controle e os valores são apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ 72
- Figura 22 – DlyL ativa Caspase-3. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6 h, seguidas pela medição da atividade da Caspase 3. O gráfico demonstra a atividade da Caspase 3 após 6 h de tratamento com veículo (NC) ou DlyL. O controle positivo (PC) foi realizado com estaurosporina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados são expressos como uma porcentagem de controle e os valores são apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, em comparação ao controle..... 73
- Figura 23 – DlyL induz lesão na membrana celular do glioma C6. As células de glioma C6 foram incubadas com veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50

e 100 µg/mL) por 24 h ou 48 h. As células foram coradas com Hoechst e iodeto de propídio (IP). Posteriormente, as células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (10×). A figura mostra uma imagem representativa e quantificação da coloração de IP por 24 h (A) e 48 h (B) após o tratamento. As imagens são representativas de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação foi expressa como uma porcentagem da fluorescência IP/Hoechst, e os valores são apresentados como média ± EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas. ** p <0,01 *** p <0,001 ou **** p <0,0001, em comparação ao controle..... 73

Figura 24 – DlyL melhora a detecção de organelas vesiculares ácidas (OVAs) em células de glioma C6. A figura mostra imagens representativas e quantificação da coloração com laranja de acridina das células de glioma C6 após incubação com veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 µg/mL) por 24 h (A) e 48 h (B). Cromatina (CR) e organelas da vesícula ácida (OVA) foram identificadas como coloração verde e vermelha, respectivamente. As células positivas para OVA (vermelhas) representam autofagia, e a sobreposição de OVA e CR é apresentada como CR + OVA. As células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (ampliação de 10x). A quantificação foi expressa como uma porcentagem de OVA/CR, e os valores são apresentados como média ± EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicado. *** p <0,001 ou **** p <0,0001, em comparação ao controle..... 75

Figura 25 – Efeito inibitório do DlyL na migração celular de glioma C6. As células foram plaqueadas em uma placa de 48 poços na concentração de 1,5 x 10⁴ células por poço e cultivadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e uma ferida foi introduzida raspando as camadas celulares confluentes com uma ponta de pipeta P200, seguida de lavagem com PBS. Posteriormente, DMEM isento de soro contendo veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50 ou 100 µg/mL) foi adicionado e as células foram mantidas nessas condições por

48 h. As imagens foram adquiridas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (ampliação de 5×) nos períodos de 0, 24 e 48 h após os tratamentos. As linhas definem a área sem células. O gráfico mostra a magnitude da inibição da migração celular por DlyL. Para quantificação, a ferida foi medida (distância em mm entre as bordas) em cada momento e o valor expresso é uma porcentagem do fechamento total (100%). As barras representam 200 µm. Os valores são expressos como média ± EPM de quatro experiências independentes realizadas em triplicado. **** p <0,0001, em comparação ao controle..... 76

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|----------|---|--|----|
| Tabela 1 | – | Diferentes tipos de interface formados entre monômeros de lectinas de leguminosas..... | 32 |
| Tabela 2 | – | Dados coletados, refinamento e parâmetros de qualidade dos dados..... | 54 |
| Tabela 3 | – | Interações de Van der Waals e polares entre DlyL e Xman..... | 64 |
| Tabela 4 | – | Interações de DlyL com N-glicanos..... | 67 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | Considerações iniciais | 16 |
| 1.2 | Carboidratos e o glicocódigo | 18 |
| 1.3 | Histórico das lectinas | 19 |
| 1.4 | Definição de lectinas | 22 |
| 1.5 | Classificação de lectinas vegetais | 23 |
| 1.5.1 | <i>Amarantinas</i> | 26 |
| 1.5.2 | <i>Lectinas com especificidade à quitina</i> | 26 |
| 1.5.3 | <i>Lectinas do floema de Cucurbitaceae</i> | 27 |
| 1.5.4 | <i>Lectinas relacionadas a Jacalina</i> | 27 |
| 1.5.5 | <i>Lectinas de leguminosas</i> | 28 |
| 1.5.6 | <i>Lectinas de ligação à manose monocotiledôneas</i> | 28 |
| 1.5.7 | <i>Proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIP-2)</i> | 29 |
| 1.6 | Aspectos gerais de lectinas de leguminosas | 30 |
| 1.7 | Aplicação e atividades biológicas de lectinas | 34 |
| 1.8 | Efeito de lectinas contra células de câncer | 36 |
| 1.9 | Lectinas de Diocleinae | 38 |
| 1.10 | Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i> Mart. ex Benth | 40 |
| 1.11 | Glioma | 41 |
| 2 | OBJETIVOS | 44 |
| 2.1 | Objetivo geral | 44 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 44 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 45 |
| 3.1 | Coleta de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i> | 45 |
| 3.2 | Purificação da lectina de sementes de <i>Dioclea lasiophylla</i> | 45 |
| 3.3 | Cristalização de DlyL | 45 |
| 3.4 | Coleta e processamento de dados de raios-X | 46 |
| 3.5 | Determinação e análise da estrutura de DlyL | 46 |
| 3.6 | Docking molecular | 47 |
| 3.7 | Atividade citotóxica de DlyL em células de glioma da linhagem C6 | 48 |
| 3.7.1 | <i>Cultura de linha celular e tratamento com DlyL</i> | 48 |
| 3.7.2 | <i>Microscopia óptica</i> | 49 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.7.3 | <i>Ensaio MTT</i> | 49 |
| 3.7.4 | <i>Detecção de produção ROS</i> | 49 |
| 3.7.5 | <i>Ensaio TMRE</i> | 50 |
| 3.7.6 | <i>Ensaio Caspase-3</i> | 50 |
| 3.7.7 | <i>Ensaio de microscopia de fluorescência com laranja de acridina</i> | 51 |
| 3.7.8 | <i>Ensaio de microscopia de fluorescência com iodeto de propídio</i> | 51 |
| 3.7.9 | <i>Ensaio de migração</i> | 52 |
| 3.7.10 | <i>Análise estatística</i> | 52 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 53 |
| 4.1 | Purificação de DlyL | 53 |
| 4.2 | Estrutura cristalográfica de DlyL | 53 |
| 4.3 | Sítios de ligação de DlyL | 61 |
| 4.4 | Docking molecular | 65 |
| 4.5 | Efeito do DlyL nas células de glioma C6 de rato | 70 |
| 5 | CONCLUSÃO | 79 |
| | REFERÊNCIAS | 80 |
| | ANEXO A - CAPA DE ARTIGO 1 | 96 |
| | ANEXO B - CAPA DE ARTIGO 2 | 97 |
| | ANEXO C - CAPA DE ARTIGO 3 | 98 |
| | ANEXO D - CAPA DE ARTIGO 4 | 99 |
| | ANEXO E - CAPA DE ARTIGO 5 | 100 |
| | ANEXO F - CAPA DE ARTIGO 6 | 101 |
| | ANEXO G - CAPA DE ARTIGO 7 | 102 |
| | ANEXO H - CAPA DE ARTIGO 8 | 103 |
| | ANEXO I - CAPA DE ARTIGO 9 | 104 |
| | ANEXO J - CAPA DE ARTIGO 10 | 105 |
| | ANEXO K - CAPA DE ARTIGO 11 | 106 |
| | ANEXO L - CAPA DE ARTIGO 12 | 107 |
| | ANEXO M - CAPA DE ARTIGO 13 | 108 |
| | ANEXO N - CAPA DE ARTIGO 14 | 109 |
| | ANEXO O - CAPA DE ARTIGO 15 | 110 |
| | ANEXO P - CAPA DE ARTIGO 16 | 111 |
| | ANEXO Q - CAPA DE ARTIGO 17 | 112 |

| | |
|--|-----|
| ANEXO R - CAPA DE ARTIGO 18 | 113 |
| ANEXO S - CAPA DE ARTIGO 19 | 114 |
| ANEXO T - CAPA DE ARTIGO 20 | 115 |
| ANEXO U - CAPA DE ARTIGO 21 | 116 |
| ANEXO V - CAPA DE ARTIGO 22 | 117 |
| ANEXO W - CAPA DE ARTIGO 23 | 118 |
| ANEXO X - CAPA DE ARTIGO 24 | 119 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações iniciais

Os carboidratos são a classe de macromoléculas mais abundantes da natureza e mais complexas, com grande variedade estrutural. Essa classe de moléculas pode ser encontrada na sua forma mais simples, que são os monossacarídeos (exemplos: glicose e galactose), como também em suas formas mais complexas, como oligossacarídeos (exemplo: glicanos) e polissacarídeos (exemplos: amido e glicogênio) (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). As interações específicas que ocorrem nos seres vivos envolvendo proteínas e carboidratos mediadas por proteínas que se ligam à glicanos (PLG), tem sido o foco de muitos estudos dentro da área da glicobiologia para explicar eventos biológicos, como mecanismos de infecção viral, inflamação, imunidade, câncer, além de outros com importância fisiológica (CUMMINGS, 2019; MÉNDEZ-HUERGO; BLIDNER; RABINOVICH, 2017; THOMPSON; DE VRIES; PAULSON, 2019). Em glicoproteínas, os glicanos tem duas funções, sendo uma delas a de guardar informação que é codificada por sua estrutura, que eventualmente será lida por PLG's e é importante para mecanismos de sinalização molecular. A outra função é sua influência direta na proteína na qual está conjugada, que pode influenciar na conformação de sua estrutura tridimensional, estabilidade e localização celular, desse modo, regulando sua atividade (CUMMINGS, 2019; CUMMINGS; PIERCE, 2014). Alterações nos padrões de glicosilação, ou seja, modificações estruturais aberrantes ou não comuns, em algumas glicoproteínas presentes na superfície de células, estão relacionados a muitas doenças como fibrose hepática, imunodeficiência, anomalias cardíacas e o câncer (FREIRE-DE-LIMA; PREVIATO; MENDONÇA-PREVIATO, 2016; REILY *et al.*, 2019).

Dentro do grupo das PLG's estão as lectinas, uma classe de proteínas capazes de se ligar a carboidratos específicos e de decifrar o “glicocódigo”, que é a informação contida nas estruturas dos glicanos. Portanto, essas proteínas demonstram ser potenciais ferramentas moleculares para estudo de eventos biológicos envolvendo processos de sinalização molecular mediados por carboidratos complexos. Essa propriedade permite a aplicação de lectinas em diversas áreas, como por exemplo, no diagnóstico de doenças via monitoramento das modificações na estrutura de glicanos de glicoproteínas celulares (DE OLIVEIRA FIGUEIROA *et al.*, 2017; HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017). Desse modo, essas moléculas podem ser empregadas em investigações de composição glicosídica da superfície

celular, podendo diferenciar tipos de células, como também atuar em processos de diferenciação, crescimento e agregação celular (SHARON; LIS, 2004).

Muitos estudos também estão relacionados a aplicação envolvendo lectinas em ensaios de atividades biológicas, a maioria elicitadas por sua capacidade de interagir com carboidratos, tais como: atividade cicatrizante, anti- ou pró-inflamatória vasorelaxante, nociceptiva, inseticida, antifúngica e antiviral (CAVADA *et al.*, 2018c; CORIOLANO *et al.*, 2014; FUJIMOTO; GREEN, 2012; FUQUA *et al.*, 2015; MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Devido a capacidade de lectinas de reconhecerem carboidratos específicos, elas têm atraído grande interesse em estudos estruturais para compreensão da sua especificidade com carboidratos objetivando explorá-las em várias aplicações biológicas e biotecnológicas. Alguns produtos farmacológicos a base de lectinas já estão sendo disponibilizados comercialmente, como pomada vaginal que previne infecções contra o vírus do HIV (BEAMAN *et al.*, 1996) e colunas que reduzem a carga viral de pacientes de Hepatite C (TULLIS *et al.*, 2009). Nos últimos anos, muitos trabalhos vêm demonstrando a capacidade dessas moléculas de reconhecerem antígenos glicosilados específicos (biomarcadores) de células cancerígenas, propriedade esta que as tornaram moléculas promissoras para diagnóstico e terapia na área de cancerologia (LUBKOWSKI *et al.*, 2017).

Na literatura, há trabalhos envolvendo a bioprospecção e caracterização estrutural dessas proteínas a partir de várias fontes biológicas, como vírus, bactérias e animais, sendo as mais estudadas as provindas de plantas (KUMAR *et al.*, 2012). Dentro do reino vegetal, podemos destacar as lectinas isoladas da família das leguminosas, especialmente as da subtribo Diocleinae. Já foram relatados dados de procedimentos de purificação, caracterização estrutural e as potencialidades de aplicação em atividades biológicas e biotecnológica (CAVADA *et al.*, 2018c).

Desse modo, o isolamento e a caracterização biológica e estrutural de novas lectinas sempre ganham destaque por possibilitar a descoberta de novas propriedades funcionais. Além disso, as bases moleculares de interação entre lectinas e glicoconjugados podem ser estudadas mais detalhadamente. Ferramentas de simulações de *docking* molecular podem enriquecer essas análises pois permitem análise de interação com vários ligantes, que provêm mais detalhes das interações entre os átomos do receptor e do ligante, conformação, estabilidade de ligação, contribuição energética, entre outros (SALMASO; MORO, 2018).

1.2 Carboidratos e o glicocódigo

Carboidratos são a classe de macromoléculas mais abundantes da natureza, compostas principalmente por carbono, oxigênio e hidrogênio, e uma das mais complexas com grande variedade estrutural, devido à inúmeras possibilidades de interligações e alto número de conformações que podem adotar (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012; SHARON; LIS, 2004). Durante muito tempo essas moléculas foram associadas à duas funções, fonte energética para os seres vivos e como componentes estruturais. Em relação a função estrutural, os carboidratos são moléculas altamente hidrofílicas e com alta carga eletrostática. Estas propriedades as permitem participar na estabilização estrutural, solubilização e na proteção de biomoléculas glicosiladas, como proteínas e lipídios, contra hidrólise enzimática (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012; OHTSUBO; MARTH, 2006). Na década de 60, alguns trabalhos demonstraram uma terceira função dos carboidratos que é a sinalização molecular. Devido à complexidade estrutural, essas moléculas podem ser ricas em informação, até mais que os ácidos nucleicos e são de fundamental importância em mecanismos de interação célula-célula e sinalização molecular intra e extracelular, sendo elementos determinantes em processos de reconhecimento em vários processos biológicos (CUMMINGS, 2019; REILY *et al.*, 2019).

Os carboidratos são covalentemente ligados a proteínas por um processo chamado de glicosilação, que é uma modificação pós-traducional que ocorre comumente em proteínas. No processo de *N*-glicosilação, um resíduo de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) é covalentemente ligado por uma ligação do tipo amida a um resíduo de asparagina em uma região Asn-X-Ser/Thr (X: qualquer aminoácido, exceto Prolina). A região é necessária para reconhecimento por enzimas, porém uma proteína possuir essa sequência, indica que a mesma possui potencial ou potenciais sítios de glicosilação, mas não significa que será obrigatoriamente glicosilada. Para glicanos *N*-ligados, quando a proteína recém-sintetizada entra no retículo endoplasmático (RE), o glicano é adicionado e processado, e posteriormente modificado no complexo de Golgi, gerando um dos três tipos de *N*-glicanos encontrados em proteínas maduras: complexo, híbrido e ricos em manose. *O*-glicosilações são modificações pós-traducionais em que os glicanos são ligados através de resíduos de *N*-acetil-D-galactosamina a um resíduo de serina ou treonina. *O*-glicanos são muito importantes para processos de sinalização em mamíferos. Padrões incomuns de glicosilação estão relacionados à processos inflamatórios, câncer e algumas doenças (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012; REILY *et al.*, 2019).

Carboidratos podem estar ligados covalentemente a proteínas, como também em lipídios, e estão presentes na superfície de células formando o chamado glicocálice. Essa região é muito importante para processos de sinalização celular e reconhecimento por outras células (ex: linfócitos), moléculas (ex: anticorpos, hormônios) e microorganismos invasores (ex: vírus e bactérias) (OHTSUBO; MARTH, 2006). Dessa forma, os carboidratos atuam como mensageiros entre células participando de fenômenos de proliferação, diferenciação e interações celulares em diversas condições fisiopatológicas. Alguns estudos já mostraram que a identificação de padrões anormais de glicosilação em células podem ser utilizados para diagnóstico de células cancerígenas (CUMMINGS, 2019; GABIUS *et al.*, 2015; PINHO; REIS, 2015).

A glicobiologia é área que estuda a estrutura e a biossíntese de carboidratos (cadeias de açúcar ou glicanos) que são amplamente distribuídos na natureza. A composição, sequência e organização estrutural desses glicanos é chamado de “glicocódigo”, no qual estão associados a um tipo de biomolécula ou célula (GABIUS *et al.*, 2015; MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012; VARKI, 2017). As características químicas dos carboidratos são ricas em informação. Os monômeros podem ser encontrados em duas formas enantioméricas, D- ou L, também podem se apresentar na forma de furanosídeos ou piranosídeos, são capazes de ligarem um ao outro por ligações α ou β -glicosídicas com diferentes combinações de átomos, além da sua capacidade de incluir pontos de ramificação a partir de monômeros simples. Desse modo, há muitas possibilidades de associação desses monossacarídeos quando formam oligossacarídeos ou polissacarídeos, o que acarreta em uma grande variabilidade de moléculas (WIEDERSCHAIN, 2013). Monitorar a distribuição e composição desses carboidratos em células e organismos é uma tarefa difícil e novas estratégias para esse tipo de análise permitirá um avanço no estudo da relação entre glicoconjugados e diversos processos biológicos complexos como mecanismos de sinalização, efeitos biológicos e até mesmo detectar processos patológicos de uma doença, como nível de estadiamento de células tumorais (PINHO; REIS, 2015; REILY *et al.*, 2019; WU; WONG, 2011).

1.3 Histórico das lectinas

A história das lectinas começou já no século XIX em que houve o primeiro relato sobre sua existência. Esse relato foi a tese de doutorado de Peter Hermann Stillmark, apresentada em 1888, em que isolou uma proteína, na qual a descreveu como extremamente

tóxica, a partir de sementes de mamona (*Ricinus communis*) e a nomeou de Ricina. Ao testar a reatividade de extratos dessa semente em eritrócitos, observou a formação de coágulos (VAN DAMME, 2014). Anteriormente a este trabalho, o mesmo grupo de Stillmark tinha avaliado a toxicidade de extratos de sementes de *Abrus precatorius*, porém somente em 1890, foi relatado por Hellin a capacidade desses extratos de aglutinar eritrócitos, determinando que era uma proteína e a nomeou de Abrina (SHARON; LIS, 2004). Esse fenômeno foi analisado em mais detalhes nos próximos anos.

O ano de 1891, foi um ano importante para área da imunologia, pois o pesquisador Paul Ehrlich conseguiu estabelecer princípios fundamentais da imunologia usando as proteínas Ricina e Abrina, relatando o princípio da reação antígeno/anticorpo, a transferência de imunidade passada de mãe para filho e o fenômeno de memória imunológica (SHARON; LIS, 2004). Elfstrand em 1898, utilizou pela primeira vez o termo “hemaglutinina”, utilizado para classificar todas as proteínas capazes de aglutinar células (VAN DAMME, 2014). Depois da descoberta da Ricina e Abrina, outras proteínas tóxicas foram identificadas e com capacidade de aglutinar eritrócitos. Porém, em 1907, os pesquisadores Karl Landsteiner e Raubitschek reportaram que extratos não tóxicos de sementes de plantas também eram capazes de aglutinar eritrócitos e até mesmo tinham especificidades por certos tipos de sangue. As espécies relatadas foram *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa* (ervilhaca) (VAN DAMME, 2014).

Nesta época, já se sabia da capacidade dessas proteínas de aglutinar eritrócitos, porém não se sabia quais propriedades eram responsáveis por essa atividade. Somente em 1950, dados referentes do mecanismo molecular responsável pelas atividades dessas proteínas foram relatados. Primeiramente, em 1919, James B. Sumner na Universidade Cornell (Ithaca, Nova York, purificou a primeira lectina vegetal a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) e a nomeou de Concanavalina A (ConA). Em 1936, Sumner e Howell relataram a primeira inibição de atividade de aglutinação de eritrócitos, de ConA, utilizando o açúcar extraído da cana (SUMNER; HOWELL, 1936). Entretanto, somente em 1952, que Watkins e Morgan demonstraram pela primeira vez que atividade de aglutinação das lectinas é devido a capacidade delas de reconhecerem carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos, provando assim que as lectinas possuíam atividade de ligação a carboidratos (WATKINS; MORGAN, 1952). Desde a descoberta da primeira lectina de plantas há mais de 100 anos, um número cada vez maior de lectinas de plantas tem sido relatado na literatura, impulsionado pela criação de diversas matrizes cromatográficas com carboidratos imobilizados (BARRE *et al.*,

2019; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998). Devido à sua abundância em sementes de leguminosas, bem como a maior presença de espécies no dia-dia da humanidade, a pesquisa de lectinas se concentraram bastante em lectinas de leguminosas há vários anos (SHARON; LIS, 2004). Outro motivo para o aumento do interesse em pesquisa com lectinas foi a descoberta da PHA, lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*, que apresentou atividade mitogênica para linfócitos (SHARON; LIS, 2004). Em pouco tempo, várias outras lectinas provaram ser mitogênicas, em especial, a descoberta que a Concanavalina A era mitogênica, pois sua atividade podia ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos como a manose. Esta descoberta forneceu indícios que a atividade mitogênica de lectinas era devido a reação entre a proteína e os carboidratos presentes na superfície dos linfócitos.

Para uma melhor compreensão das atividades biológicas das lectinas e seu grande potencial, pesquisas visaram analisar estruturalmente essas proteínas, até mesmo a nível molecular. Em 1972, a estrutura tridimensional de ConA foi determinada por cristalografia de raios X (BECKER *et al.*, 1975; HARDMAN; AINSWORTH, 1972). Na década de 1980, as pesquisas com lectinas vegetais se voltaram para os tecidos de armazenamento (especialmente cascas, rizomas, bulbos e cormos) como uma rica fonte de proteínas de ligação a carboidratos (VAN DAMME *et al.*, 1998). A extensão das sementes para outros tecidos vegetais permitiu que a lectinologia progredisse, uma vez que a purificação dessas lectinas resultou na descoberta de mais lectinas com uma grande variedade de estruturas moleculares e propriedades de ligação a carboidratos.

Na década de 1980, o foco da pesquisa em lectinas mudou para uma caracterização molecular, incluindo a determinação das sequências de aminoácidos dos polipeptídios da lectina e sua estrutura tridimensional (MOREIRA *et al.*, 1991). Em 1983, a primeira lectina foi clonada, em particular a lectina de soja (VODKIN; RHODES; GOLDBERG, 1983). A disponibilidade de amostras purificadas de lectina permitiu estudar tanto as propriedades físico-químicas quanto a atividade biológica das proteínas com mais detalhes. Ao longo dos anos, houve um progresso substancial na tecnologia disponível para, por exemplo, determinar a estrutura molecular da proteína e sua especificidade de ligação a carboidratos. Os avanços na bioquímica e na biologia molecular também determinaram o progresso das análises estruturais de proteínas, com o sequenciamento de aminoácidos de proteínas ou da clonagem molecular de cDNA's que codificam lectinas, pois são informações necessárias para desvendar a estrutura

tridimensional da lectina e seu domínio de reconhecimento à carboidratos (CRD) (BARRE *et al.*, 2019).

Muitas lectinas foram isoladas de diversas fontes biológicas e tiveram suas estruturas primárias e terciárias, bem como seus efeitos e aplicações biológicas determinados (BARRE *et al.*, 2019; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

1.4 Definição de lectinas

O termo aglutinina foi primeiramente proposto para denominar os extratos que possuíam capacidade de aglutinação de eritrócitos, porém não foi bem aceito por pesquisadores da área de imunologia, pois eram de origem vegetal. O termo “lectina”, derivado da palavra em latim “*legere*” (que significa escolher ou selecionar) foi sugerido por Boyd e Shapleight e se tornou mais apropriado, pois moléculas que aglutinam eritrócitos podem ser encontradas em quase todos os tecidos estudados (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Esse termo também foi aplicado para se referir ao fato de que as lectinas podem reconhecer e ligar especificamente a estruturas de carboidratos, e também a capacidade de distinguirem eritrócitos de diferentes tipos de sangue, ou seja, selecionar células.

Nos primeiros dias após o surgimento da área de estudo das lectinas, a lectinologia, a definição concentrava-se na capacidade das lectinas vegetais de aglutinar eritrócitos, desse modo, foi feita uma definição que englobava proteínas que continham dois ou mais domínios de reconhecimento à carboidratos, um requisito para a aglutinação. Na medida que novas lectinas foram sendo purificadas e caracterizadas, novas propriedades e características foram sendo observadas, o que levou a adaptações na definição dessa classe de proteínas. A descoberta de que existem lectinas com apenas um CRD e lectinas que possuem vários sítios, mas tem atividade hemaglutinante fraca, como também proteínas quiméricas que possuem dois domínios com atividades diferentes e sendo apenas um deles classificado como CRD, exigiram mudanças da definição dessas proteínas. Em 1995, Peumans e Van Damme criaram uma definição que até então é a mais utilizada e atende uma ampla gama de lectinas, e descreve as lectinas como “uma classe de proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico, que se liga reversivelmente a um mono- ou oligossacarídeo específico” (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME, 2014).

Porém, resultados mais recentes demonstram que é necessária uma atualização dessa definição, pois lectinas demonstraram interação com moléculas não-glicídicas, como por exemplo hormônios vegetais (DELATORRE *et al.*, 2007, 2013).

1.5 Classificação de lectinas vegetais

O grupo de Van Damme subdividiu as lectinas vegetais baseados em sua estrutura geral, quantidade de domínio e tipos de domínios, e as separou em quatro grupos: as merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 1) (VAN DAMME *et al.*, 1998; MISHRA *et al.*, 2019).

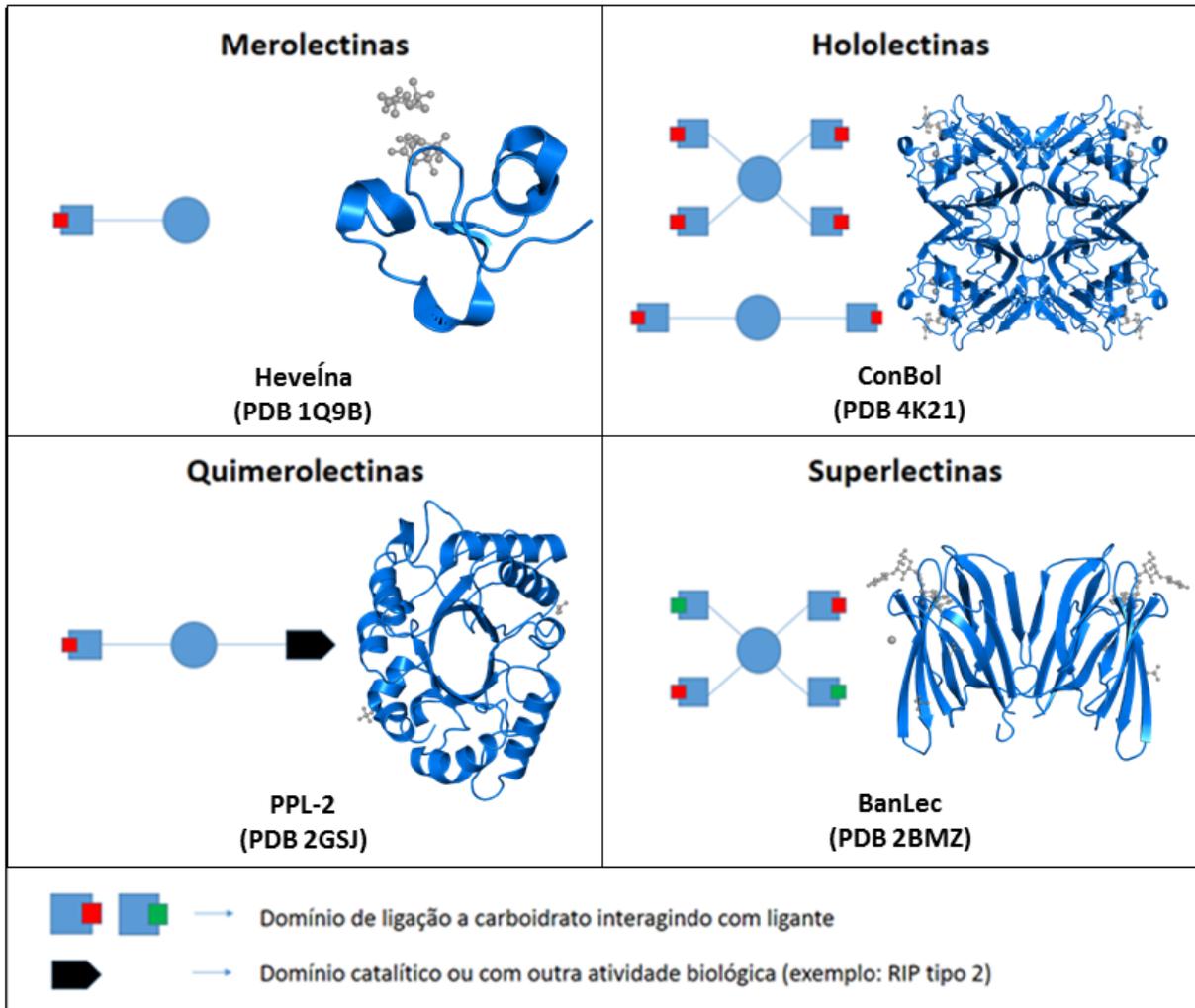
Lectinas que possuem apenas um CRD e são incapazes de precipitar glicoconjugados e aglutinar eritrócitos, foram classificadas como merolectinas. Um exemplo de lectina desta é a Heveína, uma proteína do látex de seringueira (*Hevea brasiliensis*), que possui especificidade à quitina (VAN PARIJS *et al.*, 1991).

As hololectinas têm pelo menos dois CRD's idênticos e similares. Como as hololectinas são de natureza divalente ou multivalente, aglutinam células e precipitam glicoconjugados. Como exemplo podemos citar as lectinas de leguminosas, como ConA e ConBr (lectina de *Canavalia brasiliensis*) (CAVADA *et al.*, 2019b).

As quimerolectinas que possuem um CRD conjugado com outro domínio com atividade enzimática. O domínio enzimático opera independentemente do CRD. Com base no número de CRDs presentes, a quimerolectina pode se comportar como merolectina ou hololectina. Temos como exemplo, as proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 (RIP), como Ricina e Abrina (BOLOGNESI *et al.*, 2016), e PPL-2 (lectina de *Parkia platycephala* 2) que possui domínio quitinásico (CAVADA *et al.*, 2006).

As superlectinas podem ser consideradas uma classe distinta de hololectinas. Elas possuem dois CRD's que não são idênticos e que reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Por exemplo, lectina de bulbo de tulipa (TxLCI), que contém dois CRD's, que um se liga especificamente à resíduos de manose e o outro à *N*-acetil-D-galactosamina (VAN DAMME *et al.*, 1997).

Figura 1 - Representação da classificação estrutural dos quatro tipos de lectinas de plantas.

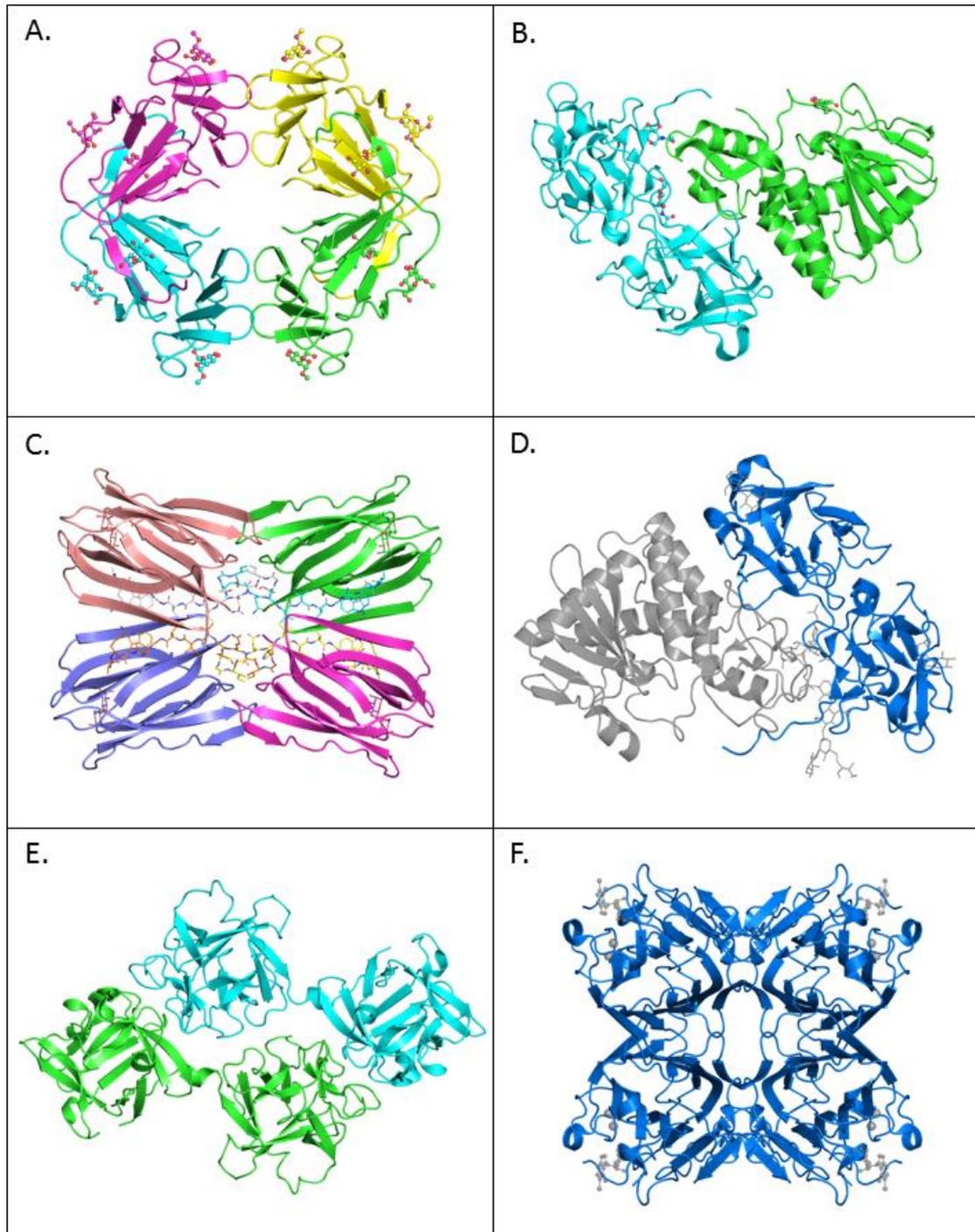


Fonte: PINTO-JUNIOR, 2016.

