



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

MAYARA TORQUATO LIMA DA SILVA

ESTUDOS ESTRUTURAIS, CLONAGEM E EXPRESSÃO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DA LECTINA DE *Canavalia bonariensis*

FORTALEZA

2019

MAYARA TORQUATO LIMA DA SILVA

ESTUDOS ESTRUTURAIS, CLONAGEM E EXPRESSÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DA LECTINA DE *Canavalia bonariensis*

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará em 2019, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

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)

- S581e Silva, Mayara Torquato Lima da.
Estudos estruturais, clonagem e expressão e atividade biológica da lectina de *Canavalia bonariensis* /
Mayara Torquato Lima da Silva. – 2019.
80 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Cristalografia de Raios X. 2. Glioma. 3. Docking molecular. 4. Dinâmica molecular. 5. Proteína
recombinante. I. Título.

CDD 664

MAYARA TORQUATO LIMA DA SILVA

ESTUDOS ESTRUTURAIS, CLONAGEM E EXPRESSÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DA LECTINA DE *Canavalia bonariensis*

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará em 2019, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Wandemberg Paiva Ferreira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras
Centro Universitário INTA (UNINTA)

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

Prof. Dr. Jorge Luis Martins
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

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

Aos meus pais, Lino e Joseleuda, que nunca mediram esforços para que eu realizasse meus objetivos, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTO

À Deus, por ter me concedido força e saúde para a realização deste trabalho, agradeço por todas as vitórias e pelas situações de aprendizado nos momentos adversos.

Aos professores Dr. Benildo Cavada e Dra. Kyria Santiago por serem fonte de inspiração e sempre conseguir despertar em mim o verdadeiro anseio pela ciência. Agradeço também por terem compartilhando tanto conhecimento, por toda ajuda, paciência, disponibilidade e confiança.

Aos professores Dr. Jorge Martins e Dr. Wandemberg Ferreira, pela disponibilidade de terem aceitado prontamente o convite de participar desta banca.

Aos professores Dr. João Batista Cajazeira e Dr. Jorge Correia pela verdadeira parceria e amizade durante esses anos de doutorado. Obrigada por estarem sempre presentes e pelo convite em compor esta banca.

Ao professora Dra. Rodrigo Bainy Leal e laboratório de Neuroquímica permitir a realização dos experimentos de atividade biológica em glioma apresentados neste trabalho.

À todos os amigos no BioMol-Lab. A execução desse trabalho seria impossível sem a colaboração e apoio de cada um de vocês. Ao longo desses 10 anos agradeço em especial os que estiveram comigo no fim dessa trajetória e acompanharam todo o meu crescimento dentro deste grupo: Cláudia, Gleiciane, Clareane, Vanir, Vinícius, Mayara Queiroz, Alfa, Messias e Neto.

À todos os professores e funcionários da Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da UFC.

À minha mãe Joseleuda, meu pai Lino e meu irmão João Marcello, por serem os verdadeiros pilares que sustentam toda a minha caminhada e que sempre dão apoio incondicional a todas as minhas decisões.

Ao meu namorado Júnior Queiroz, por toda amizade, carinho, incentivo e ajuda que foram fundamentais para a conclusão de mais essa etapa da minha vida.

Finalmente, a todos os demais que contribuíram para a realização deste trabalho os meus sinceros agradecimentos. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Na ciência, o crédito vai para o homem que convence o mundo de uma ideia, não para aquele que a teve primeiro”. William Osler

RESUMO

O reconhecimento entre proteínas e carboidratos é fundamental em muitos processos biológicos, tais como infecções virais, bacterianas e parasitárias, separação de células e componentes solúveis, fertilização, crescimento, diferenciação e metástase do câncer. Modificações nos padrões de glicosilação presentes nessas células afetadas são indício marcantes dessas patologias e progressão da doença. Dentro dessa problemática o uso de lectina pode facilitar, portanto, a descoberta de novos biomarcadores, tendo em vista que são proteínas capazes de se ligar de modo específico e reversível a carboidratos. Dentre as lectinas vegetais, as mais extensivamente estudadas são as isoladas a partir das espécies pertencentes à família das leguminosas, com destaque neste trabalho a lectina de *Canavalia bonariensis* (CaBo), uma lectina glicose/manose específica. No presente trabalho, foi relatado a estrutura cristalina de CaBo determinada em resolução atômica na presença de α -metil-manosídeo, um ligante específico. Similar às características estruturais de outras lectinas de leguminosas, a CaBo apresentou o motivo *jellyroll* e um sítio de ligação de metal ocupado por íons de cálcio e manganês próximos ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). O potencial citotóxico da CaBo sobre culturas celulares de glioma das linhagens C6 (rato) foi investigado e os resultados demonstraram a sua capacidade de afetar a viabilidade celular e a migração por indução de autofagia e morte celular, sugerindo o potencial de antiglioma da lectina. Em busca de investigar os mecanismos de ação dessa proteína, os aspectos estruturais da lectina foram analisados através das ferramentas de docking e dinâmica molecular. Os resultados corroboram com dados anteriores, indicando que a atividade biológica da lectina ocorre principalmente através de interações com glicoproteínas, uma vez que a lectina interagiu favoravelmente com vários N-glicanos e ainda demonstrou sua estabilidade de interação com ligantes do tipo manose. Assim, diante do potencial biotecnológico já relatado para essa lectina buscou-se também através deste trabalho produção da forma recombinante da CaBo em sistema heterólogo, de modo que a rCaBo foi devidamente expressa utilizando-se células de *E. coli*.

Palavras-chave: Cristalografia de Raios X. Glioma. *Docking* molecular. Dinâmica molecular. Proteína recombinante.

ABSTRACT

Recognition between proteins and carbohydrates is fundamental in many biological processes, such as viral, bacterial and parasitic infections, separation of cells and soluble components, fertilization, growth, differentiation and cancer metastasis. Changes in glycosylation patterns present in these affected cells are striking evidence of these disorders and disease progression. Within this problematic the use of lectin can facilitate, therefore, the discovery of new biomarkers, considering that they are proteins able to bind specifically and reversibly to carbohydrates. Among the plant lectins, the most extensively studied are those isolated from the legume family species, with emphasis in this work the lectin of *Canavalia bonariensis* (CaBo), a lectin glucose/mannose specific. In the present work, it was reported the crystalline structure of CaBo determined in atomic resolution in the presence of α -methyl-mannoside, a specific ligand. Similar to the structural characteristics of other legume lectins, CaBo presented the jellyroll motif and a metal binding site occupied by calcium ions and manganese near the carbohydrate recognition domain (CRD). The cytotoxic potential of CaBo on glioma cell cultures of C6 lines (rat) was investigated and the results demonstrated its ability to affect cell viability and migration by autophagy induction and cell death, suggesting the potential antiglioma for the lectin. In order to investigate the mechanisms of action of this protein, the structural aspects of the lectin were analyzed through the tools of docking and molecular dynamics. The results corroborate with previous data indicating that the biological activity of lectin occurs mainly through interactions with glycoproteins, since lectin interacted favorably with several N-glycans and also demonstrated its interaction stability with mannose-type binders. Thus, in view of the biotechnological potential already reported for this lectin, the production of the recombinant form of CaBo in a heterologous system was also sought through this work, so that rCaBo was properly expressed using *E. coli* cells.

Keywords: X-Ray Crystallography. Glioma. *Docking* molecular. Molecular dynamics. Recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Exemplos de N-glicanos reconhecidos pela Concanavalin A (ConA)	22
Figura 2	– Esquema da oligomerização das lectinas <i>ConA-like</i>	24
Figura 3	– Cristais de CaBo complexado com α -metil-manosídeo (α MM)	47
Figura 4	– Gráfico de Ramachandran da estrutura final da CaBo calculado pelo programa Coot	50
Figura 5	– Estrutura tetramérica da CaBo complexada com α -metil-manosídeo	51
Figura 6	– Dados de validação da estrutura da CaBo obtidos através do wwPDB VALIDATION	52
Figura 7	– Representação do sítio de ligações a metais da CaBo	53
Figura 8	– Representação do domínio de reconhecimento a carboidratos da CaBo	53
Figura 9	– O tratamento com CaBo diminui a viabilidade celular e promove alteração na morfologia celular	55
Figura 10	– Efeito inibitório da CaBo na migração de células de glioma C6	56
Figura 11	– Indução de autofagia por CaBo em células de glioma C6 com o fluorescente laranja de acridina	57
Figura 12	– Fluorescência de IP por Hoechst em células C6 expostas ao veículo (controle) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100 μ g/mL de CaBo após 24 h e 48 h de tratamento	58
Figura 13	– Representação dos N-glicanos complexos usados nas simulações com a CaBo	60
Figura 14	– Resultados das simulações de dinâmica molecular entre CaBo isolada e complexada a diferentes ligantes (α MM e M13)	63
Figura 15	– Número de pontes de hidrogênio durante as simulações de dinâmica molecular entre a CaBo e os diferentes açúcares	64
Figura 16	– Construção da proteína de fusão NusA-His6-rCaBo	65
Figura 17	– Eletroforese em gel de agarose 1%: Extração do DNA plasmidial e PCR da <i>C. bonariensis</i>	66

Figura 18 – SDS-PAGE 10 %: Perfil de expressão da NusA-His6-rCaBo em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em diferentes condições	67
Figura 19 – SDS-PAGE 12 %: Extração de proteínas totais	67
Figura 20 – Purificação da NusA-His6-rCaBo	68
Figura 21 – Purificação da rCaBo	69
Figura 22 – SDS-PAGE 12 %: Monitoramento da purificação da rCaBo	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de coleta de difração, refinamento e parâmetros de qualidade do cristal da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i> complexada com α -metil-manosídeo (α MM)	48
Tabela 2 – Interações de Van der Waals e contatos polares entre CaBo e α -metil-D-manosídeo.....	54
Tabela 3 – Escore das interações entre a CaBo e diferentes <i>N</i> -glicanos obtidos por <i>docking molecular</i>	61
Tabela 4 – Atividade hemaglutinante da rCaBo contra eritrócitos de coelho	70
Tabela 5 – Inibição da atividade hemaglutinante da rCaBo	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
A.H.	Atividade hemaglutinante
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConV	Lectina de <i>Canavalia virosa</i>
Coot	Crystallographic Object-Oriented Toolkit
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
CSL	Lectina cerebelar solúvel
Da e kDa	Dálton e kilodálton
DLL	Lectina de <i>Dioclea lasiocarpa</i>
DlyL	Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i>
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNAp	DNA plasmidial
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GlicNAc	N-Acetilglicosamina
HPA	Lectina de <i>Helix pomatia</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactosídeo
LA	Laranja de acridina
LCA	Lectina de <i>lens culinaris</i>
M13	Manose- α 1,3-manose
α MM	α -metil-manosídeo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
OVA	Organelas vesiculares ácidas
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polietilenoglicol
r- α Dguia	Lectina recombinante de <i>Dioclea guianensis</i>
r- α DGL	Lectina recombinante de <i>Dioclea grandiflora</i> ,
rCaBo	Lectina recombinante de <i>Canavalia bonariensis</i>

RMSD	Desvio quadrático médio
RMSF	Flutuação quadrática média
SA	Ácido siálico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de docecil sulfato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Glicobiologia	18
2.1.1	<i>Lectinas e o seu papel na glicobiologia</i>	20
2.2	As lectinas de leguminosas e seus aspectos estruturais	22
2.3	Lectinas como ferramentas moleculares na cancerologia	25
2.3.1	<i>Gliomas</i>	26
2.4	A biologia estrutural e a bioinformática na caracterização de lectinas	27
2.5	A produção de lectinas recombinantes.....	29
2.6	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivos Gerais.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Caracterização estrutural da lectina selvagem de <i>Canavalia bonariensis</i> e avaliação do seu potencial citotóxico frente a células de glioma de linhagem C6	34
4.1.1	<i>Determinação da estrutura tridimensional da CaBo por cristalografia de Raios X</i>	34
4.1.1.1	<i>Purificação da lectina tipo selvagem</i>	34
4.1.1.2	<i>Ensaio de cristalização</i>	34
4.1.1.3	<i>Difração de Raios X</i>	35
4.1.1.4	<i>Resolução da estrutura</i>	35
4.1.2	<i>Avaliação da citotoxicidade da CaBo contra células de glioma da linhagem C6</i>	36
4.1.2.1	<i>Cultura de células e tratamento com a lectina</i>	36
4.1.2.2	<i>Ensaio de Viabilidade celular</i>	36
4.1.2.3	<i>Microscopia de luz</i>	37
4.1.2.4	<i>Teste com laranja de acridina</i>	37
4.1.2.5	<i>Ensaio de iodeto de propídio</i>	37

4.1.2.6	<i>Ensaio de migração celular</i>	38
4.1.2.7	<i>Análise estatística</i>	38
4.1.3	<i>Avaliação da Especificidade fina a carboidratos da CaBo por bioinformática</i>	38
4.1.3.1	<i>Docking Molecular</i>	38
4.1.3.2	<i>Dinâmica Molecular</i>	39
4.2	Produção e purificação da lectina recombinante de <i>Canavalia bonariensis</i>	40
4.2.1	<i>Clonagem e expressão da cadeia α de <i>Canavalia bonariensis</i></i>	40
4.2.1.1	<i>Obtenção do gene sintético da cadeia α da lectina de <i>Canavalia bonariensis</i></i>	40
4.2.1.2	<i>Preparo de Células Competentes</i>	40
4.2.1.3	<i>Transformação Bacteriana</i>	41
4.2.1.4	<i>Purificação dos plasmídeos recombinantes e confirmação da transformação</i>	42
4.2.1.4.1	<i>Amplificação do gene codificador da lectina</i>	42
4.2.1.5	<i>Ensaio de Expressão da Proteína Recombinante</i>	43
4.2.2	<i>Purificação da lectina recombinante de <i>Canavalia bonariensis</i></i>	44
4.2.2.1	<i>Preparo do extrato proteico</i>	44
4.2.2.2	<i>Cromatografia de afinidade</i>	44
4.2.2.3	<i>Ensaio de digestão da rCaBo</i>	45
4.2.3	<i>Determinação da atividade hemaglutinante e especificidade a carboidratos da rCaBo</i>	45
4.2.3.1	<i>Análise da Atividade Hemaglutinante e determinação da atividade específica</i>	45
4.2.3.2	<i>Análise da Especificidade por Carboidratos</i>	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1	Cristalização e resolução da estrutura tridimensional da CaBo	46
5.1.1	<i>Sítios de interação a metais e carboidrato</i>	52
5.2	Efeito da CaBo nas células de glioma C6 de rato	53
5.3	Análise da especificidade fina da CaBo por carboidratos	59
5.4	Produção e purificação da lectina recombinante de <i>Canavalia bonariensis</i>	65
5.4.1	<i>Transformação bacteriana e confirmação dos clones positivos</i>	65
5.4.2	<i>Purificação da rCaBo</i>	67
6	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Oligossacarídeos e glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídios) têm intrigado pesquisadores por décadas no seu envolvimento como mediadores de eventos celulares complexos. Sua variedade estrutural permite que eles codifiquem informações para reconhecimento molecular específico, servindo como determinantes para o enovelamento e estabilidade de proteínas, comunicação, diferenciação e proliferação celular, entre outros eventos de importância fisiológica (COCINERO; ÇARÇABAL, 2015). Modificações aberrantes no padrão de glicosilações de superfícies celulares mostram-se a partir de estudos atuais como sendo resultados de doenças, incluindo desordens hereditárias, imunodeficiência, doenças cardiovasculares e câncer (FREIRE-DE-LIMA; PREVIATO; MENDONÇA-PREVIATO, 2016). Monitorar modificações na estrutura de glicanos de proteínas celulares tornou-se uma popular ferramenta para diagnóstico (DE OLIVEIRA FIGUEIROA et al., 2017). Nesse contexto, o estudo dos carboidratos e de suas funções através da glicobiologia adquiri grande importância para elucidação do papel dessas moléculas nas células.