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas desde organismos mais simples, como vírus (GLICK *et al.*, 1991) e bactérias (IMBERTY *et al.*, 2004), como também em organismos mais complexos, como fungos (KAWAGISHI *et al.*, 2001), insetos (TAKASE *et al.*, 2009), animais e plantas (KILPATRICK, 2002).

Em 1998, na tentativa de organizar as lectinas vegetais em grupos, Van Damme e colaboradores criaram uma outra classificação relacionando estruturas primárias e terciárias presentes em bancos de dados, com dados evolutivos, formando sete grupos ou famílias (Figura 2). Podemos destacar:

Figura 2 - Classificação das lectinas vegetais.



Fonte: PINTO-JUNIOR, 2016. (A) Lectina de monocotiledôneas ligantes à manose, aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) (PDB 1MSA); (B) Lectina ligante à quitina compostas por domínios heveínicos, lectina de *Viscum album* (ML-1) (PDB 1CE7) (C) Lectinas relacionadas às Jacalinas, lectina de *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) (PDB 1M26); (D) RIP's do tipo II, Ricina (PDB 2AAI); (E) Lectina da família da amarantina, *Amaranthus caudatus* (ACA) (PDB 1JLY); (F) Lectinas de leguminosas, *Canavalia boliviana* (ConBol) (PDB 4K21).

1.5.1 *Amarantinas*

As lectinas pertencentes a essa família são derivadas de sementes de espécies do gênero *Amaranthus* (KOEPE; RUPNOW, 1988; ZENTENO; OCHOA, 1988) e o principal membro dessa família é a lectina de sementes de *Amaranthus caudatus* (BIRD, 1954). As lectinas desta família são compostas por duas subunidades de cerca de 33 kDa que são completamente iguais. O protômero de amarantinas consiste em 300 resíduos de aminoácidos e contém dois domínios homólogos (domínio N e C) que estão ligados por uma hélice curta. Cada domínio é composto por folha- β de seis filamentos com β -*hairpin* que forma um conjunto de β -barril (TRANSUE *et al.*, 1997). Os dois protômeros interagem entre si por interações não covalentes. O CRD é formado na interface entre os domínios N e C dos monômeros virados. A ligação entre amaranto e carboidratos depende de um complexo padrão de ligações de hidrogênio entre átomos do carboidrato com resíduos de aminoácidos localizados em β -*hairpins* expostos na superfície da molécula. A amaranto é considerada uma lectina específica à GalNAc, mostrando maior afinidade pelo dissacarídeo de antígeno T (Gal β (1,3)GalNAc) (RINDERLE *et al.*, 1989).

1.5.2 *Lectinas com especificidade à quitina*

Lectinas que contêm pelo menos um domínio heveínico (semelhante à Heveína) são classificadas como lectinas de ligação à quitina. WGA (aglutinina do germe de trigo) foi a primeira lectina isolada e caracterizada com ligação à quitina (LEVINE; KAPLAN; GREENAWAY, 1972; NAGATA; BURGER, 1972; WRIGHT, 1990). Essa lectina é composta de duas subunidades de 18 kDa consistindo de quatro domínios heveínicos estruturalmente semelhantes. A família de lectinas de ligação à quitina é um grupo bem heterogêneo, pois esta família compreende merolectinas, quimerolectinas e hololectinas. Um domínio heveínico completo contém 43 resíduos de aminoácidos com 4 pontes de dissulfeto intracadeias, enquanto o domínio heveínico truncado, encontrado em certas lectinas, contém 30 resíduos de aminoácidos com 3 pontes dissulfeto intracadeias (MISHRA *et al.*, 2019).

A família de lectinas de ligação à quitina compreende pelo menos dois tipos diferentes de lectinas quiméricas. O primeiro grupo são as lectinas das solanáceas que são diméricas, compostas por protômeros que consistem em um domínio de ligação à quitina N-terminal com três repetições de domínios heveínicos ligados a um domínio rico em serina-

hidroxi-prolina *O*-glicosilada (ALLEN *et al.*, 1996; KIELISZEWSKI; SHOWALTER; LEYKAM, 1994). O segundo grupo é a quitinase de classe 1 que contém um único domínio heveínico N-terminal ligado através de um domínio rico em glicina/prolina a um domínio de quimerase cataliticamente ativo (BEINTEMA, 1994). Os sítios de ligação a carboidratos da lectina de ligação à quitina são complexos e se ligam preferencialmente a oligossacarídeos com repetições de GlcNAc (*N*-acetil-D-glucosamina). A estrutura 3D dos domínios de ligação aos carboidratos dessas lectinas é determinada principalmente pela estrutura das unidades de heveína (ANDERSEN *et al.*, 1993).

1.5.3. Lectinas do floema de Cucurbitaceae

São a subfamília das lectinas de ligação à quitina. A primeira lectina dessa família foi isolada da abóbora (*Cucurbita maxima*), denominada lectina de abóbora (HOSSAINI, 1968; LIU *et al.*, 1996). Após isto, muitas outras lectinas foram isoladas a partir do floema de diferentes gêneros de *Cucurbitaceae*, como as espécies de *Cucurbita*, *Citrullus*, *Cucumis*, *Sechium*, *Luffa* e *Coccinia*, que apresentaram atividade de lectina. Geralmente, as lectinas do floema de *Cucurbitaceae* formam um dímero, onde duas subunidades (25 kDa cada) são ligadas covalentemente através de duas ligações dissulfeto inter cadeia (READ; NORTHCOTE, 1983).

1.5.4 Lectinas relacionadas a Jacalina

Jacalina é a lectina das sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Essa é classificação é dada às lectinas que estão relacionadas estruturalmente e evolutivamente às lectinas da jaca. Essas lectinas possuem especificidade a galactose ou manose. As lectinas com especificidade de galactose consistem em quatro protômeros idênticos compostos por grandes cadeias- α e cadeias- β pequenas contendo um único CRD. A análise de difração de raios-X mostrou que a estrutura tridimensional de jacalina (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1996) é composta por três β -prismas simétricos. Cada β -prisma contém três folhas- β com quatro filamentos cada. Das doze cadeias, onze cadeias são construídas por cadeias- α enquanto a cadeia- β forma a décima segunda cadeia. A estrutura tetramérica é formada por quatro protômeros interagindo entre si por interações não covalentes. Cada protômero contém um CRD, composto por resíduos de glicina, tirosina, triptofano, ácido aspártico das cadeias α , que formam uma rede de ligações de hidrogênio com O3, O4, O5 e O6 da metil α -D-galactose. O

subgrupo específico de galactose mostra alta afinidade por Gal β (1,3)GalNAc, o antígeno T (SARKAR; WU; KABAT, 1981; SASTRY *et al.*, 1986) enquanto as lectinas específicas para manose se ligam especificamente a manose e maltose, e mostram alta afinidade por oligossacarídeos (PEUMANS *et al.*, 1997; VAN DAMME *et al.*, 1999).

1.5.5 Lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas são as que apresentam a maior diversidade especificidades do que qualquer outro grupo de lectinas. Todas as lectinas de leguminosas são constituídas por protômeros de 25-30 kDa, entre 220-250 aminoácidos e formados por uma ou duas cadeias polipeptídicas. Além disso, podem ou não ser *N*-glicosiladas e, nas glicosiladas, a proteína contém uma ou duas cadeias de glicanos. Além disso, a maioria dessas lectinas são metaloproteínas, com algumas exceções, entre todas as lectinas de plantas onde os protômeros contêm um sítio de ligação à metais contendo os íons Mn²⁺ e Ca²⁺ fortemente ligados, responsáveis pela manutenção do CRD. As lectinas podem formar dímeros e/ou tetrâmeros, e se ligam especificamente aos resíduos de manose, galactose, glicose, fucose e seus derivados (LORIS *et al.*, 1998).

1.5.6 Lectinas de ligação à manose monocotiledôneas

É uma superfamília de lectinas específicas a manose. Estes são estruturalmente e evolutivamente diferentes das lectinas de leguminosas e lectinas relacionadas a jacalina. A primeira lectina foi isolada a partir do bulbo de *Galanthus nivalis*, denominada GNA (VAN DAMME; ALLEN; PEUMANS, 1987). Após o isolamento de outras lectinas semelhantes de diferentes famílias de monocotiledôneas, foi criada essa superfamília de lectinas. As informações detalhadas sobre a estrutura tridimensional das lectinas dessa família foram obtidas através do estudo da estrutura da GNA e de lectinas relacionadas (HESTER *et al.*, 1995; WRIGHT, 1990). A GNA é composta por quatro protômeros idênticos, não covalentemente ligados e de 109 resíduos (12 kDa) cada. Cada protômero é composto de três subdomínios agrupados em conjunto (chamados subdomínio 1, 2 e 3). Além disso, cada subdomínio contém quatro folhas- β em sequência e uma folha- β estendida que localizada na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica. Todos os subdomínios estão ligados entre si por *loops* e formam um CRD específico à manose com um β -barril de 12 fitas. Uma única ligação dissulfeto

está presente entre Cys29 e Cys52 no protômero. Quando quatro protômeros (A, B, C e D) são combinados por interações não-covalentes, forma-se o homotetrâmero de GNA que se parece com uma coroa achatada com um canal de solvente amplo central de 16 Å. Quatro protômeros, associam-se aos pares (isto é, A com D e B com C) pelas ligações de hidrogênio em dímeros que são estabilizados pela troca de *loops* no C-terminal. Além disso, a associação de dímeros A-D e B-C em tetrâmeros envolve principalmente interações hidrofóbicas. São três CRD's por protômero, portanto, no total, 12 CRD's de ligação à manose são encontrados nos tetrâmeros do GNA (HESTER *et al.*, 1995).

1.5.7 Proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIP-2)

As RIP's são conhecidas como inibidores catalíticos do ribossomo eucariótico (BOLOGNESI *et al.*, 2016). As RIP's são subdivididas em dois grupos diferentes, tipo 1 e tipo 2. As do tipo 1 são as pequenas proteínas com atividade polinucleotídica: adenosina glicosidase e as RIPs do tipo 2 são proteínas quiméricas típicas que contêm duas cadeias, A e B, funcionalmente e estruturalmente diferentes, que abrigam uma atividade enzimática e outra de ligação à carboidratos. A cadeia A do N-terminal (25 a 30 kDa) possui atividade de *N*-glicosidase, enquanto a cadeia B (30 a 35 kDa) na extremidade do C-terminal contém dois CRD's distintos. Além disso, ambas as cadeias permanecem juntas através de uma ligação dissulfeto localizada entre o C-terminal da cadeia A e no N-terminal da cadeia B.

A RIP tipo 2 pode ser monomérica (com um par de protômeros, A-s-s-B), dimérica (2A-s-s-B) ou tetramérica (4A-s-s-B). Dados da estrutura tridimensional desta família foram obtidas a partir da análise da estrutura cristalográfica da Ricina (RUTENBER; ROBERTUS, 1991). Uma cadeia presente em cada protômero é composta por oito hélices- α e seis filamentos de folha- β .

A dobragem da cadeia B é ainda estabilizada por quatro pontes de dissulfeto. A dobragem geral dos CRD's é caracterizada por uma estrutura típica de β -*trefoil* (Murzin *et al.*, 1992). Verificou-se que muitos das RIP's tipo 2 mostram especificidade para os resíduos de galactose e *N*-acetil-D-galactosamina (Peumans *et al.*, 2001).

Apesar do grupo de Van Damme ter definido essas famílias correlacionando aspectos evolutivos e estruturais das lectinas, na medida que novas lectinas vão sendo descobertas e caracterizadas, propriedades novas ou distintas estão sendo observadas, dessa forma, essa classificação deixa de existir um limite taxonômico bem definido e passa a ser

considerado somente o aspecto estrutural. Um exemplo claro deste fato são as lectinas encontradas nas sementes do gênero *Parkia* (*Parkia platycephala* e *Parkia biglobosa*), que são específicas para manose e glicose, cuja estrutura é composta por três domínios repetidos relacionados à jacalina, porém, são espécies de leguminosas (BARI *et al.*, 2016). O sequenciamento de genomas de soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis* revelou que essas espécies possuem centenas de genes que codificam lectinas pertencentes a todas as principais superfamílias de lectinas (JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010). Essas particularidades mostram que há a necessidade de uma atualização dos dados na literatura para criação de uma nova classificação de famílias de lectinas.

1.6 Aspectos gerais de lectinas de leguminosas

As lectinas mais estudadas provem do reino vegetal, principalmente a da família *Leguminosae*. Lectinas de leguminosas são a classe mais estudada e que apresenta o maior número de lectinas purificadas e caracterizadas (MISHRA *et al.*, 2019; SHARON; LIS, 2004; VAN DAMME, 2014). Esta família compreende 727 gêneros e 19.325 espécies, com cerca de 220 gêneros e 2736 espécies com ocorrência no Brasil. A família *Leguminosae* é subdividida em três subfamílias, *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* e *Papilionoideae*, sendo a última com maior número de trabalhos publicados envolvendo lectinas. Muitos dos primeiros trabalhos surgiram a partir de espécies que possuem grande importância econômica e são consumidos pela população, como: ervilha (*Pisum sativum*), soja (*Glycine max*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*). Mais de 100 lectinas foram identificadas, purificadas e caracterizadas, a maioria isoladas a partir de sementes (LORIS *et al.*, 1998; SHARON; LIS, 2004). Em média, essas proteínas podem corresponder a cerca de 5-10% do total das proteínas solúveis a partir de extratos de sementes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

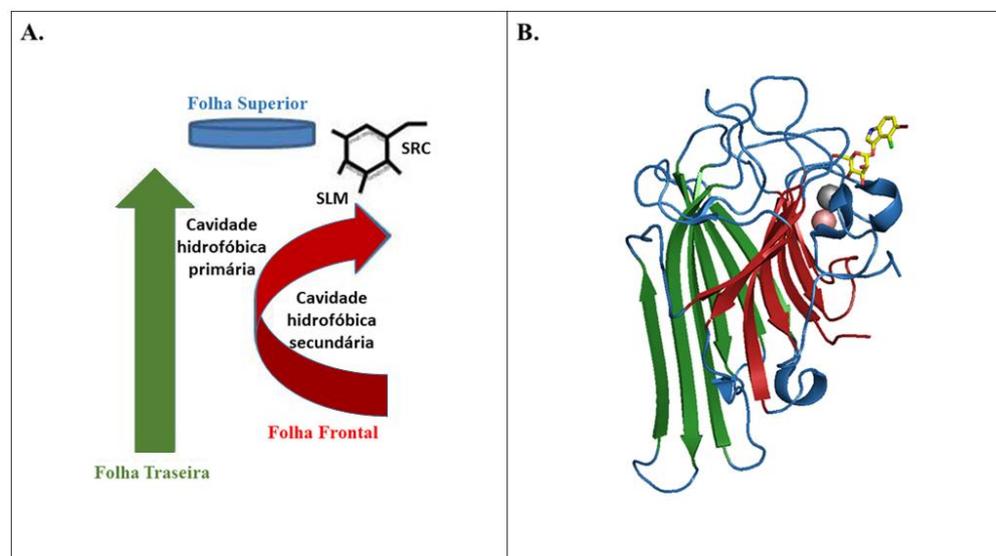
Lectinas de leguminosas apresentam alta homologia de estrutura primária e terciária, porém apresentam diferentes propriedades biológicas quando aplicadas em ensaios experimentais. Deste modo, é necessário que cada lectina seja estudada de forma isolada para que o potencial biotecnológico de cada molécula seja determinado. Esse fato estimula diversos estudos de identificação, purificação, caracterização físico-química, caracterização estrutural e análise de atividade biológica de novas lectinas (COELHO *et al.*, 2017).

Em relação as características estruturais, os monômeros dessas proteínas possuem massa molecular variando entre 25-30 kDa, com um domínio de ligação à metais (MBS, do

inglês *metal binding site*) e um domínio de reconhecimento à carboidrato (CRD, de *carbohydrate recognition domain*). O MBS se liga a cátions bivalentes, um deles sendo o Ca^{2+} e outro geralmente Mn^{2+} , mas pode variar entre Zn^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} , pois esses íons estabelecem interações com esse sítio. O sítio de metais é conservado nestas proteínas e é responsável pela estabilização de resíduos importantes para formação do CRD (LORIS *et al.*, 1998, 2004). Através de uma molécula de água estrutural, o cálcio é capaz de interagir com um resíduo de ácido aspártico presente no CRD que mantém uma ligação *cis*-peptídica estável entre os resíduos Ala-Asp. O resíduo de ácido aspártico na posição *cis* é encontrado na base do sítio de ligação a carboidrato e ele é o maior responsável por orientar e estabilizar o ligante dentro do sítio. Os aminoácidos presentes no MBS como os dois envolvidos na isomerização do *cis* são altamente conservados nas lectinas de leguminosas, com poucas exceções (LORIS *et al.*, 1998).

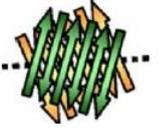
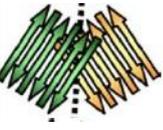
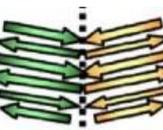
O monômero dessa classe de lectinas é caracterizado pela presença do motivo proteico conhecido como *jellyroll*, ou também chamado β -sanduíche (Figura 3), que também é encontrado em proteínas de capas virais (ARGOS; TSUKIHARA; ROSSMANN, 1980; CHELVANAYAGAM; HERINGA; ARGOS, 1992). Este motivo é caracterizado por possuir uma folha- β traseira parcialmente estendida de 6 fitas e uma folha- β frontal curvada de 7 fitas, antiparalelas, unidas entre si por alças (LORIS *et al.*, 1998). Algumas das lectinas que possuem esse mesmo arranjo possuem capacidade de sustentar sua atividade mesmo depois de aquecidas a 60 °C por mais de 1 hora (LOSSIO *et al.*, 2017; PEREIRA-JUNIOR *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012). Os monômeros se oligomerizam de sete formas diferentes, que podem ser: de interface canônica (ou tipo II), X1, X2, X3, X4, X5, e a chamada interface não usual da PNA (lectina de *Arachis hypogaea*) (Tabela 1).

Figura 3 - Conformação de um monômero de lectina de leguminosa (*jellyroll*).



Fonte: PINTO-JUNIOR, 2016. (A) Diagrama esquemático da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas (SLM – sitio de ligação a metais, SRC – Sitio de reconhecimento a carboidrato); (B) Estrutura terciária do monômero da lectina de *Canavalia boliviana* (ConBol) complexada com X-Man (em amarelo) (PDB: 4K21), em vermelho, são as fitas correspondentes a folha frontal, em verde, são as fitas correspondentes a folha traseira. As duas esferas correspondem aos metais, Ca^{2+} (cinza) e Mn^{2+} (rosa).

Tabela 1 - Diferentes tipos de interface formados entre monômeros de lectinas de leguminosas.

| | | |
|----------------------------|--|---|
| Canônica ou Tipo II | Presente em Lectinas diméricas (PSL) ou tetraméricas (ConA). |  |
| X1 | Observada no dímero DB58 e nas interfaces não-canônicas da PHA e SBA. |  |
| X2 | Apenas em tetrâmeros, como na interface não canônica da ConA e DGL. |  |
| X3 | Dímero tipo EcorL. |  |
| X4 | Dímeros tipos GS4 e GS1. |  |
| X5 | Observada em dímeros do tipo GS1. Assemelha-se a interface X4, entretanto, com uma orientação diferente. |  |
| Interface não-usual da PNA | Lectina de <i>Arachis hypogaea</i> (PNA). |  |

Fonte: adaptado de (SINHA *et al.*, 2007)

A interface canônica é a mais observada entre as lectinas de leguminosas e consiste em uma disposição paralela das folhas- β traseiras de dois monômeros adjacentes, gerando uma espécie de folha contínua contendo 12 fitas. Moléculas de água também atuam nessa interação

e apresentam grande contribuição na formação de ligações cruzadas entre os monômeros. Mutações pontuais em aminoácidos da região de interação podem mudar o arranjo das moléculas de água entre elas e prejudicar a associação (LORIS *et al.*, 1998). Esse padrão de oligomerização pode ser modificado pela presença de aminoácidos carregados na região de associação ou de glicosilações. Um exemplo é a lectina de *Erythrina corallodendron*, que supostamente não forma o dímero canônico devido ao impedimento estérico gerado por uma glicosilação presente no resíduo Asn17 (SHAANAN; LIS; SHARON, 1991). Outro exemplo é a lectina de lectina IV de *Griffonia simplicifolia* (GS-IV), na qual acredita-se que a presença do aminoácido carregado Glu58 causa uma repulsão eletrostática na zona de interação que evita a formação do dímero canônico (PILLER; PILLER; CARTRON, 1990).

Essas lectinas podem se organizar como dímeros ou tetrâmeros em solução, que podem ser formados por monômeros iguais ou diferentes. Essa diversidade na oligomerização pode influenciar diretamente na interação com carboidratos, tendo em vista que o CRD pode adotar uma conformação diferente em cada uma delas (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007). O arranjo tetramérico da lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) é bastante distinto dos demais, nele há formação de um dímero canônico que interage com outro dímero não canônico formado pela interação dos loops laterais. Estudos anteriores supõem que a formação desse tetrâmero se deve somente às propriedades intrínsecas da molécula, uma vez que essa lectina não é glicosilada e por isso não há impedimento estérico por parte de carboidratos (BANERJEE *et al.*, 1996). A oligomerização tetramérica de algumas lectinas da subtribo Diocleinae demonstrou ser dependente do pH do meio (NAGANO *et al.*, 2008; ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015). Outra variedade de arranjo foi observada nas lectinas de soja (SBA, do inglês *soybean agglutinin*) e de *Phaseolus vulgaris* (PHA-L), as quais formam tetrâmeros constituídos por dois dímeros canônicos ((HAMELRYCK *et al.*, 1996) e não dependente de pH. Esse tipo foi considerado o arranjo padrão para lectinas de leguminosas por ter sido observado com mais frequência em estruturas cristalográficas (LORIS *et al.*, 1998).

Além da capacidade de se ligar a carboidratos, essas lectinas demonstraram capacidade de serem carreadores de moléculas hidrofóbicas na forma dimerica e tetramérica, devido a forma de cavidades hidrofóbicas na molécula (ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983; YANG; GALL; EDELMAN, 1974). Existem poucos trabalhos abordando essas cavidades, mas já foi demonstrado que elas são capazes de estabelecer interações estáveis com hormônios vegetais derivados de adenina (DELATORRE *et al.*, 2007, 2013).

Em relação a especificidade por carboidratos, as lectinas de leguminosas podem ser classificadas como: ligantes a fucose, a GlcNAc/GlcNAc (β 1-4), a manose/glicose, a galactose e/ou N-acetil-galactosamina e aquelas se ligam apenas a açúcares complexos (LORIS *et al.*, 1998). Muitos estudos vêm demonstrando a capacidade dessas proteínas de interagir com glicanos de maior complexidade e até mesmo antígenos de natureza glicídica, como antígeno Tn. As variações de especificidade dessas lectinas as tornam importantes ferramentas na Glicobiologia, para decifrar glicocódigos de células-alvo e entender processos de sinalização, como também em várias aplicações biotecnológicas sendo utilizadas como marcadores histoquímicos (JU; OTTO; CUMMINGS, 2011; VAN DAMME, 2014).

1.7 Aplicação e atividades biológicas de lectinas

A capacidade das lectinas de interagir com glicanos presentes na superfície de células tornaram essas proteínas potenciais ferramentas para estudos nas áreas de agronomia, medicina e biotecnologia. As lectinas de plantas agem como um potencial agente inseticida contra um amplo espectro de insetos em diferentes ordens, como coleópteros, dípteros, lepidópteros, himenópteros, isópteros, neuropteranos e homópteros, etc. Elas foram utilizadas com sucesso anteriormente como alternativa às medidas convencionais de controle de insetos (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; MISHRA *et al.*, 2019). Além da propriedade anti-inseticida, as lectinas também possuem ação antimicrobiana contra várias bactérias (gram-positivas e gram-negativas), vírus e fungos. A interação das lectinas com os glicoconjugados presentes na superfície da membrana celular microbiana leva à inibição do crescimento microbiana, sua adesão e migração (BREITENBACH BARROSO COELHO *et al.*, 2018). Foram relatados também o efeito antiparasitário de lectinas contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Tetrahymena pyriformis* e *Giardia lamblia*. A atividade é baseada em sua propriedade de se ligar a carboidratos específicos presentes no parasita, causando interferência nos processos biológicos importantes para sua sobrevivência no hospedeiro (IORDACHE *et al.*, 2015). Além disso, a Jacalina foi capaz de atuar como adjuvante e modular a imunidade celular e humoral do hospedeiro, aumentando a produção de anticorpos contra antígenos de *Trypanosoma cruzi* em células infectadas (JANDÚ *et al.*, 2017).

Lectinas também são bastante aplicadas nas áreas da glicômica e glicoproteômica, devido sua capacidade de isolar glicoconjugados e glicoproteínas em solução. Elas podem ser imobilizadas em suportes sólidos inertes para criação de matrizes cromatográficas de afinidade

a moléculas glicosiladas. Um exemplo é uma coluna cromatográfica que possui ConA (lectina de *Canavalia ensiformes*), WGA (lectina de *Triticum vulgare*) e Jacalina (lectina de *Artocarpus integrifolia*) imobilizadas covalentemente em uma resina do tipo POROS 20-AL, bastante utilizada para enriquecimento de glicoproteínas para estudos de glicoproteômica (ABBOTT; PIERCE, 2010; KULLOLLI; HANCOCK; HINCAPIE, 2008). Outros exemplos temos as lectinas de *Dioclea lasiophylla* e *Platypodium elegans*, que foram eficientemente imobilizadas em CNBr-Sepharose 4B (ARARIPE *et al.*, 2017; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013) e a lectina de *Clathrotropis nitida* que foi ligada covalentemente em matriz de quitosana (ALVES *et al.*, 2015).

Lectinas podem ser aplicadas em ensaios chamados ELLA (Ensaio de lectina ligada a enzima) e usadas para detectar unidades específicas de carboidratos na superfície das células. Este ensaio adota o princípio do ensaio ELISA, mas em ELLA, lectinas de leguminosas são usadas como um reagente de captura e detecção no lugar de anticorpo. Essa técnica tem sido muito utilizada na caracterização e quantificação *in situ* de exo-polissacarídeos de biofilme, pois as lectinas são capazes de reconhecer os carboidratos encontrados em matrizes de biofilmes (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017).

Lectinas também são aplicadas em biossensores baseadas na técnica de EIS (Espectroscopia de impedância eletroquímica). Esses biossensores são sensíveis, específicos, robustos e portáteis, e podem ser usados como ferramentas eficazes para caracterizar e detectar o processo de modificação da superfície celular e de bioreconhecimento (GROSSI *et al.*, 2019; GROSSI; RICCÒ, 2017). Por exemplo, o EIS tem sido empregado como biossensor para detectar bactérias usando ConA (GUO *et al.*, 2012). Essa técnica também é usada para a determinação sensível e discriminação da alfa-fetoproteína (AFP) que foi desenvolvida empregando a lectina como elemento de reconhecimento molecular (CHEN *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 1999).

Lectinas vegetais apresentam diversos efeitos biológicos já relatados na literatura, como os efeitos cicatrizante (CORIOLANO *et al.*, 2014), nociceptivo (CAVADA *et al.*, 2018a; PINTO *et al.*, 2013), apoptótico (CHOI; LYU; PARK, 2004), antiproliferativo sobre células cancerígenas (LIU *et al.*, 2009), anti- (MOTA *et al.*, 2006) ou pró-inflamatório (MARQUES *et al.*, 2017; NECO *et al.*, 2018; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2014), antidepressivo (RIEGER *et al.*, 2014), neuroprotetor (JACQUES *et al.*, 2013), antifúngico (KLAFKE *et al.*, 2013), antiviral (SWANSON *et al.*, 2010) e antibacteriano (QADIR *et al.*, 2013). Todos esses efeitos demonstraram participação do CRD.

1.8 Efeito de lectinas contra células de câncer

A propriedade intrínseca das lectinas para ligar resíduos específicos de açúcar nas glicoproteínas e no complexo glicolipídico as tornaram uma molécula adequada para uso em muitos estudos biomédicos, incluindo pesquisa de câncer (BHUTIA *et al.*, 2019; JU *et al.*, 2013; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). A glicosilação diferenciada de glicoproteínas e de glicolipídios é uma das muitas mudanças moleculares que acompanham o surgimento de tumores malignos. Já é bem estabelecido que glicanos regulam a proliferação, invasão, metástase e angiogênese dos tumores (MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; VEILLON *et al.*, 2018). Alguns desses carboidratos associados a tumores já são caracterizados e descritos na literatura (PEARCE, 2018). A identificação, portanto, de uma população de glicofomas modificadas de uma glicoproteína pode ser usada como diagnóstico para alguns tipos de câncer.

Como exemplo, a PHA (lectina de *Phaseolus vulgaris*) e outras lectinas não leguminosas como o GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*), MAL (lectina de *Maccakia amurensis*), DSA (lectina de *Datura stramonium*) e WGA (aglutinina do germe de trigo) em contato com diferentes linhas celulares de melanoma humano, foram capazes de se ligar aos oligossacarídeos expostos à superfície de células de melanoma, que estavam associados à capacidade das células tumorais de induzirem metástases (LITYNSKA *et al.*, 2001). Além disso, a análise de expressão de antígenos de carboidratos no carcinoma ductal de mama humano (CDMH), usando as lectinas de *Griffonia simplicifolia* (GSL-1) e *Vicia villosa* (VVA), revelou uma correlação positiva entre o aumento da interação de VVA e GSL-1, e o grau do tumor em pacientes com (CDMH), indicando o papel dos determinantes antigênicos na invasão do câncer (KOROURIAN *et al.*, 2008). ConA e UEA (aglutinina de *Ulex eueropaeus*) também foram utilizadas como marcadores de glândula parótida e carcinoma mucoepidermóide com displasia alta ou baixa/intermediária, respectivamente (SOBRAL *et al.*, 2010).

A interação de lectinas com diversos tipos de câncer já é estudada desde 1983, com o relato da ligação da lectina de *Helix pomatia* (HPA) a células em metástase de câncer de mama via antígeno Tn (LEATHEM; DOKAL; ATKINS, 1983). Além da HPA, também já foi demonstrado que muitas outras lectinas conseguem diferenciar células normais de células cancerígenas, como a lectina VCA de *Viscum album* (LYU; PARK, 2007), e ConBr de *Canavalia brasiliensis* (SILVA *et al.*, 2014) dentre outras. Dessa forma, o uso dessas lectinas pode facilitar, portanto a descoberta de novos biomarcadores. Uma variedade de lectinas

vegetais já foram usadas com sucesso como agente antitumoral/antineoplásico contra vários tipos de câncer, incluindo leucemia, sarcoma, hepatoma e câncer de mama (BHUTIA *et al.*, 2019). Elas são aplicadas como marcadores histoquímicos de células específicas, sendo muito utilizadas para detecção de células tumorais (JU; OTTO; CUMMINGS, 2011). Algumas lectinas possuem potencial anticâncer, como a de sementes de *Pisum sativum*, que foi microencapsulada com esferas de alginato de cálcio para liberação controlada na corrente sanguínea e para evitar que a proteína seja degradada quando ingerida por via oral, sendo um agente promissor contra carcinoma hepatocelular (HCC) (EL-AASSAR *et al.*, 2014). A microesfera associada à ConA também exibiu aumento da fixação e liberação do fármaco trihidratado da amoxicilina em fluidos gastrointestinais estimulados (BAKOWSKY *et al.*, 2008; JAIN *et al.*, 2014). Os lipossomas ligados à aglutinina de *Bauhinia purpurea* foram utilizados para direcionar o conjugado ao câncer de próstata humano, e esta formulação lipossômica reprimiu a proliferação celular após a ligação específica às células DU145 em camundongos (IKEMOTO *et al.*, 2016).

Em 2009, Liu e colaboradores testaram o efeito antiproliferativo de ConA contra células A375 de melanoma humano. Os resultados mostram que ConA apresentou efeito citotóxico dependente de CRD contra as células testadas de maneira dependente da dose e do tempo com IC₅₀ de 25 µg/mL, em 24 h. Foram observadas alterações morfológicas, incluindo protusão da membrana (processo que faz um desarranjo da membrana e é comum em processo de apoptose) e condensação nuclear. O número de células apoptóticas também foi aumentado com uma contagem mais baixa de células necróticas, sugerindo que a morte celular foi causada por apoptose. Os autores verificaram que o tratamento com lectina induziu o colapso do potencial da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c que causou a ativação da caspase, levando à conclusão de que a morte celular induzida por ConA ocorreu por uma via apoptótica mitocondrial (LIU *et al.*, 2009).