A habilidade de ligação de carboidratos a outras macromoléculas tais como proteínas, possibilita que as informações armazenadas nas moléculas de açúcar sejam decodificadas e traduzidas em eventos biológicos de interesse. Várias classes de proteínas apresentam essa capacidade de ligação, entre elas, as lectinas. As lectinas são um grupo de proteínas de grande importância biotecnológica que se destacam nos estudos e bioprospecção desde a sua descoberta, devido a sua capacidade de reconhecerem e se ligarem reversivelmente a carboidratos específicos.

As características próprias das lectinas fazem com que elas tenham funções intrínsecas e sejam amplamente utilizadas como base nos estudos de interação entre proteínas e glicoconjugados, o que reforça a possibilidade de possuírem papel fundamental em vários processos de reconhecimento molecular e sinalização celular (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005). Além disso, essas proteínas têm sido caracterizadas também como insumos biotecnológicos com aplicações em diferentes áreas. Por exemplo, lectinas também já são comercializadas como colunas que reduzem a carga viral de pacientes de Hepatite C (TULLIS et al., 2009) e como pomada vaginal que previne infecções contra o vírus do HIV (BEAMAN et al., 1996). Uma das propriedades dessas moléculas que atualmente vem sendo explorada corresponde a sua atividade antitumoral. A capacidade de lectinas em reconhecerem padrões anormais de glicosilação na superfície da membrana de células cancerosas torna essas

moléculas promissoras nos estudos de cancerologia (BELICKY; KATRLIK; TKA , 2016), tanto em diagnóstico como em terapia.

No que compreende os estudos de caracterização de lectinas, os principais enfoques se concentram nas lectinas de plantas, em especial as lectinas isoladas da família das leguminosas e subtribo Diocleinae. Essas proteínas são altamente similares do ponto de vista estrutural sendo geralmente compostas por 2 ou 4 subunidade iguais de massa molecular em torno de 25 kDa, mas apresentam diferenças significativas na potência de suas atividades biológicas (BARROSO-NETO et al., 2014) de modo que o isolamento e a caracterização biológica e estrutural de novas lectinas sempre ganha destaque por possibilitar a descoberta de novas propriedades funcionais.

Dentre os principais trabalhos envolvendo as lectinas, destacamos os que investigam especificamente a lectina de *Canavalia bonariensis* (CaBo), uma lectina glicose/manose específica isolada a partir de sementes de *Canavalia bonariensis*, a qual teve o seu primeiro relato de purificação descrito por Cavada e colaboradores (1996). Os últimos estudos contribuíram para uma melhor caracterização estrutural e funcional da proteína. A CaBo teve sua estrutura tridimensional modelada através de ferramentas *in silico* e seu efeito edematogênico avaliado dentro do modelo de edema de pata de rato. O teste demonstrou que a lectina induziu a formação de edema no modelo testado indicando um possível efeito inflamatório relacionado a resposta pela lectina (SILVA, 2015; SILVA et al., 2016a).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (DOU 02/08/1999) a *Canavalia bonariensis*, uma espécie nativa da região Sul do país, está em fase de extinção desde 1999, fato este que dificulta uma melhor avaliação do potencial biotecnológico da lectina tipo selvagem. Estudos preliminares observaram que a CaBo constitui-se como uma mistura de cadeias intactas e fragmentos que se combinam entre si para formar isolectinas, geralmente diméricas ou tetraméricas (CALVETE et al., 1999). A heterogeneidade de moléculas biológicas com a presença de isoformas pode influenciar diretamente no seu potencial biológico.

Com base em informações a cerca de lectinas correlatas, esse trabalho visa bioprospectar potencialidades biotecnológicas para a CaBo dentro de um modelo de ensaio biológico que almeja um diagnóstico precoce para glioma. Ademais, é certo que se revela salutar que explorar as possibilidades de ligações entre lectinas e glicoconjugados complexos, bem como compreender os mecanismos moleculares que regem essas interações, possibilita a abertura de uma gama de oportunidades para o melhor entendimento da ação dessas macromoléculas. Neste contexto, a biologia estrutural e as ferramentas de bioinformática também se mostram como técnicas aliadas para esse propósito.

Assim, diante do potencial biotecnológico apresentado pela lectina de *Canavalia bonariensis* e das dificuldades em se trabalhar com a lectina tipo selvagem devido a escassez do material biológico e da obtenção de sementes, esse trabalho também tem o amparo na necessidade de se produzir uma única isoforma da CaBo formada apenas pela proteína no seu estado mais ativo (cadeia intacta), de modo recombinante e expressa em sistema heterólogo. A capacidade de expressar e purificar uma proteína na sua forma recombinante permite a obtenção da proteína homogênea e em grande quantidade possibilitando sua caracterização biológica caracterização estrutural bem como seu uso como possível ferramenta biotecnológica em escala laboratorial ou mesmo industrial (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

Tomando como premissa os fatos expostos, a seguir será apresentada uma contextualização teórica que dará entendimento à temática abordada neste estudo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Glicobiologia

Inicialmente, cumpre apontar o papel fundamental da glicobiologia no desenvolvimento deste trabalho, pontuando que sua definição compreende o estudo da estrutura, biossíntese e biologia de sacarídeos (cadeias de açúcar ou glicanos) que estão amplamente distribuídos na natureza. A glicobiologia é um dos campos de mais rápido crescimento nas ciências biomédicas, com relevância para a pesquisa básica, biomedicina e biotecnologia (VARKI et al., 2017).

Neste contexto, a glicobiologia evidencia as características químicas dos monômeros de carboidratos, dentre as quais são relevantes a possibilidade de serem *D*- ou *L*-enantiômeros, a de se apresentarem na forma de furanosídeos ou piranosídeos, a de se ligarem um ao outro por ligações α ou β -glicosídicas, seu potencial em formar glicogonjugados (glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídeos), além da sua capacidade de incluir pontos de ramificação a partir de monômeros simples. As características enumeradas implicam na possibilidade de associação desses monossacarídeos em oligossacarídeos ou polissacarídeos, estruturas poliméricas bem mais complexas do que polímeros de ácidos nucleicos e proteínas. Essas diversas possibilidades estruturais que os oligossacarídeos podem assumir quando ligado a outras moléculas são responsáveis por codificar informações bastante complexas, informações essas conhecidas como glicocódigo ou código dos açúcares (WIEDERSCHAIN, 2013), que funcionam como verdadeiros CEPs (códigos de endereçamentos postais) celulares.

Diante do exposto, adentra-se nas glicosilações, que são modificações pós-traducionais complexas formadas por múltiplas estruturas de carboidratos ligados a proteínas ou lipídeos. Carboidratos nas superfícies celulares são marcadores primários do estado fisiológico das células (WIEDERSCHAIN, 2013). A glicosilação de proteínas é a modificação pós-traducional mais comum entre os seres vivos e influencia fortemente outros aspectos funcionais, incluindo localização celular, degradação e controle de qualidade de proteínas (ARNOLD et al., 2007), bem como sinaliza o tipo de interação de uma célula com as células adjacentes. Por exemplo, modificações nos padrões de glicosilações das células ou de um dado tecido ou órgão podem estar relacionadas com processos inflamatórios, patogenicidades e progressões de câncer (DUBE; BERTOZZI, 2005). Entretanto, o mecanismo envolvido nessas modificações nas superfícies celulares ainda não está claro. O desenvolvimento de estratégias

para visualizar e monitorar a distribuição de glicanos em células e organismos irá promover avanços no entendimento das relações entre glicanos e patologias (WU; WONG, 2011).

Duas principais classes comuns de glicosilações são definidas segundo a natureza de ligação covalente estabelecida entre o glicano e a parte peptídica da proteína: as *N*- e *O*-glicosilações. Esses dois tipos de glicosilações podem ser encontradas simultaneamente em uma mesma proteína (VARKI et al., 2017).

As *N*-glicosilações referem-se a uma ligação de oligossacarídeos a um átomo de nitrogênio presente no N₄ dos resíduos de asparagina, envolvendo o reconhecimento de uma sequência consenso (Asn-X-Ser/Thr, onde X é qualquer aminoácido que não prolina). Esse evento ocorre em proteínas secretadas ou de membrana pertencentes a organismos de eucariotos ou mesmo de *archae*. Nos eucariotos, as *N*-glicosilações ocorrem como um processo pós-traducional no retículo endoplasmático das células. Sua formação inclui a ligação de blocos de açúcar (incluindo 2 N-acetilglicosamina (GlcNAc), 9 manoses e 3 glicoses) e podem sinalizar eventos celulares ou apresentar funções específicas para a proteína, tais quais direcionar o transporte da glicoproteína, modificar suas propriedades de estabilidade e solubilidade e mediar interações celulares (SINCLAIR; ELLIOTT, 2005). Os complexos de glicanos MAN3, MAN5 e MAN9 estão ancorados a glicoproteínas e envolvidos em alguns processos do sistema imune (RUDD et al., 2001).

Por sua vez, a *O*-glicosilação é uma modificação pós-traducional que consiste na formação de uma ligação glicosídica entre o carbono anomérico de um carboidrato com a hidroxila de um resíduo de serina ou treonina de uma proteína já na sua conformação ativa. Glicosilações do tipo *O*-glicanos são extremamente diversas em composição química e nenhuma sequência consenso tem sido observada (SCHMALTZ; HANSON; WONG, 2011). Mucinas são a classe de glicoproteínas que carregam a maior quantidade de *O*-glicanos. Os açúcares mais comuns nessas glicosilações são N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglicosamina, galactose, fucose e ácido siálico. O comprimento de um *O*-glicano pode variar desde um único resíduo de GalNAc até mais de 20 resíduos (VARKI et al., 2017). Inúmeras doenças estão associadas com expressão anormal do gene de mucina e na modificação do padrão de *O*-GalNAc glicanos. Entre essas se incluem o câncer, as doenças inflamatórias no intestino e as doenças bronquiais e pulmonares (BROCKHAUSEN; SCHACHTER; STANLEY, 2017), entre outras.

A habilidade de ligação de carboidratos a outras macromoléculas tais como proteínas, possibilita que as informações armazenadas nas moléculas de açúcar através dos seus padrões de glicosilação (glicocódigo) sejam decodificadas e traduzidas em eventos biológicos

de interesse, e dando ênfase ao estudo de diagnóstico, a descoberta da especificidade de determinadas glicoproteínas e oligossacarídeos da superfície celular leva à aplicação destas moléculas na pesquisa básica e na análise biomédica dentro de uma rotina laboratorial (RUDIGER; GABIUS, 2001).

Moléculas que sejam capazes de decifrar o glicocódigo, em especial as variações nos padrões de *N*- e *O*- glicosilações de superfícies celulares são, portanto, muito importantes nos estudos de glicobiologia. Várias classes de proteínas apresentam essa capacidade de ligação, entre elas, as lectinas, objeto de estudo desse trabalho.

2.1.1 Lectinas e o seu papel na glicobiologia

O reconhecimento entre proteínas e carboidratos é fundamental em muitos processos biológicos, tais como infecções virais, bacterianas e parasitárias, separação de células e componentes solúveis, fertilização, crescimento, diferenciação e metástase do câncer. Neste aspecto, um fator que mais alavanca a importância do estudo científico das lectinas é o reconhecimento de sua capacidade única de "ler" as informações biológicas que são codificadas na estrutura tridimensional de açúcares, o glicocódigo (WIEDERSCHAIN, 2013)

A análise do contexto histórico sobre o estudo das lectinas aponta que já transcorreu mais de um século desde o primeiro relato e descrição sobre as mesmas, em 1888. O termo geral "lectina" (do latim "*legere*" significa escolher ou selecionar) foi proposto para representar proteínas de origem não-imune com especificidade a açúcares e desde o desenvolvimento da técnica de cromatografia de afinidade, em 1960, inúmeras lectinas já foram purificadas, e na medida em que novas funções e características iam sendo reveladas para essas moléculas, a lectinologia foi se desenvolvendo (SHARON; LIS, 2004).

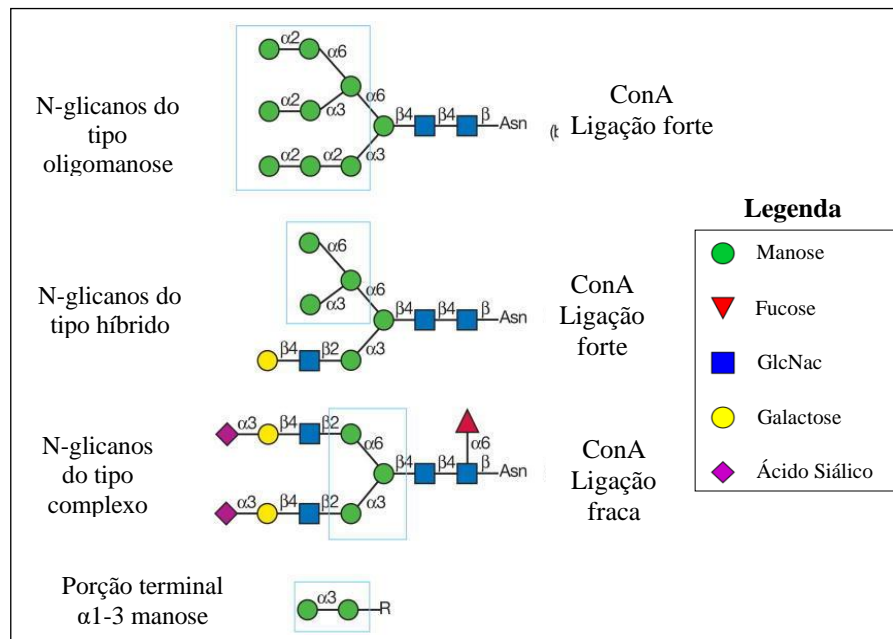
A investigação sobre o contexto e evolução histórica do estudo das lectinas evidencia ainda que a revelação mais importante e valiosa sobre as lectinas é que elas podem reconhecer e se ligar de modo específico e reversível a carboidratos. Esta propriedade confere a essas proteínas um enorme potencial e valor no estudo das glicoproteínas e facilita a compreensão dos mecanismos de muitos processos fisiológicos e patológicos (DAN; LIU; NG, 2016). O meio através do qual as lectinas se ligam a esses carboidratos está relacionado a um pequeno número de aminoácidos na estrutura da proteína que compõem uma região denominada domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) (SHARON; LIS, 2004). Esse domínio lectínico reconhece resíduos de carboidratos em terminais não-redutores de glicoproteínas e glicolipídios encontrados nas membranas celulares.

As lectinas têm especificidades complexas que podem reconhecer não apenas diferentes monossacarídeos dentro da cadeia de glicano, como manose, N-acetilglicosamina, ácido siálico (SA) ou galactose, mas também diferentes ligações entre monômeros, sacarídeos ou ramificações de glicano. Um exemplo é o reconhecimento seletivo do vírus da gripe em humanos e aves. A lectina do vírus *influenza* reconhece SA ligados a galactose através de ligação α 2-6 expressos em células humanas, enquanto que a lectina do vírus da gripe aviária reconhece SA α 2-3 ligados a galactose em células de aves. Isso explica o porquê do vírus da gripe aviária não infectar seres humanos e a gripe humana não infectar as aves (BELICKY; KATRLIK; TKA, 2016).

As lectinas de plantas compreendem o grupo que mais desperta o interesse da comunidade científica, com destaque para as isoladas da família das leguminosas. Essas aglutininas representam um papel importante no desenvolvimento do estudo das lectinas em virtude da sua abundância nas sementes, além de terem em sua maioria, um processo relativamente simples de purificação. Muitas reconhecem e se ligam a açúcares simples tais como glicose e seus α -glicosídeos, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglicosamina ou fucose. Essa afinidade pode ser muito maior para com os constituintes de glicoproteínas, ácido siálico e N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Muitas lectinas de plantas usadas comumente como ferramentas na glicobiologia se encontram disponíveis comercialmente. A maioria destas lectinas é caracterizada por testes de inibição, nos quais monossacarídeos ou pequenos oligossacarídeos são utilizados para bloquear a ligação das proteínas frente a um glicano alvo. Essas lectinas são agrupadas de acordo com a sua especificidade em relação a monossacarídeos e pela preferência de distinção entre anômeros α ou β de açúcares. Entretanto, lectinas pertencentes a grupos particulares de especificidade podem diferir sua afinidade frente a diferentes glicanos. Um exemplo é a Concanavalina-A (lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*), uma lectina glicose/manose específica que apresentou também capacidade de reconhecimento a N-glicanos. A ConA possui maior preferência de ligação com N-glicanos do tipo oligomanose em relação a N-glicanos biantenados e não possui capacidade de se ligar a complexos de N-glicosilações ramificadas (Figura 1). Outras lectinas tais quais a PHA de sementes de *Phaseolus vulgaris* e a LCA de sementes de *Lens culinaris* também reconhecem estruturas específicas de N-glicanos formadas por complexos tri ou tetrantenados (VARKI et al., 2017).

Figura 1 - Exemplos de N-glicanos reconhecidos pela Concanavalin A (ConA)



Fonte: Adaptado de VARKI et al., 2017.

A elucidação dos mecanismos que tornam essas proteínas aptas a reconhecer uma ampla gama de carboidratos e glicoconjugados é a chave para o entendimento da essência das interações carboidratos-proteínas (KANEDA et al., 2002).

2.2 As lectinas de leguminosas e seus aspectos estruturais

No que se refere à análise estrutural de lectinas vegetais dentro da família das leguminosas, a subfamília Papilionoideae representa o subgrupo com a maior quantidade de lectinas estudadas (aproximadamente 99%), seguido pela subfamília Cesalpinoideae (aproximadamente 0,9% e a subfamília Mimosoideae (aproximadamente 0,1%) (LORIS et al., 1998).

Dentro da subfamília Papilionoidea, a tribo Phaseoleae possui o maior quantitativo de estudo sobre lectinas, especialmente aquelas isoladas de plantas da subtribo Diocleinae. As lectinas de Diocleinae são aquelas dos gêneros *Canavalia*, *Dioclea*, *Cratyli*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Camptosema* e são comumente conhecidas como *ConA-like* devido às semelhanças estruturais com a lectina de *Canavalia ensiformis*, ConA.

Estas aglutininas são a base central para o estudo molecular das interações lectina-carboidrato, além de serem fundamentais para a compreensão dos seus aspectos relacionados a estrutura-função, assim. tendo em vista que as funções biológicas dessas proteínas estão associadas

diretamente com sua atividade de ligação a carboidrato, é importante destacarmos nesta sessão as características estruturais que integram as lectinas de leguminosas (CAVADA et al., 2019; LORIS et al., 1998).

As estruturas primárias das lectinas *ConA-like* exibem homologias notáveis, demonstrando que essas proteínas têm sido conservadas através da evolução. Estas são compostas de 237 resíduos de aminoácidos com poucas exceções, como por exemplo a CFL (lectina de *Cratylia floribunda*, que possuem 236 resíduos (CALVETE et al., 1999). Essas lectinas atingem essa forma a partir de um processamento pós-traducional de seu precursor glicosilado. A pré-pro-lectina é formada por um peptídeo sinal + cadeia γ + peptídeo central + cadeia β + peptídeo C-terminal.

Após o processamento no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vacúolos das células vegetais, a proteína perde seus peptídeos intermediários e as cadeias γ e β são religadas na ordem inversa, formando uma cadeia α ($\beta + \gamma$), que consiste na cadeia madura da lectina de aproximadamente 237 aa com uma massa molecular média de 25 kDa. Este processamento foi inicialmente descrito para ConA como permutação circular (BOWLES et al., 1986; FAYE; CHRISPEELS, 1987).

Em relação à sua organização tridimensional, a ConA foi a primeira lectina leguminosa a ter seu arranjo resolvido (BECKER et al., 1975). Seu modelo estrutural refinado (PDB: 1JBC) é notável por ser uma referência nos estudos estruturais de diversas lectinas de plantas e é caracterizado por uma estrutura monomérica conhecida como *jellyroll*, também comum a essas outras lectinas e seu arranjo está associado ao processo de reconhecimento de carboidratos. Esse arranjo estrutural é comum às lectinas leguminosas.

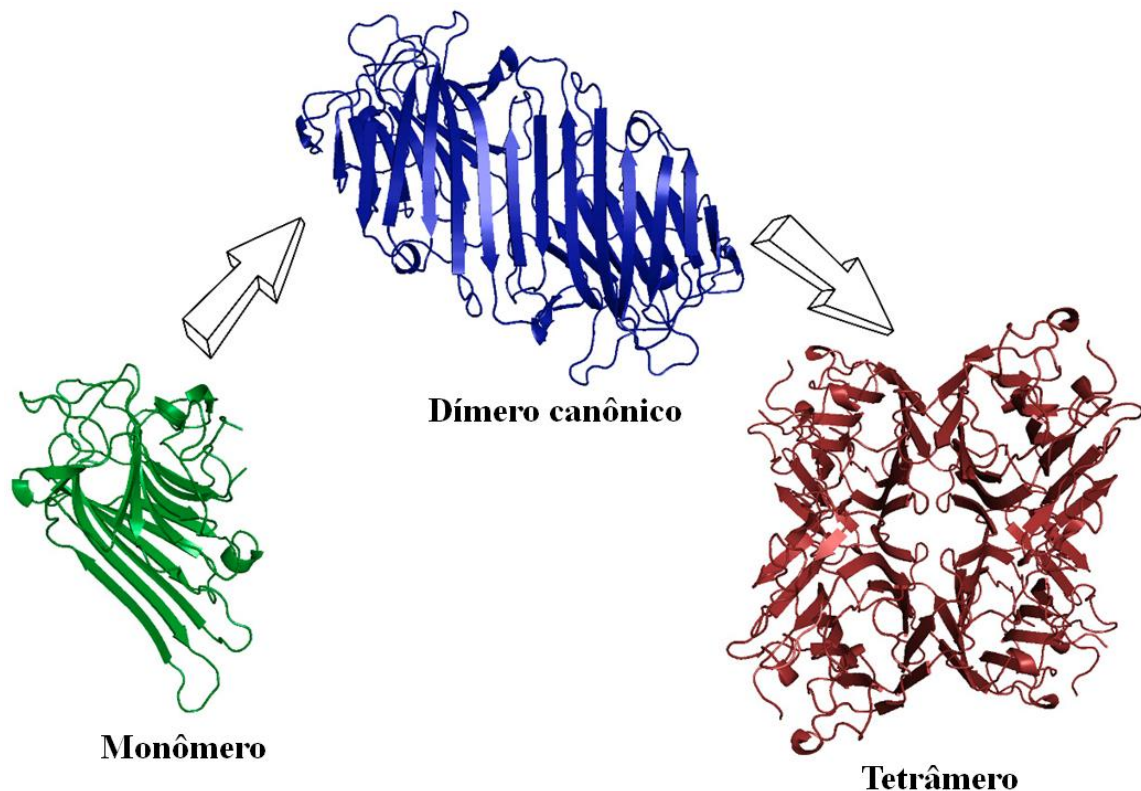
O motivo, também conhecido como dobramento β -sanduíche, tem em suas porções anterior e posterior, respectivamente, uma folha- β parcialmente estendida de seis filamentos e uma folha β curvada de sete filamentos antiparalelos, unidas por uma terceira folha- β de cinco fitas, localizada na porção superior do motivo (CHANDRA et al., 2001). Essas folhas são conectadas por alças, de modo que a estrutura se assemelha a um sanduíche e é estabilizada pela presença de dois núcleos hidrofóbicos (BANERJEE et al., 1996).

Na estrutura monomérica dessa classe de proteínas, o domínio de reconhecimento de carboidratos da lectina é disposto em uma depressão na superfície da proteína (LORIS et al., 1998). Essa região é bem conservada entre lectinas *ConA-like*, com a destaque para especificidade fina para os manosídeos simples glicose e α -metil-manosídeo e seus derivados. O reconhecimento específico à carboidratos ocorre através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre lectina e açúcar, envolvendo os resíduos na vizinhança do CRD

(NAISMITH et al., 1994). Além deste sítio primário, dois outros sítios secundários estão presentes na estrutura da proteína, que são o sítio hidrofóbico adicional e dois locais de ligação aos íons metálicos Ca^{2+} e Mn^{2+} .

Em sua maioria, as lectinas de leguminosas são formadas por dímeros canônicos ou por tetrâmeros formados pela união de dímeros, com os tetrâmeros apresentando duas interfaces semelhantes as interfaces dos dímeros (FIGURA 2).

Figura 2 – Esquema da oligomerização das lectinas ConA-like



Fonte: Adaptado de CAVADA et al., 2019.

Embora seja veemente abordado a forte semelhança entre as estruturas primárias, secundárias e terciárias dessas lectinas, suas estruturas quaternárias apresentam variações consideráveis, como por exemplo, algumas lectinas de leguminosas exibem uma oligomerização dependente de pH (CALVETE et al., 1999; NAGANO et al., 2008). O impacto dessas variações tem implicações funcionais, uma vez que podem acarretar variações de especificidade da ligação a glicanos complexos (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017)

Atualmente, mais de 20 lectinas de Diocleinae já tiveram seus modelos tridimensionais determinados, reunindo mais de 100 depósitos de estruturas no *Protein Data*

Bank (CAVADA et al., 2019). Essa bagagem reúne informações para a elucidação dos mecanismos que envolvem o papel biológico dessas proteínas.

2.3 Lectinas como ferramentas moleculares na cancerologia

Alterações nos padrões de glicosilação compreendem uma característica fenotípica associada a células cancerígenas. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez em 1969 com a demonstração de que os fibroblastos saudáveis possuem glicoproteínas de membrana menores que em suas células afetadas (MEEZAN et al., 1969). Essas mudanças nas glicosilações podem afetar a super ou a baixa expressão dos glicanos naturalmente presentes nessas células, o que resulta em alterações funcionais como por exemplo, a adesão de receptores de superfície celular (TANIGUCHI; KIZUKA, 2015).

Baseado nesses eventos, pesquisadores propõem que as glicosilações aberrantes expressas em células afetadas sejam usadas como diagnóstico precoce de tumores, determinação de estágio da doença e até mesmo como alvo em estratégias terapêuticas (DUBE; BERTOZZI, 2005; KÖLBL; ANDERGASSEN; JESCHKE, 2015).

As glicoproteínas são atualmente os principais biomarcadores usados no meio clínico. Mudanças nas glicosilações afetadas pelo câncer estão comumente associadas com a presença de ácido siálico, fucose, aumento das ramificações de GlcNAc em *N*-glicanos e a super expressão de mucina *O*-GalNAc glicanos (PINHO; REIS, 2015).

Portanto, não é de surpreender que as lectinas e sua capacidade de reconhecer carboidrato sejam utilizadas constantemente em estudos para rastreamento de novos biomarcadores de câncer (GEMEINER et al., 2009).

Desde 1984, a interação de lectinas com câncer já é estudada com o relato da ligação da lectina de *Helix pomatia* (HPA) à células em metástase de câncer de mama (LEATHEM; DOKAL; ATKINS, 1983). Além da HPA, também já foi demonstrado que muitas outras lectinas conseguem diferenciar células normais de células com câncer, como a lectina VCA de *Viscum album* (LYU; PARK, 2007), ConA de *Canavalia ensiformis* (LEI; CHANG, 2007), ConBr de *Canavalia brasiliensis* (SILVA et al., 2014), dentre outras. A ConA pode levar à morte programada de células cancerígenas, tendo como alvo vias apoptóticas (FU et al., 2011).

Com base nesses efeitos algumas lectinas já são usadas no desenvolvimento de biosensores visando o diagnóstico precoce de câncer, a exemplo das lectinas ArtinM (lectina de *Artocarpus heterophyllus*) específica a D-manose que consegue detectar células cancerígenas relacionadas à leucemia (CARVALHO et al., 2014) e a Cramoll (lectina de

Cratylia mollis) que promete um diagnóstico diferencial para o câncer de próstata através de detecção *label-free* (SILVA et al., 2016b). O uso de novas lectinas pode facilitar, portanto, a descoberta de novos biomarcadores.

2.3.1 Gliomas

Os gliomas representam entre 50 e 80 % dos tumores cerebrais primários classificados como malignos em adultos (LEFRANC et al., 2005; LE MERCIER et al. 2010; RIOS MARCO et al., 2015) e recebem o nome dependendo do tipo de células a partir das quais se desenvolvem: astrocitomas (astrócitos), oligodendrogliomas (oligodendrócitos), ependimomas (células ependimais) e oligoastrocitoma (mistura de várias células gliais). Estudos de novos compostos que sejam capazes de interagir com alta especificidade sobre as células tumorais e que de forma seletiva possam levar à morte ou inibição da proliferação dessas células representam um desafio relevante a ser enfrentado.