Em 2017, Gondim e colaboradores também investigaram o potencial antiproliferativo de outras lectinas ConA-like, que foram DLL (lectina de *Dioclea lasiocarpa*), ConM (lectina de *Canavalia marítima*), DSL (lectina de *Dioclea sclerocarpa*) e ConBr (lectina de *Canavalia brasiliensis*), avaliando os efeitos de apoptose e do ciclo celular nas linhas celulares de câncer de ovário, pulmão, próstata e mama. Em geral, todas as lectinas testadas apresentaram efeitos significativos contra as linhas celulares de câncer de ovário, pulmão e próstata, com DLL exibindo o IC₅₀ mais baixo de 52 ± 2 nM contra células de câncer de ovário A2780. A lectina parecia causar alterações morfológicas nas células cancerígenas com aumento

do núcleo e disseminação celular. Um exame mais detalhado dos mecanismos desencadeantes mostrou que a DLL induziu a parada do ciclo celular G2/M com um grande aumento na ativação da Caspase-9, indicando morte celular programada por apoptose (GONDIM *et al.*, 2017).

1.9 Lectinas de Diocleinae

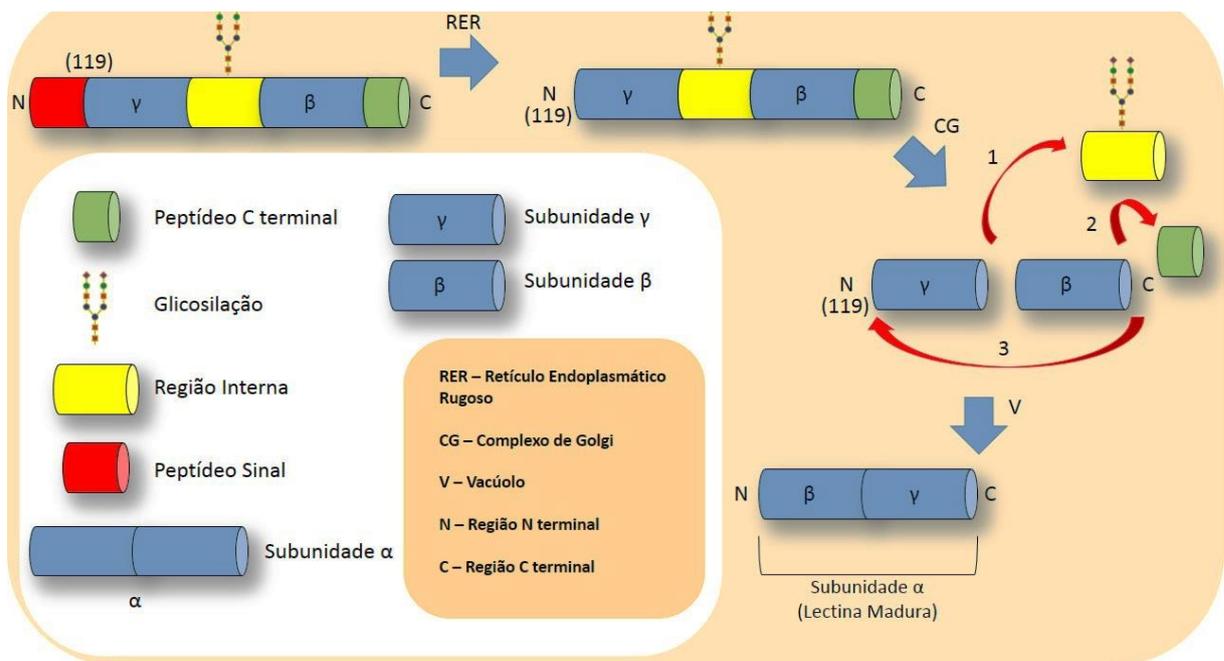
Entre as lectinas de leguminosas mais estudadas estão as da subfamília *Papilionoideae*, em especial as da tribo *Phaseoleae* (SHARON; LIS, 2004). Na tribo *Phaseoleae* podemos destacar a subtribo de Diocleinae, que apresenta 13 táxons ao nível de gênero: *Camptosema*, *Canavalia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cratylia*, *Dioclea*, *Galactia*, *Luzonia* e *Macropsychanthus* (LACKEY, 1981; VARELA *et al.*, 2004).

Lectinas dessa subtribo apresentam alta similaridade de estrutura primária, com todos os resíduos de aminoácidos do MBS e CRD são conservados. Apesar disso, essas lectinas apresentam diferentes tipos ou intensidades de efeitos em ensaios de atividade biológica, sugerindo que essas pequenas diferenças podem influenciar na forma com que a lectina interage com receptores glicosilados (CAVADA *et al.*, 2001, 2018c). Outro fator que pode influenciar nessa interação é a oligomerização dessas proteínas em solução que pode ou não ser influenciada pelo ambiente em que se encontram. Muitas lectinas dessa subtribo estão presentes na forma dimérica ou tetramérica dependendo do pH do meio (NAGANO *et al.*, 2008; ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015). As diferentes formas do estado oligomérico podem ser importantes para estabelecer interações biológicas multivalentes, proporcionando maior resistência ao estresse de cisalhamento que está presente em sistemas biológicos de reconhecimento, estabelecendo interações com cinética maior do que sistemas de interação monovalentes e disponibilizando arranjos espaciais diferentes do mesmo sítio de reconhecimento, favorecendo a estabilização de ligações (CAVADA *et al.*, 2018c).

Lectinas dessa subtribo sofrem um tipo de modificação pós-traducional, chamado de permutação circular (Figura 4). A proteína traduzida, pré-pró-lectina, corresponde a uma cadeia proteica com um peptídeo sinal. Depois da remoção co-translacional do peptídeo sinal, a cadeia proteica é endereçada para o retículo endoplasmático rugoso (RER) onde é N-glicosilado em um resíduo de asparagina localizado na parte central da cadeia, formando o precursor da lectina madura, chamado de pró-lectina. Esta pró-lectina segue sua via pelo complexo de Golgi onde é removido um segmento glicosilado de quinze aminoácidos localizado no centro da cadeia. A porção C-terminal também é processada nesta etapa, perdendo

um segmento de 9 aminoácidos. Devido à remoção do peptídeo glicosilado, a cadeia inicial é dividida em dois fragmentos contendo o N-terminal chamado de γ e o C-terminal chamado de β . Após essa divisão, as porções N- e C- terminal são religadas de maneira inversa, onde o fragmento γ passa a ser o C-terminal e o fragmento β passa a ser o N-terminal. Uma clivagem subsequente libera 4 resíduos de aminoácidos originando a lectina madura com 237 resíduos. A nova ligação peptídica que liga os fragmentos se localiza entre os fragmentos 118 e 119 da lectina madura. Após a junção dos dois fragmentos é formada a cadeia α . Todo esse processo é catalisado por uma enzima asparaginil endopeptidase (BOWLES *et al.*, 1986; BOWLES; PAPPIN, 1988; CHRISPPEELS *et al.*, 1986; FAYE; CHRISPPEELS, 1987; VAN HALBEEK *et al.*, 1982).

Figura 4. Representação esquemática do processo de permutação circular de lectinas do tipo ConA.



Fonte: SANTIAGO, 2014.

Em relação às atividades biológicas, muitos trabalhos reportam vários efeitos relacionadas as lectinas de Diocleinae, como: atividade antifúngica (ARAUJO-FILHO *et al.*, 2010), anti-inflamatória e analgésica (BEZERRA *et al.*, 2014), pro-inflamatória (LOSSIO *et al.*, 2017; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2016; SANTIAGO *et al.*, 2014), antinociceptiva (FIGUEIREDO *et al.*, 2009), vasorelaxante (ASSREUY *et al.*, 2009; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a) e citotóxica para células de glioma (CAVADA *et al.*, 2018b; NASCIMENTO *et al.*,

2018, 2019, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017). Esses resultados demonstram o elevado potencial dessas proteínas e o quão é importante caracteriza-las detalhadamente para obtenção de dados que possam explicar como essas proteínas provocam estes efeitos.

No *Protein Data Bank* (PDB) consta estruturas de lectinas de 10 espécies do gênero *Dioclea*, 26 do gênero *Canavalia*, 2 do gênero *Cratylia*, 1 do gênero *Camptosema* e 1 do gênero *Cymbosema*, totalizando 38 lectinas da subtribo Diocleinae determinados por cristalografia de raios-X. Apesar da alta similaridade de estrutura terciária, estudos de caracterização através de acoplamento e dinâmica molecular vem demonstrando que as pequenas diferenças entre essas lectinas, fazem com que elas tenham diferentes interações favoráveis com ligantes e comportamentos em simulação de dinâmica (CAVADA *et al.*, 2018c; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b, 2017a).

1.10 Lectina de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth

Dioclea lasiophylla Mart. ex Benth (Figura 5) é uma espécie trepadeira da família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae* e subtribo *Diocleinae*. De maior ocorrência na costa do Nordeste do Brasil, *D. lasiophylla* e outras onze espécies pertencentes a esse gênero formam um grupo de plantas conhecidas popularmente como “olho-de-boi” ou “mucunã”. Essas plantas são utilizadas pela população local como analgésicos, para o tratamento de cálculo renal, reumatismo e suas sementes como calmante, tônico, parasiticida e formicida.

Figura 5. Fotos da inflorescência e de sementes de *Dioclea lasiophylla*.



Fonte: PINTO-JUNIOR, 2016.

A lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla*, nomeada de DlyL, foi purificada em uma única etapa através de cromatografia de afinidade em matriz Sephadex[®] G-50 e demonstrou especificidade por α -metil-D-manosídeo e D-manose, como também foi capaz de interagir com as glicoproteínas, ovalbumina e fetuína. Semelhante a outras lectinas da subtribo Diocleinae, DlyL possui três cadeias (α , β e γ) com massas de 25.417, 12.585 e 12.848 Da, respectivamente, e não possui ligações dissulfeto. DlyL foi caracterizada físico quimicamente, apresentando atividade ótima em pH 8,0, estável a uma temperatura de 70 °C e mostrou-se ser dependente de metais bivalentes, como Ca^{2+} e Mn^{2+} . A lectina exibiu baixa toxicidade contra náuplios de *Artemia* sp., sendo este efeito dependente da concentração da lectina em solução, e foi imobilizada em Sepharose[®] 4B ativada com brometo de cianogênio sendo capaz de capturar glicoproteínas em solução (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013).

A sequência de aminoácidos de DlyL foi determinada por espectrometria de massas em *tandem* (MS/MS) em conjunto com o sequenciamento do gene que codifica para a lectina, que apresentou alta similaridade com outras lectinas de espécies da mesma subtribo. A estrutura tridimensional de DlyL foi predita *in silico* através de modelagem por homologia. Em relação a atividades biológicas, DlyL apresentou efeito vasorelaxante em músculo liso de aortas endotelizadas de rato e atividade inflamatória no modelo de edema de pata em ratos, bem como efeito hipernociceptivo, determinado pelo método Von Frey (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b).

1.11 Glioma

De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer), câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Células cancerígenas se dividem rapidamente tendem a ter alta atividade metabólica, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo. Glioma é o nome dado ao tumor de células gliais e engloba astrocitomas, oligodendrogliomas e ependimomas. Essa classificação depende do tipo de célula glial que originou o glioma (RUBIN, 2010).

Os astrocitomas correspondem ao subconjunto de glioma que se originou a partir de astrócitos, e compreende mais de 50% dos gliomas observados, devido aos astrócitos serem as células gliais de maior abundância no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. Essas células atuam ativamente no desenvolvimento do cérebro, na regulação do SNC maduro e da neuroplasticidade, como também na manutenção do ambiente fisiológico para correta atividade

dos neurônios (CHERRY; STELLA, 2014; VANDEMARK *et al.*, 2009; WILHELMSSON *et al.*, 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os astrocitomas podem ser classificados em quatro graus (I-IV) de severidade histológica baseado nos seguintes critérios de avaliação: celularidade, pleomorfismo nuclear, atividade mitótica do tumor e presença de necrose e neovascularização. Caso seja identificado angiogênese e proliferação vascular acompanhada da formação dos gliomas, o glioma é classificado em um dos graus de malignidade, sendo o glioblastoma multiforme (GBM), também classificado como astrocitomas de grau IV, o tipo com maior ocorrência em exames de diagnóstico em adultos (CHENG *et al.*, 2013).

Para uma melhor avaliação do grau de severidade de um glioma, pesquisador buscam observar características moleculares característicos de cada estágio do tumor. Por exemplo, o nível de expressão de certas proteínas da família de metaloproteinases de matriz (MMP está relacionado com malignidade do tumor (PAGENSTECHER *et al.*, 2001). Mais atualmente, grupos de pesquisa avaliam o estadiamento de neoplasias e a presença de células que sofrem apoptose, necrose e autofagia (DEMARIA *et al.*, 2010). Os GBM's são também caracterizados por regiões de hipóxia e muitas vezes por grandes áreas de necrose, e tal estresse contínuo ou excessivo em última instância, resulta em morte celular induzida por autofagia (PRATT; ANNABI, 2014). Os fatores de risco relacionados ao aparecimento do câncer podem ser hereditários ou encontrados no meio ambiente, sendo que a esse último, é atribuída a maioria dos casos (TAYLOR; LADANYI, 2011).

Lectinas têm importante papel na adesão entre células, atuando ligadas a membrana plasmática ou não e reconhecendo glicanos em células vizinhas, elas estão presentes fazendo esse papel nos mais diferentes tecidos do corpo humano. Mudanças no nível de expressão dos ligantes dessas lectinas podem ser indicação de neoplasias nessas células. Células de glioma C6 de rato são um modelo experimental já bem utilizado para o estudo da angiogênese, crescimento tumoral e invasão de células malignas de glioblastoma, além de ser também utilizado para o design e avaliação de terapias de câncer. Essas lectinas podem inibir a tumorigênese ligando-se a proteínas glicosiladas na membrana das células cancerígenas. É sabido que os glicoconjugados desempenham papéis importantes em muitos processos biológicos, incluindo o câncer, com células malignas geralmente apresentando padrões de glicosilação alterados (MARQUES *et al.*, 2017). Essas alterações nos glicanos permitem a ligação preferencial da lectina nas células cancerígenas para induzir os efeitos acima.

Estudos recentes demonstraram que as lectinas de Diocleinae, como ConV (lectina de *Canavalia virosa*), CaBo (lectina de *C. bonariensis*), DVL (lectina de *Dioclea violacea*) e DLL (lectina de *Dioclea lasiocarpa*), poderiam induzir a morte celular em células de glioma, especialmente a cepa de glioma C6 de ratos. Todas essas lectinas induziram uma redução significativa na viabilidade celular, variando de 30% a 60% com concentração de 100 µg/mL e exposição de 48 h. Algumas dessas lectinas afetaram o potencial da membrana mitocondrial ou a migração celular, e todas induziram alterações morfológicas nas células de uma forma poligonal para uma forma esférica, seguidas pela redução da adesão celular. Os métodos de coloração indicaram morte celular por processos autofágicos, necróticos e apoptóticos induzidos por vias mitocondriais e modulação de metaloproteinases (CAVADA *et al.*, 2018b; NASCIMENTO *et al.*, 2018, 2019, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Cristalizar e determinar a estrutura cristalográfica da lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL), bem como analisar a sua interação com *N*-glicanos e investigar o efeito da lectina em modelos de citotoxicidade para células de glioma da linhagem C6.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina a partir de sementes de *Dioclea lasiophylla*;
- Analisar a homogeneidade da amostra por SDS-PAGE;
- Cristalizar a lectina utilizando a técnica de difusão de vapor;
- Obter dados de difração de raios X;
- Determinar a estrutura tridimensional da lectina por cristalografia de raios X;
- Analisar a interação de DlyL com *N*-glicanos utilizando *docking* molecular;
- Avaliar a citotoxicidade de DlyL para células de glioma da linhagem C6.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de sementes de *Dioclea lasiophylla*

As sementes de *Dioclea lasiophylla* foram coletadas em Iguape, Ceará (Brasil) e identificadas pelo Herbário Prisco Bezerra EAC no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.2 Purificação da lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla*

A lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* foi purificada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinto-Junior e colaboradores (2013) (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013). As sementes foram moídas até um pó fino em um moinho de café. As proteínas solúveis foram extraídas em NaCl 0,15 M [1:10 (p/v)] sob agitação constante durante 4 h à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 9.000 rpm à 4 °C por 20 min e o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro (WhatmanTM). O sobrenadante resultante foi aplicado à uma coluna cromatográfica de afinidade Sephadex[®] G-50 (6,5 × 1,8 cm) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ e MnCl₂, ambos em uma concentração de 5 mM. O material que não se ligou com a matriz (P1) foi eluído com a mesma solução e a lectina foi eluída com adição de D-glicose 0,1 M na solução de equilíbrio. Todas frações eluídas foram monitoradas por absorvância à 280 nm.

3.3 Cristalização de DlyL

Amostra de DlyL pura foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM, pH 7,6, em uma concentração de 12,5 mg/mL e incubado com Xman 5 mM (5 bromo-6-cloro-3-indolil- α -D-manopiranosídeo) por 1 h, a 37 °C. A solução foi subsequentemente centrifugada a 10.000 rpm por 10 min para remover qualquer material insolúvel e o sobrenadante foi usado em ensaios de cristalização. Os ensaios de cristalização foram realizados a 25 °C usando método de difusão de vapor em gota suspensa. Estratégia de matriz esparsa foi utilizada com os kits de cristalização JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience), Crystal Screen I, II e Index (Hampton Research), e as placas foram montadas no robô Mosquito Crystal (TPP Labtech, Hertfordshire, Reino Unido). Os cristais cresceram em HEPES 100 mM, pH 7,0 e PEG 6000 a 10%, e essa condição foi

otimizada em uma placa de cristalização MRC Maxi de 48 poços (SWISSCI AG) a 298 K. As gotículas de 4 μ L foram preparadas misturando soluções proteicas tamponadas com as soluções de condição em uma proporção de volume de 1:1 (JANCARIK; KIM, 1991). Cristais adequados para difração de raios-X cresceram em 2 meses para dimensões de aproximadamente 0,1 mm \times 0,3 mm \times 0,1 mm. Cristais com alta qualidade de difração foram obtidos na condição contendo HEPES 0,1 M, pH 6,8 e PEG 6000 8%.

3.4 Coleta e processamento de dados de raios-X

Os cristais adequados para difração por raios-X foram lavados brevemente na solução mãe (HEPES 0,1 M, pH 6,8 e PEG 6000 8%) contendo glicerol como crioprotetor, que foi adicionado para uma concentração final de 20%, e os dados de difração de raios X foram coletados de um único cristal resfriado a -173,15 °C. Os dados foram coletados na linha de feixe 1,47 Å, usando uma fonte de radiação síncrotron em uma estação MX2 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas, Brasil) com um detector PILATUS 2MTM (Dectris, Suíça). Foram coletadas 180 imagens com um ângulo de oscilação de 0,5°. Os dados foram processados usando o iMosflm (WINN *et al.*, 2011), o conteúdo de solvente e o número de moléculas por unidade assimétrica foram estimados com o programa Matthews_Coef (MATTHEWS, 1968). A redução dos dados foi realizada usando o programa Scala (EVANS, 2011). Esses programas estão contidos no pacote de programas do CCP4 (Collaborative Computational Project No. 4).

3.5 Determinação e análise da estrutura de DlyL

A estrutura cristalina de DlyL foi determinada por substituição molecular com o programa Molrep (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) no pacote CCP4, usando o monômero da estrutura de lectina de *Dioclea guianensis* (DguiL, PDB id: 2JE7) como modelo de pesquisa (NAGANO *et al.*, 2008) com a sequência de aminoácidos deduzida a partir da proteína precursora de DlyL (Uniprot ID: C0HK27) após o processamento manual. O refinamento, a adição de moléculas de água e ligantes e a geração de mapas de omissões foram realizados com o programa PHENIX (ADAMS *et al.*, 2010). Os procedimentos automáticos foram auxiliados por modificações manuais auxiliados pelo WinCoot (EMSLEY *et al.*, 2010). A qualidade do modelo foi avaliada pela ferramenta de validação do PDB (READ *et al.*, 2011). As interações de van der Waals e polares foram analisadas usando o programa CONTACT do CCP4 com uma

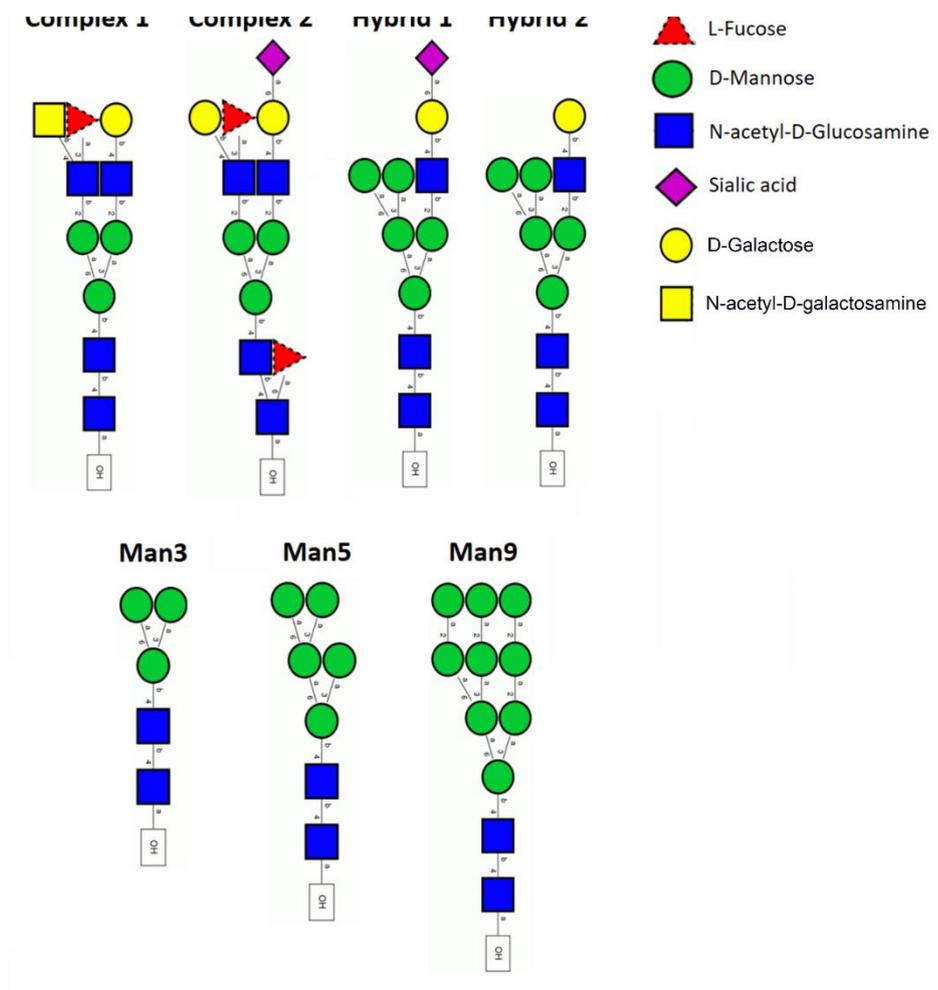
distância de corte de 3,5 Å. O programa UCSF Chimera, v. 1.12 (PETTERSEN *et al.*, 2004), foi usado para gerar as figuras em 3D e LigPlot, v. 1.4.5 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) foi usado para gerar representações das interações em 2D. Servidor de validação de site de ligação de metal CheckMyMetal (CMM) (https://csgid.org/csgid/metal_sites/) foi usado para validação e análise da geometria da coordenação dos metais (ZHENG *et al.*, 2014, 2017). As coordenadas e os fatores de estrutura foram depositados no *Protein Data Bank* (PDB) com o código de acesso 6CJ9. A sobreposição da estrutura DlyL com as estruturas das lectinas de *Dioclea virgata* (DvirL) (PDB id: 3RS6) e *Dioclea guianensis* (DguiL) (PDB id: 1H9P) foi realizada usando UCSF Chimera, v. 1.12. Além disso, alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de DlyL e outras lectinas de sementes de Diocleinae foi feito através do servidor o ESPript 3.0. As sequências usadas foram das lectinas de *Dioclea lasiocarpa* (DLL, PDB: 5UUY), DvirL (Uniprot id: P58907), DguiL (Uniprot id: P81637), *Dioclea reflexa* (DrfL, Uniprot id: C0HK81), *Canavalia bonariensis* (CaBo, Uniprot id: P58906; PDB id: 5U3E), *Canavalia virosa* (ConV, Uniprot id: C0HJY) e *Canavalia ensiformes* (ConA, Uniprot id: P81461).

3.6 Docking molecular

Para analisar a capacidade do DlyL de interagir com os *N*-glicanos, foram realizadas simulações de *docking* molecular utilizando o programa GOLD, v. 5.5 (CDCC, Cambridge, Inglaterra). Este programa testa várias conformações de ligantes, permitindo uma flexibilização parcial dos resíduos da proteínas (JONES *et al.*, 1997). Os parâmetros utilizados foram: tamanho da população de 100, pressão de seleção de 1,1, número de operações de 10.000, número de ilhas de 5, tamanho de nicho de 2, frequência de cruzamento de 95, número de poses de 20 e função de pontuação PLANTSPLP (KORB; STUTZLE; EXNER, 2009). As poses de menor energia foram escolhidas combinando a pontuação de encaixe, penalidades na geometria do ligante, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (DE AVILA *et al.*, 2017; HEBERLE; DE AZEVEDO, 2011; HECK *et al.*, 2017; XAVIER *et al.*, 2016). O domínio de reconhecimento à carboidrato de DlyL foi escolhido como o centro de aplicação do algoritmo, com todos os átomos de aminoácidos e 3 moléculas estruturais de água em um raio de 10 Å. Os *N*-glicanos testados são esquematicamente ilustrados na Figura 6 e foram selecionados com base em sua presença na superfície celular, ancorada em glicoproteínas da matriz extracelular (PARKER *et al.*, 2013). As estruturas dos glicanos foram geradas e minimizadas

energeticamente com o servidor *Carbohydrate Builder* (Woods Group, Glycan Web, Universidade da Geórgia em Atenas, GA, <http://glycam.org>) e o campo de força GLYCAM_06 (KIRSCHNER *et al.*, 2008), respectivamente.

Figura 6 - Representação da estrutura dos glicanos que foram utilizados no docking molecular.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.7 Atividade citotóxica de DlyL em células de glioma da linhagem C6

3.7.1 Cultura de linha celular e tratamento com DlyL

Para todos os ensaios, DlyL foi diluída com tampão salino HEPES sem glicose, composto por NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM e CaCl₂ 1 mM, pH 7,4. A linha celular C6 de glioma de rato (BENDA *et al.*, 1968) foi mantida em meio Eagle's modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®).

(Gibco®), 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco®). As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 95% de O₂ e 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas e incubadas por 24 horas a 37 °C em uma incubadora (5% de CO₂) até confluência de 80%. Posteriormente, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas em DMEM sem soro, mas contendo veículo (HEPES – tampão salino sem glicose) ou DlyL durante todo o experimento.

3.7.2 Microscopia óptica

A fim de abordar alterações morfológicas em resposta ao tratamento com lectina, as células foram visualizadas por microscopia óptica por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U. Resumidamente, as células de glioma C6 foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas com veículo (HEPES - tampão salino sem glicose) ou DlyL por 3, 6, 12, 24 e 48 h, e após o tratamento, as células foram visualizadas por microscopia óptica.

3.7.3 Ensaio MTT

A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de redução colorimétrico MTT (Sigma®) [30- (4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difeniltetrazólio] (MOSMANN, 1983). As células (5×10^3 células por poço) foram semeadas em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 ou 48 h com veículo (controle) ou DlyL em uma concentração final de 10, 30, 50 e 100 µg/mL. Após o tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas por 1 h (37 °C) com 0,1 mL de MTT à 0,5 mg/mL diluído em solução salina equilibrada de Hanks (HBSS). As desidrogenases mitocondriais em células viáveis reduziram o MTT a cristais de formazan, que foram dissolvidos em 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 minutos a 37 °C. A absorbância foi medida por espectrofotometria usando o *Spectramax Paradigm* ($k = 540$ nm). Os resultados foram expressos como uma razão de absorbância da amostra para a absorbância de controle (veículo), considerada como 100%.

3.7.4 Detecção de produção ROS

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na linhagem celular C6, 5×10^3 células por poço foram semeadas em uma placa de 96 poços, contendo veículo

(controle) ou DlyL na concentração final de 10, 30, 50 e 100 µg/mL, e incubadas por 3 ou 6 h. Após o tratamento, o meio foi substituído por 0,1 mL de corante fluorescente de 1 µM de dihidrodamina (DCF-DA) (CHEN *et al.*, 2017) e as placas foram protegidas da luz por 20 minutos a 37 °C. Depois disso, as células foram lavadas com tampão fosfo-salino, pH 7,4, (PBS), e a fluorescência foi medida com o *Spectramax Paradigm* usando excitação a 485 nm e emissão a 520 nm. A fluorescência foi expressa como uma porcentagem de controle (veículo) considerado como 100%.

3.7.5 Ensaio TMRE

O potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi medido usando uma sonda fluorescente de éster etílico de tetrametilrodamina (TMRE) (Invitrogen[®]) (EHRENBERG *et al.*, 1988). As células C6 foram semeadas (5×10^3 células por poço) em uma placa de 96 poços, contendo veículo (controle) ou

DlyL na concentração final em 10, 30, 50 e 100 µg/mL e incubadas por 3 ou 6 h. Após o período de tratamento, o meio foi substituído por 0,1 mL de uma solução de TMRE 10 nM e as placas foram protegidas da luz por 20 minutos a 37 °C. Depois disso, as células foram lavadas com tampão PBS, e a fluorescência foi medida usando o *Spectramax Paradigm* com excitação de 550 nm e emissão de 590 nm. A fluorescência foi expressa como uma porcentagem do controle (veículo) considerado como 100%.

3.7.6 Ensaio Caspase-3

Para detectar se o DlyL poderia induzir apoptose celular, a atividade da Caspase 3 foi analisada. O kit de ensaio EnzChek[®] Caspase-3 (Invitrogen) foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante. As células foram plaqueadas com densidade de 5×10^5 células por poço em placas de 6 poços. O controle positivo foi realizado com estaurosporina (1 mM) e o controle negativo obtido por tratamento celular apenas com veículo. Dois poços foram reunidos após tratamentos para que a concentração final por reação fosse igual a 1×10^6 células, de acordo com as recomendações do fabricante. Neste ensaio, as células foram tratadas por 6 h, uma vez que o DlyL promove uma redução notável da viabilidade celular após períodos mais longos de incubação (por exemplo, 12 a 24 h). Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram tripsinizadas, coletadas em tubos de 1,5 mL e depois centrifugadas

a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente foram lavadas com 1 x PBS e armazenadas a -80 °C durante a noite para promover lise celular. Posteriormente, as células foram incubadas com tampão de lise comercial em um banho de gelo por 30 min e centrifugadas nas mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi transferido para uma placa preta de 96 poços (PerkinElmer™) e o substrato da reação foi adicionado. Uma curva padrão foi feita com uma solução de 7-amino-4-metilcumarina (AMC; 10 mM), o substrato da reação. Após a colocação do substrato, o homogenato celular foi submetido a um ensaio cinético fechado por 1 h com as seguintes condições: excitação em 342 nm, corte em 435 e emissão em 446 nm.

3.7.7 Ensaio de microscopia de fluorescência com laranja de acridina

A coloração das células com laranja de acridina (LA) foi realizada para estudar o padrão de morte celular e a indução de organelas vesiculares ácidas (OVA) pela lectina após 24 e 48 h de incubação. As células C6 foram semeadas em uma placa de 96 poços na concentração de 5×10^3 células por poço por 24 h em DMEM suplementado com 10% de FBS. Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM sem soro e contendo veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 µg/mL). Após 24 e 48 h, as células foram coradas com LA (10 µg/mL; Sigma Chemicals, EUA) por 20 minutos no escuro. Todos os procedimentos foram realizados a 37 °C (SINGH *et al.*, 2016a). As células foram visualizadas com um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U usando conjuntos de filtros, excitação de 470 nm e emissão de 525 nm para detecção de cromatina (CR) e excitação de 350 nm e emissão de 615 nm para detecção de vesículas ácidas (AVO).

3.7.8 Ensaio de microscopia de fluorescência com iodeto de propídio

Para avaliação do rompimento de membrana celular, bem como diferenciar células normais, células em apoptose e células que sofreram necrose, o ensaio com iodeto de propídio (IP) foi implementado. Além disso, nesse ensaio as células C6 foram semeadas em uma placa de 96 poços nas mesmas condições descritas para o ensaio com laranja de acridina (5×10^3 células por poço) e tratadas com veículo ou DlyL em concentrações e períodos de tempo, como mencionado anteriormente. Após a incubação, as células foram coradas com Hoechst (1 µg/mL, Sigma Chemicals, EUA) e IP (14 µg/mL, Sigma Chemicals, EUA) por 15 minutos no escuro (SINGH *et al.*, 2016a). As células foram visualizadas sob um microscópio invertido NIKON

eclipse T2000-U usando conjuntos de filtros, excitação de 488 nm e emissão de 560 nm para PI, e excitação de 353 nm e emissão de 483 nm para Hoechst.

3.7.9 Ensaio de migração

As células C6 foram semeadas em uma placa de 48 poços na concentração de 5×10^4 células por poço e incubadas por 24 h. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e um espaço foi introduzido em cada poço raspando as camadas celulares confluentes com uma ponta de pipeta P200, seguida de lavagem com PBS para remover as células frouxamente retidas (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Em seguida, meio DMEM isento de soro contendo veículo (controle) ou DlyL, nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, foi adicionado. As imagens foram capturadas nos períodos de tempo 0, 24 e 48 h após os tratamentos pelo microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U.

3.7.10 Análise estatística

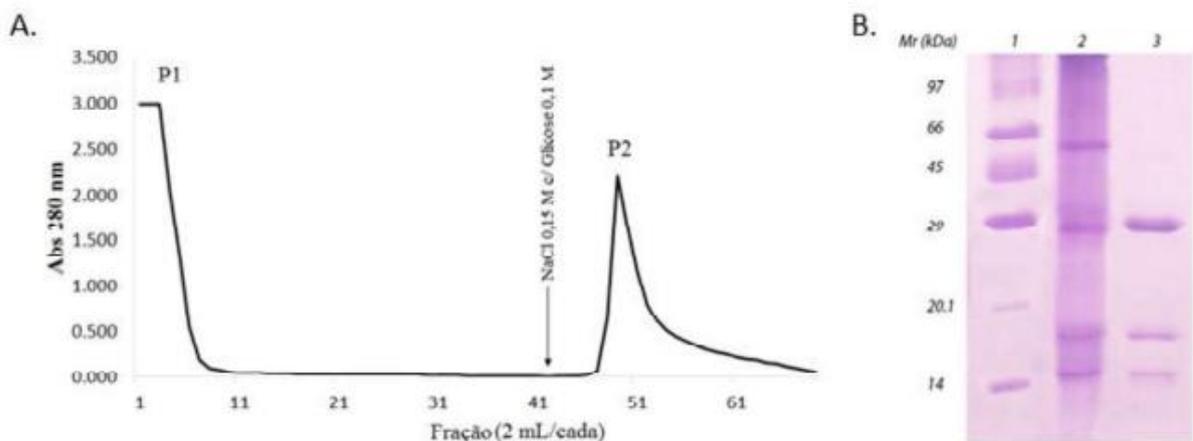
Os resultados foram analisados usando o GraphPad Prism, versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentados apresentaram distribuição normal, segundo o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$). Dessa forma, foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação de DlyL

DlyL foi purificada de acordo com o protocolo estabelecido por Pinto-Junior e colaboradores (2013) (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2013) por um único passo cromatográfico de afinidade usando uma matriz de Sephadex-G50. O perfil cromatográfico e eletroforético (SDS-PAGE) (Figura 7) de DlyL foram os esperados para a lectina, sendo eficientemente eluída da matriz com adição de D-glucose e apresentado as 3 bandas proteicas, referentes as cadeias α (29 kDa), β (14 kDa) e γ (12 kDa), características de lectinas da subtribo Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2018c).

Figura 7 - Avaliação da purificação de DlyL. A) Perfil cromatográfico; B) Perfil eletroforético em SDS-PAGE.



Fonte: elaborado pelo autor. A) Extrato total (Vamostra= 15 mL) aplicado em uma matriz cromatográfica de Sephadex G-50 (6.5 x 1.8 cm). A fração não retida (P1) foi eluída com o NaCl 0,15 M contendo CaCl₂ e MnCl₂, ambos a 5 mM. A fração retida (P2) foi eluída com solução de NaCl 0,15 M contendo D-glucose 0,1 M. As frações foram coletadas alíquotas de 2 mL/tubo com fluxo de 1 mL/minuto; B) Linha 1: Marcadores moleculares (fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa)). Linha 2: extrato bruto; Linha 3: DlyL pura (30 μ g).

4.2 Estrutura cristalográfica de DlyL

Cristais pequenos de DlyL foram cultivados na condição n^o 28 do kit JBScreen JCSG ++ (HEPES 100 mM pH 7,0 e PEG 6000 a 10%) e o cristal difratável foi obtido por

otimização dessa condição (HEPES 100 mM pH 6,8 e PEG 6000 8%). Os dados de difração mostraram que o cristal DlyL pertence ao grupo espacial ortorrômbico I222 (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados coletados, refinamento e parâmetros de qualidade dos dados.

| PDB ID 5U37 | |
|--|---|
| Parâmetros | Valores |
| Coleta de Dados | |
| Grupo espacial | I222 |
| Parâmetros de célula unitária | |
| a. b. c (Å) | 64.1, 86.93, 92.82 |
| α . β . γ (°) | 90, 90, 90 |
| Reflexões totais | 155,085 (16,858) |
| Número de reflexões únicas | 28,693 (4,097) ^d |
| Moléculas por unidade assimétrica | 1 |
| Limites de resoluções (Å) | 27.86 – 1.70 (1.79 – 1.70) ^d |
| R _{merge} ^a (%) | 8.5 (52.2) ^d |
| Completeza | 99.4 (98.8) ^d |
| Multiplicidade | 5.4 (4.1) ^d |
| I/ σ (I) médio | 9.4 (2.6) ^d |
| Wilson B-fator (Å ²) | 20.01 |
| CC1/2 | 99.6 (79.9) |
| Substituição Molecular | |
| wRfactor | 0.377 |
| Score | 0.802 |
| Refinamento | |
| Faixa de resolução (Å) | 27.86 – 1.70 |
| R _{factor} ^b (%) | 19.33 (31.58) ^d |
| R _{free} ^c (%) | 21.37 (34.31) ^d |
| Número de reflexões | 28,524 (2,646) ^d |
| Reflexões usada para o R-free | 1,385 (145) |
| Número de resíduos por unidade assimétrica | 237 |
| Número de moléculas de água | 143 |
| RMS desvios dos valores ideais | |
| Comprimentos de ligação (Å) | 0.007 |

| | |
|--|-------|
| Ângulos de ligação (°) | 0.99 |
| Fator de temperatura | |
| Valor médio de B para toda a cadeia proteica (Å ²) | 24.85 |
| Ligantes (Å ²) | 35.30 |
| Solvente (Å ²) | 32.21 |
| Rotâmeros e gráfico de Ramachandran | |
| Rotâmeros com desvio (%) | 0 |
| Resíduos em regiões mais favoráveis (%) | 96.17 |
| Resíduos em regiões permitidas (%) | 3.83 |
| Resíduos em regiões não permitidas (%) | 0 |

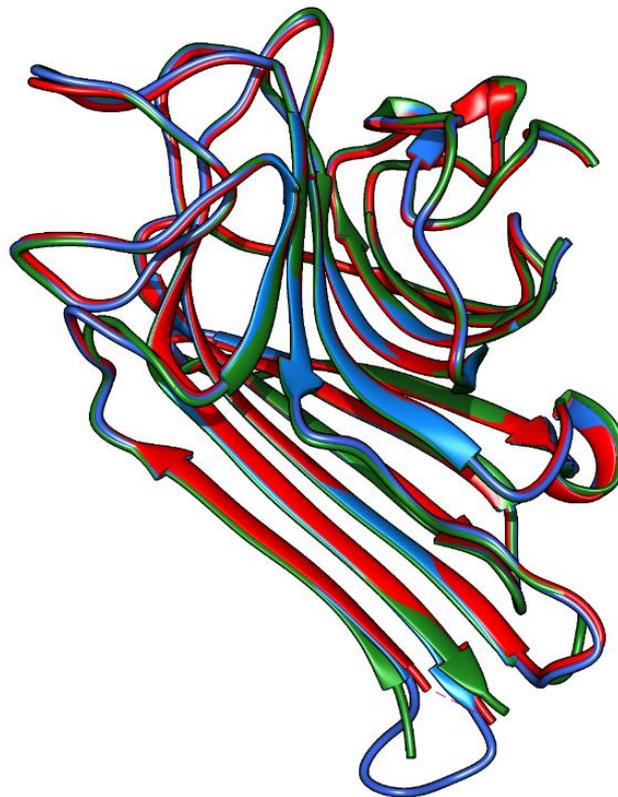
Fonte: elaborado pelo autor. (a) $R = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}$ onde $I(hkl)$ é a intensidade da medição da reflexão h e $\langle I(hkl) \rangle$ é o valor médio do $I(hkl)$ para todas as medidas I . (b) $R_{\text{work}} = 100 \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|}$, onde $|F_o|$ e $|F_c|$ são as amplitudes observadas e calculadas do fator de estrutura, respectivamente. (c) $R_{\text{free}} = R$ -fator calculado para um subconjunto de 5% de reflexões selecionado aleatoriamente e excluído do refinamento. (d) os valores entre parênteses representam a camada mais alta.

Com base em uma massa de 25.569 Da (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b), o coeficiente de Matthew foi calculado como 2,54 Å³Da⁻¹, indicando a presença de um monômero por unidade assimétrica e um teor de solvente de 51,66%. O monômero DguiL (PDB id: 2JE7) demonstrou ser um excelente modelo para substituição molecular e apresentou um RMSD de 0,195 Å para 237 átomos de C α quando comparado às coordenadas do monômero DlyL, demonstrando 97% de similaridade de sequência (NAGANO *et al.*, 2008; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b). O modelo mostrou estereoquímica aceitável e sem problemas referentes ao Ramachandran.

A estrutura de DlyL complexada com Xman foi refinada para 1,7 Å e foram modeladas 215 moléculas de água. O monômero adotou um motivo *jellyroll* observado em muitas proteínas de revestimento viral (ARGOS; TSUKIHARA; ROSSMANN, 1980; CHELVANAYAGAM; HERINGA; ARGOS, 1992) e em muitas lectinas de leguminosas, que geralmente são descritas como β -sanduíche (LORIS *et al.*, 1998). Esse motivo é comum nas lectinas de Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2018c), por exemplo, uma comparação estrutural entre *Dioclea virgata* lectina (DvirL) (PDB id: 3RS6) (NOBREGA *et al.*, 2012) ou DguiL (PDB id: 1H9P) (WAH *et al.*, 2001) e DlyL (Figure 8) demonstrou um RMSD de 0,266 Å para 225 átomos de C α e 0,196 Å para 206 átomos de C α , respectivamente, com diferenças encontradas em regiões de alta flexibilidade, como loops. Este motivo apresenta uma folha- β curvada

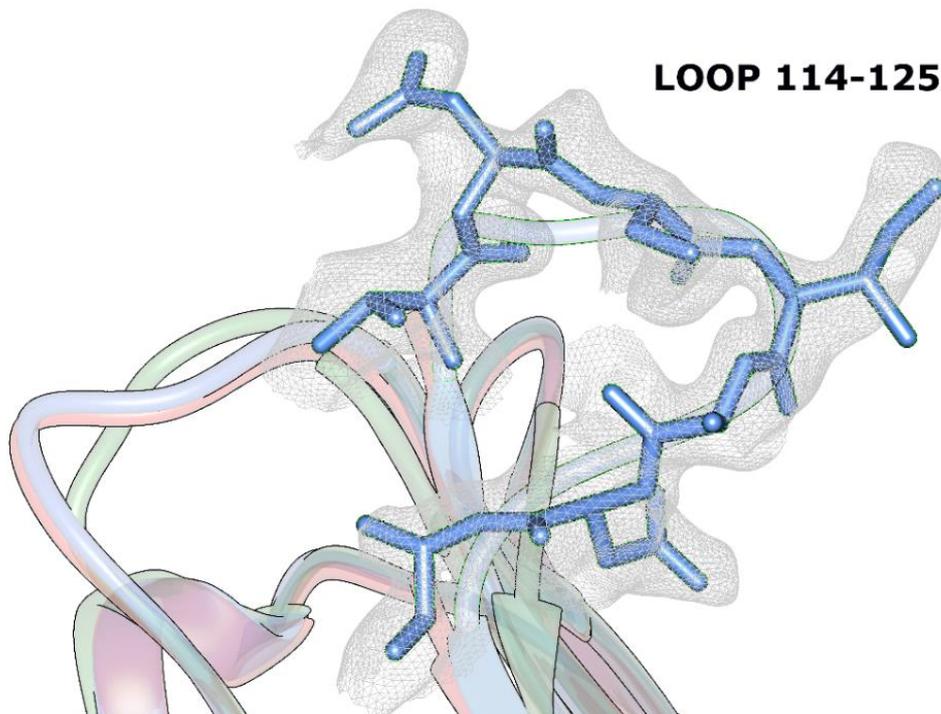
antiparalela de sete filamentos que contém aminoácidos diretamente relacionados ao CRD e ao MBS. Essa folha- β é conectada por loops à outra folha- β estendida antiparalela de seis filamentos que mantêm a estabilidade estrutural e é responsável por contatos interdiméricos nas formas dimérica ou tetramérica (LORIS *et al.*, 1998). Todos os resíduos de aminoácidos estão alocados dentro da densidade de elétrons, incluindo os resíduos da alça Lys116-Thr117-Asn118-Ser119-Ile120-Ala121-Asp122-Ala123 (Figure 9), que não foram visualizados em outras lectinas de *Dioclea* devido à alta desordem dessa região (BATISTA DA NOBREGA *et al.*, 2012; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a; WAH *et al.*, 2001).

Figura 8 - Representação em *cartoon* da sobreposição entre DlyL (em azul), DvirL (PDB id: 3RS6, em vermelho) e DguiL (PDB id: 1H9P, em verde).



Fonte: elaborado pelo autor.

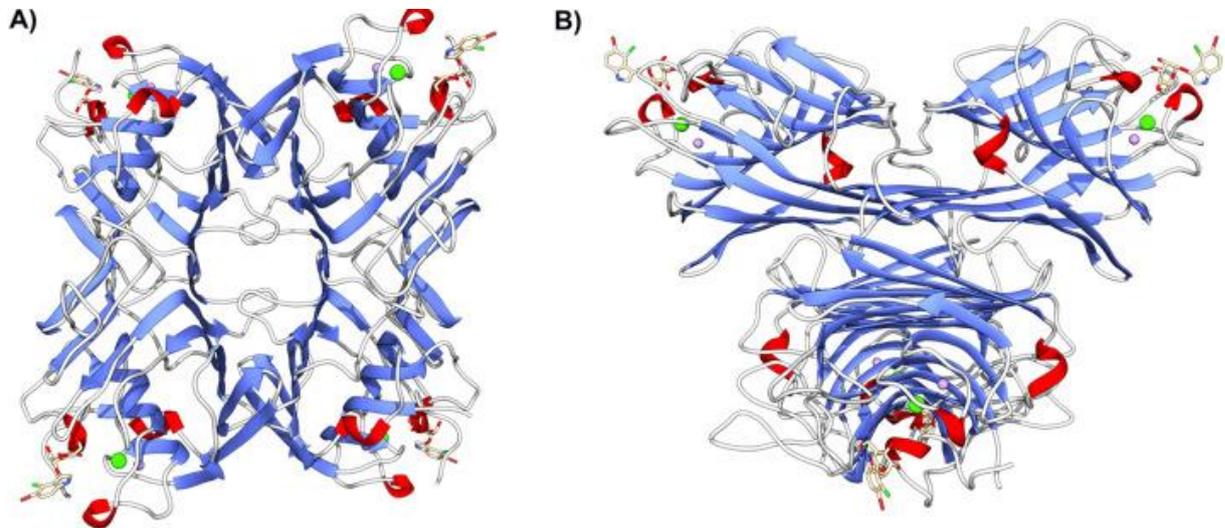
Figura 9 - Região de alça entre os resíduos 114-125 de DlyL com o mapa de densidade de elétrons ($2mFo-dFc$) contornado em 1σ . As cadeias polipeptídicas superpostas são representadas na representação *cartoon* com DlyL (em azul), DvirL (em vermelho) e DguiL (em verde).



Fonte: elaborado pelo autor.

A oligomerização tetramérica foi sugerida pela análise PISA (Figure 10) (KRISSEL; HENRICK, 2007). O tetrâmero é formado pela associação consecutiva de dois dímeros canônicos (LORIS *et al.*, 1998; ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015). O dímero canônico é caracterizado pela associação lado a lado de duas folhas- β parcialmente estendidas (seis fitas) de modo como se formassem uma folha β contínua de doze fitas (BRINDA *et al.*, 2004; SINHA *et al.*, 2007), que é um padrão também visto em outras lectinas de Diocleinae (CAVADA *et al.*, 2018c; NASCIMENTO *et al.*, 2017; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a). Estudos anteriores com lectinas de Diocleinae demonstraram a importância das interações na cavidade central do tetrâmero e nas regiões interdiméricas periféricas que estabilizam a forma tetramérica sob diferentes condições de pH em solução (NAGANO *et al.*, 2008; WAH *et al.*, 2001; ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015). Na cavidade central do tetrâmero, o resíduo His51 contribui para a estabilização da alça central 114-125, fornecendo orientação espacial favorável para a interação com His131, que promove a formação de contatos interdiméricos.

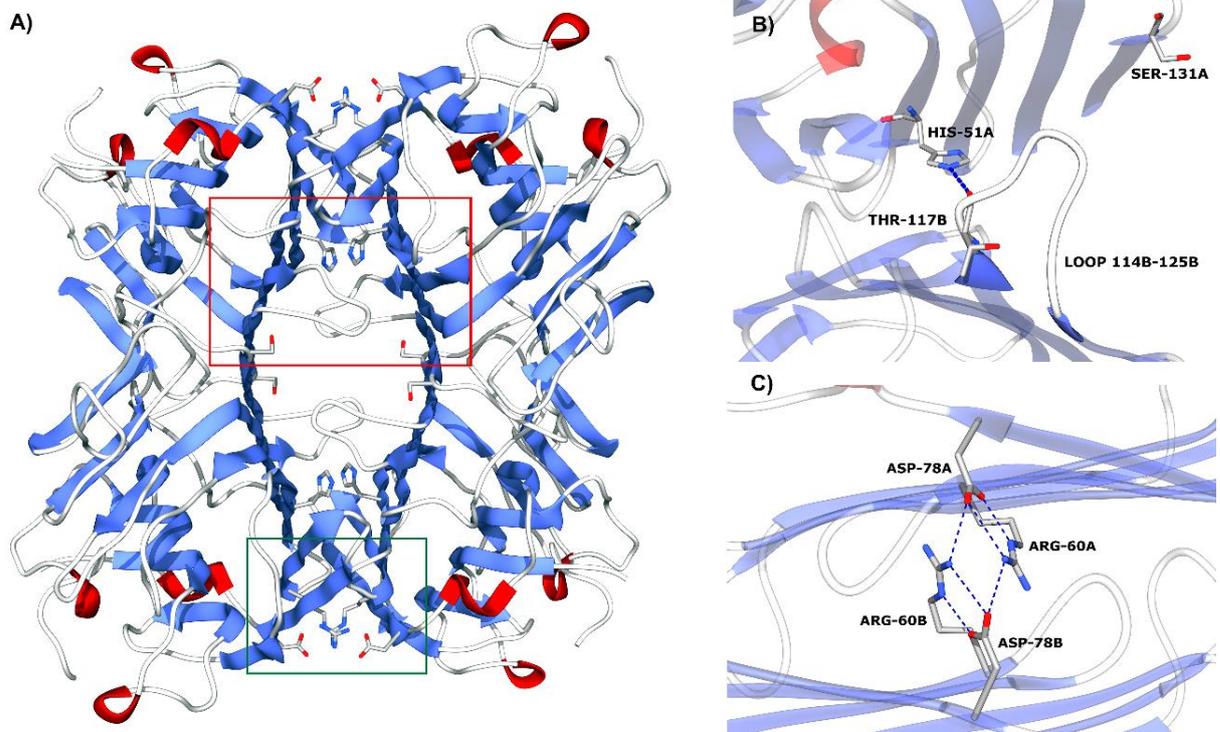
Figura 10 - Estrutura geral do tetrâmero DlyL complexada com Xman na representação *cartoon*. Esferas representam íons cálcio (em verde) e manganês (em roxo). A molécula X-man está na representação de esqueleto carbônico coloridos em amarelo. A) Vista frontal; B) Vista lateral.



Fonte: elaborado pelo autor.

Além disso, os resíduos Arg60 e Asp78 nas regiões periféricas também são responsáveis pela estabilização da forma quaternária, mas com menos influência em comparação ao loop central. A análise estrutural das lectinas de *Dioclea guianensis* (PDB id: 2JDZ) e *Dioclea grandiflora* (PDB id: 2JE9) indicou que a substituição da histidina na posição 131 pela asparagina reduz drasticamente os contatos interdiméricos e desfaz a interação que ocorria entre a His131 e o loop 114-125, que estabilizava a associação tetramérica independente do pH do meio (NAGANO *et al.*, 2008; ZAMORA-CABALLERO *et al.*, 2015). DlyL tem um resíduo de serina na posição 131 (Figura 11A, B) que não forma interações com a alça central, provavelmente indicando que DlyL é uma lectina com estrutura tetramérica dependente de pH. Nas regiões periféricas, foram observadas interações previstas para a lectina (Figura 11C). Estudos anteriores de dinâmica molecular das lectinas de *Dioclea* demonstraram que outras regiões da proteína podem afetar as interações de CRD com ligantes, como a região central do loop 114-125, que, como visto anteriormente, também está envolvida na estabilização da forma tetramérica (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a, 2017b).

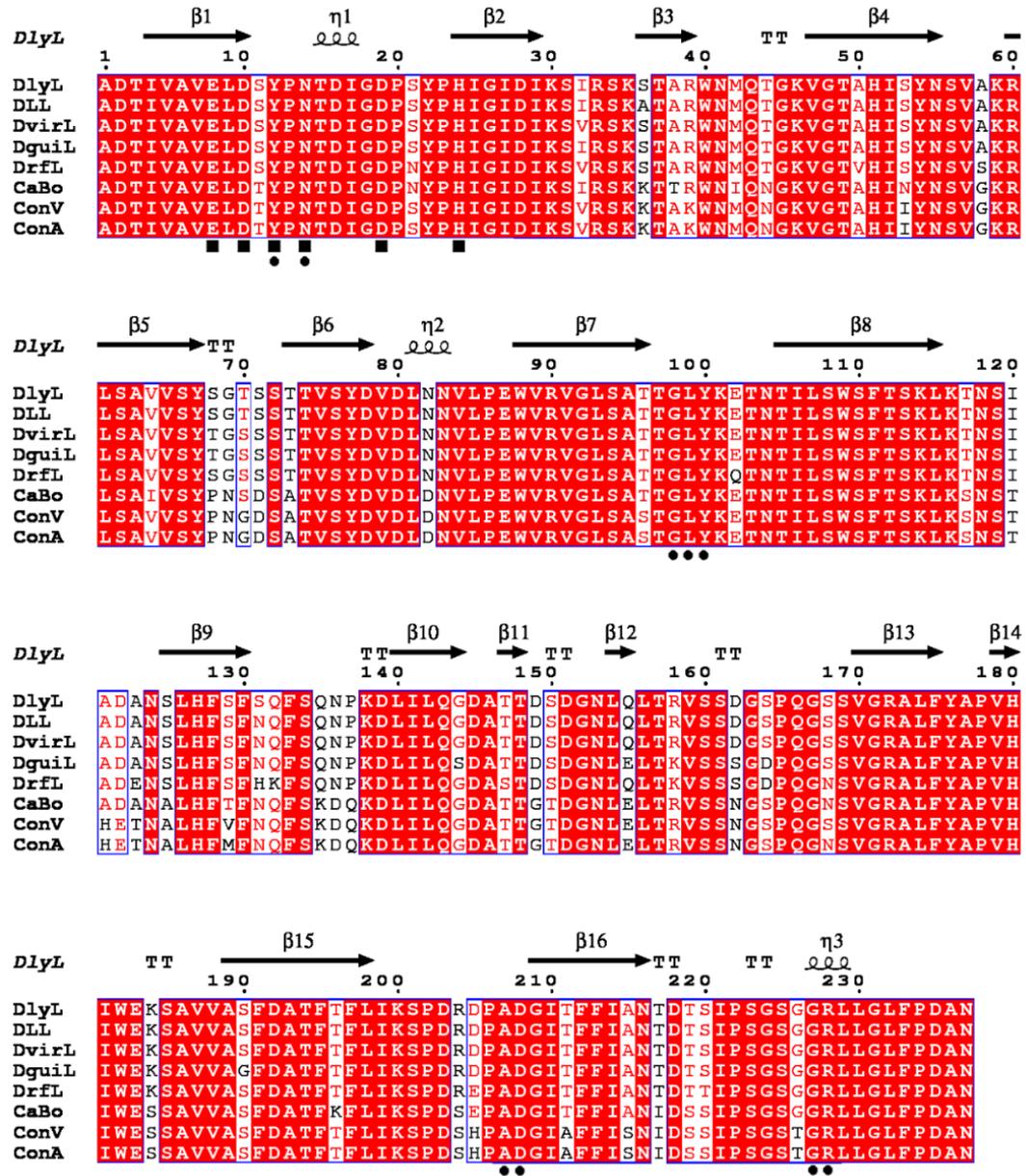
Figura 11 - A) Interações interdiméricas no tetrâmero de DlyL. A cavidade central é indicada com caixa vermelha e a região periférica com caixa verde. B) Interações na cavidade central; C) Interações em regiões periféricas.



Fonte: elaborado pelo autor.

Uma similaridade maior que 80% de estrutura primária é compartilhada entre as lectinas de Diocleinae (Figura 12) (CAVADA *et al.*, 2018c), mas pequenas diferenças, bem como a oligomerização dependente de pH presente nessas proteínas, podem influenciar sua interação com os receptores glicosilados. O impacto dessas diferenças foi observado pela dinâmica molecular de duas lectinas dessa subtribo, DrfL (lectina de *Dioclea reflexa*) e DSL (lectina de *Dioclea sclerocarpa*), com 98% de similaridade. Durante as simulações na presença de Xman, o comportamento do CRD das lectinas foi significativamente diferente em relação aos volumes mínimo e máximo de cavidades (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a). Esses fatores podem afetar a intensidade e o tipo de atividades biológicas promovidas por diferentes lectinas, como vasorelaxação, inflamação e atividade antiglioma (ASSREUY *et al.*, 2009; CAVADA *et al.*, 2018c; NASCIMENTO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017).

Figura 12 - Alinhamento de lectinas da subtribo Diocleinae

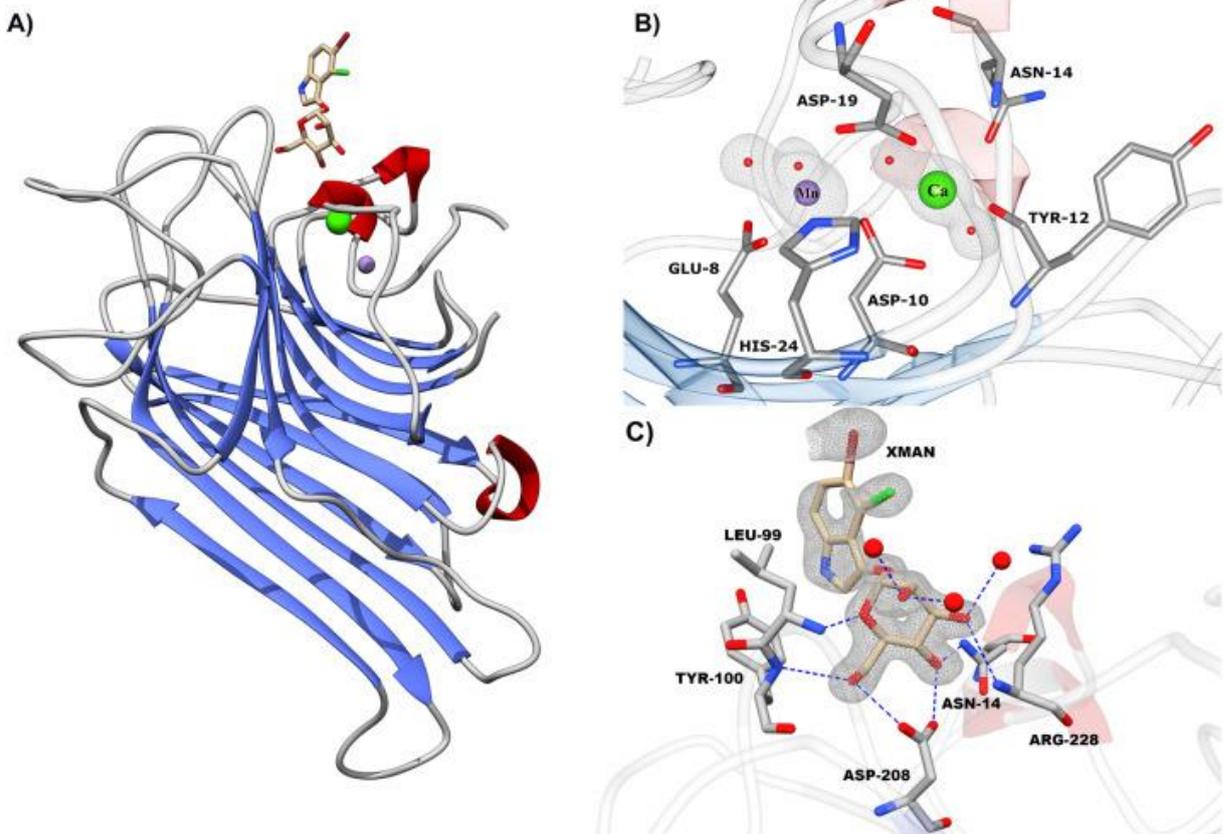


Fonte: elaborado pelo autor. Lectinas de *Dioclea lasiocarpa* (DLL, 99% de similaridade; PDB id: 5UUY), *Dioclea virgata* (DvirL, 98% de similaridade; Uniprot id: P58907), *Dioclea guianensis* (DguiL, 96% de similaridade; Uniprot id: P81637), *Dioclea reflexa* (DrfL, 93% de similaridade; Uniprot id: C0HK81), *Canavalia bonariensis* (CaBo, 86% de similaridade; Uniprot id: P58906), *Canavalia virosa* (ConV, 84% de similaridade; Uniprot id: C0HJY), e *Canavalia ensiformes* (ConA, 84% de similaridade; Uniprot id: P81461). Os símbolos são os seguintes: hélices 310 (η), β -fitas (β), β -curvas (TT), resíduos de ligação ao açúcar (círculos) e resíduos de ligação à metais (quadrados).

4.3 Sítios de ligação de DlyL

O monômero apresentou os íons cálcio e manganês no sítio de ligação à metais (MBS), assim como a molécula Xman ligada ao CRD. O DlyL contém um MBS altamente conservado localizado nas proximidades do CRD. Quatro aminoácidos estabilizam cada íon metálico, tendo dois resíduos em comum, totalizando seis resíduos compondo o sítio. O íon cálcio é coordenado pelos resíduos Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19, e o íon manganês é coordenado por Glu8, Asp10, Asp19 e His24, com duas moléculas de água coordenando cada íon (Figura 13A, B).

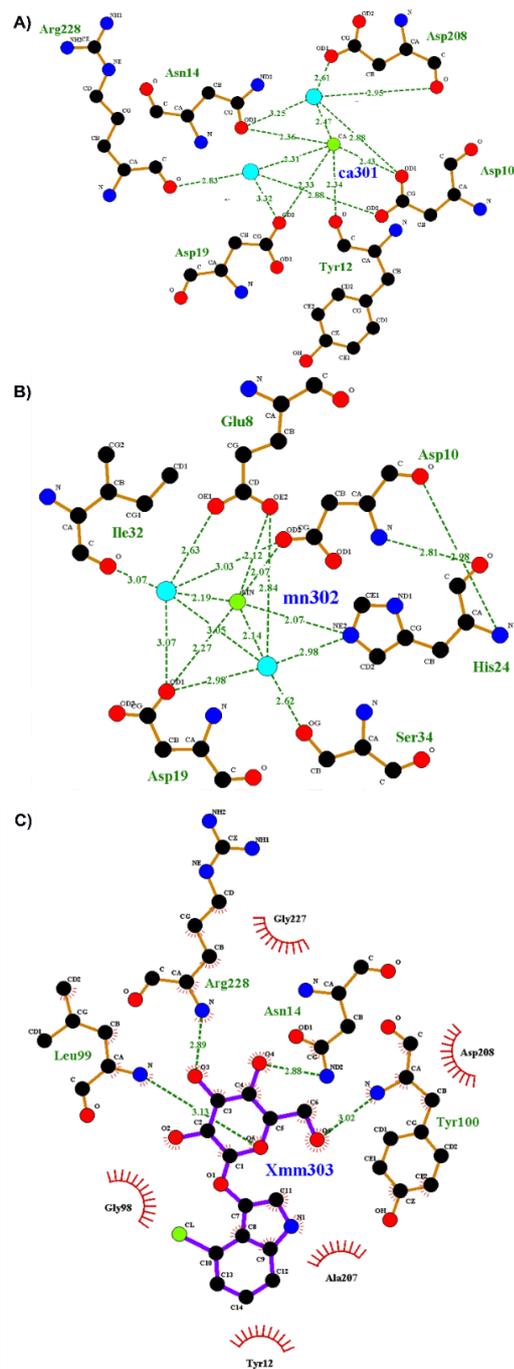
Figura 13 - A) monômero DlyL na representação *cartoon*; B) sítio de ligação à metais de DlyL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) de 3σ em torno de Ca^{2+} (esfera verde), Mn^{2+} (esfera roxa) e moléculas de água (esferas vermelhas); C) domínio de reconhecimento à carboidratos de DlyL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) de 3σ em torno do Xman. A molécula X-man está na representação de esqueleto carbônico com carbonos coloridos em amarelo.



Fonte: elaborado pelo autor.