A proliferação descontrolada, característica das células cancerígenas *in vivo*, pode ser reproduzida em condições *in vitro* (COOPER, 2000). Assim, numerosos modelos de linhagens de celulares cancerígenas foram estabelecidos e utilizados ao longo dos anos. Células de glioma C6 de rato são um modelo experimental já bastante 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 (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002).

Em estudos de proliferação e adesão de células C6 foi observado que tanto as propriedades proliferativas quanto as adesivas das células C6 eram dependentes da expressão de glicoproteínas de membranas com *N*-glicanos de oligomanose e híbridos. Na ausência desses *N*-glicanos, decorrida do cultivo dessas células em meio com inibidores de glicosilações, as propriedades de proliferação e adesão das células C6 foram reduzidas (SCHRAEN-MASCHKE; ZANETTA, 2003). A CSL (lectina cerebelar solúvel) é uma proteína endógena solúvel presente em cerebelos de ratos e específica a oligomanosídeos e a *N*-glicanos híbridos. Essa lectina aparenta estar diretamente ligada com o surgimento de câncer ao ter sua expressão aumentada em condições malignas. Conforme observado, a CSL pode atuar como molécula de ligação a glicoproteínas expressas na superfície de células C6 promovendo um possível efeito mutagênico para essas células (SCHRAEN-MASCHKE; ZANETTA, 2003).

Baseado nesses estudos algumas lectinas de leguminosas tiveram seu potencial citotóxico avaliados em culturas celulares de linhagens C6. As lectinas *ConA-like* isoladas a partir de sementes de *Canavalia virosa* (ConV) e *Dioclea lasiocarpa* (DLL) possuem a capacidade de reduzir a viabilidade e migração celular em modelo *in vitro* da linhagem C6 de glioblastoma, bem como promover mudanças morfológicas nessas células (NASCIMENTO et al., 2017; OSTERNE et al., 2017).

2.4 A biologia estrutural e a bioinformática na caracterização de lectinas

A principal estratégia experimental para a caracterização estrutural de lectinas e demais macromoléculas é a cristalografia de Raios X. Através dessa técnica pode-se determinar a posição atômica de todos os átomos constituintes de uma macromolécula biológica e visualizar interações das proteínas com seus ligantes específicos. Esse estudo estrutural é fundamental para o entendimento molecular de vários mecanismos biológicos. O uso dessa técnica requer a obtenção de um bom cristal de interesse, estruturas formadas por repetições translacionais da molécula ou átomos em todas as direções. Cristais são distinguidos de substâncias amorfas pelas suas faces retas e sua anisotropia (algumas de suas propriedades físicas são dependentes da direção em que medidas são feitas no cristal), que refletem o empacotamento regular das moléculas, átomos e íons. É por causa desse arranjo regular que os cristais difratam Raios X (OOI, 2010).

A cristalografia de Raios X possibilita a representação de uma estrutura estática da proteína bem definida sob uma determinada condição experimental. Embora seja amplamente utilizada, apresenta limitações por representar uma indicação estática do comportamento da proteína. Demais técnicas podem se complementar nesses estudos estruturais permitindo estimar interações e a energia livre de ligação entre a proteína e ligantes, antes mesmo que a interação entre esses seja alcançada, e também obter "filmes" detalhados do movimento molecular (SOARES, 1997).

A técnica de *Docking* molecular (ou ancoragem molecular) permite prever a orientação adotada por uma molécula ao se ligar à outra, e é frequentemente usada para prever a conformação adotada por pequenas moléculas ao se ligar a proteínas. Os custos computacionais com essas análises são bem menores se comparados aos gastos laboratoriais despendidos ao ensaiar experimentalmente essas interações. Esta importante ferramenta tem sido usada para filtrar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar

os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo da lectina (RODRIGUES et al., 2012).

A partir da ancoragem molecular, são obtidas diferentes conformações espaciais do ligante, possibilitando ao analista identificar qual dentre estas é a mais provável na interação ligante alvo. A técnica é uma análise *in-silico* que promove modificações na conformação/orientação da proteína frente a um *screening* de ligantes menores para maximizar a interação entre eles. A partir de cada conformação espacial, são obtidas energias livres de ligação não-covalente (entre o ligante e o alvo), onde a menor energia é considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN et al., 2004)

Apesar da grande capacidade, o método de *docking* ainda encontra algumas limitações importantes, dentre as quais talvez a mais importante seja a baixa flexibilidade do receptor. Uma das técnicas utilizadas para contornar essa dificuldade é conhecida como *ensemble docking*, que envolve o uso de técnicas de amostragem por simulação molecular (dinâmica molécula, por exemplo) para criar uma variedade de conformações para o receptor, e utilizar essas conformações nos estudos de *docking*.

Um desses métodos de simulação computacional é a Dinâmica Molecular (DM), que estuda o movimento físico dos átomos e moléculas das quais se conhecem o potencial de interação entre estas partículas e as equações que regem o seu movimento. Cálculos de mecânica molecular, interações intra e intermoleculares são calculadas de uma forma simplificada utilizando uma parametrização empírica. Esses parâmetros incluem as massas dos átomos, cargas, ângulos, diedros, potenciais entre átomos não ligados (van der Waals e interações eletrostáticas), etc. Frequentemente o conjunto desses parâmetros de ajuste, juntamente com as respectivas funções, é denominado como “campo de forças molecular” (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990) A partir dessas forças, resolvem-se as equações do movimento para descrever como as posições atômicas variam com o tempo.

Simulações na escala do nanosegundo são normalmente necessárias para muitos estudos. No estudo estrutural das macromoléculas a Dinâmica Molecular permite modelar interações proteína-ligante previstas por *docking* molecular e avaliar sua estabilidade em um espaço de tempo.

Algumas lectinas já tiveram seu comportamento avaliado por simulações envolvendo *docking* e dinâmica molecular. A lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) apresentou forte interação aos oligomanosídeos MAN3, MAN5 e MAN9. A estabilidade da ligação foi avaliada por dinâmica molecular. DlyL se liga a vários manosídeos sugerindo que essa lectina possa interagir com *N*-glicanos acoplados a glicoconjugados e essas interações com exceção da

MAN5, apresenta a formação de ligações de hidrogênio extra em adição ao CRD. O entendimento desse tipo de interação pode ser um mecanismo básico para a compressão das diversas atividades biológicas reportadas para as lectinas (PINTO-JUNIOR et al., 2017).

2.5 A produção de lectinas recombinantes

As lectinas de plantas, conforme já pontuado, consistem nas que originaram a maior quantidade de trabalhos científicos. Sobre essas proteínas, registra-se ainda que são isoladas comumente a partir de fontes naturais, como folhas, caules ou sementes, sendo um fato comum para a maior parte dessas a heterogeneidade das amostras purificadas devido a presença de isoformas. É de bom alvitre salientar que podem ser observados em ensaios de caracterização e aplicações biológicas que as múltiplas isolectinas podem levar a resultados inconstantes, o que dificulta o uso dessas proteínas como ferramentas biomédicas. Por esta razão, a produção de lectinas por meios da tecnologia do DNA recombinantes tem a vantagem de obter grandes quantidades de proteínas com sequências de aminoácidos definidas e propriedades mais precisas (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

Diante das perspectivas e potencialidades voltadas a diversas aplicações biotecnológicas, um grande número de lectinas já foram expressas e purificadas a partir de organismos recombinantes em sistemas heterólogos. O processo envolve cinco passos descritos a seguir de modo simplificado: inicialmente seleciona-se o gene da lectina de interesse; após, o mesmo é ligado a um vetor de expressão que estará sob controle de um promotor induzível; em seguida, transforma-se uma célula hospedeira com o gene modificado; na sequência, induz-se a expressão da proteína e por fim ela estará pronta para ser purificada e caracterizada (ROSANO; CECCARELLI, 2014)

Os três principais sistemas para a expressão de proteínas recombinantes comumente usados são bactéria (*Escherichia coli*), leveduras (*Pichia pastoris*) e a expressão de proteína mediada por de baculovírus, embora vários outros sistemas estejam também disponíveis, incluindo outras bactérias (por exemplo, *Lactococcus lactis*), e expressão em células de mamíferos e de plantas. A escolha dentre os sistemas disponíveis depende principalmente da natureza da proteína heteróloga a ser expressa (JAYARAJ; SMOOKER, 2009). Células de *E. coli* são comumente utilizadas para a produção de lectinas não-glicosiladas, enquanto *P. pastoris* se revelam mais adequadas à solução de problemas relacionados a expressão de proteínas insolúveis e para produção de proteínas glicosiladas (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2014).

Registra-se ainda que dentre os sistemas de expressão, *Escherichia coli* é o mais utilizado para produção de lectinas e demais proteínas recombinantes em virtude de apresentar muitas vantagens em relação aos demais, tais como condições mais favoráveis de crescimento e replicação das células, rápida acumulação de biomassa, além de apresentar processo de escalonamento mais simplificado e econômico (JAYARAJ; SMOOKER, 2009).

Com a seleção das células hospedeiras, prossegue-se para a escolha do vetor adequado. O sistema pET apresenta uma família de vetores desenvolvidos para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. O gene alvo é clonado em uma das mais de 40 configurações dos plasmídeos pET que apresenta o promotor forte T7 reconhecido pela T7 RNA polimerase lisogeno λ DE3. Esta enzima, é controlada pelo promotor *lacUV5* presente no genoma de *E. coli*. Dessa forma, células DE3 de *E. coli* são utilizadas como fábricas de produção de proteínas recombinantes que utilizam vetores pET como sistema de clonagem. Tanto o promotor *lacUV5* quanto o promotor T7 são induzíveis pelo isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG). A RNA polimerase T7 é tão seletiva e ativa que, quando totalmente induzida, quase todos os recursos da célula são convertidos em expressão do gene alvo; o produto desejado pode compreender mais de 50% da proteína celular total algumas horas após a indução (NOVAGEN, 2003).

Geralmente, células de *E. coli* são transformadas com vetores de expressão e crescida em meio de cultura esterilizado (BMGY e meio Luria-Bertani). O cultivo das células é realizado em condições com temperatura definida, monitoramento da densidade óptica no momento da indução e da concentração de indutor e tempo de expressão. O isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) é o indutor mais frequentemente utilizado. Após indução, o meio de cultura é clarificado por centrifugação e as células precipitadas são lisadas para liberação das lectinas recombinantes ao tampão de lise, gerando um extrato bruto. Este é utilizado para a purificação das lectinas (UPADHYAY *et al.* 2010; TATENO *et al.* 2004).

A purificação das lectinas recombinantes pode ser feita através das próprias propriedades de ligação a carboidratos que essas proteínas possuem ou, se necessário, pelo uso de caudas de fusão cuja informação gênica está presente no vetor recombinante escolhido para expressão da proteína recombinante. As proteínas de fusão podem facilitar a purificação de proteínas recombinantes bem como facilitar o *folding* correto dessas proteínas no momento da sua síntese e, conseqüentemente, otimizar a sua solubilidade. Elas são obtidas através dos vetores de expressão e possuem um sítio de clivagem próximo a proteína de interesse para posterior remoção (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013)

Após a sua expressão e purificação, as lectinas recombinantes são submetidas a ensaios para avaliar suas funcionalidades e fazer as devidas comparações com as lectinas tipo selvagem. Todas essas ferramentas têm se mostrado eficientes para a produção de lectinas recombinantes, viabilizando os estudos aprofundados das suas propriedades bioquímicas, estruturais e biológicas. Dentre as várias lectinas de plantas produzidas por hospedeiros recombinantes, destacam-se as lectinas r- α Dguia e r- α DGL (lectinas recombinantes de *Dioclea guianensis* e *Dioclea grandiflora*, respectivamente). Essas lectinas tiveram suas cadeias principais (cadeia α) subclonadas e expressas em células de *E. coli* (BL21 (DE3)) e suas estruturas tridimensionais avaliadas e comparadas com as respectivas lectinas tipo selvagem (NAGANO et al., 2008).

2.6 Lectina de *Canavalia bonariensis*

Analisado o cenário em torno do estudo das lectinas, passamos então ao objeto principal deste trabalho científico, a lectina de *Canavalia bonariensis*.

A *Canavalia bonariensis* Lindl. é uma espécie vegetal nativa da região sul do Brasil, presente principalmente no Rio Grande do Sul. É pertencente a família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Papilionoideae e tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (DOU 02/08/1999) a *Canavalia bonariensis* é uma espécie nativa da região Sul do país e está em fase de extinção desde 1999.

Cavada e colaboradores (1996) purificaram uma lectina glicose/manose específica a partir de sementes de *Canavalia bonariensis*. Essa lectina apresentou o efeito de indução da migração de neutrófilos em ratos e camundongos, indicando uma possível atividade pro-inflamatória da proteína. Em trabalhos posteriores foi observado que a lectina tipo selvagem da CaBo revelava uma mistura de cadeias (intactas e fragmentos) que se combinam entre si para formarem isolectinas (CALVETE et al., 1999). Fato similar já havia sido verificado para a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (GRANGEIRO et al., 1997).

Em seus primeiros estudos de caracterização estrutural, a CaBo teve sua sequência de aminoácidos elucidada. Para tanto, foi utilizada uma associação das técnicas de Espectrometria de Massas e Biologia Molecular, que possibilitou a sobreposição da sequência parcial da lectina obtida através do sequenciamento *de novo* com a tradução do gene da lectina isolado e amplificado a partir do DNA genômico da *Canavalia bonariensis*. A sequência primária total da lectina está depositada no Uniprot *datbank* e pode ser acessada através do código P58906 (SILVA et al., 2016a).

A CaBo possui sequência proteica bastante conservada em relação às demais lectinas do mesmo gênero, apresentando similaridade de aproximadamente 91% com essas proteínas. Ao longo da sua sequência surgiram algumas modificações de resíduos de aminoácidos que são característicos das lectinas do gênero. Essas modificações analisadas do ponto de vista filogenético sugerem que a lectina de *Canavalia bonariensis* seja a mais primitiva dentre as demais lectinas do gênero *Canavalia* e tenha se originado de um ancestral comum que divergiu formando as lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Dioclea*, *Cratylia* e *Camptosema* (SILVA et al., 2016a).