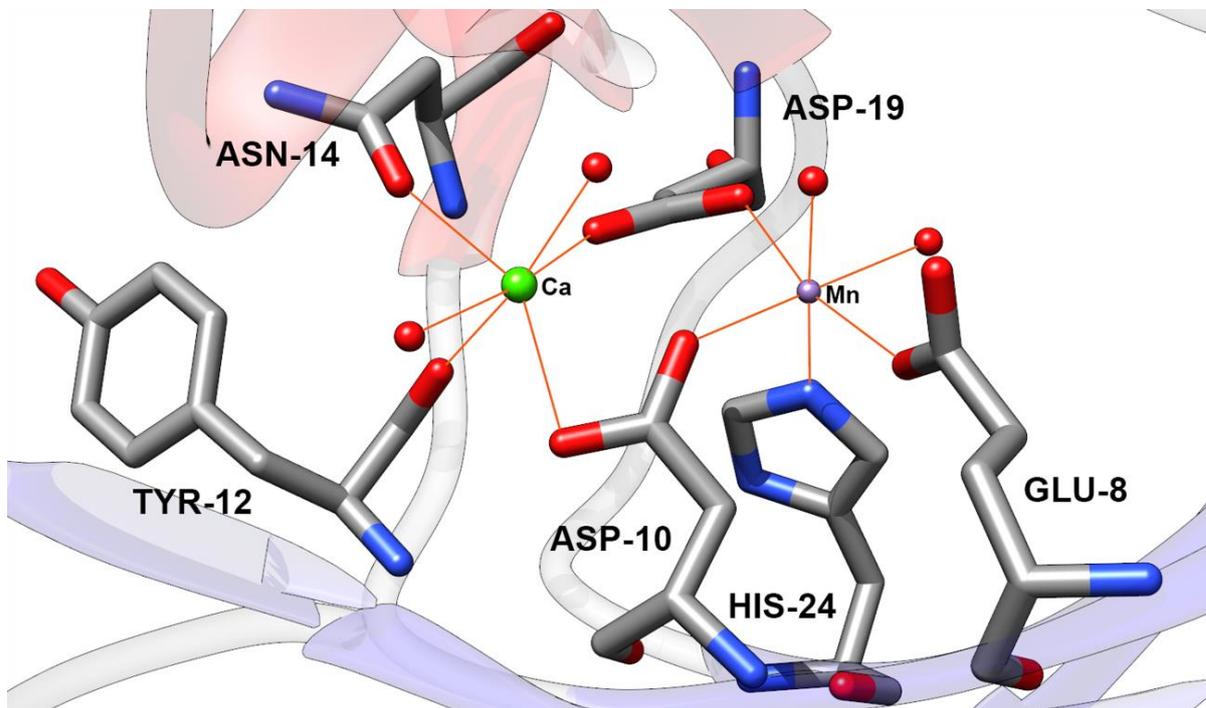
Uma representação 2D do LIGPLOT das coordenações dos íons com suas respectivas distâncias pode ser vista na Figura 14A-B. A análise do servidor CMM sugeriu a presença de ambos os cátions. O *B*-fator médio dos íons cálcio e manganês foi 20,40 Å² e 23,7 Å², respectivamente, ambos com ocupação de 100% e apresentando geometria de coordenação octaédrica (Figura 15).

Figura 14 - Representações LIGPLOT de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de coordenação em torno de A) Ca²⁺, B) Mn²⁺ e C) Xman.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15 - Sítio de ligação à metais de DlyL com as interações de coordenação em torno dos íons cálcio e manganês.



Fonte: elaborado pelo autor.

DlyL foi co-cristalizado com Xman para identificação do seu CRD. O *B*-fator médio da molécula de Xman foi de 27 Å² com ocupação de 100%. A cavidade em que o CRD se encontra é formada por quatro segmentos descontínuos: Tyr12-Phe13-Asn14-Thr15-Asp16, Gly98-Leu99-Tyr100 e Ala207-Asp208 e Gly227-Arg228-Leu229. O Xman foi estabilizado no CRD por uma rede de ligações de hidrogênio que conectam os resíduos Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 aos resíduos N1, O3, O4, O5 e O6 presentes na estrutura Xman (Figura 13C; Tabela 3). Além disso, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas entre os resíduos Gly98, Leu99, Ala207, Asp208, Gly227, Arg228 e átomos de C6, C11, O4, O5 e O6 do ligante foram identificados (Figura 14C; Tabela 3).

Tabela 3 - Interações de Van der Waals e polares entre DlyL e Xman.

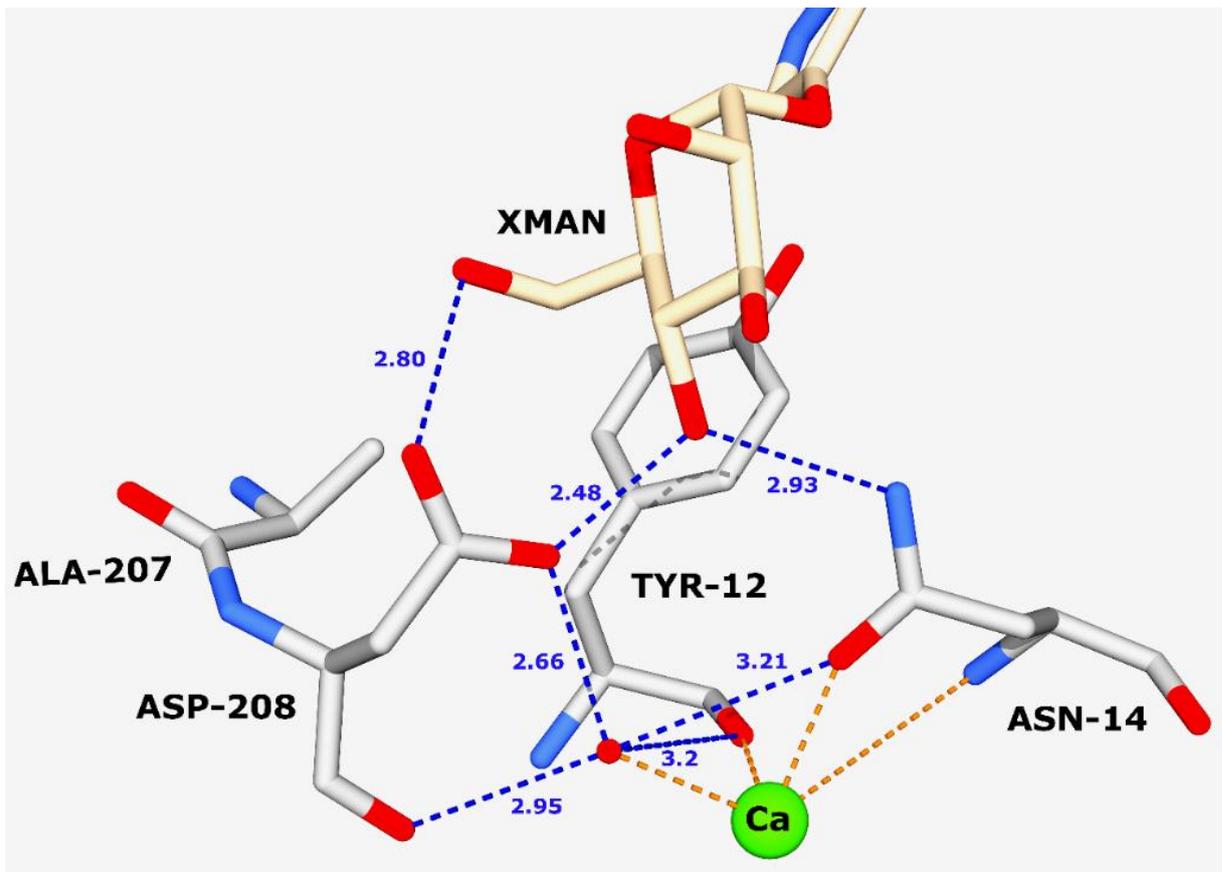
| Aminoácido | X-Man | Distância (Å) |
|------------------------------------|-------|---------------|
| <i>Interações de van der Waals</i> | | |
| Arg228 CB | O4 | 3.40 |
| Asp208 OD2 | C6 | 3.39 |
| Asp208 CG | O4 | 3.34 |
| Leu99 CB | O5 | 3.20 |
| Gly98 CA | O6 | 3.24 |
| Ala207 CB | O6 | 3.35 |
| Tyr12 OH | C11 | 3.16 |
| <i>Contatos Polares</i> | | |
| Tyr12 OH | N1 | 3.32 |
| Arg228 N | O3 | 2.91 |
| Arg228 N | O4 | 3.36 |
| Asn14 ND2 | O4 | 2.93 |
| Asp208 OD1 | O4 | 2.49 |
| Asp208 OD2 | O6 | 2.80 |
| Leu99 N | O5 | 3.10 |
| Leu99 N | O6 | 3.12 |
| Tyr100 N | O6 | 3.06 |
| Tyr100 O | O6 | 3.39 |

Fonte: elaborado pelo autor.

O íon cálcio é responsável pela estabilização de um peptídeo *cis* entre Ala207 e Asp208 através de uma ponte formada com uma molécula de água (Figure 16). A formação desse peptídeo *cis* é importante para a formação de CRD; assim, os resíduos Ala207-Asp208 são posicionados na base do CRD e estabilizam o ligante dentro do domínio. O peptídeo *cis* Ala-Asp é altamente conservado em lectinas de leguminosas e é crucial para a manutenção do CRD nessas proteínas (LORIS *et al.*, 1998). Além disso, o íon cálcio interage diretamente com os resíduos Tyr12 e Asn14, estabilizando a alça Tyr12-Phe13-Asn14-Thr15-Asp16 para interagir com os ligantes. Todos os resíduos de aminoácidos do MBS e CRD são conservados em lectinas de Diocleinae (Figura 12), como DLL, DvirL, DguiL, DrfL, CaBo, ConA, ConV,

bem como DlyL (BATISTA DA NOBREGA *et al.*, 2012; CAVADA *et al.*, 2018b, 2018c, 2019a, 2019b; NAGANO *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017a).

Figura 16 - Representação da estabilização de resíduos de CRD pelo íon cálcio. As esferas representam o íon cálcio (em verde) e a molécula de água (em vermelho).



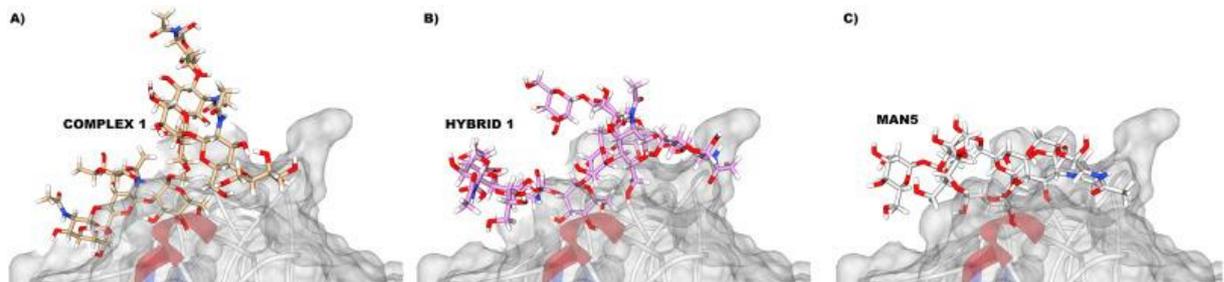
Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Docking molecular

As representações e as pontuações de *docking* de DlyL com *N*-glicanos são mostradas nas Figuras 17 e 18, e Tabela 4. As interações formadas entre DlyL e o complexo1 e complexo2 apresentaram pontuações de acoplamento de -72,20 e -61,88, indicando que a lectina pode teoricamente interagir com a porção manosil (Figura 17A e Figura 18A) desses glicanos e que terminal composto por ácido siálico afeta a ligação de DlyL a este tipo de glicano. Para glicanos do tipo híbrido, DlyL interagiu favoravelmente com o híbrido1 (pontuação: -71,81) e o híbrido2 (pontuação: -60,18) (Figura 17B e Figura 18B), demonstrando um efeito positivo com a presença de ácido siálico na região terminal. DlyL interagiu favoravelmente com

N-glicanos ricos em manose, especialmente com Man5 (Figura 17C), com uma pontuação de -49,75. Os complexos DlyL-Man3 e DlyL-Man9 (Figure 18C, D) apresentaram pontuações de -44,57 e -46,75, valores mais baixos em comparação com os outros glicanos testados. Em geral, em comparação com o CaBo (PDB id: 5U3E) e DLL (PDB id: 5UUY), DlyL interagiu menos favoravelmente com os *N*-glicanos ricos em manose (Tabela 4) (CAVADA *et al.*, 2018b; NASCIMENTO *et al.*, 2017). Além disso, o *redocking* com Xman apresentou interações semelhantes às da estrutura cristalográfica, validando nossos resultados. Ao comparar as pontuações de *docking* entre Xman e *N*-glicanos, é possível afirmar que DlyL pode interagir com todos os tipos de *N*-glicanos testados (Tabela 3).

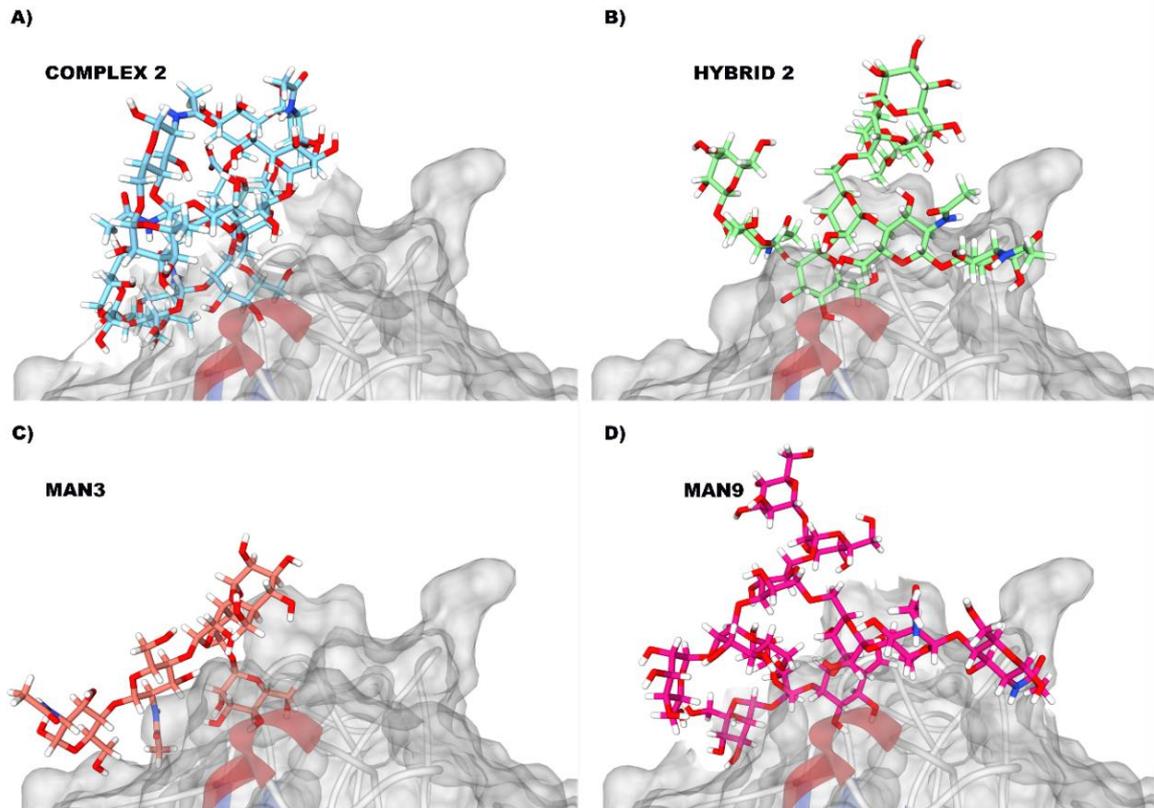
Figura 17 - DlyL complexada com *N*-glicanos a partir dos resultados de *docking*. As cadeias polipeptídicas são representadas na representação de *cartoon* e em superfície cinza. Os glicanos estão na representação de esqueletos carbônicos. DlyL complexada com A) Complexo1, B) Híbrido1, C) Man5.



Fonte: elaborado pelo autor.

Nas glicoproteínas que são *N*-glicosiladas, os carboidratos são ancorados covalentemente ao resíduo de asparagina na sequência Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Nos eucariotos, o processo de glicosilação é iniciado no retículo endoplasmático rugoso (RER) pela adição covalente de um precursor de oligossacarídeo (2 *N*-acetilglucosamina, 9 manose e 3 glicose) à asparagina da proteína alvo. O precursor comum pode gerar as três principais classes de glicanos *N*-ligados: complexo, híbrido ou ricos em manose (Figura 6).

Figura 18 - DlyL complexada com N-glicanos a partir dos resultados de docking. As cadeias polipeptídicas são representadas na representação de cartoon e em superfície cinza. Os glicanos estão na representação de esqueletos carbônicos. DlyL complexada com A) Complexo2; B). Híbrido 2; C) Man3; D) Man9.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 4 - Interações de DlyL com N-glicanos.

| Carboidratos | Pontuações de <i>docking</i> | | |
|--------------|------------------------------|-------------------|------------------|
| | DlyL | CaBo ^a | DLL ^b |
| Xman | -43.58 | - | - |
| Man3 | -42.42 | -57.04 | -58.21 |
| Man5 | -48.40 | -54.62 | -62.42 |
| Man9 | -44.28 | -71.33 | -58.10 |
| Complexo1 | -61.49 | -54.71 | -59.81 |
| Complexo2 | -55.10 | -35.39 | -61.54 |
| Híbrido1 | -69.10 | -47.59 | -61.51 |
| Híbrido2 | -60.29 | -60.80 | -75.03 |

Fonte: elaborado pelo autor. (a) Pontuações de *docking* da lectina de *Canavalia bonariensis* (CAVADA *et al.*, 2018b); (b) Pontuações de *docking* da lectin de *Dioclea lasiocarpa* (NASCIMENTO *et al.*, 2017).

Os resíduos de glicose são removidos no RER e a glicoproteína é exportada para o aparelho de Golgi (AG). No AG, os resíduos de manose podem ser removidos ou não, e outros monossacarídeos (*N*-acetilglucosamina, *N*-acetilgalactosamina, galactose, fucose e ácido siálico) podem ser adicionados ao final da cadeia do glicano (BIEBERICH, 2014; NAGAE; YAMAGUCHI, 2012; PINHO; REIS, 2015; SUN *et al.*, 2012). Muitos desses glicanos estão em glicoconjugados presentes na superfície celular, e modificações estruturais nesses oligossacarídeos são observadas em células malignas (GOETZ *et al.*, 2009; NAGAE; YAMAGUCHI, 2012; PINHO; REIS, 2015; POWLESLAND *et al.*, 2009). *N*-glicanos modificados podem afetar a sobrevivência e a progressão dos tumores, bem como acelerar processos invasivos e metastáticos na maioria das linhas de câncer, como o glioma (STOWELL; JU; CUMMINGS, 2015; VEILLON *et al.*, 2018; YAMAMOTO *et al.*, 2000).

O tipo complexo apresenta um ou mais ramos de *N*-acetil-lactosamina (LacNAc) (Galactosil- β 1,4-*N*-acetil-D-glucosamina) ligados ao núcleo principal (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011). Neste trabalho, o complexo1 representa um glicano biantenário com ramos LacNAc, com um ramo apresentando um grupo fucosil, enquanto o complexo2 é semelhante, mas com ácido siálico em um terminal galactosil. O híbrido mostra características dos glicanos complexos e dos ricos em manose, apresentando ramos com porções manosil e outros com resíduos LacNAc (SUN *et al.*, 2012). O híbrido1 é composto por dois grupos manosil acoplados a um ramo do núcleo e um LacNAc sialilado acoplado ao outro, enquanto o híbrido2 possui uma estrutura semelhante, mas sem o ácido siálico. O tipo de glicanos com alto teor de manose apresenta apenas porções manosil nos ramos (BIEBERICH, 2014; SUN *et al.*, 2012).

As pontuações de *docking* de DlyL para *N*-glicanos complexos demonstraram resultados semelhantes aos de CaBo (CAVADA *et al.*, 2018b), mas diferentes dos de DLL (NASCIMENTO *et al.*, 2017), que não foram afetados pela presença de ácido siálico (Tabela 4). Para glicanos híbridos, a presença de ácido siálico afetou positivamente a interação, demonstrando um efeito oposto ao observado para os *N*-glicanos complexos. Esses resultados foram diferentes dos das análises de *docking* de CaBo e DLL, em que foi observada uma diminuição pontuação na molécula sialilada (Tabela 4) (CAVADA *et al.*, 2018b; NASCIMENTO *et al.*, 2017). No caso dos *N*-glicanos ricos em manose, DlyL interagiu mais favoravelmente com o Man5 do que com o Man3 ou o Man9. Esses resultados contrastam com os de estudos anteriores sobre *docking* de corpo rígido a partir de estrutura modelada que demonstraram uma menor afinidade pelo Man5 (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017b). O

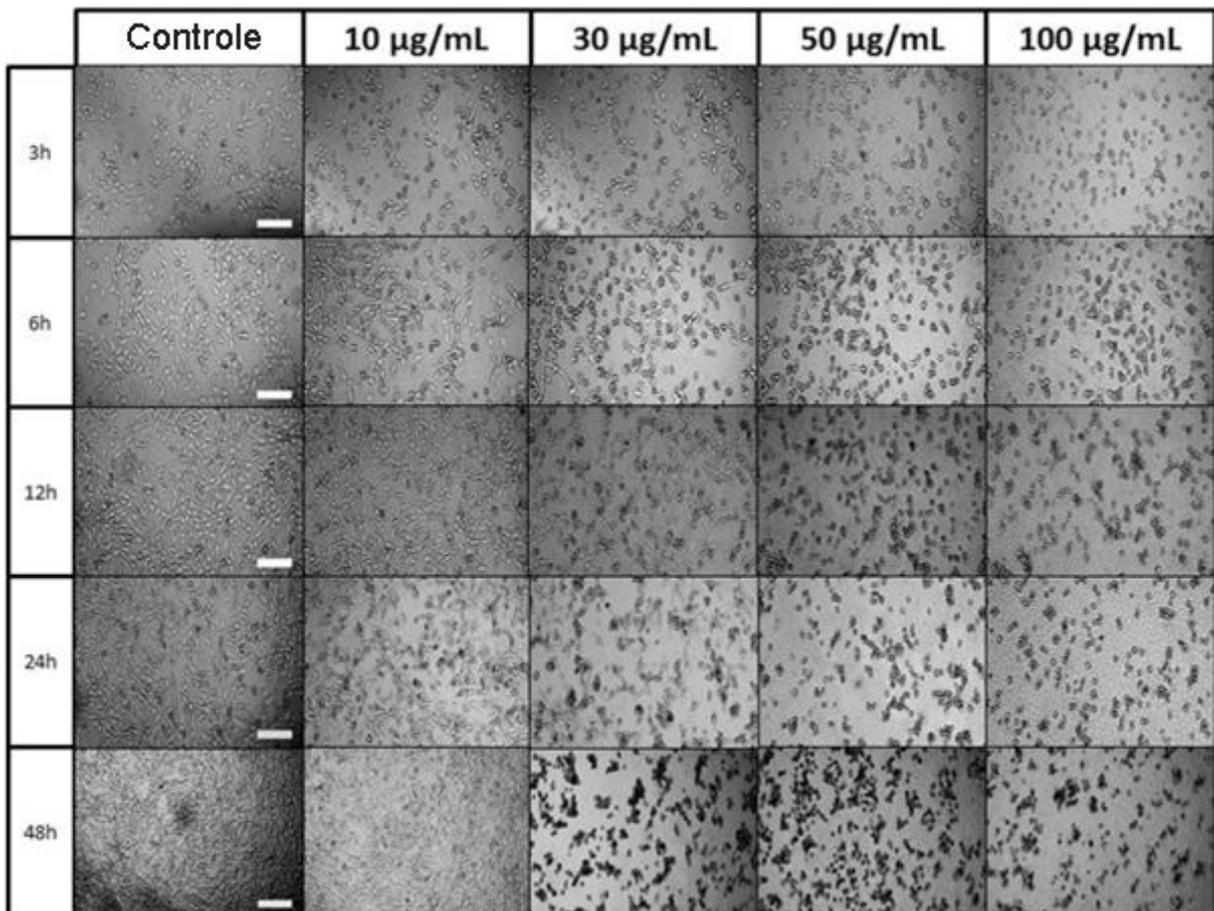
posicionamento diferenciado dos átomos e a ausência de solvatação na estrutura modelada são fatores que podem ter gerado essa discrepância na pontuação em relação à estrutura cristalográfica. Além disso, neste trabalho foi permitida uma flexibilidade parcial dos resíduos de CRD, enquanto no trabalho anterior a DlyL foi mantida completamente rígida. DlyL teve um comportamento semelhante ao DLL, pois interagiu menos favoravelmente com os *N*-glicanos ricos em manose em comparação com os outros tipos de glicanos, o que é inesperado para as lectinas com especificidade à manose (CAVADA *et al.*, 2018b) e diferente do comportamento do CaBo que interagiu mais favoravelmente com esses glicanos (NASCIMENTO *et al.*, 2017). Assim, embora as lectinas sejam muito semelhantes, as variações observadas demonstram que elas interagem de maneira diferente com diferentes glicanos, tornando bastante explícito que mesmo pequenas substituições de aminoácidos podem afetar a maneira como essas proteínas interagem com seus ligantes, explicando a diferença de intensidade observada em atividades biológicas de Diocleinae lectinas (CAVADA *et al.*, 2018c).

Man9 e Man5 fazem parte da glicosilação da gp120 presente no envelope do HIV e são essenciais para a ligação do HIV aos receptores da superfície celular, como o CD4 (cluster de diferenciação 4) (QI; JO; IM, 2016; SIROIS *et al.*, 2007). Man5 apresentou a maior pontuação para DlyL, e essa interação já foi comprovada experimentalmente para outras lectinas de Diocleinae (DAM *et al.*, 1998). Algumas lectinas de leguminosas específicas para manose foram capazes de inibir a fusão do vírus HIV com células CD4 através da interação com a gp120 (HANSEN *et al.*, 1989). Assim, nossos dados sugerem que o DlyL pode ter a mesma capacidade de inibir a infecção pelo HIV. As pontuações de *docking* indicaram que a lectina poderia interagir fortemente com todos os glicanos testados (MARQUES *et al.*, 2017; PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017c). Portanto, é possível concluir que os efeitos biológicos de DlyL estão relacionados à sua capacidade de ligação aos *N*-glicanos.

4.5 Efeito do DlyL nas células de glioma C6 de rato

Os resultados mostram que DlyL 30–100 $\mu\text{g/mL}$ induziu alterações morfológicas das células de glioma C6 de rato após 6 h de incubação (Figura 19). A forma aderente foi alterada para uma forma esférica em resposta à DlyL. Além disso, foram observados detritos, que caracterizam a degradação da matriz extracelular e a indução de morte celular.

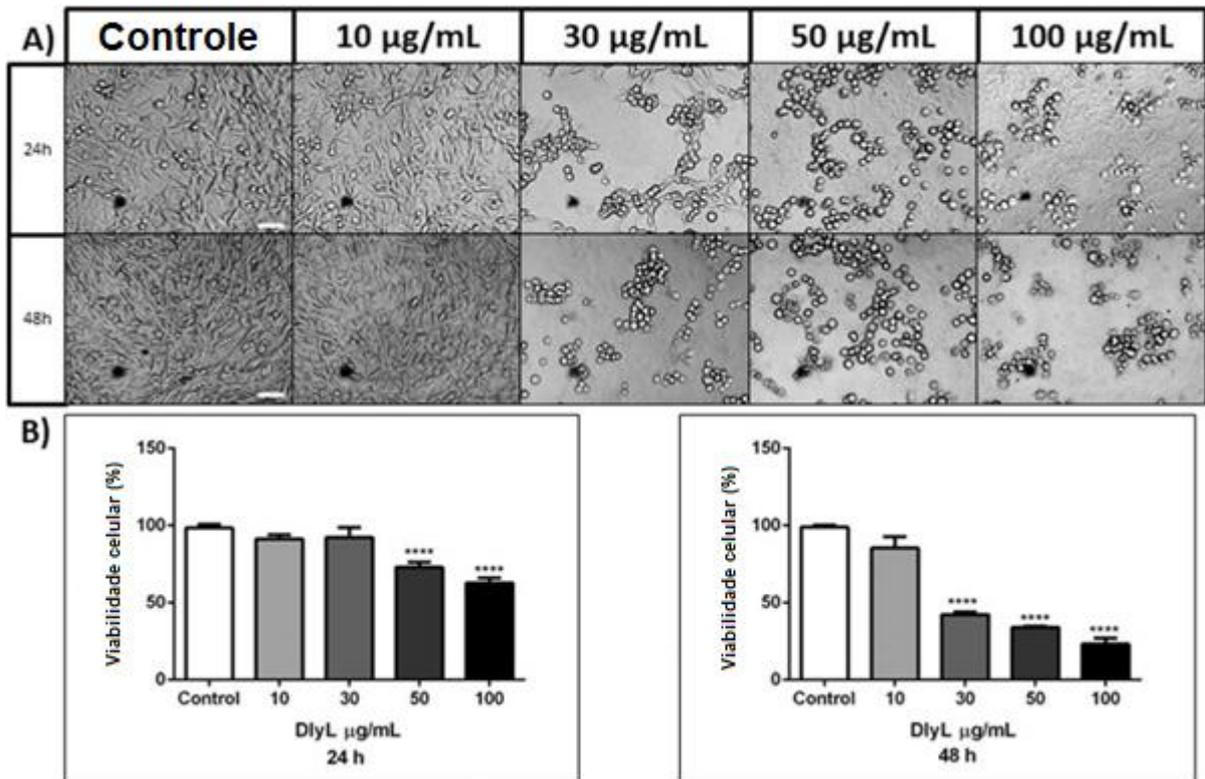
Figura 19 - O tratamento com DlyL altera a morfologia das células de glioma C6. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo (HEPES; controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por 3, 6, 12, 24 ou 48 h, seguidas de análise da morfologia celular. As células foram avaliadas pelo microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U por microscopia óptica (10 \times), e as imagens são representativas de três experimentos independentes realizadas em triplicata. As barras brancas representam 100 μm .



Fonte: elaborado pelo autor.

DlyL nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuiu a viabilidade celular após 24 horas e entre 30-100 $\mu\text{g/mL}$ após 48 horas de tratamento, conforme medido pelo ensaio MTT (Figura 20), não havendo diferenças estatísticas.

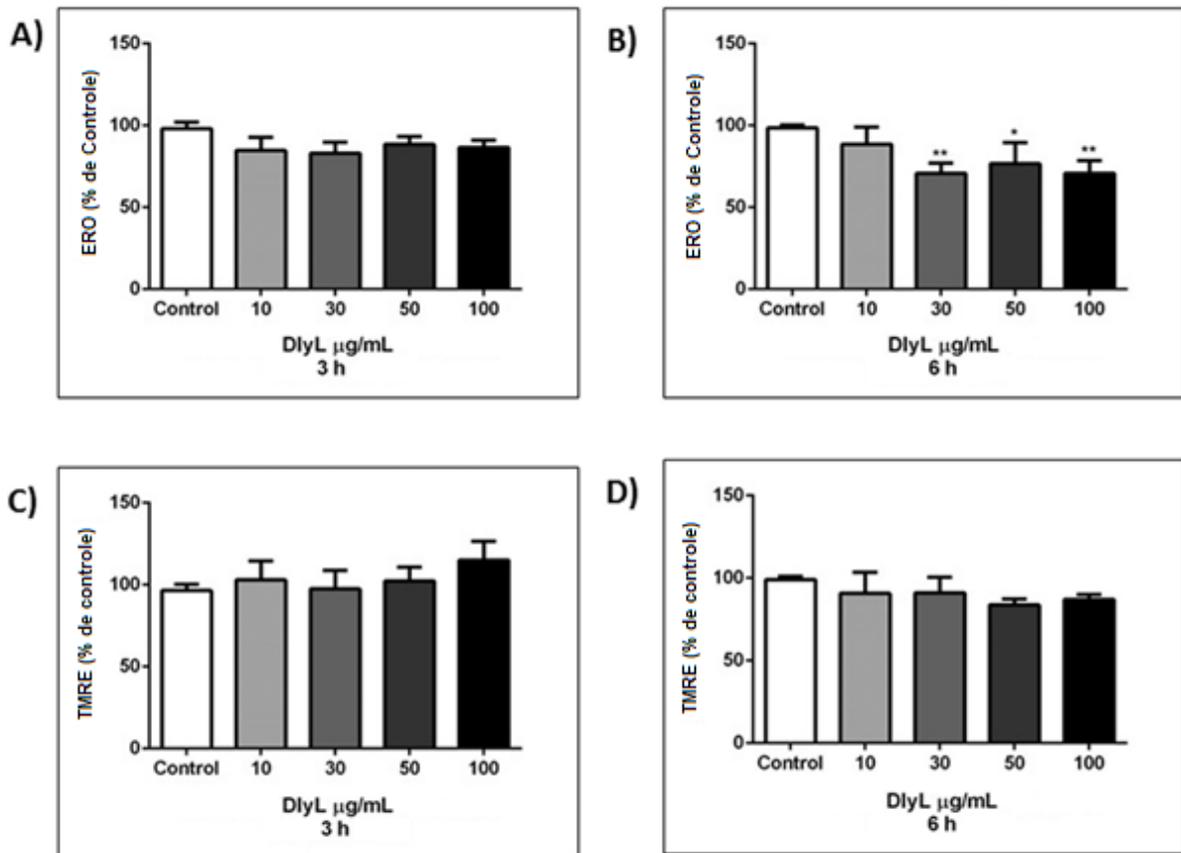
Figura 20 - DlyL altera a viabilidade e morfologia celular. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo (HEPES; controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) por 24 ou 48 h. (A) é uma imagem representativa de quatro experimentos independentes realizados em triplicata, e mostra a morfologia celular, avaliada por microscopia óptica, em resposta à exposição à DlyL (24 e 48 h). As células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (10 \times). (B) mostra a viabilidade celular medida pelo ensaio MTT após tratamento com DlyL por 24 h e 48 h, respectivamente. Os dados são expressos como uma porcentagem de controle (considerado 100%), e os valores são apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. **** $p < 0,0001$, em comparação ao controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

Com base nesses achados, também foi avaliada a capacidade de DlyL de alterar os níveis de ERO, o potencial da membrana mitocondrial e a capacidade de ativar a caspase-3. Os resultados mostram que o DlyL 30–100 $\mu\text{g/mL}$ causou uma redução no nível de ERO após 6 h de incubação sem alterações no potencial da membrana mitocondrial (Figura 21).

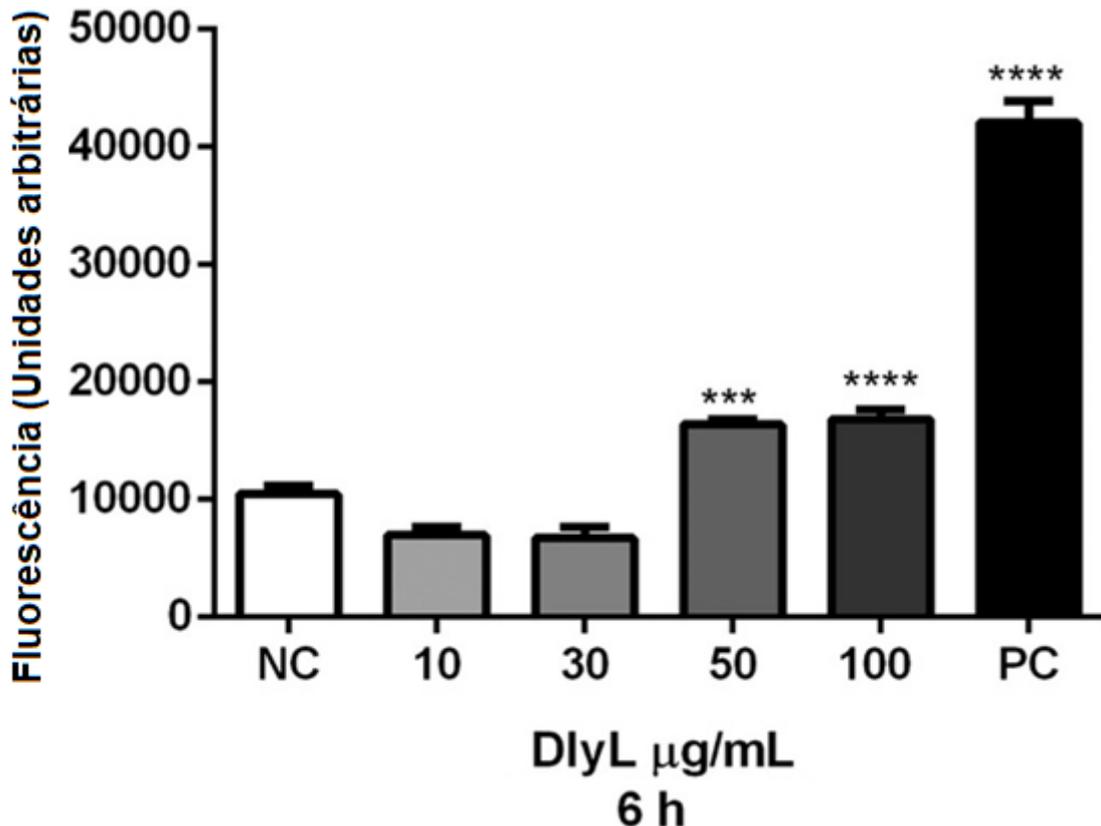
Figura 21 - DlyL altera o nível de ERO, mas não modificou o potencial da membrana mitocondrial. As células de glioma C6 foram expostas (3 e 6 h) ao veículo (HEPES; controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). (A) e (B) mostram níveis de ERO avaliados pelo corante fluorescente di-hidrorodamina (DCF-DA) após 3 e 6 h de tratamento, respectivamente. (C) e (D) mostram o potencial mitocondrial avaliado por sonda fluorescente de éster etílico (TMRE) após 3 e 6 h de tratamento, respectivamente. Os dados são expressos como uma porcentagem de controle e os valores são apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.



Fonte: elaborado pelo autor.

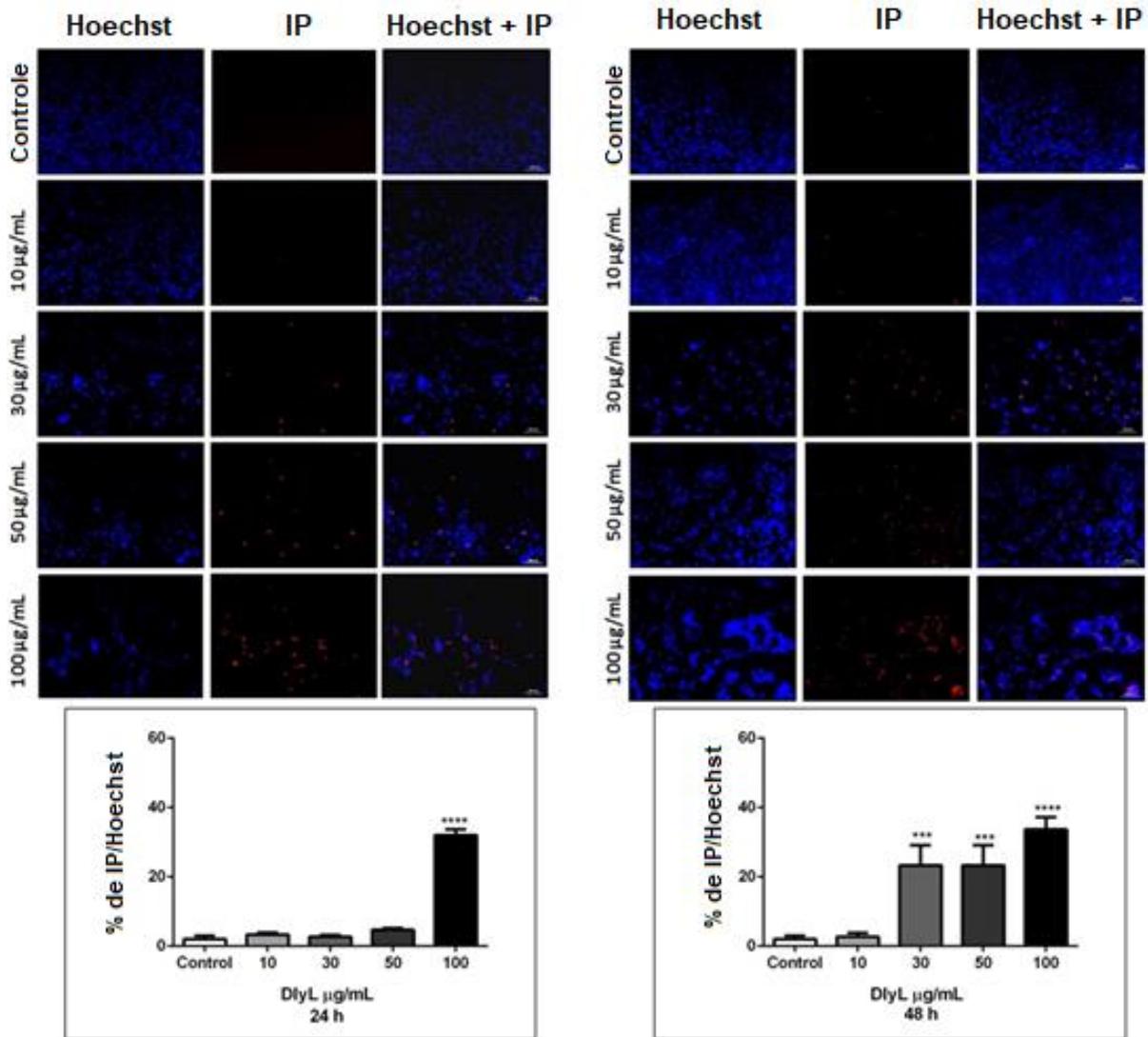
Além disso, DlyL à 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (6 h) promoveram leve ativação da caspase-3 (Figura 22), em comparação ao controle positivo, estaurosporina (1 μM). Para detectar a ruptura da membrana celular em resposta ao tratamento com lectina, foi realizado o ensaio de iodeto de propídio (IP) após 24 e 48 h de incubação. Observou-se um aumento significativo da marcação de IP em DlyL 100 $\mu\text{g/mL}$ após 24 h de incubação (Figura 23), enquanto após 48 h de incubação, DlyL 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ poderia aumentar a marcação de IP em comparação ao controle (Figura 23B). Estes resultados indicam que a morte celular com lesão de membrana se aproxima de 40% do total de células e que aparece após um longo período de incubação.

Figura 22 - DlyL ativa Caspase-3. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 6 h, seguidas pela medição da atividade da Caspase 3. O gráfico demonstra a atividade da Caspase 3 após 6 h de tratamento com veículo (NC) ou DlyL. O controle positivo (PC) foi realizado com estaurosporina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados são expressos como uma porcentagem de controle e os valores são apresentados como média \pm EPM de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, em comparação ao controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

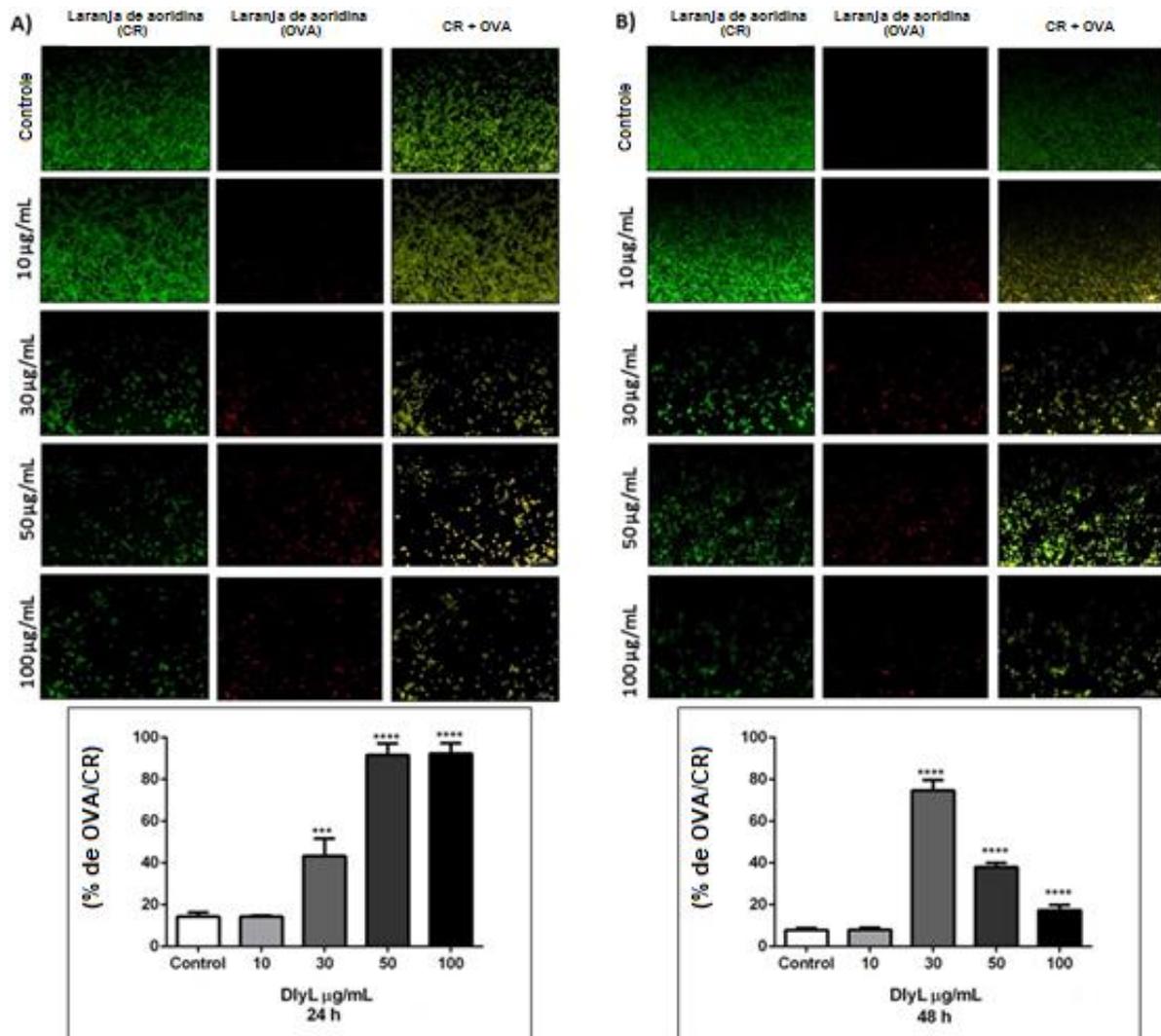
Figura 23 - DlyL induz lesão na membrana celular do glioma C6. As células de glioma C6 foram incubadas com veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h ou 48 h. As células foram coradas com Hoechst e iodeto de propídio (IP). Posteriormente, as células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (10 \times). A figura mostra uma imagem representativa e quantificação da coloração de IP por 24 h (A) e 48 h (B) após o tratamento. As imagens são representativas de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação foi expressa como uma porcentagem da fluorescência IP/Hoechst, e os valores são apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicatas. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$, em comparação ao controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

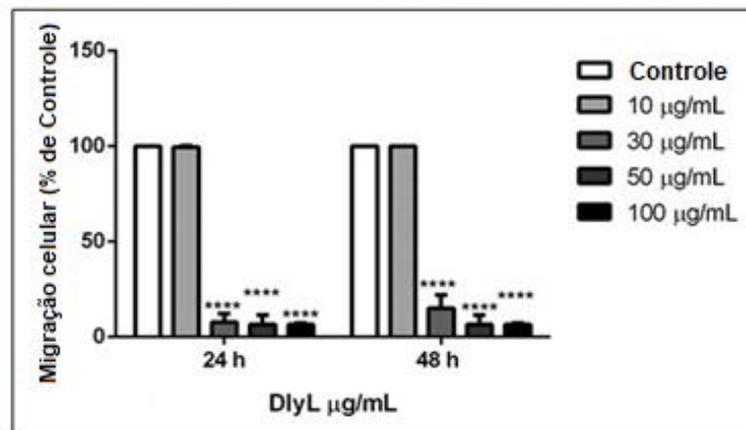
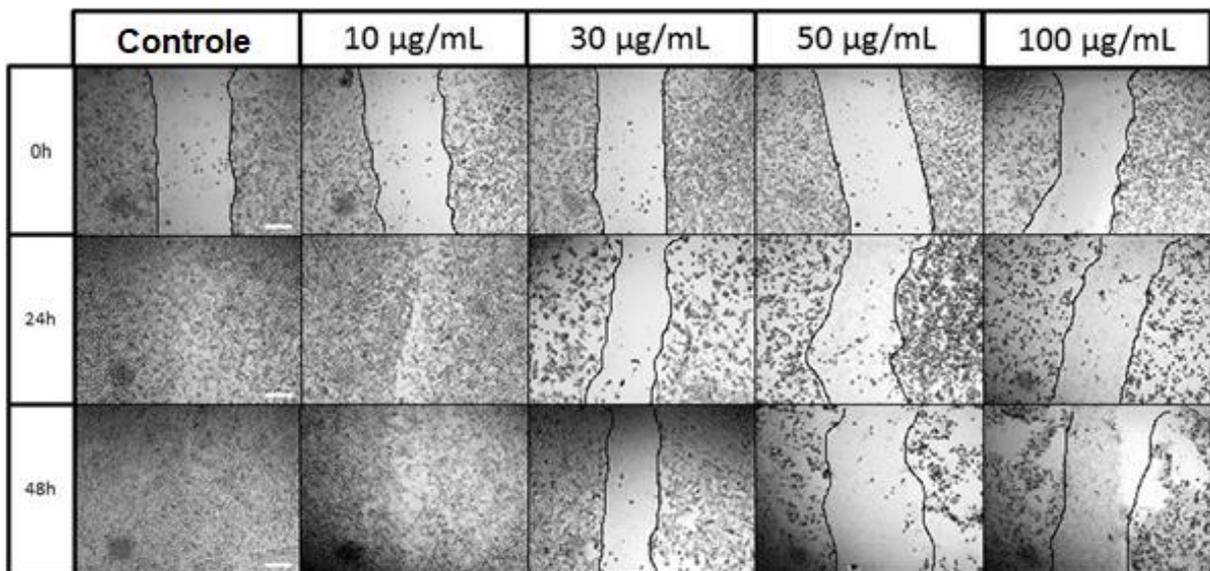
A possível mediação de processos autofágicos por DlyL também foi avaliada usando o ensaio de laranja de acridina. Os resultados mostraram um aumento robusto, aproximando-se de 90%, das organelas vesiculares ácidas (OVAs) em resposta ao DlyL a 50 e 100 µg/mL e cerca de 50% em resposta ao DlyL a 30 µg/mL após 24 h de incubação (Figura 24). No entanto, após 48 horas de tratamento, o efeito de DlyL 30 µg/mL foi mais proeminente (cerca de 80% dos OVAs) quando comparado ao de 50 e 100 µg/mL, o que induziu um aumento no OVA aproximando-se de 40 e 20%, respectivamente (Figura 24B). Finalmente, também foi avaliada a capacidade do DlyL de afetar a migração celular. Nossos dados mostram que o DlyL de 30 a 100 µg/mL inibiu a migração de células C6 em até 90% em comparação ao controle (Figure 25).

Figura 22 - DlyL melhora a detecção de organelas vesiculares ácidas (OVAs) em células de glioma C6. A figura mostra imagens representativas e quantificação da coloração com laranja de acridina das células de glioma C6 após incubação com veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h (A) e 48 h (B). Cromatina (CR) e organelas da vesícula ácida (OVA) foram identificadas como coloração verde e vermelha, respectivamente. As células positivas para OVA (vermelhas) representam autofagia, e a sobreposição de OVA e CR é apresentada como CR + OVA. As células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (ampliação de 10x). A quantificação foi expressa como uma porcentagem de OVA/CR, e os valores são apresentados como média \pm EPM de quatro experimentos independentes realizados em triplicado. *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$, em comparação ao controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 23 - Efeito inibitório do DlyL na migração celular de glioma C6. As células foram plaqueadas em uma placa de 48 poços na concentração de $1,5 \times 10^4$ células por poço e cultivadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura foi descartado e uma ferida foi introduzida raspando as camadas celulares confluentes com uma ponta de pipeta P200, seguida de lavagem com PBS. Posteriormente, DMEM isento de soro contendo veículo (controle) ou DlyL (10, 30, 50 ou 100 µg/mL) foi adicionado e as células foram mantidas nessas condições por 48 h. As imagens foram adquiridas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U (ampliação de 5×) nos períodos de 0, 24 e 48 h após os tratamentos. As linhas definem a área sem células. O gráfico mostra a magnitude da inibição da migração celular por DlyL. Para quantificação, a ferida foi medida (distância em mm entre as bordas) em cada momento e o valor expresso é uma porcentagem do fechamento total (100%). As barras representam 200 µm. Os valores são expressos como média ± EPM de quatro experiências independentes realizadas em triplicado. **** p <0,0001, em comparação ao controle.



Fonte: elaborado pelo autor.

Vários estudos sugeriram as lectinas vegetais como moléculas biológicas capazes de induzir a morte de células tumorais via modulação de vias apoptóticas e (FU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2013). Foi relatado que a lectina Concanavalina A (ConA) que possui especificidade à manose/glicose desencadeia autofagia em células de hepatoma, bem como apoptose mediada por mitocôndrias em células de melanoma e células de carcinoma hepatocelular humano (CHANG *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2013).

A ConA também foi capaz de induzir a autofagia em células de glioma U87 humano por um mecanismo envolvendo JAK2/STAT3, metaloproteinase de matriz tipo 1 de membrana (MT1-MMP) e indução de BNIP3 (CHANG *et al.*, 2007; PRATT; ANNABI, 2014; PRATT; ROY; ANNABI, 2012). Além disso, sugeriu-se que a lectina de ligação à manose (MBL), uma lectina de mamífero dependente de Ca^{2+} e específica para manose e N-acetilglucosamina, que exibe um biomarcador e potencial terapêutico para muitas doenças humanas (SINGH *et al.*, 2016b), possui atividade inibidora de crescimento contra células de carcinoma colorretal humano (MA *et al.*, 1999) e capacidade de ligar células de glioma e promover a ativação do complemento (FUJITA *et al.*, 1995).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que as lectinas de leguminosas de ligação à glicose/manose, incluindo ConV (purificado de *Canavalia virosa*), CaBo (purificado de *Canavalia bonariensis*) e DLL (purificado de *Dioclea lasiocarpa*), são capazes de alterar a morfologia celular, inibindo a migração celular, induzindo autofagia e provocando morte celular de glioma com diferentes perfis e potência (CAVADA *et al.*, 2018b; NASCIMENTO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017). Portanto, é interessante notar que a capacidade do DlyL de ativar a Caspase 3, por exemplo, não atingiu a intensidade da DLL (NASCIMENTO *et al.*, 2017), indicando, novamente, que pequenas diferenças estruturais podem desencadear diferentes graus de potência em relação à indução de apoptose em células de glioma (CAVADA *et al.*, 2018c).

A autofagia é um processo catabólico evolutivamente conservado pelo qual proteínas e organelas danificadas são encapsuladas no autofagossomo de membrana dupla e degradadas no lisossomo no contexto de uma série altamente orquestrada de eventos moleculares. No entanto, em contraste com o papel protetor das células fisiológicas da autofagia, papéis conflitantes foram relatados para esse processo no câncer (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017). Portanto, a autofagia é um mecanismo complexo que pode produzir morte ou sobrevivência celular (PRATT; ANNABI, 2014; PRATT; ROY; ANNABI, 2012; REDMANN; DARLEY-

USMAR; ZHANG, 2016). No presente estudo, DlyL 30–100 µg/mL pode provocar autofagia intensa após 24 h de incubação. De fato, esse efeito nas células de glioblastoma foi encontrado em resposta a outras lectinas de leguminosas, como ConV, CaBo e ConA, nessa faixa de concentração (CAVADA *et al.*, 2018b; OSTERNE *et al.*, 2017; PRATT; ANNABI, 2014; PRATT; ROY; ANNABI, 2012), e no caso da DLL, também na concentração de 10 µg/mL (NASCIMENTO *et al.*, 2017). Após 48 h de tratamento, é digno de nota que o marcador autofágico (OVA) não é tão evidente, enquanto uma diminuição robusta na viabilidade celular e o aparecimento de rompimento da membrana celular (aumento de 20-40% na marcação de IP) foram claramente detectados. No entanto, o efeito sobre a ruptura da membrana foi relativamente menor comparado ao tratamento de células C6 por 48 h com DLL ou ConV, no qual foi observado um aumento de 40 a 90% na marcação de IP (NASCIMENTO *et al.*, 2017; OSTERNE *et al.*, 2017). O papel da ERO e da autofagia na sobrevivência ou morte de células cancerígenas são elementos-chave para estratégias de tratamento (HAMBRIGHT; GHOSH, 2017; WALTON, 2016). Nossos dados mostraram que o DlyL (30–100 µg/mL) induziu uma diminuição no nível de ERO após 6 h de incubação. Embora não tenhamos explorado mais esse mecanismo, podemos especular que ele possa estar associado a uma autofagia precoce induzida por lectina, o que poderia diminuir a geração ERO basal de células de glioma C6. No entanto, esse aspecto está fora do escopo do presente artigo e será abordado em estudos futuros.

Por meio do ensaio de migração celular (Figura 25), DlyL (30–100 µg/mL) demonstrou retardar a proliferação/migração celular às 24 e 48 h. Note-se que esse efeito concorda com as alterações morfológicas que ocorrem no mesmo momento e faixa de concentração. Além disso, é importante destacar que essa ação inibitória do DlyL na migração celular foi mais intensa do que a encontrada em resposta ao CaBo e ConV (CAVADA *et al.*, 2018b; OSTERNE *et al.*, 2017; WILDBURGER *et al.*, 2015).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho relatou a estrutura tridimensional da lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla*, denominada DlyL. DlyL mostrou-se estruturalmente semelhante a outras lectinas de Diocleinae, no entanto, diferentes resíduos de aminoácidos impactam diferencialmente sua interação com ligantes e a estabilização da estrutura quaternária de proteínas. Esses aspectos foram abordados no trabalho e diretamente relacionados às diferenças observadas na análise *in silico* das interações com os *N*-glicanos, bem como ao potencial efeito citotóxico demonstrado pelas lectinas de Diocleinae. Portanto, os achados apoiam o potencial antitumoral e antiglioma das lectinas de leguminosas da subtribo Diocleinae, sugerindo que mesmo pequenas diferenças estruturais entre as lectinas podem alterar sua potência respectiva na mediação de autofagia e apoptose celular, o que é importante para o desenvolvimento de terapias antitumorais.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, K. L.; PIERCE, J. M. Lectin-Based Glycoproteomic Techniques for the Enrichment and Identification of Potential Biomarkers. **Methods in Enzymology**, [s.l.], v. 480, p. 461–476, 1 jan. 2010.
- ADAMS, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, [s.l.], v. 66, n. Pt 2, p. 213–221, fev. 2010.
- ALLEN, A. K. *et al.* Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s.l.], v. 28, n. 11, p. 1285–1291, nov. 1996.
- ALVES, A. C. *et al.* A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: Partial characterization and immobilization in chitosan beads. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 588, 2015.
- ANDERSEN, N. H. *et al.* Hevein: NMR assignment and assessment of solution-state folding for the agglutinin-toxin motif. **Biochemistry**, [s.l.], v. 32, n. 6, p. 1407–1422, fev. 1993.
- ARARIPE, D. A. *et al.* Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 102, 2017.
- ARAÚJO-FILHO, J. H. *et al.* A ConA-like lectin from *Dioclea guianensis* Benth. has antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*, unlike its homologues, ConM and ConA. **Journal of agricultural and food chemistry**, [s.l.], v. 58, n. 7, p. 4090–4096, abr. 2010.
- ARGOS, P.; TSUKIHARA, T.; ROSSMANN, M. G. A structural comparison of concanavalin A and tomato bushy stunt virus protein. **Journal of molecular evolution**, [s.l.], v. 15, n. 3, p. 169–179, jul. 1980.
- ASSREUY, A. M. S. *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [s.l.], v. 380, n. 6, p. 509–521, dez. 2009.
- BAKOWSKY, H. *et al.* Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1778, n. 1, p. 242–249, 1 jan. 2008.
- BANERJEE, R. *et al.* Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 259, n. 2, p. 281–296, 1996.
- BARI, A. U. *et al.* Lectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 92, 2016.

- BARRE, A. *et al.* Overview of the Structure–Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants, Algae and Fungi. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 20, n. 2, jan. 2019.
- BATISTA DA NOBREGA, R. *et al.* Structure of Dioclea virgata lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, [s.l.], v. 94, n. 3, p. 900–906, mar. 2012.
- BEAMAN, I. B. S. *et al.* United States Patent. 1996.
- BECKER, J. W. *et al.* The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 250, n. 4, p. 1513–1524, fev. 1975.
- BEINTEMA, J. J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 350, n. 2–3, p. 159–163, 22 ago. 1994.
- BENDA, P. *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science (New York, N.Y.)**, v. 161, n. 3839, p. 370–371, jul. 1968.
- BEZERRA, G. A. *et al.* Structural studies of an anti-inflammatory lectin from Canavalia boliviana seeds in complex with dimannosides. **PloS one**, [s.l.], v. 9, n. 5, p. e97015, 2014.
- BHUTIA, S. K. *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological research**, [s.l.], v. 144, p. 8–18, jun. 2019.
- BIEBERICH, E. Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. **Advances in neurobiology**, [s.l.], v. 9, p. 47–70, 2014.
- BIRD, G. W. Observations on the interactions of the erythrocytes of various species with certain seed agglutinins. **British journal of experimental pathology**, [s.l.], v. 35, n. 3, p. 252–254, jun. 1954.
- BOLOGNESI, A. *et al.* Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 12, nov. 2016.
- BOWLES, D. J. *et al.* Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. **The Journal of cell biology**, [s.l.], v. 102, n. 4, p. 1284–1297, abr. 1986.
- BOWLES, D. J.; PAPPIN, D. J. Traffic and assembly of concanavalin A. **Trends in biochemical sciences**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 60–64, fev. 1988.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, N.Y.)**, v. 119, n. 3091, p. 419, mar. 1954.
- BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 125, n. 5, p. 1238–1252, 2018.
- BRINDA, K. V. *et al.* Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein**

science : a publication of the Protein Society, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 1735–1749, jul. 2004.

CAVADA, B. S. *et al.* Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 123–135, jun. 2001.

CAVADA, B. S. *et al.* cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **The FEBS journal**, [s.l.], v. 273, n. 17, p. 3962–3974, set. 2006.

CAVADA, B. S. *et al.* Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa). **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 107, n. PartA, p. 236–246, 2018a.

CAVADA, B. S. *et al.* *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 106, 2018b.

CAVADA, B. S. *et al.* ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 20, n. 1, dez. 2018c.

CAVADA, B. S. *et al.* ConBr, the Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Seeds: Forty Years of Research. **Current protein & peptide science**, [s.l.], v. 20, n. 6, p. 600–613, 2019a.

CAVADA, B. S. *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 134, p. 901–911, 1 ago. 2019b.

CHANG, C.-P. *et al.* Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 45, n. 2, p. 286–296, fev. 2007.

CHELVANAYAGAM, G.; HERINGA, J.; ARGOS, P. Anatomy and evolution of proteins displaying the viral capsid jellyroll topology. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 228, n. 1, p. 220–242, nov. 1992.

CHEN, L. *et al.* ABCG2 downregulation in glioma stem cells enhances the therapeutic efficacy of demethoxycurcumin. **Oncotarget**, [s.l.], v. 8, n. 26, p. 43237–43247, jun. 2017.

CHEN, P. *et al.* Identification of N-glycan of alpha-fetoprotein by lectin affinity microarray. **Journal of cancer research and clinical oncology**, [s.l.], v. 134, n. 8, p. 851–860, ago. 2008.

CHENG, L. *et al.* Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. **Cell**, [s.l.], v. 153, n. 1, p. 139–152, mar. 2013.

CHERRY, A. E.; STELLA, N. G protein-coupled receptors as oncogenic signals in glioma: emerging therapeutic avenues. **Neuroscience**, [s.l.], v. 278, p. 222–236, out. 2014.

CHOI, S. H.; LYU, S. Y.; PARK, W. B. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase

inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. **Archives of pharmacal research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 68–76, jan. 2004.

CHRISPEELS, M. J. *et al.* Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 261, n. 22, p. 10021–10024, ago. 1986.

COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, [s.l.], v. 2017, p. 1594074, 2017.

CORIOLOANO, M. C. *et al.* Parkia pendula seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s.l.], v. 172, n. 5, p. 2682–2693, mar. 2014.

CUMMINGS, R. D. “Stuck on sugars – how carbohydrates regulate cell adhesion, recognition, and signaling”. **Glycoconjugate Journal**, [s.l.], v. 36, n. 4, p. 241–257, 2019.

CUMMINGS, R. D.; PIERCE, J. M. The challenge and promise of glycomics. **Chemistry & biology**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 1–15, jan. 2014.

DAM, T. K. *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. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 20, p. 12082–12088, maio 1998.

DE AVILA, M. B. *et al.* Supervised machine learning techniques to predict binding affinity. A study for cyclin-dependent kinase 2. **Biochemical and biophysical research communications**, [s.l.], v. 494, n. 1–2, p. 305–310, dez. 2017.

DE OLIVEIRA FIGUEIROA, E. *et al.* Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 34, p. 3667–3680, 2017.

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

DELATORRE, P. *et al.* Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from Canavalia maritima seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**, [s.l.], v. 95, n. 9, p. 1697–1703, set. 2013.

DEMARIA, S. *et al.* Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, v. 33, n. 4, p. 335–351, maio 2010.

EHRENBERG, B. *et al.* Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. **Biophysical journal**, [s.l.], v. 53, n. 5, p. 785–794, maio 1988.

EL-AASSAR, M. R. *et al.* Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. **International Journal of Biological**

Macromolecules, [s.l.], v. 69, p. 88–94, 1 ago. 2014.

EMSLEY, P. *et al.* Features and development of Coot. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, [s.l.], v. 66, n. Pt 4, p. 486–501, abr. 2010.

EVANS, P. R. An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, [s.l.], v. 67, n. Pt 4, p. 282–292, abr. 2011.

FAYE, L.; CHRISPEELS, M. J. Transport and processing of the glycosylated precursor of Concanavalin A in jack-bean. **Planta**, [s.l.], v. 170, n. 2, p. 217–224, fev. 1987.

FIGUEIREDO, J. G. *et al.* Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [s.l.], v. 380, n. 5, p. 407–414, nov. 2009.

FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. **Editorial: Glycosylation Changes in Cancer: An Innovative Frontier at the Interface of Cancer and Glycobiology**. **Frontiers in oncology**, 2016.

FU, L. L. *et al.* Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s.l.], v. 43, n. 10, p. 1442–1449, 2011.

FUJIMOTO, Y. K.; GREEN, D. F. Carbohydrate recognition by the antiviral lectin cyanovirin-N. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 134, n. 48, p. 19639–19651, dez. 2012.

FUJITA, T. *et al.* Mannose-binding protein recognizes glioma cells: in vitro analysis of complement activation on glioma cells via the lectin pathway. **Japanese journal of cancer research : Gann**, [s.l.], v. 86, n. 2, p. 187–192, fev. 1995.

FUQUA, J. L. *et al.* Bulk production of the antiviral lectin griffithsin. **Plant biotechnology journal**, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 1160–1168, out. 2015.

GABIUS, H.-J. *et al.* The glycobiology of the CD system: a dictionary for translating marker designations into glycan/lectin structure and function. **Trends in biochemical sciences**, [s.l.], v. 40, n. 7, p. 360–376, jul. 2015.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, [s.l.], v. 113, n. 3, p. 236–247, maio 2011.