Os últimos estudos contribuíram para uma melhor caracterização estrutural e funcional da proteína. A CaBo teve sua estrutura tridimensional modelada através de ferramentas *in silico* e seu efeito edematogênico avaliado dentro do modelo de edema de pata de rato. O teste demonstrou que a lectina induziu a formação de edema no modelo testado indicando um efeito inflamatório relacionado a resposta pela lectina, atestando resultados já descritos anteriormente. (SILVA, 2015; SILVA et al., 2016a)

Diante dos dados apresentados é premente a necessidade de percorrer os resultados e potencialidades descritas para a lectina de *Canavalia bonariensis*. Neste contexto, o presente trabalho tem por escopo a investigação dos aspectos estruturais da lectina tais como elucidação da sua estrutura tridimensional dentro de uma condição experimental, bem como a avaliação de seus efeitos biológicos no modelo de citotoxicidade em células de glioma. Ademais será também explorado a produção da proteína recombinante da cadeia α da CaBo com o foco na preservação da molécula biologicamente ativa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo principal realizar uma análise sistemática dos aspectos estruturais da lectina de *Canavalia bonariensis*, avaliar seu potencial citotóxico contra células de glioma de linhagem C6, bem como obter de forma recombinante a cadeia α da CaBo.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter cristais difratáveis da CaBo pelo método de difusão de vapor;
- Resolver e analisar as estruturas da referida molécula;
- Analisar as interações da CaBo frente aos seus ligantes específicos por *docking* e dinâmica molecular;
- Investigar a toxicidade e efeitos morfológicos da CaBo em células de glioma da linhagem C6;
- Obter comercialmente o gene sintético da lectina recombinante de *Canavalia bonariensis* (rCaBo);
- Tornar cepas de clonagem e expressão competentes para a realização de transformações celulares;
- Obter clones positivos de *E. coli* (clonagem e expressão) transformados com o gene que codifica a cadeia α da CaBo;
- Verificar a melhor condição de expressão da proteína de fusão;
- Produzir e purificar a rCaBo;
- Caracterizar a lectina recombinante rCaBo quanto a sua afinidade a carboidratos e/ou glicoproteínas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização estrutural da lectina selvagem de *Canavalia bonariensis* e avaliação do seu potencial citotóxico frente a células de glioma de linhagem c6.

4.1.1 Determinação da estrutura tridimensional da CaBo por cristalografia de Raios X

4.1.1.1 Purificação da lectina tipo selvagem

A lectina Cabo tipo selvagem foi purificada a partir de sementes de *Canavalia bonariensis* através de cromatografia de afinidade em matriz de SephadexTM G-50 (GE Healthcare®), conforme protocolo descrito por Silva e colaboradores (2016).

Para tanto, um extrato total foi preparado a partir de uma suspensão da farinha fina de *C. bonariensis* em NaCl 150 mM na proporção de 1/10 (P/V), mantido sob agitação por 4h, seguido de clarificação. Após centrifugação, o sobrenadante obtido posteriormente ao descarte de todos os precipitados foi definido como extrato total e deste, 6 mL foram aplicados na matriz cromatográfica (1,0 x 8,0 cm), previamente equilibrada com solução salina (NaCl 150 mM) e mantido em contato por 16 h (*overnight*). Em seguida, a fração não retida foi eluída com NaCl 150 mM contendo MnCl₂ 5 mM e CaCl₂ 5 mM enquanto que a fração retida foi eluída com solução de Glicina 100 mM pH 2,6 adicionado de NaCl 150 mM. Frações de 1,5 mL foram coletadas manualmente a um fluxo de 1 mL/min. O processo de purificação foi monitorado por espectrofotometria, utilizando-se o espectrofotômetro Ultrospec 2 *pro* (Amersham Biosciences®) operando em um comprimento de onda de 280 nm. A fração retida contendo a proteína pura foi exaustivamente dialisada contra água destilada e, então, liofilizada.

4.1.1.2 Ensaio de cristalização

Para a condução do ensaio de cristalização a CaBo liofilizada foi ressuspensa em Tris-HCl 25 mM, pH 7,6 na concentração final de 12,5 mg/mL, contendo α -metil-d-manosídeo 5mM, sendo em seguida, incubada a 37 °C por 1 hora de modo a garantir a formação do complexo lectina-açúcar. O kit utilizado para o *screening* de cristalização foi o *Crystal Screen JSCG++* (Jena Bioscience®) (JANCARIK; KIM, 1991). O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços pelo método de difusão de vapor com gotas suspensas utilizando-se o robô TTP LabTech's Mosquito Crystal. Posteriormente as placas foram mantidas em

repouso a 20° C, e em seguida, realizado o monitoramento quanto à formação de cristais, bem como avaliação quanto à possível necessidade de otimização das condições do experimento. Essa otimização visa potencializar uma melhor formação dos cristais, com características que o tornem mais viáveis para a difração de Raios-X, por exemplo, maior tamanho e formas geométricas mais definidas.

4.1.1.3 Difração de Raios X

Cristais difratáveis da CaBo foram encaminhados para a coleta de dados. Para a execução do ensaio, o cristal foi coletado e submetido a -173 °C utilizando glicerol 30% como crioprotetor, para evitar a formação de gelo. Os dados foram gerados a um comprimento de onda de 1,47 Å utilizando-se uma fonte de radiação síncrotron (linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS, Campinas-SP) e um detector PILATUS2M (Dectris, Suíça). Foram geradas um total de 360 imagens coletadas a partir de ângulos de oscilação de 1°.

4.1.1.4 Resolução da estrutura

Os dados gerados a partir da difração dos cristais foram indexados e escalonados utilizando-se o software iMOSFLM, ferramenta presente na suíte CCP4. As coordenadas atômicas utilizadas como modelo de referência foram da lectina de *Canavalia gladiata* (PDB code: 1WUV), a qual apresenta identidade de 92 % com relação a estrutura primária da CaBo. O problema de fases foi solucionado através do método de substituição molecular usando o software MOLREP e todos os ciclos de refinamento de corpo rígido e refinamento posicionais foram conduzidos através da suíte PHENIX 1.11.1-2575 (ADAMS et al., 2010).

Posteriormente, ajustes manuais foram realizados através da visualização dos mapas de densidade no programa Coot (EMSLEY et al., 2010). Todos os passos manuais seguiram de ciclos de refinamentos posicionais e os valores de Rfree e Rfactor foram monitorados, sendo estes importantes para calcular a concordância do refinamento (BRÜNGER, 1992).

A validação do modelo final foi realizada utilizando-se a *PDB Validation Tool* (PDB) (READ et al., 2011) tendo sido a estrutura final da CaBo visualizada através do software WinCoot (EMSLEY et al., 2010), e as ilustrações relacionadas ao modelo molecular da CaBo preparadas através dos softwares PyMOL Molecular Graphics System (Delano Scientific, Palo Alto, CA) (DELANO, 2002) e LIGPLOT (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

As coordenadas atômicas da CaBo complexadas com α -metil-d-manosídeo estão depositadas no *Protein Data Bank*, sob o código de acesso 5U3E.

4.1.2 - Avaliação da citotoxicidade da CaBo contra células de glioma da linhagem C6.

4.1.2.1 Cultura de células e tratamento com a lectina

As células de rato de linhagem C6 foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (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 ar e 5% de CO₂. Para a condução do experimento, as células foram distribuídas em placas de 96 poços seguindo uma densidade de 5×10^3 ou 5×10^4 células por poço, respectivamente, e incubadas por 24 h a 37 °C em uma incubadora (5% CO₂). Posteriormente, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas por 24 ou 48 h em DMEM livre de soro, contendo o veículo (controle) ou a CaBo. Cumpre observar que a lectina foi diluída com tampão HEPES-salino pH 7,4 (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM e CaCl₂ 1 mM).

Para todos os ensaios, as culturas de células para o controle do experimento foram incubadas com o veículo, tampão HEPES-salino sem glicose.

4.1.2.2 Ensaio de Viabilidade celular

Com escopo de avaliar a viabilidade celular utilizou-se o método colorimétrico com sal de tetrazólio [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (MOSMANN, 1983). As células C6 foram distribuídas em placas de 96 poços (5×10^3 por poço), e incubadas posteriormente por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂ (5%). Após 24 h o meio de cultura foi substituído, e as células foram incubadas com o mesmo meio contendo o veículo (controle) e a CaBo a diferentes concentrações finais (10, 30, 50 e 100 μ g/mL).

Após 24 h do tratamento, o meio foi removido e as células foram incubadas por uma hora a 37 °C com 100 μ L de MTT 0,5 mg/ml diluído em PBS e incubadas por 1h em estufa a 37° C. As desidrogenases mitocondriais nas células viáveis reduziram o MTT até a formação de cristais de formazan, de modo que a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória. Os cristais formados, que são insolúveis em água, foram dissolvidos com 100 μ L de DMSO/poço e posteriormente, as placas foram incubadas por 30 min a 37 °C. A

absorbância foi medida por espectrofotometria a 540 nm em leitor de placas (Infinite M200-Tecan). Os resultados foram expressos como uma porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle (veículo) considerado como 100% viáveis.

4.1.2.3 Microscopia de luz

A fim de avaliar as alterações morfológicas em resposta ao tratamento com a lectina, as células foram visualizadas em um microscópio óptico invertido NIKON eclipse T2000-U. Resumidamente, as células foram distribuídas em placa de 96 poços, mantendo a densidade de 5×10^3 células por poço, por 24 h nas mesmas condições descritas anteriormente. O meio de cultura foi então substituído e as células foram incubadas por 48 h em DMEM sem soro contendo o veículo (controle) ou a CaBo. Em seguida as células foram visualizadas através da captura de imagens representativas em 24 e 48 h.

4.1.2.4 Teste com laranja de acridina

A coloração de células com laranja de acridina (LA) foi realizada para estudar o padrão de morte celular e a indução de organelas vesiculares ácidas pela lectina após 24 e 48 h de incubação. As células C6 foram distribuídas em uma placa de 48 poços a uma concentração de 5×10^4 células por poço em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino durante 24 h. Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM sem soro e com veículo (controle) ou lectina CaBo (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 24 e 48 h, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído a 3,7% e coradas com LA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Sigma Chemicals, EUA) por 20 min no escuro. Todos os procedimentos foram realizados a 37°C. As células foram visualizadas por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U usando conjuntos de filtros, com 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 (OVA).

4.1.2.5 Ensaio de iodeto de propídio

Para o ensaio de iodeto de propídio, as células C6 foram distribuídas em placa de 48 poços nas mesmas condições descritas na sessão anterior para o ensaio laranja de acridina (5×10^4 células por poço) e tratados com o veículo ou a CaBo nas mesmas concentrações e tempo conforme mencionado previamente. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e

sequencialmente incubadas com tampão de ligação (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM e CaCl₂ 25 mM) contendo Hoechst (1 µg/mL, Sigma Chemicals, EUA) e iodeto de propídio (14 µg/mL, Sigma Chemicals, EUA) por 15 min no escuro (Singh et al., 2016). As células foram visualizadas sob um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U utilizando conjuntos de filtros, com excitação a 488 nm e 560 nm para iodeto de propídio e excitação a 353 nm e 483 nm para Hoechst.

4.1.2.6 Ensaio de migração celular

Células de glioma C6 foram distribuídas em placa de 48 poços à concentração de $1,5 \times 10^4$ células por poço e incubadas por 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi descartado, e uma pequena ranhura foi introduzida em cada cavidade raspando as camadas de células superficiais com uma ponta de pipeta P200, seguida por lavagem com PBS para remover qualquer célula fracamente mantida.

Em seguida, adicionou-se meio DMEM sem de soro contendo o veículo (controle) ou a lectina CaBo nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg/mL.. As imagens foram capturadas nos tempos 0, 24 e 48 h após os tratamentos por um microscópio invertido NIKON eclipse T2000-U.

4.1.2.7 Análise estatística

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

4.1.3. Avaliação da Especificidade fina a carboidratos da CaBo por bioinformática

4.1.3.1 Docking Molecular

O *docking* molecular foi utilizado para prever a interação da CaBo com oligossacarídeos presentes em N-glicanos de várias glicoproteínas, visando a caracterização e a correlação dos respectivos resultados com os dados de atividade citotóxica para glioma. As

representações de sacarídeos foram obtidas a partir de trabalhos científicos (PARKER et al., 2013), e as estruturas resultantes foram previamente desenhadas através da ferramenta GLYCAM-Web Carbohydrate Builder.

O AMBER 12 foi utilizado para minimizar a energia de todas as estruturas utilizadas neste trabalho (CASE et al., 2006) com o campo de força GLYCAM_06j-1. As preparações dos ligantes, tais como a falta ou adição de átomos de hidrogênio e correções de ligações foram realizadas pelo Hermes v. 1.8.2. As simulações foram realizadas pelo programa GOLD v. 5.5 (CCDC, Cambridge, Inglaterra), que usa um algoritmo para realizar o acoplamento de ligantes nos sítios de ligação do receptor, gerando um grande número de conformações de ligantes com flexibilidade parcial do receptor (JONES et al., 1997).

O *docking* foi realizado na forma adiante descrita. A CaBo fora preparada para simulações através da adição de átomos de hidrogênio e remoção de ligantes e moléculas de solvente. O sítio de ligação foi determinado como sendo o centro do CRD, e todos os átomos em torno de um raio de 10-Å.

Os parâmetros escolhidos foram os seguintes: função do score ChemScore (ELDRIDGE et al. 1997), tamanho populacional 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 e número de poses de 20.

As melhores poses foram escolhidas por combinação de score do *docking*, violações da geometria do ligante, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas esperadas. O modelo da CaBo em complexada com α -metil-d-manosídeo foi usado para comparação. As imagens foram geradas através do PyMol.

4.1.3.2 Dinâmica Molecular

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para analisar o comportamento da CaBo em solução e a sua estabilidade de ligação com α -metil-D-manosídeo (MMA) e o dimanosídeo manose-1,3- α -D-manose (M13). As simulações foram realizadas utilizando a suíte Groningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS) v. 5.1.2 com os parâmetros do campo de forças GROMOS 54a7. Antes das simulações, as coordenadas dos ligantes foram submetidas ao servidor online ATB para parametrização e em seguida, checadas manualmente.

Na etapa seguinte, uma caixa cúbica foi gerada com o módulo *editconf* e a proteína foi solvatada com o modelo de água de carga única (spc) usando o módulo *genbox*. Íons de sódio (Na⁺) foram adicionados para neutralizar o sistema conforme necessário.

Posteriormente, minimizações de energia foram aplicadas usando o método *steepest descent* com critério para convergência de 10 kJ/mol. A minimização foi seguida por equilíbrio em termostatos NVT seguido por NPT com acoplamento de pressão isotrópico Parrinello-Rahman para 1 bar e acoplamento de temperatura Noose-Hoover (PARRINELLO; RAHMAN, 1980) para 300 K. Interações eletrostáticas de longa distância foram calculadas pelo método de Particle Mesh Ewald (PME) (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993) com um limiar de 10 Å. Constrição linear (LINCS) (HESS et al., 1997) foi utilizado para limitar as ligações.

O tempo de simulação utilizado para todos os sistemas foi de 50 ns e as coordenadas foram salvas a cada 2 ps. As trajetórias geradas foram analisadas com auxílio dos programas XMGrace, PyMol e VMD (HUMPHREY et al., 1996).