GLICK, G. D. *et al.* Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 266, n. 35, p. 23660–23669, dez. 1991.

GOETZ, J. A. *et al.* Glycomic profiling of invasive and non-invasive breast cancer cells. **Glycoconjugate journal**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 117–131, fev. 2009.

GONDIM, A. C. S. *et al.* The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal**

of **inorganic biochemistry**, [s.l.], v. 175, p. 179–189, out. 2017.

GROSSI, M. *et al.* Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) characterization of saline solutions with a low-cost portable measurement system. **Engineering Science and Technology, an International Journal**, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 102–108, 1 fev. 2019.

GROSSI, M.; RICCÒ, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review. **Journal of Sensors and Sensor Systems**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 303–325, 2017.

GUO, X. *et al.* Carbohydrate-based label-free detection of Escherichia coli ORN 178 using electrochemical impedance spectroscopy. **Analytical chemistry**, [s.l.], v. 84, n. 1, p. 241–246, jan. 2012.

HAMBRIGHT, H. G.; GHOSH, R. Autophagy: In the cROSshairs of cancer. **Biochemical pharmacology**, [s.l.], v. 126, p. 13–22, fev. 2017.

HAMELRYCK, T. W. *et al.* The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 271, n. 34, p. 20479–20485, ago. 1996.

HANSEN, J. E. *et al.* Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. **AIDS (London, England)**, v. 3, n. 10, p. 635–641, out. 1989.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, [s.l.], v. 11, n. 26, p. 4910–4919, dez. 1972.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. S. Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, [s.l.], v. 2017, n. 9, p. 1–30, 2017.

HEBERLE, G.; DE AZEVEDO, W. F. J. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. **Current medicinal chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 9, p. 1339–1352, 2011.

HECK, G. S. *et al.* Supervised Machine Learning Methods Applied to Predict Ligand-Binding Affinity. **Current medicinal chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 23, p. 2459–2470, 2017.

HESTER, G. *et al.* Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nature structural biology**, [s.l.], v. 2, n. 6, p. 472–479, jun. 1995.

HOSSAINI, A. A. Hemolytic and hemagglutinating activities of 222 plants. **Vox sanguinis**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 410–417, dez. 1968.

IKEMOTO, K. *et al.* Bauhinia purpurea agglutinin-modified liposomes for human prostate cancer treatment. **Cancer science**, [s.l.], v. 107, n. 1, p. 53–59, jan. 2016.

IMBERTY, A. *et al.* Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. **Microbes and infection**, [s.l.], v. 6, n. 2, p. 221–228, fev. 2004.

- IORDACHE, F. *et al.* Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p. 152–161, 2015.
- JACQUES, A. V. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 62, n. 6, p. 836–842, 1 maio 2013.
- JAIN, S. K. *et al.* Lectin conjugated gastro-retentive microspheres of amoxicillin for effective treatment of *Helicobacter pylori*. **Current Science**, [s.l.], v. 106, n. 2, p. 267–276, 2014.
- JANCARIK, J.; KIM, S.-H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 409–411, 1991.
- JANDÚ, J. J. B. *et al.* Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. **Frontiers in pharmacology**, [s.l.], v. 8, p. 671, 2017.
- JIANG, Q.-L. *et al.* Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell proliferation**, [s.l.], v. 48, n. 1, p. 17–28, fev. 2015.
- JIANG, S.-Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC evolutionary biology**, [s.l.], v. 10, p. 79, mar. 2010.
- JOHNSON, P. J. *et al.* Glycan composition of serum alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular carcinoma and non-seminomatous germ cell tumour. **British journal of cancer**, [s.l.], v. 81, n. 7, p. 1188–1195, dez. 1999.
- JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.
- JU, T. *et al.* Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. **Proteomics. Clinical applications**, [s.l.], v. 7, n. 9–10, p. 618–631, out. 2013.
- JU, T.; OTTO, V. I.; CUMMINGS, R. D. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. **Angewandte Chemie (International ed. in English)**, [s.l.], v. 50, n. 8, p. 1770–1791, fev. 2011.
- KAWAGISHI, H. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 53–58, jan. 2001.
- KIELISZEWSKI, M. J.; SHOWALTER, A. M.; LEYKAM, J. F. Potato lectin: a modular protein sharing sequence similarities with the extensin family, the hevein lectin family, and snake venom disintegrins (platelet aggregation inhibitors). **The Plant journal : for cell and molecular biology**, [s.l.], v. 5, n. 6, p. 849–861, jun. 1994.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et biophysica acta**, [s.l.], v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, set. 2002.
- KIRSCHNER, K. N. *et al.* GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of computational chemistry**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 622–655, mar.

2008.

KLAFKE, G. B. *et al.* Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. **Mycopathologia**, [s.l.], v. 175, n. 1–2, p. 147–151, fev. 2013.

KOEPPE, S. J.; RUPNOW, J. H. Purification and Characterization of a Lectin from the Seeds of Amaranth (*Amaranthus cruentus*). **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 53, n. 5, p. 1412–1417, 1988.

KORB, O.; STUTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. **Journal of chemical information and modeling**, [s.l.], v. 49, n. 1, p. 84–96, jan. 2009.

KOROURIAN, S. *et al.* Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma in situ of the breast by lectin histochemistry. **BMC cancer**, [s.l.], v. 8, p. 136, maio 2008.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 372, n. 3, p. 774–797, set. 2007.

KULLOLLI, M.; HANCOCK, W. S.; HINCAPIE, M. Preparation of a high-performance multi-lectin affinity chromatography (HP-M-LAC) adsorbent for the analysis of human plasma glycoproteins. **Journal of separation science**, [s.l.], v. 31, n. 14, p. 2733–2739, ago. 2008.

KUMAR, KK. *et al.* Biological role of lectins: A review. **Journal of Orofacial Sciences**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

LACKEY, J. A. Phaseoleae DC.(1825). **Advances in legume systematics**, 1981.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017.

LEATHEM, A.; DOKAL, I.; ATKINS, N. Lectin binding to normal and malignant breast tissue. **Diagnostic histopathology**, [s.l.], v. 6, n. 3–4, p. 171–180, 1983.

LEVINE, D.; KAPLAN, M. J.; GREENAWAY, P. J. The purification and characterization of wheat-germ agglutinin. **The Biochemical journal**, [s.l.], v. 129, n. 4, p. 847–856, out. 1972.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LITYNSKA, A. *et al.* Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. **Melanoma research**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 205–212, jun. 2001.

LIU, B. *et al.* Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 482, n. 1–2, p. 1–6, 1 fev. 2009.

- LIU, J. *et al.* Solution structure and backbone dynamics of recombinant Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V determined by NMR spectroscopy. **Biochemistry**, [s.l.], v. 35, n. 5, p. 1516–1524, fev. 1996.
- LIU, Z. *et al.* Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell proliferation**, [s.l.], v. 46, n. 5, p. 509–515, out. 2013.
- LORIS, R. *et al.* Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1383, n. 1, p. 9–36, 3 mar. 1998.
- LORIS, R. *et al.* Structural Basis of Oligomannose Recognition by the Pterocarpus angolensis Seed Lectin. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 335, n. 5, p. 1227–1240, 2004.
- LOSSIO, C. F. *et al.* Lectin from Canavalia villosa seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 105, 2017.
- LUBKOWSKI, J. *et al.* Structural analysis and unique molecular recognition properties of a Bauhinia forficata lectin that inhibits cancer cell growth. **The FEBS Journal**, [s.l.], v. 284, n. 3, p. 429–450, 2017.
- LYU, S.-Y.; PARK, W.-B. Effects of Korean mistletoe lectin (Viscum album coloratum) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes. **Archives of pharmacal research**, [s.l.], v. 30, n. 10, p. 1252–1264, out. 2007.
- MA, Y. *et al.* Antitumor activity of mannan-binding protein in vivo as revealed by a virus expression system: mannan-binding protein-independent cell-mediated cytotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v. 96, n. 2, p. 371–375, jan. 1999.
- MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 2, p. 2014–2033, jan. 2015.
- MARQUES, G. F. O. *et al.* Contribution of the carbohydrate-binding ability of Vatairea guianensis lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, [s.l.], v. 140, 2017.
- MATTHEWS, B. W. Solvent content of protein crystals. **Journal of Molecular Biology**, [s.l.], v. 33, n. 2, p. 491–497, 28 abr. 1968.
- MÉNDEZ-HUERGO, S. P.; BLIDNER, A. G.; RABINOVICH, G. A. Galectins: emerging regulatory checkpoints linking tumor immunity and angiogenesis. **Current Opinion in Immunology**, [s.l.], v. 45, p. 8–15, 1 abr. 2017.
- MISHRA, A. *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 134, p. 110827, 1 dez. 2019.
- MOREIRA, R. DE A. *et al.* Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 86 Suppl 2, p. 211–218, 1991.

- MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 448–462, jun. 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, [s.l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.
- MOTA, M. R. L. *et al.* Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [s.l.], v. 374, n. 1, p. 1–10, out. 2006.
- MUNKLEY, J.; ELLIOTT, D. J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**, [s.l.], v. 7, n. 23, p. 35478–35489, jun. 2016.
- NAGAE, M.; YAMAGUCHI, Y. Function and 3D structure of the N-glycans on glycoproteins. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 8398–8429, 2012.
- NAGANO, C. S. *et al.* Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **The Biochemical journal**, [s.l.], v. 409, n. 2, p. 417–428, jan. 2008.
- NAGATA, Y.; BURGER, M. M. Wheat germ agglutinin. Isolation and crystallization. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 247, n. 7, p. 2248–2250, abr. 1972.
- NASCIMENTO, A. P. M. *et al.* Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 120, n. Pt A, p. 566–577, dez. 2018.
- NASCIMENTO, A. P. M. *et al.* Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 134, p. 660–672, ago. 2019.
- NASCIMENTO, K. S. *et al.* Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s.l.], v. 92, 2017.
- NECO, A. H. B. *et al.* Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from *Centrolobium microchaete* seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 117, p. 124–133, 2018.
- OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. **Cell**, [s.l.], v. 126, n. 5, p. 855–867, set. 2006.
- OSTERNE, V. J. S. *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 94, 2017.

- PAGENSTECHEER, A. *et al.* Distinct expression patterns and levels of enzymatic activity of matrix metalloproteinases and their inhibitors in primary brain tumors. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, [s.l.], v. 60, n. 6, p. 598–612, jun. 2001.
- PARKER, B. L. *et al.* Site-specific glycan-peptide analysis for determination of N-glycoproteome heterogeneity. **Journal of proteome research**, [s.l.], v. 12, n. 12, p. 5791–5800, dez. 2013.
- PEARCE, O. M. T. Cancer glycan epitopes: biosynthesis, structure and function. **Glycobiology**, [s.l.], v. 28, n. 9, p. 670–696, 2018.
- PEREIRA-JUNIOR, F. N. *et al.* Purification and characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from the seeds of *Platymiscium floribundum* Vogel. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 25, n. 8, p. 443–449, 2012.
- PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- PEUMANS, W. J. *et al.* Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate journal**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 259–265, fev. 1997.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, [s.l.], v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.
- PILLER, V.; PILLER, F.; CARTRON, J. P. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. **European journal of biochemistry**, [s.l.], v. 191, n. 2, p. 461–466, jul. 1990.
- PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature reviews. Cancer**, [s.l.], v. 15, n. 9, p. 540–555, set. 2015.
- PINTO JÚNIOR, Vanir Reis. Análise estrutural de uma lectina de sementes de *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth e avaliação do seu efeito vasorelaxante, inflamatório e nociceptivo. 2016. 111 f. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais)-Universidade Federal do Ceará, 2016.
- PINTO-JUNIOR, V. R. *et al.* Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* mart. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 18, n. 9, p. 10857–10869, set. 2013.
- PINTO-JUNIOR, V. R. *et al.* Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 29, n. 4, 2016.
- PINTO-JUNIOR, V. R. *et al.* Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 98, 2017a.
- PINTO-JUNIOR, V. R. *et al.* Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive

protein. **Biochimie**, [s.l.], v. 135, 2017b.

PINTO-JUNIOR, V. R. *et al.* Crystal structure of *Pisum arvense* seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.], v. 630, 2017c.

PINTO, N. V. *et al.* Homologous *Canavalia* lectins elicit different patterns of antinociceptive responses. **Natural product communications**, [s.l.], v. 8, n. 11, p. 1621–1624, nov. 2013.

POWLESLAND, A. S. *et al.* Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. **Glycobiology**, [s.l.], v. 19, n. 8, p. 899–909, ago. 2009.

PRATT, J.; ANNABI, B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells. **Cellular signalling**, [s.l.], v. 26, n. 5, p. 917–924, maio 2014.

PRATT, J.; ROY, R.; ANNABI, B. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, [s.l.], v. 22, n. 9, p. 1245–1255, set. 2012.

QADIR, S. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, [s.l.], v. 04, n. 11, p. 999–1006, 2013.

QI, Y.; JO, S.; IM, W. Roles of glycans in interactions between gp120 and HIV broadly neutralizing antibodies. **Glycobiology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 251–260, mar. 2016.

READ, R. J. *et al.* A new generation of crystallographic validation tools for the protein data bank. **Structure (London, England : 1993)**, v. 19, n. 10, p. 1395–1412, out. 2011.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). **European journal of biochemistry**, [s.l.], v. 134, n. 3, p. 561–569, ago. 1983.

REDMANN, M.; DARLEY-USMAR, V.; ZHANG, J. The Role of Autophagy, Mitophagy and Lysosomal Functions in Modulating Bioenergetics and Survival in the Context of Redox and Proteotoxic Damage: Implications for Neurodegenerative Diseases. **Aging and disease**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 150–162, mar. 2016.

REILY, C. *et al.* Glycosylation in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, [s.l.], v. 15, n. 6, p. 346–366, 2019.

RIEGER, D. K. *et al.* ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target. **Journal of molecular recognition : JMR**, [s.l.], v. 27, n. 12, p. 746–754, dez. 2014.

RINDERLE, S. J. *et al.* Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of *Amaranthus caudatus*, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 264, n. 27, p. 16123–16131, set. 1989.

- ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 258, n. 22, p. 13820–13824, 1983.
- RUTENBER, E.; ROBERTUS, J. D. Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. **Proteins**, [s.l.], v. 10, n. 3, p. 260–269, 1991.
- SALMASO, V.; MORO, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in Pharmacology**, [s.l.], v. 9, n. AUG, p. 1–16, 2018.
- SANKARANARAYANAN, R. *et al.* A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. **Nature structural biology**, [s.l.], v. 3, n. 7, p. 596–603, jul. 1996.
- SANTIAGO, M.Q. Purificação, caracterização e atividade biológica de uma lectina extraída de sementes de *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. 2013. **Monografia**, Universidade Federal do Ceará, 2013.
- SANTIAGO, M. Q. *et al.* Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Journal of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 27, n. 3, 2014.
- SARKAR, M.; WU, A. M.; KABAT, E. A. Immunochemical studies on the carbohydrate specificity of *Maclura pomifera* lectin. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s.l.], v. 209, n. 1, p. 204–218, 1981.
- SASTRY, M. V *et al.* Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1---3)D-GalNAc). **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 261, n. 25, p. 11726–11733, set. 1986.
- SHAANAN, B.; LIS, H.; SHARON, N. Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5033, p. 862–866, nov. 1991.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s.l.], v. 14, n. 11, p. 53R-62R, nov. 2004.
- SILVA, F. DE O. *et al.* Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in veterinary science**, [s.l.], v. 96, n. 2, p. 276–282, abr. 2014.
- SILVA, H. C. *et al.* Purification and primary structure determination of a galactose-specific lectin from *Vatairea guianensis* Aublet seeds that exhibits vasorelaxant effect. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 12, p. 2347–2355, 2012.
- SINGH, R. *et al.* Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLoS one**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. e0146110, 2016a.
- SINGH, S. S. *et al.* Mannose Binding Lectin: A Potential Biomarker for Many Human

Diseases. **Current medicinal chemistry**, [s.l.], v. 23, n. 33, p. 3847–3860, 2016b.

SINHA, S. *et al.* Subunit assembly of plant lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, [s.l.], v. 17, n. 5, p. 498–505, 1 out. 2007.

SIROIS, S. *et al.* Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine. **Current medicinal chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 30, p. 3232–3242, 2007.

SOBRAL, A. P. V *et al.* ConA and UEA-I lectin histochemistry of parotid gland mucoepidermoid carcinoma. **Journal of oral science**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 49–54, mar. 2010.

STOWELL, S. R.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. Protein glycosylation in cancer. **Annual review of pathology**, [s.l.], v. 10, p. 473–510, 2015.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of bacteriology**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 227–237, ago. 1936.

SUN, Q. *et al.* Hybrid- and complex-type N-glycans are not essential for Newcastle disease virus infection and fusion of host cells. **Glycobiology**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 369–378, mar. 2012.

SWANSON, M. D. *et al.* A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 285, n. 12, p. 8646–8655, mar. 2010.

TAKASE, H. *et al.* Identification and comparative analysis of three novel C-type lectins from the silkworm with functional implications in pathogen recognition. **Developmental and comparative immunology**, [s.l.], v. 33, n. 6, p. 789–800, jun. 2009.

TAYLOR, B. S.; LADANYI, M. Clinical cancer genomics: how soon is now? **The Journal of pathology**, [s.l.], v. 223, n. 2, p. 318–326, jan. 2011.

THOMPSON, A. J.; DE VRIES, R. P.; PAULSON, J. C. Virus recognition of glycan receptors. **Current Opinion in Virology**, [s.l.], v. 34, p. 117–129, 1 fev. 2019.

TRANSUE, T. R. *et al.* **Structure of benzyl T-antigen disaccharide bound to Amaranthus caudatus agglutinin**. **Nature structural biology**, United States, out. 1997.

TULLIS, R. H. *et al.* Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients. **Blood Purification**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 64–69, 2009.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, [s.l.], v. 30, n. 6, p. 1022–1025, 1997.

VAN DAMME, E. J. *et al.* Isolation and molecular cloning of a novel type 2 ribosome-inactivating protein with an inactive B chain from elderberry (*Sambucus nigra*) bark. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 272, n. 13, p. 8353–8360, mar. 1997.

VAN DAMME, E. J. *et al.* Characterization and molecular cloning of the lectin from

Helianthus tuberosus. **European journal of biochemistry**, [s.l.], v. 259, n. 1–2, p. 135–142, jan. 1999.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 575–692, nov. 1998.

VAN DAMME, E. J. M. History of plant lectin research. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s.l.], v. 1200, p. 3–13, 2014.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **{FEBS} Letters**, [s.l.], v. 215, n. 1, p. 140–144, 1987.

VAN HALBEEK, H. *et al.* Characterization of the Primary Structure and the Microheterogeneity of the Carbohydrate Chains of Porcine Blood-Group H Substance by 500-MHz ¹H-NMR Spectroscopy. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 127, n. 1, p. 21–29, 1982.

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, [s.l.], v. 183, n. 2, p. 258–264, jan. 1991.

VANDEMARK, K. L. *et al.* The activation of M1 muscarinic receptor signaling induces neuronal differentiation in pyramidal hippocampal neurons. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, [s.l.], v. 329, n. 2, p. 532–542, maio 2009.

VARELA, E. S. *et al.* Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 59–69, 1 jan. 2004.

VARKI, A. Biological roles of glycans. **Glycobiology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p. 3–49, jan. 2017.

VEILLON, L. *et al.* Glycosylation Changes in Brain Cancer. **ACS chemical neuroscience**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 51–72, jan. 2018.

VODKIN, L. O.; RHODES, P. R.; GOLDBERG, R. B. cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. **Cell**, [s.l.], v. 34, n. 3, p. 1023–1031, out. 1983.

WAH, D. A. *et al.* Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 310, n. 4, p. 885–894, jul. 2001.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering, Design and Selection**, [s.l.], v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995.

WALTON, E. L. **The dual role of ROS, antioxidants and autophagy in cancer**. **Biomedical journal**, United States, abr. 2016.

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by

simple sugars. **Nature**, [s.l.], v. 169, n. 4307, p. 825–826, maio 1952.

WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. **Biochemistry**, [s.l.], v. 78, n. 7, p. 679–696, 2013.

WILDBURGER, N. C. *et al.* Integrated Transcriptomic and Glycomic Profiling of Glioma Stem Cell Xenografts. **Journal of proteome research**, [s.l.], v. 14, n. 9, p. 3932–3939, set. 2015.

WILHELMSSON, U. *et al.* Astrocytes negatively regulate neurogenesis through the Jagged1-mediated Notch pathway. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 30, n. 10, p. 2320–2329, out. 2012.

WINN, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, [s.l.], v. 67, n. Pt 4, p. 235–242, abr. 2011.

WRIGHT, C. S. 2.2 A resolution structure analysis of two refined N-acetylneuraminyl-lactose--wheat germ agglutinin isolectin complexes. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 215, n. 4, p. 635–651, out. 1990.

WU, C.-Y.; WONG, C.-H. Chemistry and glycobiology. **Chemical communications (Cambridge, England)**, [s.l.], v. 47, n. 22, p. 6201–6207, jun. 2011.

XAVIER, M. M. *et al.* SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, [s.l.], v. 19, n. 10, p. 801–812, 2016.

YAMAMOTO, H. *et al.* β 1,6-N-Acetylglucosamine-bearing N-Glycans in Human Gliomas: Implications for a Role in Regulating Invasivity. **Cancer Research**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 134–142, 2000.

YANG, D. C.; GALL, W. E.; EDELMAN, G. M. Rotational correlation time of concanavalin A after interaction with a fluorescent probe. **The Journal of biological chemistry**, [s.l.], v. 249, n. 21, p. 7018–7023, nov. 1974.

ZAMORA-CABALLERO, S. *et al.* Quaternary structure of Dioclea grandiflora lectin assessed by equilibrium sedimentation and crystallographic analysis of recombinant mutants. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 589, n. 18, p. 2290–2296, 19 ago. 2015.

ZENTENO, E.; OCHOA, J.-L. Purification of a lectin from Amaranthus leucocarpus by affinity chromatography. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 313–317, 1 jan. 1988.

ZHENG, H. *et al.* Validation of metal-binding sites in macromolecular structures with the CheckMyMetal web server. **Nature protocols**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 156–170, jan. 2014.

ZHENG, H. *et al.* CheckMyMetal: a macromolecular metal-binding validation tool. **Acta crystallographica. Section D, Structural biology**, [s.l.], v. 73, n. Pt 3, p. 223–233, mar. 2017.

ANEXO A – CAPA DO ARTIGO 1

International Journal of Biological Macromolecules 114 (2018) 64–76



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells



Rodrigo Bainy Leal ^{a,*}, Vanir Reis Pinto-Junior ^b, Vinicius Jose Silva Osterne ^b, Ingrid Alessandra Victoria Wolin ^a, Ana Paula Machado Nascimento ^a, Antonio Hadson Bastos Neco ^b, David Alencar Araripe ^b, Priscilla Gomes Welter ^a, Corneville Correia Neto ^b, Jorge Luis Almeida Correia ^b, Cintia Renata Costa Rocha ^c, Kyria Santiago Nascimento ^b, Benildo Sousa Cavada ^{b,*}

^a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2017

Received in revised form 28 February 2018

Accepted 16 March 2018

Available online 17 March 2018

Keywords:

DlyL

Crystal structure

Glioma

ABSTRACT

Lectins are a class of carbohydrate-binding proteins or glycoproteins with diverse specificities and functions. The determination and characterization of the three-dimensional structures of these proteins are keys to understanding their biological effects. Recent studies have explored the anticancer potential of *Diocleinae* lectins (from *Leguminosae* family), evaluating their antiproliferative effect and their ability to induce glioma cell death via apoptosis and autophagy. In this work, the three-dimensional structure of *Dioclea lasiophylla* seed lectin (DlyL) complexed with Xman (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- α -D-mannopyranoside) was determined by X-ray crystallography. Moreover, interactions with relevant N-glycans were evaluated by molecular docking. DlyL presented the *jellyroll* motif, and both metal binding site (MBS) and carbohydrate-recognition domain (CRD) were determined and characterized. Molecular docking simulations indicated that DlyL interacts favorably with N-glycans, especially those of the complex and hybrid types, unlike previously studied *Diocleinae* lectins. DlyL also showed antitumor potential against rat C6 glioma cells impairing cell migration, inducing autophagy and cell death via activation of caspase 3. These results indicate that small structural differences among *Diocleinae* lectins can, in turn, result in differential modulation of autophagy and cell apoptosis processes.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO B – CAPA DO ARTIGO 2

International Journal of Biological Macromolecules 134 (2019) 901–911



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Review

One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review

Benildo Sousa Cavada ^{a,*}, Vinicius Jose Silva Osterne ^a, Claudia Figueiredo Lossio ^a, Vanir Reis Pinto-Junior ^a,
Messias Vital Oliveira ^a, Mayara Torquato Lima Silva ^a, Rodrigo Bainy Leal ^b, Kyria Santiago Nascimento ^{a,*}^a BioMol-Lab, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil^b Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2019

Received in revised form 16 May 2019

Accepted 16 May 2019

Available online 18 May 2019

Keywords:

Lectin

Canavalia

Structure

ABSTRACT

Lectins are proteins that can bind specifically and reversibly to carbohydrates. This capacity gives lectins multiple biological roles and biotechnological applications. Although lectins can be found in all organisms, plant lectins, especially legume lectins, are undoubtedly the most thoroughly studied. Among legume lectins, the lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Canavalia brasiliensis* (ConBr), both from Diocleinae subtribe, are two of the most well-known lectins. It has been 100 years since the first report of ConA and 40 years since the first report of ConBr, making 2019 an important year for lectinology. Structural data of these lectins in combination with biological activity tests clearly indicate that even a small shift in amino acid sequence can affect the tertiary and quaternary structures, consequently affecting the biological activity of these proteins. It is in this context that the present paper aims to review the structural data of ConA and ConBr, focusing on the primary structure, crystallography, tertiary and quaternary structures of these lectins, as well as their binding sites. This paper also expands the structural data by employing molecular dynamics to evaluate carbohydrate-binding properties and structural stability. It is anticipated that these data will increase knowledge about the structure-function relationships of these proteins.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO C – CAPA DO ARTIGO 3

Current Protein and Peptide Science, 2019, 20, 600-613

REVIEW ARTICLE



ConBr, the Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Seeds: Forty Years of Research



Benildo Sousa Cavada^{*}, Vinicius Jose Silva Osterne, Vanir Reis Pinto-Junior and Kyria Santiago Nascimento

BioMol-Lab, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Ceará, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: October 16, 2018
 Revised: November 30, 2018
 Accepted: December 29, 2018

DOI:
 10.2174/1389203720666190104123210



Abstract: Lectins are defined as proteins or glycoproteins capable of specific and reversible binding to carbohydrates. Inside this group of proteins, the most well-studied lectins belong to the Leguminosae family, and inside this family, the Diocleinae subtribe includes the most characterized lectin Concavalin A (ConA), as well as ConBr, the lectin from *Canavalia brasiliensis*, the subject of this review. Since 1979, several studies have been published in the literature regarding this lectin, from its isolation and characterization to its several biological activities. This year, 2019, will mark 40 years since researchers have begun to study ConBr and 100 years since the discovery of ConA, making 2019 a momentous year for lectinology. Owing to the abundance of studies involving ConBr, this review will focus on ConBr's purification, physicochemical properties, functional and structural analyses, biological activities and biotechnological applications. This will give researchers a broad glimpse into the potential of this lectin, as well as its characteristics, as we look ahead to its expanding applications in glycomics and biotechnology.

Keywords: *Canavalia brasiliensis*, lectin, ConBr, biological activities, properties, lectinology.

ANEXO D – CAPA DO ARTIGO 4



International Journal of
Molecular Sciences



Review

ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships

Benildo S. Cavada *, Vanir R. Pinto-Junior, Vinicius J. S. Osterne and Kyria S. Nascimento

BioMol-Lab, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceara, Fortaleza-CE 60440-970, Brazil; juniorreis4@hotmail.com (V.R.P.-J.); vinnyosterne@gmail.com (V.J.S.O.); kyriasantiago@gmail.com (K.S.N.)

* Correspondence: bscavada@ufc.br; Tel.: +55-85-3366-9818

Received: 28 November 2018; Accepted: 19 December 2018; Published: 21 December 2018



Abstract: Lectins are a widely studied group of proteins capable of specific and reversible binding to carbohydrates. Undoubtedly, the best characterized are those extracted from plants of the Leguminosae family. Inside this group of proteins, those from the Diocleinae subtribe have attracted attention, in particular Concanavalin A (ConA), the best-studied lectin of the group. Diocleinae lectins, also called ConA-like lectins, present a high similarity of sequence and three-dimensional structure and are known to present inflammatory, vasoactive, antibiotic, immunomodulatory and antitumor activities, among others. This high similarity of lectins inside the ConA-like group makes it possible to use them to study structure/biological activity relationships by the variability of both carbohydrate specificity and biological activities results. It is in this context the following review aims to summarize the most recent data on the biochemical and structural properties, as well as biological activities, of ConA-like lectins and the use of these lectins as models to study structure/biological activity relationships.

Keywords: lectins; ConA-like; diocleinae subtribe; structure; biological activities

ANEXO E – CAPA DO ARTIGO 5

Journal of Molecular Modeling (2018) 24: 251
<https://doi.org/10.1007/s00894-018-3800-y>

ORIGINAL PAPER



Homology modeling, molecular docking, and dynamics of two α -methyl-D-mannoside-specific lectins from *Arachis* genus

Kyria Santiago Nascimento¹ · David Alencar Araripe¹ · Vanir Reis Pinto-Junior¹ · Vinicius Jose Silva Osterne¹ · Francisco William Viana Martins¹ · Antonio Hadson Bastos Neco¹ · Gil Aquino Farias² · Benildo Sousa Cavada¹ 

Received: 20 October 2017 / Accepted: 16 August 2018 / Published online: 25 August 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The *Arachis* genus belongs to the Dalbergieae tribe, a group of plants that show promising potential novel lectins. Three lectins of the well-known *Arachis hypogaea* have already been purified, while lectins from related species are still unknown. Genomes of two closely related species, *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, were recently sequenced. Therefore, this study aimed to establish the three-dimensional structure of *Arachis duranensis* lectin (ADL) and *Arachis ipaensis* lectin (AIL) by homology modeling, test their activity against mannosides, and perform molecular dynamics (MD) simulations on these two proteins, both unligated and interacting with mannose or α -methyl-D-mannoside. The fold obtained for the molecular models agrees with data obtained from previous leguminous lectins, showing a conserved jelly roll motif. Docking scores indicate that these lectins have different theoretical binding energy with monosaccharides, disaccharides, and high-mannose glycans. MD simulations revealed that these proteins are α -methyl-D-mannoside-specific, having less stable interactions with mannose. This study thus serves as a guide for further research on lectins of the *Arachis* genus.

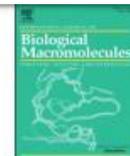
Keywords *Arachis* lectins · Molecular dynamics · Homology modeling

ANEXO F – CAPA DO ARTIGO 6



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from *Centrolobium microchaete* seeds

Antonio Hadson Bastos Neco^a, Vanir Reis Pinto-Junior^a, David Alencar Araripe^a, Mayara Queiroz Santiago^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Claudia Figueiredo Lossio^a, Clareane Avelino Simplicio Nobre^a, Messias Vital Oliveira^a, Mayara Torquato Lima Silva^a, Maria Gleiciane Queiroz Martins^a, Joao Batista Cajazeiras^b, Gabriela Fernandes Oliveira Marques^{b,c}, Diego Rabelo Costa^a, Kyria Santiago Nascimento^a, Ana Maria Sampaio Assrey^{b,c,*}, Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceara (UFC), Fortaleza, Ceara, Brazil

^b Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA), Sobral, Ceara, Brazil

^c Universidade Estadual do Ceara (UECE), Fortaleza, Ceara, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2018

Received in revised form 11 May 2018

Accepted 23 May 2018

Available online 24 May 2018

Keywords:

Dalbergieae

CML

Structure

Molecular dynamics

Inflammatory

ABSTRACT

Lectins represent a class of proteins or glycoproteins capable of reversibly binding to carbohydrates. Seed lectins from the Dalbergieae tribe (Leguminosae) have structural variability, carbohydrate specificity, and biological effects, such as inflammation, vasorelaxation and cancer antigen binding. To comprehensively address these factors, the present work aimed to establish and characterize the three-dimensional structure of *Centrolobium microchaete* lectin (CML) by homology modeling, investigate protein-carbohydrate interactions and evaluate its inflammatory effect on mice. Molecular docking was performed to analyze interactions of the lectin with monosaccharides, disaccharides and *N*-glycans. Two dimannosides, methyl mannose-1,3- α -D-mannose (MDM) and mannose-1,3- α -D-mannose (M13), were used in molecular dynamics (MD) simulations to study the behavior of the carbohydrate-recognition domain (CRD) over time. Results showed an expanded domain within which hydrophobic interactions with the methyl group in the MDM molecule were established, thus revealing novel interactions for mannose-specific Dalbergieae lectins. To examine its biological activities, CML was purified in a single step by affinity chromatography on Sepharose-mannose matrix. The lectin demonstrated inflammatory response in the paw edema model and stimulated leukocyte migration to the animal peritoneal cavities, an effect elicited by CRD. For the first time, this work reports the molecular dynamics of a lectin from the Dalbergieae tribe.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO G – CAPA DO ARTIGO 7

International Journal of Biological Macromolecules xxx (2017) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa)

Benildo Sousa Cavada^{a,*}, David Alencar Araripe^a, Ivanice Bezerra Silva^a,
 Vanir Reis Pinto-Junior^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Antonio Hadson Bastos Neco^a,
 Eva Pollyanna Peixe Laranjeira^b, Claudia Figueiredo Lossio^a, Jorge Luis Almeida Correia^a,
 Alana Freitas Pires^b, Ana Maria Sampaio Assreuy^{b,*}, Kyria Santiago Nascimento^a

^a Universidade Federal do Ceará (UFCE), Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2017

Received in revised form 29 August 2017

Accepted 30 August 2017

Available online xxx

Keywords:

nPELa

Crystal structure

Nociception

ABSTRACT

A native lectin (nPELa), purified from seeds of the species *Platypodium elegans*, Dalbergieae tribe, was crystallized and structurally characterized by X-ray diffraction crystallography and bioinformatics tools. The obtained crystals diffracted to 1.6 Å resolution, and nPELa structure were solved through molecular substitution. In addition, nPELa has a metal binding site and a conserved carbohydrate recognition domain (CRD) similar to other Dalbergieae tribe lectins, such as PAL (*Pterocarpus angolensis*) and CTL (*Centraiobium tomentosum*). Molecular docking analysis indicated high affinity of this lectin for different mannosides, mainly trimannosides, formed by α -1,3 or α -1,6 glycosidic bond, as evidenced by the obtained scores. In addition, molecular dynamics simulations were performed to demonstrate the structural behavior of nPELa in aqueous solution. In solution, nPELa was highly stable, and structural modifications in its carbohydrate recognition site allowed interaction between the lectin and the different ligands. Different modifications were observed during simulations for each one of the glycans, which included different hydrogen bonds and hydrophobic interactions through changes in the relevant residues. In addition, nPELa was evaluated for its nociceptive activity in mice and was reported to be the first lectin of the Dalbergieae tribe to show CRD-dependent hypernociceptive activity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO H – CAPA DO ARTIGO 8

International Journal of Biological Macromolecules 106 (2018) 369–378



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and anti glioma potential



Benildo Sousa Cavada^{a,*}, Mayara Torquato Lima Silva^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a,
 Vanir Reis Pinto-Junior^a, Ana Paula Machado Nascimento^b,
 Ingrid Alessandra Victoria Wolin^b, Isabella Aparecida Heinrich^b,
 Clareane Avelino Simplicio Nobre^a, Cleane Gomes Moreira^a, Claudia Figueiredo Lossio^a,
 Cintia Renata Costa Rocha^d, Jorge Luiz Martins^c, Kyria Santiago Nascimento^a,
 Rodrigo Bainy Leal^{b,*}

^a Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^c Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Recife, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2017

Received in revised form 19 July 2017

Accepted 3 August 2017

Available online 10 August 2017

Keywords:

CaBo

Glioma

Crystal structure

ABSTRACT

CaBo is a mannose/glucose-specific lectin purified from seeds of *Canavalia bonariensis*. In the present work, we report the CaBo crystal structure determined to atomic resolution in the presence of X-man, a specific ligand. Similar to the structural characteristics of other legume lectins, CaBo presented the jellyroll motif, a metal binding site occupied by calcium and manganese ions close to the carbohydrate-recognition domain (CRD). *In vitro* test of CaBo cytotoxicity against glioma cells demonstrated its ability to decrease the cellular viability and migration by induction of autophagy and cell death. Molecular docking simulations corroborate previous data indicating that the lectin's biological activities occur mostly through interactions with glycoproteins since the lectin interacted favorably with several N-glycans, especially those of the high-mannose type. Together, these results suggest that CaBo interacts with glycosylated cell targets and elicits a remarkable anti glioma activity.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO I – CAPA DO ARTIGO 9

Biochimie 140 (2017) 58–65



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. Paranjana, 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 Barúna, 949, 60420-160, 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- α -galactosamine, α -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 (SFBMM). All rights reserved.

ANEXO J – CAPA DO ARTIGO 10

Archives of Biochemistry and Biophysics 630 (2017) 27–37



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

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

Crystal structure of *Pisum arvense* seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics



Vanir Reis Pinto-Junior ^a, Mayara Queiroz Santiago ^a, Camila Bezerra Nobre ^b,
 Vinicius Jose Silva Osterne ^a, Rodrigo Bairy Leal ^c, Joao Batista Cajazeiras ^d,
 Claudia Figueiredo Lossio ^a, Bruno Anderson Matias Rocha ^a,
 Maria Gleiciane Queiroz Martins ^a, Clareane Avelino Simplicio Nobre ^a,
 Mayara Torquato Lima Silva ^a, Kyria Santiago Nascimento ^{a,*}, Benildo Sousa Cavada ^{a,**}

^a Universidade Federal do Ceara (UFC), Fortaleza, Ceara, Brazil

^b Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte (FMJ), Juazeiro do Norte, Ceara, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA), Sobral, Ceara, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2017

Received in revised form

19 July 2017

Accepted 23 July 2017

Available online 25 July 2017

Keywords:

Pisum arvense

PAL

Viciaeae

Crystal structure

Molecular docking

Molecular dynamics

ABSTRACT

The *Pisum arvense* lectin (PAL), a legume protein belonging to the Viciaeae tribe, is capable of specific recognition of mannose, glucose and its derivatives without altering its structure. In this work, the three-dimensional structure of PAL was determined by X-ray crystallography and studied in detail by a combination of molecular docking and molecular dynamics (MD). Crystals belonging to monoclinic space group P2₁ were grown by the vapor diffusion method at 293 K. The structure was solved at 2.16 Å and was similar to that of other Viciaeae lectins. The structure presented R_{factor} and R_{free} of 17.04% and 22.08%, respectively, with all acceptable geometric parameters. Molecular docking was performed to analyze interactions of the lectin with monosaccharides, disaccharides and high-mannose N-glycans. PAL demonstrated different affinities on carbohydrates, depending on bond orientation and glycosidic linkage present in ligands. Furthermore, the lectin interacted with representative N-glycans in a manner consistent with the biological effects described for Viciaeae lectins. Carbohydrate-recognition domain (CRD) in-depth analysis was performed by MD, describing the behavior of CRD residues in complex with ligand, stability, flexibility of the protein over time, CRD volume and topology. This is a first report of its kind for a lectin of the Viciaeae tribe.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO K – CAPA DO ARTIGO 11

International Journal of Biological Macromolecules 105 (2017) 272–280



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies



Claudia F. Lossio^a, Cleane G. Moreira^a, Renata M.F. Amorim^b, Clareane S. Nobre^a,
Mayara T.L. Silva^a, Corneville C. Neto^a, Vanir R. Pinto-Junior^a, Ivanice B. Silva^a,
Julia Campos^c, Ana Maria S. Assrey^b, Benildo S. Cavada^{a,*}, Kyria S. Nascimento^{a,*}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (Biomol-Lab), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^b Laboratório de Fisi-Farmacologia da Inflamação (LAFIN), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2017

Received in revised form 6 July 2017

Accepted 6 July 2017

Available online 8 July 2017

Keywords:

Canavalia villosa

Inflammation

Lectin

Mass spectrometry

ABSTRACT

With important carbohydrate binding properties, lectins are proteins able to decipher the glycodecode, and as such, they can be used in bioassays involving cell–cell communication, protein targeting, inflammation, and hypernociception, among others. In this study, a new glucose/mannose-specific lectin from *Canavalia villosa* seeds (Cvill) was isolated by a single affinity chromatography step in a Sephadex[®] G-50 column, with a purification yield of 19.35 mg of lectin per gram of powdered seed. Analysis of intact protein by mass spectrometry showed the lectin is composed of three polypeptide chains, including a 25.6 kDa α chain, 12.9 kDa β , and 12.6 kDa γ fragments, similar to the profile of ConA-like glucose/mannose-specific lectins. Partial sequence of the protein was obtained by MS-MALDI TOF/TOF covering 41.7% of its primary structure. Cvill presented sugar specificity to D-glucose, α -methyl-D-mannoside, D-mannose, and glycoproteins fetuin and ovalbumin. The lectin characterization showed that Cvill presents high stability within a broad range of pH and temperature, also showing average toxicity against *Artemia nauplii*. The proinflammatory effect of Cvill was observed by induction of paw edema and hypernociception in mice, with the participation of the carbohydrate binding site, showing its potential to be used as tool in inflammation studies.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO L – CAPA DO ARTIGO 12

Biochimie 135 (2017) 126–136



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein



Vanir Reis Pinto-Junior ^a, Vinicius Jose Silva Osterne ^a, Mayara Queiroz Santiago ^a,
 Claudia Figueiredo Lossio ^a, Celso Shiniti Nagano ^a, Cintia Renata Costa Rocha ^b,
 Jessica Catarine Frutuoso Nascimento ^b, Francisco Lucas Faustino Nascimento ^c,
 Ivanice Bezerra Silva ^a, Antonia Simoni Oliveira ^a, Jorge Luis Almeida Correia ^a,
 Rodrigo Baimy Leal ^d, Ana Maria Sampaio Assreuy ^c, Benildo Sousa Cavada ^{a,*},
 Kyria Santiago Nascimento ^{a,**}

^a Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

^c Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2017

Accepted 9 February 2017

Available online 11 February 2017

Keywords:

DlyL

Structure

Molecular dynamics

Inflammatory

Hypernociceptive

ABSTRACT

Lectins are proteins, or glycoproteins, capable of reversibly binding to specific mono- or oligosaccharides via a noncatalytic domain. The Diocleinae subtribe presents lectins with high structural similarity, but different effects based on biological activity assays. This variability results from small structural differences. Therefore, in this context, the present study aimed to perform a structural analysis of the lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth seeds (DlyL) and evaluate its inflammatory effect. To accomplish this, DlyL was purified in a single step by affinity chromatography on Sephadex® G-90 matrix. DlyL primary structure was determined through a combination of tandem mass spectrometry and DNA sequencing. DlyL showed high similarity with other species from the same genus. Its theoretical three-dimensional structure was predicted by homology modelling, and the protein was subjected to ligand screening with monosaccharides, oligosaccharides and complex N-glycans by molecular docking. Stability and binding of the lectin with α -methyl- α -mannoside were assessed by molecular dynamics. DlyL showed acute inflammatory response with hypernociceptive effect in the paw edema model, possibly by interaction with glycans present at the cell surface.

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

ANEXO M – CAPA DO ARTIGO 13

International Journal of Biological Macromolecules 102 (2017) 323–330



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form



David Alencar Araripe^a, Vanir Reis Pinto-Junior^a, Antonio Hadson Bastos Neco^a,
 Mayara Queiroz Santiago^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Alana Freitas Pires^b,
 Claudia Figueiredo Lossio^a, Maria Gleiciane Queiroz Martins^a,
 Jorge Luiz Almeida Correia^a, Raquel Guimaraes Benevides^c, Rodrigo Bainy Leal^d,
 Ana Maria Sampaio Assreuy^b, Kyria Santiago Nascimento^{a,*}, Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceará (UFCE), Fortaleza, Ceará, Brazil^b Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil^c Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brazil^d Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2016

Received in revised form 30 March 2017

Accepted 31 March 2017

Available online 2 April 2017

Keywords:

PELa

Immobilization

Inflammation

ABSTRACT

The lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) was purified by affinity chromatography in a mannose-agarose column. The lectin agglutinated rabbit erythrocytes and the agglutinating effect was inhibited by previous incubation with the glycoprotein fetuin, along with *N*-acetyl-D-glucosamine, D-mannose and its derivatives. The lectin maintained complete activity in temperatures ranging from 40 to 60 °C and pH values ranging from 9 to 10. As a glycoprotein, PELa has a carbohydrate content of 2.2%, and its activity requires divalent cations such as Ca²⁺ and Mn²⁺. Based on SDS-PAGE, PELa displays a profile similar to that of other Dalbergiaceae lectins with the main chain of molecular mass around 30 kDa and two subunits of 19 kDa and 10 kDa each. Two-dimensional (2D) electrophoresis revealed the presence of isoforms with different isoelectric points, and high-performance size exclusion chromatography (HPSEC) was performed to confirm the purity of the sample. The lectin was immobilized in CNBr-activated Sepharose 4B and successfully captured fetuin in solution, demonstrating that this lectin remains active and capable of binding carbohydrates. PELa showed effects different from those of its recombinant form in both pro- and anti-inflammatory tests.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO N – CAPA DO ARTIGO 14

International Journal of Biochemistry and Cell Biology 92 (2017) 79–89



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry
and Cell Biologyjournal homepage: www.elsevier.com/locate/biocyte

Research paper

Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein[☆]

Kyria Santiago Nascimento^a, Mayara Queiroz Santiago^a, Vanir Reis Pinto-Junior^a,
 Vinicius Jose Silva Osterne^a, Francisco William Viana Martins^a, Ana Paula Machado Nascimento^b,
 Ingrid Alessandra Victoria Wolin^b, Isabella Aparecida Heinrich^b,
 Maria Gleiciane Queiroz Martins^a, Mayara Torquato Lima Silva^a, Claudia Figueiredo Lossio^a,
 Cíntia Renata Costa Rocha^c, Rodrigo Bainy Leal^{b,*,*}, Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceará (UFCE), Fortaleza, Ceará, Brazil^b Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil^c Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Dioclea lasiocarpa lectin

DLL

Crystal structure

Molecular docking

Glioma

ABSTRACT

Lectins are multidomain proteins that specifically recognize various carbohydrates. The structural characterization of these molecules is crucial in understanding their function and activity in systems and organisms. Most cancer cells exhibit changes in glycosylation patterns, and lectins may be able to recognize these changes. In this work, *Dioclea lasiocarpa* seed lectin (DLL) was structurally characterized. The lectin presented a high degree of similarity with other lectins isolated from legumes, presenting a jelly roll motif and a metal-binding site stabilizing the carbohydrate-recognition domain. DLL demonstrated differential interactions with carbohydrates, depending on type of glycosidic linkage present in ligands. As observed by the reduction of cell viability in C6 cells, DLL showed strong antitumor activity by mechanisms involving activation of caspase 3.

ANEXO O – CAPA DO ARTIGO 15

International Journal of Biological Macromolecules 94 (2017) 271–282



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomacStructural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities

Vinicius Jose Silva Osterne^a, Jose Caetano Silva-Filho^b, Mayara Queiroz Santiago^a,
 Vanir Reis Pinto-Junior^a, Alysson Chaves Almeida^a,
 Adolph Annderson Gonçalves Costa Barreto^a, Ingrid Alessandra Victoria Wolin^c,
 Ana Paula Machado Nascimento^c, Renata Moraes Ferreira Amorim^d,
 Bruno Anderson Matias Rocha^a, Plinio Delatorre^b, Celso Shiniti Nagano^a,
 Rodrigo Bainy Leal^c, Ana Maria Sampaio Assreuy^d, Kyria Santiago Nascimento^a,
 Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil^b Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Santa Catarina, Florianópolis, Brazil^d Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2016

Received in revised form 8 October 2016

Accepted 9 October 2016

Available online 11 October 2016

Keywords:

Biological activities
 Amino acid sequence
 Crystal structure
 Proinflammatory
 Anticancer

ABSTRACT

A lectin from *Canavalia virosa*, Diocleinae subtribe, was purified by affinity chromatography with Sephadex G-50 matrix and named ConV. The primary structure of ConV was obtained by mass spectrometry and crystals were obtained by the vapor diffusion method at 293 K and belonged to orthorhombic space group P2₁2₂1 with two molecules in its asymmetric unit. The structure obtained presented R_{int} and R_{free} of 18.91% and 24.92% respectively, with no residues in nonallowed regions of Ramachandran plot. The crystal structure was solved at 2.53 Å and was demonstrated to be very similar to other lectins from the same subtribe. In inflammatory tests, ConV elicited paw edema, but incubation of lectin with glucose beforehand was able to reduce the edematogenic effect, indicating the involvement of the carbohydrate recognition domain in this process. The lectin also showed toxicity to rat C6 glioma cells, disrupting the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and decreasing cell viability, indicating an anticancer potential for ConV. *In silico* studies confirmed that ConV interacts strongly with carbohydrates that comprise the N-glycans of glycoproteins. This finding corroborates the hypothesis which holds that the lectin domain interacts with glycans in molecular targets and that this contributes to the effects observed in biological activities.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO P – CAPA DO ARTIGO 16

International Journal of Biological Macromolecules 98 (2017) 12–23



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics



Vanir Reis Pinto-Junior^a, Vinicius José Silva Osterne^a, Mayara Queiroz Santiago^a, Jorge Luis Almeida Correia^a, Francisco Nascimento Pereira-Junior^b, Rodrigo Bainy Leal^c, Maria Gonçalves Pereira^d, Larissa Silva Chicas^a, Celso Shiniti Nagano^a, Bruno Anderson Matias Rocha^a, José Caetano Silva-Filho^a, Wandemberg Paiva Ferreira^a, Cíntia Renata Costa Rocha^e, Kyria Santiago Nascimento^a, Ana Maria Sampaio Assreuy^{d,*}, Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Universidade Federal do Ceará (UFC), Brejo Santo, Ceará, Brazil

^c Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 20 January 2017

Available online 24 January 2017

Keywords:

Drfl

Structure

Vasorelaxation

ABSTRACT

The three-dimensional structure of *Dioclea reflexa* seed lectin (Drfl) was studied in detail by a combination of X-ray crystallography, molecular docking and molecular dynamics. Drfl was purified by affinity chromatography using Sephadex G-50 matrix. Its primary structure was obtained by mass spectrometry, and crystals belonging to orthorhombic space group P2₁2₁2₁ were grown by the vapor diffusion method at 293 K. The crystal structure was solved at 1.765 Å and was very similar to that of other lectins from the same subtribe. The structure presented R_{factor} and R_{free} of 21.69% and 24.89%, respectively, with no residues in nonallowed regions of Ramachandran plot. Similar to other Diocleinae lectins, Drfl was capable of relaxing aortic rings via NO induction, with CRD participation, albeit with low intensity (32%). *In silico* analysis results demonstrated that Drfl could strongly interact with complex N-glycans, components of blood vessel glycoconjugates. Despite the high similarity among Diocleinae lectins, it was also reported that each lectin has unique CRD properties that influence carbohydrate binding, resulting in different biological effects presented by these molecules.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO Q – CAPA DO ARTIGO 17

International Journal of Biological Macromolecules 92 (2016) 194–201



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomacLectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects

Alfa Umara Bari^a, Mayara Queiroz Santiago^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a,
 Vanir Reis Pinto-Junior^a, Lívia Paulo Pereira^b, Jose Caetano Silva-Filho^c, Henri Debray^d,
 Bruno Anderson Matias Rocha^e, Plinio Delatorre^e, Claudener Souza Teixeira^f,
 Corneville Correia Neto^a, Ana Maria Sampaio Assreuy^b, Kyria Santiago Nascimento^{a,*},
 Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, s/n bloco 907, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, 60714-242, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, Brazil

^d University of Science and Technology of Lille, Lille, France

^e Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, s/n bloco 907, 60440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil

^f Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2016

Received in revised form 7 July 2016

Accepted 8 July 2016

Available online 10 July 2016

Keywords:

Parkia lectin

Crystal structure

Biological effects

ABSTRACT

The relation structure–activity of the Mimosoideae lectins of *Parkia platycephala* (PPL) and *Parkia biglobosa* (PBL) was analyzed in this study. PBL was solved by X-ray crystallography at a resolution of 2.1 Å, and the crystal structure belonged to the C222₁ space group. Structural organization and binding sites were also characterized. Specifically, PBL monomer consists of three β-prism domains tandemly arranged with each one presenting a different carbohydrate recognition domain (CRD). PPL showed antinociceptive activity in the mouse model of acetic acid-induced writhes with maximal inhibitory effect by 74% at 1 mg/mL. PPL also demonstrated anti-inflammatory effect causing inhibition of leukocyte migration induced by both direct and indirect chemoattractants. These PPL activities were compared to that of PBL described previously. Molecular docking of both PBL and PPL demonstrated some differences in carbohydrate–lectin interaction energy. Comparing structure and biological effects of the two lectins provided new data about their structure and the relation with its biological activities.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO R – CAPA DO ARTIGO 18

Archives of Biochemistry and Biophysics 596 (2016) 73–83



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbiStructural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity

Alysson Chaves Almeida ^a, Vinicius Jose da Silva Osterne ^a, Mayara Queiroz Santiago ^a, Vanir Reis Pinto-Junior ^a, Jose Caetano Silva-Filho ^b, Claudia Figueiredo Lossio ^a, Francisco Lucas Faustino Nascimento ^c, Ricardo Patricio Honorato Almeida ^d, Claudener Souza Teixeira ^d, Rodrigo Bainy Leal ^e, Plinio Delatorre ^b, Bruno Anderson Matias Rocha ^d, Ana Maria Sampaio Assreuy ^c, Kyria Santiago Nascimento ^a, Benildo Sousa Cavada ^{a,*}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas — BioMoLab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza — Campus I, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^c Instituto de Superior de Ciências Fisiológicas-ISCIF, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2016

Received in revised form

29 February 2016

Accepted 2 March 2016

Available online 3 March 2016

Keywords:

Lectin

Centrolobium tomentosum

Primary structure

Crystal structure

Proinflammatory activity

Molecular docking

ABSTRACT

A glycosylated lectin (CTL) with specificity for mannose and glucose has been detected and purified from seeds of *Centrolobium tomentosum*, a legume plant from *Dalbergiaceae* tribe. It was isolated by mannose-sepharose affinity chromatography. The primary structure was determined by tandem mass spectrometry and consists of 245 amino acids, similar to other *Dalbergiaceae* lectins. CTL structures were solved from two crystal forms, a monoclinic and a tetragonal, diffracted at 2.25 and 1.9 Å, respectively. The carbohydrate recognition domain (CRD), metal-binding site and glycosylation site were characterized, and the structural basis for mannose/glucose-binding was elucidated. The lectin adopts the canonical dimeric organization of legume lectins. CTL showed acute inflammatory effect in paw edema model. The protein was subjected to ligand screening (dimannosides and trimannoside) by molecular docking, and interactions were compared with similar lectins possessing the same ligand specificity. This is the first crystal structure of mannose/glucose native seed lectin with proinflammatory activity isolated from the *Centrolobium* genus.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO S – CAPA DO ARTIGO 19

Archives of Biochemistry and Biophysics 588 (2015) 33–40



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

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

A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads



Ana Cecilia Alves ^a, Mayron Alves Vasconcelos ^b, Mayara Queiroz Santiago ^a,
 Vanir Reis Pinto-Junior ^a, Vinicius Jose Silva Osterne ^a, Claudia Figueiredo Lossio ^a,
 Pedro Henrique Souza Ferreira Bringel ^c, Rondinelle Ribeiro Castro ^c,
 Celso Shiniti Nagano ^d, Plinio Delatorre ^e, Luiz Augusto Gomes Souza ^f,
 Kyria Santiago Nascimento ^a, Ana Maria Sampaio Assrey ^{c,*}, Benildo Sousa Cavada ^{a,*}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Laboratório Integrado de Biomoléculas – LIRS, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Instituto Superior de Ciências Biomédicas-ISCB and Faculdade de Filosofia Dom Aureliano Matos-FFIDAM, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada a Proteínas – LEMAP, Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Departamento de Biologia Molecular, Centro de Ciências Exatas e da Natureza – Campus I, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 August 2015

Received in revised form

27 October 2015

Accepted 29 October 2015

Available online 3 November 2015

Keywords:

Lectin

Purification

Clathrotropis nitida

Immobilization

Toxicity

Vasorelaxation

ABSTRACT

A novel lectin from seeds of *Clathrotropis nitida* (CNA) was purified and characterized. CNA is a glyco-protein containing approximately 3.3% carbohydrates in its structure. CNA promoted intense agglutination of rabbit erythrocytes, which was inhibited by galactosides and porcine stomach mucin (PSM). The lectin maintained its hemagglutinating activity after incubation in a wide range of temperatures (30–60 °C) and pH (5.0–7.0), and its binding activity was dependent on divalent cations (Ca²⁺ and Mg²⁺). SDS-PAGE showed an electrophoretic profile consisting of a single band of 28 kDa, as confirmed by electrospray ionization mass spectrometry, which indicated an average molecular mass of 27,406 ± 2 Da and the possible presence of isoforms and glycoforms. In addition, CNA exhibited no toxicity to *Artemia* sp. nauplii and elicited reversible and dose-dependent vasorelaxation in precontracted aortic rings. CNA was successfully immobilized on chitosan beads and was able to capture PSM in solution. This study demonstrated that CNA is a lectin that has potential as a biotechnological tool in glycomics and glyco-proteomics applications.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

ANEXO T – CAPA DO ARTIGO 20

Research article



Received: 1 July 2015,

Revised: 1 September 2015,

Accepted: 5 September 2015,

Published online in Wiley Online Library: 14 October 2015

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jmr.2512

Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity

Vanir R. Pinto-Junior^a, Jorge L. A. Correia^a, Ronniery I. Pereira^a, Francisco N. Pereira-Junior^a, Mayara Q. Santiago^a, Vinicius J. S. Osterne^a, Juliana C. Madeira^c, João B. Cajazeiras^a, Celso S. Nagano^b, Plinio Delatorre^d, Ana M. S. Assreuy^c, Kyria S. Nascimento^a and Benildo S. Cavada^{a*}

A novel lectin present in *Dioclea reflexa* seeds (DrFL) was discovered and described in this study. DrFL was purified in a single step by affinity chromatography in a Sephadex G-50 column. The lectin strongly agglutinated rabbit erythrocytes and was inhibited by α -methyl- α -mannoside, α -mannose, and α -glucose. The hemagglutinating activity of DrFL is optimum at pH 5.0–7.0, stable up to 50 °C, and dependent on divalent cations. Similar to other lectins of the subtribe Diocleinae, the analysis by mass spectrometry indicated that DrFL has three chains (α , β , and γ) with masses of 25 562, 12 874, and 12 706 Da, respectively, with no disulfide bonds or glycosylation. DrFL showed inflammatory activity in the paw edema model and exhibited low cytotoxicity against *Artemia* sp. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: lectin; *Dioclea reflexa*; ESI mass spectrometry; inflammatory activity

ANEXO U – CAPA DO ARTIGO 21

Research Article



Received: 18 September 2013,

Revised: 05 November 2013,

Accepted: 08 November 2013,

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/jmr.2340

Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams

Mayara Q. Santiago^a, Cintia C. F. Leitão^a, Francisco N. Pereira-Junior^a, Vanir R. Pinto-Junior^a, Vinicius J. S. Osterne^a, Claudia F. Lossio^a, João B. Cajazeiras^a, Helton C. Silva^a, Francisco V. S. Arruda^c, Livia P. Pereira^d, Ana M. S. Assreuy^d, Kyria S. Nascimento^a, Celso S. Nagano^b and Benildo S. Cavada^{a*}

Recent studies have shown that lectins are promising tools for use in various biotechnological processes, as well as studies of various pathological mechanisms, isolation, and characterization of glycoconjugates and understanding the mechanisms underlying pathological mechanisms conditions, including the inflammatory response. This study aimed to purify, characterize physicochemically, and predict the biological activity of *Canavalia oxyphylla* lectin (CoxyL) *in vitro* and *in vivo*. CoxyL was purified by a single-step affinity chromatography in Sephadex® G-50 column. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis showed that the pure lectin consists of a major band of 30 kDa (α -chain) and two minor components (β -chain and γ -chain) of 16 and 13 kDa, respectively. These data were further confirmed by electrospray ionization mass spectrometry, suggesting that CoxyL is a typical ConA-like lectin. In comparison with the average molecular mass of α -chain, the partial amino acid sequence obtained corresponds to approximately 45% of the total CoxyL sequence. CoxyL presented hemagglutinating activity that was specifically inhibited by monosaccharides (D-glucose, D-mannose, and α -methyl-D-mannoside) and glycoproteins (ovalbumin and fetuin). Moreover, CoxyL was shown to be thermostable, exhibiting full hemagglutinating activity up to 60°C, and it was pH-sensitive for 1 h, exhibiting maximal activity at pH 7.0. CoxyL caused toxicity to *Artemia nauplii* and induced paw edema in rats. This biological activity highlights the importance of lectins as important tools to better understand the mechanisms underlying inflammatory responses. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: plant lectin; *Canavalia oxyphylla*; ESI mass spectrometry; toxic effect; pro-inflammatory

ANEXO V – CAPA DO ARTIGO 22

Appl Biochem Biotechnol
DOI 10.1007/s12010-014-0751-3

**Purification, Partial Characterization,
and CNBr-Sepharose Immobilization of a Vasorelaxant
Glucose/Mannose Lectin from *Canavalia virosa* Seeds**

Vinicius J. S. Osterne · Mayara Q. Santiago · Vanir R. Pinto-Junior ·
João B. Cajazeiras · Jorge L. A. Correia · Cintia C. F. Leitão · Rômulo F. Carneiro ·
Francisco N. Pereira-Junior · Mayron A. Vasconcelos · Bruno A. M. Rocha ·
Ana Maria S. Assreuy · Pedro Henrique S. E. Bringel · Celso S. Nagano ·
Kyria S. Nascimento · Benildo S. Cavada

Received: 23 October 2013 / Accepted: 20 January 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract A novel mannose/glucose-binding lectin from *Canavalia virosa* (designated as ConV) has been purified from seeds of *C. virosa* by affinity chromatography on a mannose-Sepharose 4B column. ConV strongly agglutinates rabbit erythrocytes and was inhibited by monosaccharides (D-mannose, D-glucose, and α -methyl-D-mannoside) and glycoproteins (ovalbumin and fetuin). SDS-PAGE revealed three bands corresponding to three subunits (α , β , and γ) confirmed by ESI mass spectrometry with exact mass of $25,480 \pm 2$ Da, $12,864 \pm 1$ Da, and $12,633 \pm 1$ Da, respectively. The purified lectin was more stable in pH ranging from 7.0 to 9.0, supported up to 80°C without any loss in activity and unaffected by EDTA. ConV showed no toxicity against *Artemia* sp. nauplii and relaxed endothelized rat aorta, with the participation of the lectin domain. In our tests, the lectin immobilized on CNBr-Sepharose was capable of binding 0.8 mg of ovalbumin per

ANEXO W – CAPA DO ARTIGO 23

Appl Biochem Biotechnol (2013) 171:1944–1955
DOI 10.1007/s12010-013-0470-1

Anti-inflammatory and Antinociceptive Activity of Chitin-binding Lectin from *Canna Limbata* Seeds

Theolyta S. Araújo · Claudener S. Teixeira · Maria A. P. Falcão ·
Vanir R. Pinto Junior · Mayara Quiroz Santiago · Raquel G. Benevides ·
Plínio Delatorre · Jorge L. Martins · Magna S. Alexandre-Moreira ·
Benildo S. Cavada · Eliane A. Campesatto · Bruno A. M. Rocha

Received: 14 June 2013 / Accepted: 22 August 2013 /
Published online: 8 September 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Lectins are a structurally heterogeneous group of proteins or glycoproteins with at least one noncatalytic domain binding reversibly to a specific mono- or oligosaccharide. Monocot mannose-binding lectins are an extended superfamily of structurally and evolutionarily related proteins. In this study, we evaluated anti-inflammatory and antinociceptive effects of monocot lectin from the *Canna limbata* seeds (CLL). To accomplish this, CLL was purified and subjected to pharmacological assays: abdominal writhing induced by acetic acid, formalin, hot plate and Zymosan A-induced peritonitis tests. The CLL was purified by chromatographic chitin column, and the relative mass of 21 kDa observed in electrophoresis was confirmed by electrospray mass spectrometry, which also revealed that purified CLL consists of a dimer having a weight of 49,676 Da. The CLL showed nociceptive activity in the acetic acid test as well as peripheral antinociceptive response. The CLL also showed anti-inflammatory effect with the reduction of inflammation in the formalin test and neutrophil migration into the peritoneal cavity. This is the first report of anti-inflammatory activity for a

ANEXO X – CAPA DO ARTIGO 24

Molecules **2013**, *18*, 10857–10869; doi:10.3390/molecules180910857

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart.

Vanir Reis Pinto Júnior¹, Mayara Queiroz de Santiago¹, Vinícius José da Silva Osterne¹, Jorge Luis Almeida Correia¹, Francisco Nascimento Pereira Júnior¹, João Batista Cajazeiras¹, Mayron Alves de Vasconcelos¹, Edson Holanda Teixeira², Antônia Sâmia Fernandes do Nascimento¹, Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel¹, Emilio de Castro Miguel¹, Alexandre Holanda Sampaio³, Kyria Santiago do Nascimento¹, Celso Shiniti Nagano³ and Benildo Sousa Cavada^{1,*}

¹ Laboratory of Biologically Active Molecules (Biomol-Lab), Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Bloco 907, Lab. 1075, Campus do Pici, Fortaleza-CE 60440-970, Brazil; E-Mails: juniorreis4@hotmail.com (V.R.P.J.); mayara_delonge@hotmail.com (M.Q.S.); vinnysterne@gmail.com (V.J.S.O.); jorge.biomol@gmail.com (J.L.A.C.); fnpjuniior@yahoo.com.br (F.N.P.J.); jcajazeiras@gmail.com (J.B.C.); mayronvasconcelos@gmail.com (M.A.V.); asamiaf@gmail.com (A.S.F.N.); thaizrangel@gmail.com (T.B.A.R.M.); emiliocmiguel@yahoo.com.br (E.C.M.); kyriasantiago@gmail.com (K.S.N.)

² Integrated Laboratory of Biomolecules (LIBS), Federal University of Ceará, Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Fortaleza, CE 60430-160, Brazil; E-Mail: edson@ufc.br

³ Laboratory of Mass Spectrometry Applied to Proteins (LEMAP), Federal University of Ceará, Av. Humberto Monte s/n, Bloco 825, Campus do Pici, Fortaleza-CE 60440-970, Brazil; E-Mails: alexholandasampaio@gmail.com (A.H.S.); naganocs@gmail.com (C.S.N.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: bscavada@ufc.br; Tel./Fax: +55-85-3366-9818.

Received: 31 July 2013; in revised form: 29 August 2013 / Accepted: 30 August 2013 /

Published: 4 September 2013