4.2 Produção e purificação da lectina recombinante de *Canavalia bonariensis*

4.2.1 - Clonagem e expressão da cadeia α de *Canavalia bonariensis*

*4.2.1.1 Obtenção do gene sintético da cadeia α da lectina de *Canavalia bonariensis**

Para a produção da forma heteróloga da lectina recombinante de *Canavalia bonariensis* (rCaBo) obteve-se um gene sintético a partir da sequência de aminoácidos da proteína tipo selvagem disponível no UniProt sob o código de acesso P58906. A sequência gênica da proteína foi otimizada para expressão em *E. coli* e obtida comercialmente no vetor de expressão pET43.1a (EMD Millipore®). O gene foi posicionado no sítio múltiplo de clonagem na posição do vetor flanqueada pelas enzimas de restrição BamHI e XhoI, de modo que o gene CaBo-pET43.1a seja obtido com adição de cauda de fusão NusA (*N-utilization substance protein A*), com o intuito de otimizar a solubilidade da proteína recombinante e assim, evitar a formação de corpos de inclusão. A lectina recombinante foi também produzida com uma cauda de poli-histidina (His₆) e os sítios de clivagem de enteroquinase e trombina (respectivamente) para posterior remoção da cauda de fusão.

O plasmídeo pET43.1a foi escolhido por possuir elementos que permitem uma elevada produção de proteína recombinante na forma solúvel e de fácil purificação tendo um forte controle em função da presença do promotor T7 do lisógeno DE3. Esse plasmídeo possui o gene *Amp* que garante resistência ao antibiótico ampicilina, permitindo a seleção dos clones positivos.

4.2.1.2 Preparo de Células Competentes

As células competentes de *E.coli*, pertencentes as cepas utilizadas nas transformações que serão descritas a seguir foram obtidas de acordo com o método modificado por Hanahan, descrito por Sambrook (2001). Para isso 100 µL das células foram incorporadas em meio LB-ágar (caseína, extrato de levedura, cloreto de sódio e ágar) e mantidas a 37° C por 16 h para o crescimento das colônias.

Posteriormente, uma colônia foi inoculada em 100 mL de meio LB e incubada a 37° C por 3 horas sob agitação constante. O crescimento foi monitorado a 600 nm até atingir a densidade ótica de 0,4. Quando atingido a densidade ótica necessária, as células foram transferidas para tubos de 50 mL estéreis, mantidas no gelo por 10 minutos, e em seguida recuperadas por centrifugação a 2,700 x g, por 10 minutos a 4° C. O meio foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 30 mL de solução gelada contendo CaCl₂ 20 mM e MgCl₂ 80 mM. As células foram novamente sedimentadas por centrifugação a 2,700 x g, por 10 minutos a 4° C. O *pellet* foi ressuscitado em 4 mL de CaCl₂ 100 mM gelado e as células estocadas a -80° C em alíquotas de 100 µL (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.2.1.3 Transformação Bacteriana

O processo de transformação bacteriana foi realizado em duas etapas. Inicialmente a transformação gênica foi realizada em células competentes de *E.coli* pertencentes a cepa One Shot TOP 10 (Thermo Scientific®) com os plasmídeos contendo o gene sintético da CaBo. Esse procedimento visa propagar e armazenar de forma estável e acessível o vetor recombinante utilizado no desenvolvimento desta pesquisa. A cepa One Shot TOP 10 possui característica apropriada para clonagem de alta eficiência e replicação estável e em alto número de cópias de vetores recombinantes, apresentando inativados importantes genes para endonucleases (dependentes de metilação) e para recombinação homóloga (o que evita a deleção do inserto).

A célula hospedeira selecionada para a expressão da rCaBo foi a *E. coli* BL21 (DE3) (Merck®). Essa cepa bacteriana é extremamente adequada para altos níveis de expressão de proteínas intactas, possuindo os genes para as principais proteases (*Lon* e *OmpT*) inativados. As bactérias DE3 foram modificadas para conter o lisógeno DE3, que contém o gene da T7 RNA polimerase sob controle do promotor LacUV5, o qual requer IPTG para induzir a expressão.

O processo de transformação celular com as cepas de clonagem e expressão foi conduzido por meio de choque térmico. O procedimento consistiu em adicionar o 100 ng do DNA plasmidial (DNAP) em 100 μ L da suspensão de células bacterianas quimicamente competentes seguindo de incubação no gelo por 30 minutos, incubação no banho-maria a 42° C por 30 segundos e novamente no banho de gelo por 2 minutos. Em seguida, 900 μ L de meio LB (*Luria-Bertani*) foi adicionado a suspensão de células transformadas sendo novamente incubado a 37° C por 1 hora e 30 minutos sob agitação constante.

A seleção dos clones transformados foi feita através de pressão seletiva com o uso de antibióticos. A suspensão das células transformadas (100 μ L) foi incorporada em meio LB ágar, contendo ampicilina (concentração final de 100 μ g/mL) para viabilizar o crescimento apenas das células transformadas, sendo em seguida incubadas a 37° C por 16 h (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os clones positivos foram transferidos para 5 mL do meio LB líquido contendo ampicilina e incubados novamente a 37° C, por 16 h. A partir deste cultivo foram feitas as culturas estoque contendo glicerol 10 % permitindo o armazenamento a -80° C para que sejam feitos ensaios posteriores.

4.2.1.4 Purificação dos plasmídeos recombinantes e confirmação da transformação

Os clones positivos de *E. coli* BL21 RIL (DE3) transformados com o gene sintético foram submetidos a extração de DNAP para confirmação da transformação. A partir das culturas estoques dos clones, foram preparados 5 mL de cultivo celular em meio LB líquido contendo ampicilina seguido de incubação a 37° C, por 16 h. A cultura de bactérias foi então concentrada para a extração do DNAP e os demais passos da purificação foram conduzidos a partir do kit Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo Research®) de acordo com a protocolo descrito pelo fabricante. O perfil e a integridade do DNA plasmidial foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1 % contendo GelRed® (Biotium®). O DNAP foi visualizado na presença de um marcador de peso molecular através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador (Amersham Bioscience®).

4.2.1.4.1 Amplificação do gene codificador da lectina

A partir da extração do DNA plasmidial foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR) para selecionar a região do gene codificante para a rCaBo. A reação foi

realizada em microtubo de 0,2 mL estéril usando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific®).

Como iniciadores foram utilizados *primers* (*forward* e *reverse*) desenhados especificamente para a rCaBo com os sítios de restrição BamHI e XhoI juntamente com o tampão da Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, mais o DNAP e dNTP Mix.

A reação de amplificação ocorreu no termociclador *Eppendorf MaxyGene gradiente* (Axygen®), programado para um passo inicial de desnaturação (5 min a 94°C), seguido por 45 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a uma temperatura de 72°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). No último ciclo, foi realizada uma última fase de extensão prolongada (72°C por 7 min). Após a reação de PCR o termociclador foi programado a incubar as amostras a 4°C.

Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo GelRed® (Biotium®) na presença de um marcador molecular e foram visualizados através de exposição do gel à iluminação ultravioleta utilizando um transluminador (Amersham Bioscience®).

4.2.1.5 Ensaios de Expressão da Proteína Recombinante

Para identificar a melhor condição de expressão da rCaBo realizou-se ensaios com a cepa de expressão transformada variando os seguintes parâmetros de indução de expressão proteica: temperatura (20° C e 37° C), tempo (2 e 16 horas) e concentração do agente indutor (IPTG) (0,5 mM, 1,0 mM e 1,5 mM).

Cada inóculo foi preparado em meio LB acrescido de 5 µL da cultura estoque e ampicilina na concentração final de 100 µg/mL, sendo mantido a 37° C sob agitação constante até atingir a densidade óptica de 0,6 (fase *log*; D.O._{600 nm} = 0,6). Nesta fase foi feita a indução da expressão proteica através da adição do IPTG e um inóculo na ausência de IPTG foi considerado como controle (amostra não induzida) para posterior comparação das proteínas expressas. Após a indução da expressão a temperatura do sistema foi ajustada e de acordo com os tempos pré-estabelecidos foram feitas coletas de 1 mL dos meios de cultura para que se prosseguisse a avaliação da expressão da rCaBo através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). A proteína de fusão expressa (NusA-His₆-rCaBo) deve se apresentar com uma massa molecular aparente de 90 kDa, de maneira que a condição de indução que apresentou a maior quantidade da proteína

recombinante na fração solúvel foi utilizada para os demais procedimentos de expressão e purificação da lectina.

4.2.2 Purificação da lectina recombinante de *Canavalia bonariensis*

Após selecionar a melhor condição de expressão da rCaBo o cultivo celular foi escalonado. Para isso preparou-se um inóculo com as bactérias transformadas em 5 mL de meio LB, com 5 µL da cultura estoque e antibiótico, na temperatura de 37° C sob agitação constante, por um período de 16 horas. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL desta cultura foi inoculada em 1 L de meio LB contendo ampicilina. O meio foi incubado à 37° C sob agitação constante até alcançar uma D.O. _{600nm} de aproximadamente 0,6, no qual foi feita adição de IPTG na concentração ideal e na temperatura ajustada. Após o período de indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 7.000 x g por 20 minutos e os *pellets* foram recolhidos e armazenados a -80° C para posterior utilização.

4.2.2.1 Preparo do extrato proteico

Os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em solução tampão de Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 500 mM e Imidazol 20 mM, na proporção de 1 mL de solução para cada 100 mg de *pellet*. Em seguida foi feito o rompimento mecânico das células por meio de ultrassom, utilizando o sonicador Sonopuls HD 2070 (Bandelin ®) operando com 15 ciclos de sonicação por 20 segundos cada, a 50 W, com intervalos de 20 segundos entre os ciclos. Após a lise celular as amostras foram centrifugadas a 9.000 x g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi considerado como a fração solúvel contendo a proteína de interesse.

4.2.2.2 Cromatografia de afinidade

A proteína de fusão foi purificada a partir da fração solúvel do lisado celular através de cromatografia de afinidade em metal imobilizado (IMAC – *Immobilized Metal Ion Chromatography*) em matriz HisPur™ Ni-NTA (Thermo Scientific®), utilizando-se da especificidade a níquel adquirida pela lectina recombinante pela adição da cauda de polihistidina. A matriz cromatográfica foi previamente equilibrada com solução de Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 500 mM e Imidazol 20 mM. Um volume de 8 mL do extrato

bacteriano foi filtrado em membrana com poros de 0,45 μm , aplicado à matriz cromatográfica (1,2 x 10 cm) sob um fluxo constante de 1 mL/minuto e mantido em contato por 1 hora.

As proteínas não ligadas à matriz foram eluídas com a mesma solução de equilíbrio, enquanto que a fração retida foi eluída com solução de Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 500 mM e Imidazol a 100 e a 300 mM, sendo ambas as frações monitoradas por espectrofotometria com leitura de absorbância a 280nm em espectrofotômetro Ultrospec 2 pro (Amersham Biosciences®). O imidazol é uma molécula análoga à histidina e irá promover uma competição entre os íons de níquel presentes na resina cromatográfica e a proteína. A fração retida foi coletada em alíquotas de 1 mL, dialisada exaustivamente contra água destilada e liofilizada.

4.2.2.3 Ensaio de digestão da rCaBo

A NusA-His₆-rCaBo, expressa através do plasmídeo pET43.1a possui dois sítios de clivagem reconhecidos pelas enzimas enteroquinase e trombina, para remoção da cauda de fusão e consequente purificação da rCaBo. Para o ensaio de digestão, selecionou-se a enteroquinase.

Para a digestão da proteína de fusão com a enteroquinase foi preparada uma solução da NusA-His₆-rCaBo a 1,5 mg/mL em solução Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com CaCl₂ 2 mM, NaCl 200 mM e Tween20 1%. A clivagem foi feita com adição de 0,02 unidades da enteroquinase (E4906, Sigma-Aldrich®) para cada mg da proteína de fusão com incubação da reação a 25° C por 16 horas, segundo o manual do fabricante.

Após a reação de digestão, a solução digerida foi dialisada contra solução de NaCl 150 mM com CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM e submetida a cromatografia de afinidade em matriz de Sephadex™-G50 (GE Healthcare®), com o objetivo de separar as proteínas clivadas das não clivadas. A cromatografia foi conduzida seguindo os mesmos parâmetros descritos para a lectina tipo selvagem, sendo a fração retida considerada a lectina recombinante de *Canavalia bonariensis* (rCaBo).

4.2.3 Determinação da atividade hemaglutinante e especificidade a carboidratos da rCaBo

4.2.3.1 Análise da Atividade Hemaglutinante e determinação da atividade específica

O teste para detecção de atividade hemaglutinante (A.H.) da rCaBo foi realizado para avaliar a atividade da lectina recombinante. O experimento foi conduzido em placas de microtitulação usando diluições dispostas em duplas seriadas (MOREIRA; PERRONE, 1977). A solução de rCaBo a 1 mg/mL foi diluídas em Tris-HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM (1:2, 1:4, 1:8, ...) e a cada 100 uL da diluição foram adicionados 100uL de uma suspensão a 3 % (três por cento) de hemácias de coelho em condições nativas e tratadas enzimas proteolíticas (tripsina ou papaína). O ensaio foi incubado a 37° C por 30 min, e após esse período mantido por 30 min em repouso a temperatura ambiente. A presença ou não de A.H foi detectada macroscopicamente e o resultado foi expresso em termos de U.H./mL (Unidade Hemaglutinante por mL de solução da lectina) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível. A atividade hemaglutinante específica foi determinada pela razão entre o título de hemaglutinação (U.H./mL) e o valor definido de proteínas solúveis (mg/mL), sendo expressa em U.H./mg (Unidade de hemaglutinação por miligrama da lectina).

4.2.3.2 Análise da Especificidade por Carboidratos

A análise da especificidade da rCaBo foi determinada através de ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por açúcares simples e por glicoproteínas, o qual foi realizado utilizando um protocolo adaptado a partir daquele descrito por Ramos e colaboradores (1996).

Uma solução diluída da rCaBo a uma concentração capaz de provocar uma aglutinação de 4 U.H. foi incubada com os açúcares a 37° C por 30 minutos, sendo que para aqueles carboidratos que se mostraram capazes de inibir a atividade hemaglutinante foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI), a qual corresponde a maior diluição, ou a menor concentração, do açúcar em que permaneceu a ausência de atividade hemaglutinante. Esse ensaio tem por objetivo avaliar qualitativamente a especificidade da rCaBo pelos carboidratos testados e comparar esses resultados com os anteriormente obtidos para a lectina selvagem.

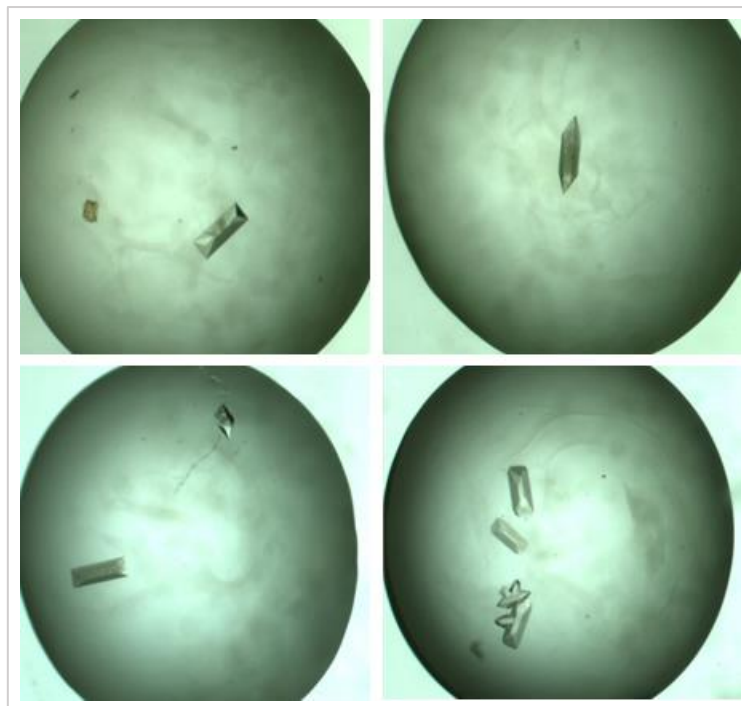
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cristalização e resolução da estrutura tridimensional da CaBo

A lectina tipo selvagem de *Canavalia bonariensis* (CaBo) foi cristalizada a partir de uma solução de 12,5 mg/mL da lectina solúvel em Tris-HCl 25 mM pH 7,6, previamente incubada por uma hora com α -metil-manosídeo (α MM) na concentração final de 5 mM. O açúcar foi utilizado para estabilizar a estrutura da lectina com o intuito auxiliar o processo de cristalização. Após a incubação a solução foi submetida ao ensaio inicial de cristalização utilizando o robô TTP LabTech's Mosquito Crystal.

A formação de cristal foi observada na condição 31 do kit JBScreen JCSG ++ Kit - Jena Bioscience™ (10% de PEG 3000, 200 mM de acetato de zinco e 100 mM de acetato de sódio com pH 4,5). Para o ensaio completo, foi realizado uma otimização desta mesma condição do kit em placas de 24 poços, variando os seguintes parâmetros: pH (4,2 a 5,0), concentração do agente precipitante (PEG 3000 7,5 a 15 %), e concentração do agente estabilizante (acetato de zinco 200 a 400 mM). Os cristais obtidos pelo método de difusão de vapor em gota suspensa, se apresentaram em condições ideais para difração algumas semanas após montagem das placas (FIGURA 3).

Figura 3 - Cristais de CaBo complexado com α -metil-manosídeo (α MM).



Fonte: Elaborada pelo autor

Os cristais foram levados para Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas – São Paulo) para difração, utilizando uma fonte de radiação síncrotron da estação

XM2 e um detector PILATUS2M® (Dectris, Suíça). Os dados foram coletados do cristal com resolução de 1,86 Å e 360 imagens foram geradas com ângulo de oscilação de 1°.

O grupo espacial do cristal foi definido como ortorrômbico I222 com parâmetros célula $a = 64,17$ Å, $b = 70,03$ Å, $c = 111,65$ Å e ângulos $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ e $\gamma = 90^\circ$. O coeficiente de Matthews foi calculado como $2,54$ Å³/Da com base no peso molecular de 25.512 Da indicado 2 moléculas por unidade assimétrica com teor de solvente de 51.66 %. Dados estatísticos referentes ao processamento, escalonamento e refinamento da estrutura são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de coleta de difração, refinamento e parâmetros de qualidade do cristal da lectina de *Canavalia bonariensis* complexada com α -metil-manosídeo (α MM)

Parâmetros	Valores
Grupo espacial	P222
Parâmetros de célula unitária	
a. b. c	64.17 Å, 70.03 Å, 111.65 Å
α . β . γ	90°, 90°, 90°
Reflexões totais	22482 (2196)
Reflexões únicas	11449 (1109) ^d
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limite de resolução (Å)	36.09 – 2.3
R _{merge} ^a (%)	5.17 (11.82) ^d
Completeza	98.58 (98.23) ^d
Multiplicidade	2 (2) ^d
I/ σ (I) média	9.48 (5.20) ^d
Wilson B-factor (Å ²)	22.91
Substituição molecular	
wRfactor	0.610
Score	0.481
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	36.09 – 2.3
R _{factor} ^b (%)	0.2412 (0.2635) ^d
R _{free} ^c (%)	0.2892 (0.3147) ^d
Número de reflexões	11360 (1109) ^d
Reflexões usadas para R-free	602 (62) ^d
Números de resíduos por unidade assimétrica	920
Número de moléculas de água	715
R.M.S.D	
Comprimento da ligação (Å)	0.01
Ângulos de ligação (graus)	1.28
Fator de temperatura	
Média do B fator para toda a cadeia da proteína (Å ²)	24.59
Ligantes	26.75

Solventes	28.76
Rotâmeros e gráfico de Ramachandran	
Rotamer discrepantes (%)	0.43
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	95.24
Resíduos em regiões adicionalmente permitidas (%)	4.33
Resíduos em regiões generosamente permitidas (%)	0.5

Fonte: Elaborada pelo autor.

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

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

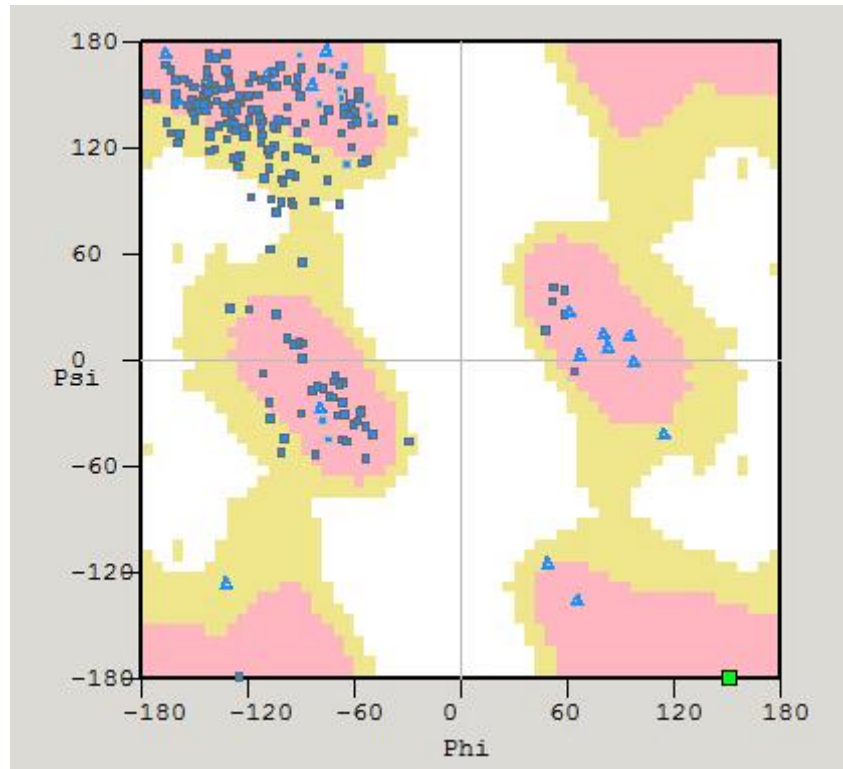
^c R_{free} = R-factor calculado aleatoriamente para 5% de um subconjunto de reflexões excluídas do refinamento;

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

A estrutura tridimensional do CaBo foi obtida experimentalmente e elucidada com base na sequência completa de aminoácidos da proteína depositada em Uniprot sob o número de acesso P58906. Embora estudos anteriores tenham indicado a presença de uma mistura de isolectinas para a lectina selvagem de *C. bonariensis*, é possível deduzir que a estrutura tridimensional determinada neste trabalho representa a isoforma mais predominante da lectina.

Fazendo uma primeira análise estrutural da CaBo, podemos analisar o gráfico de Ramachandran que nos revela informações sobre a estrutura secundária da lectina através de medidas quantitativas que definem hélices, fitas, alças e voltas. No gráfico é possível visualizar as torções dos ângulos ϕ (ϕ) e ψ (ψ) de todos os aminoácidos que constituem a cadeia polipeptídica e que contribuem para a sua conformação estrutural, assim, a análise do gráfico (Figura 4) permitiu observar que a estrutura da CaBo apresentou 100% dos resíduos localizados em regiões permitidas ou favoráveis, o que demonstra uma boa estereoquímica da sua estrutura.

Figura 4 - Gráfico de Ramachandran da estrutura final da CaBo calculado pelo programa *Coot*.

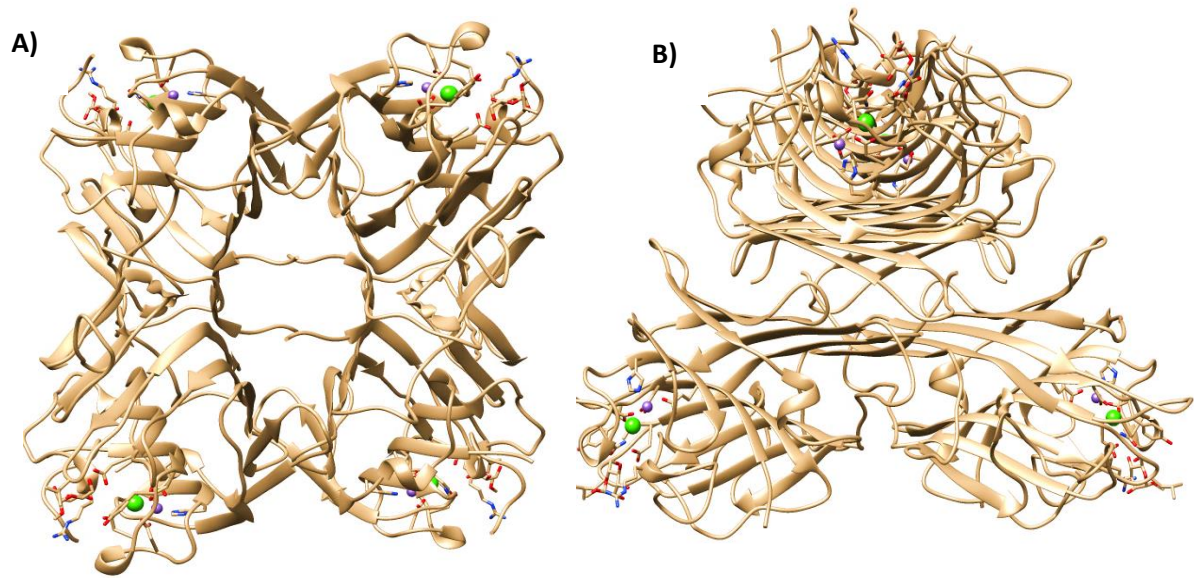


Fonte: Elaborada pelo autor via WinCoot.

O problema de fase foi solucionado através da substituição molecular usando o programa MOLREP. Para tanto foi utilizado as coordenadas moleculares da estrutura lectina *Canavalia gladiata*, devido à alta identidade em relação a lectina de *Canavalia bonariensis*.

A estrutura monomérica da CaBo, constituída por 237 aminoácidos, apresentou um motivo *jellyroll* semelhante ao observado em outras lectinas de leguminosas. Cada monômero da CaBo consiste de uma folha β antiparalela de seis fitas parcialmente estendidas e outra folha β antiparalela curva de sete fitas, ambos conectados por uma terceira folha β de duas cadeias que contém dois sítios de ligação a metal e um domínio de reconhecimento a carboidratos, os quais se apresentaram bem conservados dentre as demais lectinas *ConA-like* (FIGURA 5). A estrutura tridimensional completa da CaBo é representada na figura a seguir como uma associação dos seu monômeros, que estão associados por ligações não covalentes na forma de um dímero canônico estabilizado em uma forma tetramérica.

Figura 5 – Estrutura tetramérica da CaBo complexada com α -metil-manosídeo

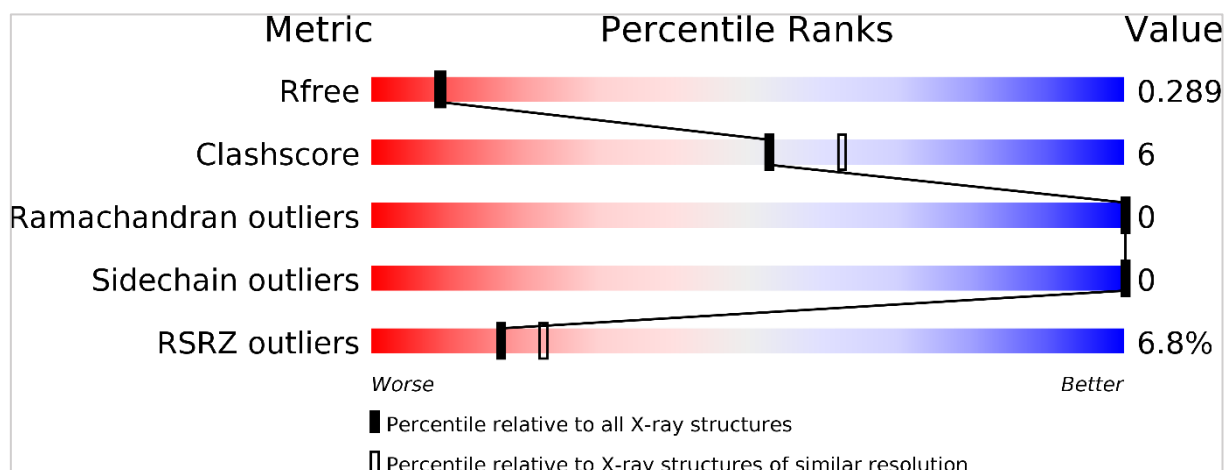


Fonte: Elaborada pelo autor. Vista frontal (A) e lateral (B) da estrutura tridimensional do tetrâmero. Os bastões representam o ligante α MM e as esferas os metais cálcio (verde) e manganês (roxo).

Modelos de lectinas isoladas dos gêneros *Canavalia* e *Dioclea* as vezes não exibem densidade eletrônica na região $_{117}\text{SNSTADA}_{123}$ devido à instabilidade desta, conforme demonstrado anteriormente por Barroso-Neto (2014). Na CaBo, as coordenadas dos resíduos 117–123 não foram modeladas, portanto, esses resíduos foram cortados na estrutura final. Essa região representa o ponto de ligação entre as subunidades β e γ , e a quantidade de resíduos envolvidos nessa interação pode contribuir para essa instabilidade. Todas as outras regiões foram bem definidas e consistentes com as sequências de aminoácidos.

O presente modelo estrutural foi considerado satisfatório tendo passado por validação através da ferramenta *PDB Validation Tool* (FIGURA 6), sendo depositada sob o código de acesso 5U3E.

Figura 6- Dados de validação da estrutura da CaBo obtidos através do wwPDB VALIDATION



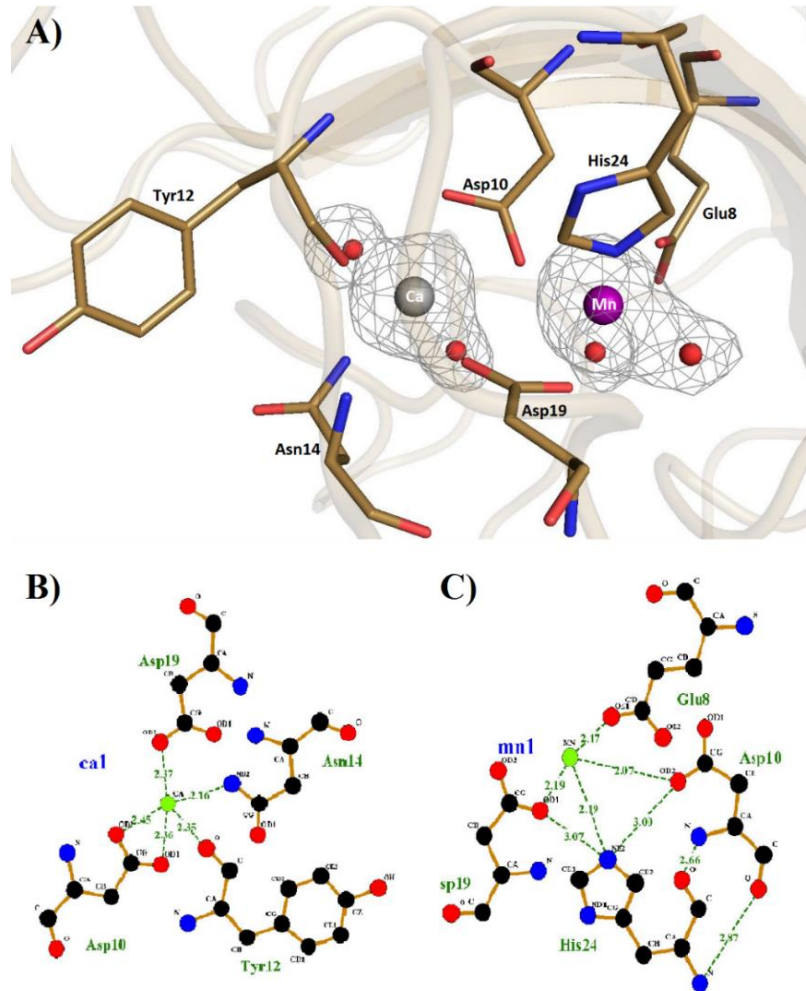
Fonte: PDB (5U3E) Crystal Structure of Native Lectin from *Canavalia bonariensis* Seeds (CaBo) complexed with alpha-methyl-D-mannoside

5.1.1 Sítios de interação a metais e carboidrato

Semelhante a outras lectinas de Diocleinae, a estrutura terciária da CaBo também é estabilizada pela coordenação entre os metais cálcio e manganês e seis resíduos de aminoácidos bem conservados. O manganês é coordenado por Glu8, Asp10, Asp19 e His24, enquanto o cálcio é coordenado por Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19. A coordenação dos metais também conta com a participação de duas moléculas de água para cada metal, como encontrado em várias outras estruturas de lectina. Essas moléculas de água são responsáveis por uma conexão indireta de Ile32/Ser34 ao manganês e Asp208/Arg228 ao cálcio (Figura 7). O sítio de ligação do metal estabiliza uma ligação peptídica do tipo *cis* entre Ala207 e Asp208, a qual é importante para a manutenção da ligação a carboidratos.

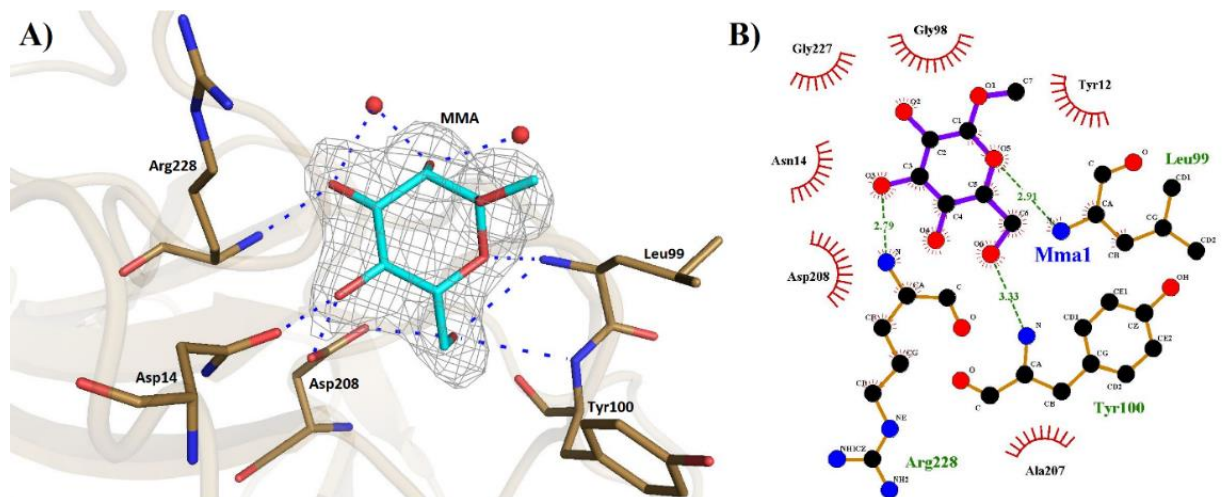
Na estrutura da CaBo, o domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) é ocupado pela molécula de α -metil-D-manosídeo que foi adaptada à lectina usando o mapa de densidade eletrônica de 2Fo-Fc (Figura 8). O CRD foi estabilizado por uma rede de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos de aminoácidos na vizinhança (Asp14, Leu99, Tyr100, Gly98, Ala207, Asp208 e Arg228). Todas as interações entre a CaBo e o α -metil-D-manosídeo estão destacadas na Tabela 2.

Figura 7 – Representação do sítio de ligações a metais da CaBo



Fonte: Elaborada pelo autor A) Mapa de densidade eletrônica das interações dos metais com a CaBo; B e C) Representações LIGPLOT de ligações de hidrogênio e interações de coordenação em torno de Ca²⁺ (B) e Mn²⁺ (C).

Figura 8 – Representação do domínio de reconhecimento a carboidratos da CaBo



Fonte: Elaborada pelo autor. A) Mapa de densidade eletrônica de interação do α -metil-D-manosídeo com a CaBo. B) Representações LIGPLOT de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas ao redor do ligante.

Tabela 2 – Interações de Van der Waals e contatos polares entre CaBo e α -metil-D-manosídeo

Aminoácido	αMM	Distância (Å)
Interações de Van der Waals		CRD
Arg228 CB	O3	3.36
Arg228 CB	O4	3.27
Asp208 OD1	C4	3.28
Asp208 OD2	C4	3.32
Asp208 CG	O4	3.29
Gly98 CA	O6	3.08
Ala207 CB	O6	3.20
Contatos polares		
Arg228 N	O3	2.79
Asn14 OD1	O4	2.83
Asp208 OD1	O4	2.45
Asp208 OD2	O6	2.67
Leu99 N	O5	3.21
Leu99 N	O6	3.21
Gly98 N	O6	3.33
Tyr100 N	O6	3.33

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2 Efeito da CaBo nas células de glioma C6 de rato

O presente trabalho tem como objetivo ocupar-se não apenas do aspecto enciclopédico, se propondo a ir além, investigando as potencialidades biotecnológicas da lectina de *Canavalia bonariensis*, o que revela a face aplicada da pesquisa, instigando assim um feixe de possibilidades em relação à exploração científica da proteína que se constitui no objeto central deste estudo.

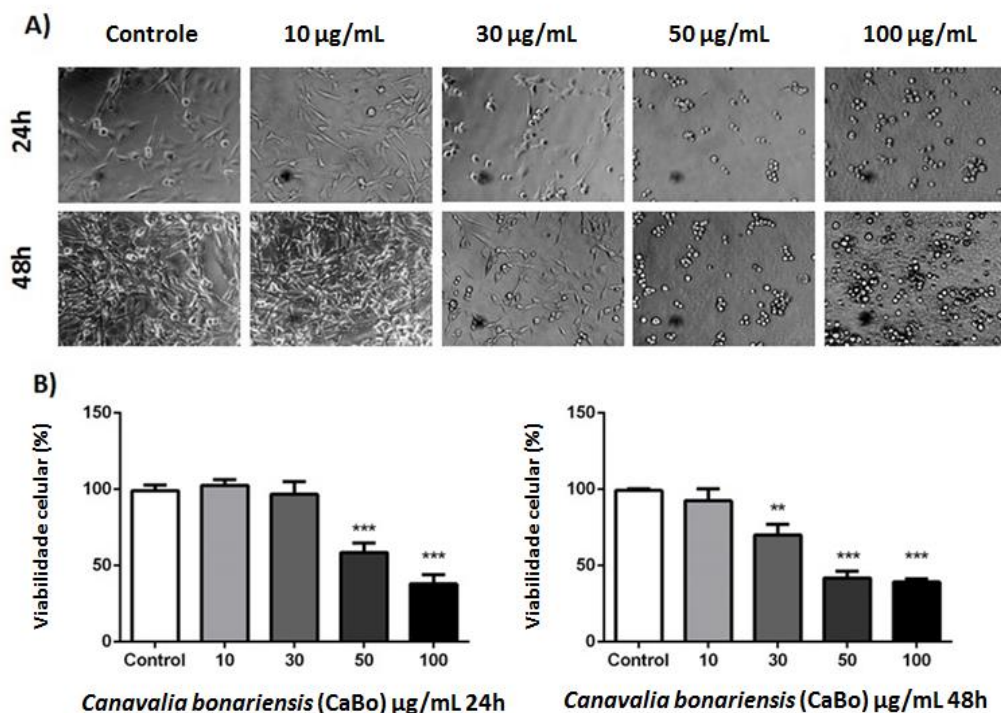
As células tumorais derivadas de glioblastoma têm sido amplamente utilizadas e constituem modelos alternativos confiáveis para a bioprospecção de moléculas com propriedades terapêuticas. Diante disso avaliamos o potencial de marcação da CaBo através de ensaios *in vitro* com uso da linhagem C6, células essas que foram derivadas de glioblastomas induzidos quimicamente pela ação de agentes alquilantes carcinogênicos em (DAI; HOLLAND, 2001).

As justificativas que impulsionaram essa pesquisa estão descritas na sessão de fundamentação teórica e se baseiam essencialmente na agressividade e alta incidência de gliomas dentre as demais neoplasias que acometem o sistema nervoso central.

De início, a capacidade de tratamento com CaBo em alterar a viabilidade das células de glioma C6 de rato foi abordada através da avaliação da morfologia celular e do ensaio de MTT (FIGURA 9B). Os resultados, como demonstrado na figura 9B, indicam que a CaBo nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ diminuem a viabilidade celular em 40% e 50%, respectivamente, após 24 horas de tratamento ($p < 0,001$). Além disso, quando as células foram tratadas por 48 h, observou-se um decréscimo de 30% na viabilidade celular nas concentrações da lectina a 30 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$) e 50% a 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$), em comparação com as células de controle.

Com relação à avaliação por microscopia de luz (FIGURA 9A), observou-se que a CaBo promoveu a alteração na morfologia das células das formas poligonal para esférica, acompanhada de uma diminuição na adesão à placa. Este efeito foi claramente observado nas concentrações da CaBo a 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ após 24 e 48 horas de tratamento.

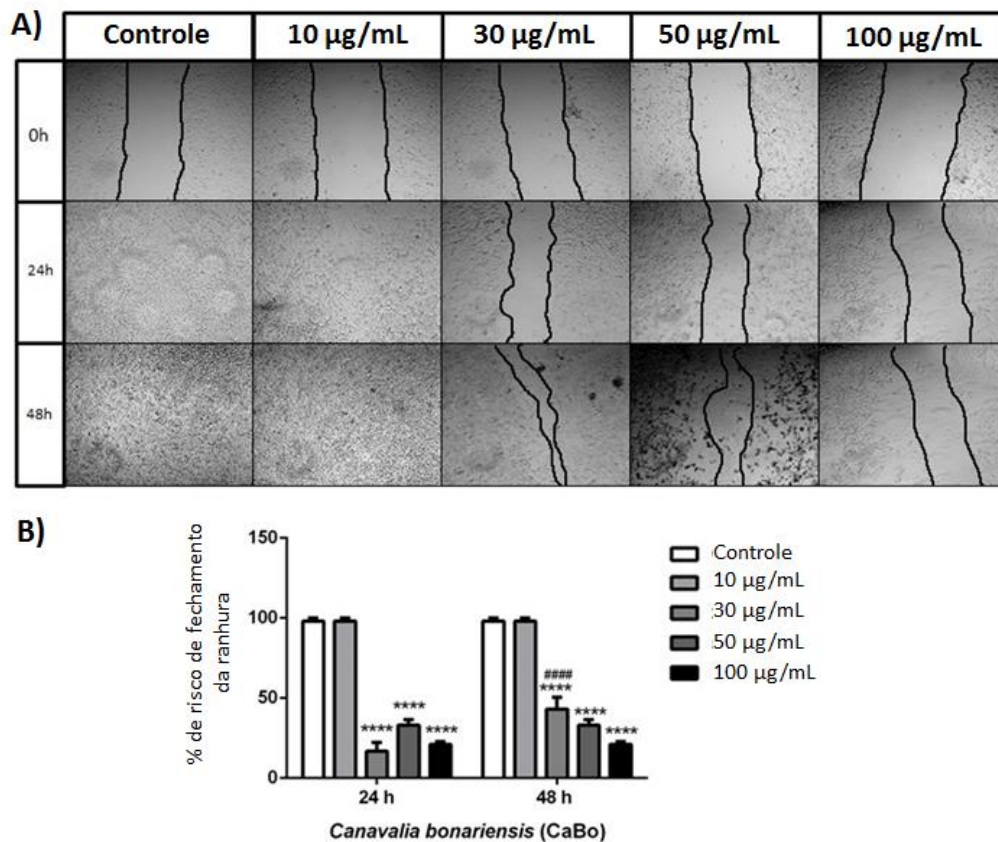
Figura 9 – O tratamento com CaBo diminui a viabilidade celular e promove alteração na morfologia celular.



Fonte: Elaborada pelo autor. (A) Acompanhamento morfológico por microscopia óptica de células C6 tratadas com veículo (controle) ou com a CaBo e (B) Viabilidade celular, pelo teste de redução do MTT, de células C6 expostas ao veículo (controle) ou à CaBo nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

O ensaio de migração celular revelou a capacidade da CaBo (30-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em retardar o crescimento das células em 24 e 48 h (FIGURA 10). Notavelmente, este efeito está de acordo com as alterações morfológicas que ocorreram nos mesmos períodos e faixa de concentração. O ensaio de arranhadura *in vitro* foi descrito como um método simples para análise de migração celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007), incluindo em células de glioblastoma (AROUI et al., 2016). Os resultados aqui obtidos mostram uma recuperação do “arranhão” prejudicada nos tempos de 24 e 48 h, incluindo na concentração que a viabilidade celular não foi alterada (CaBo 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 24 h; Fig. 9B), sugerindo que a CaBo seja capaz de prejudicar a migração celular. No entanto, mais estudos usando abordagens mais específicas para detecção de migração celular se fazem necessários para ampliar a compreensão desse efeito.

Figura 10 - Efeito inibitório da CaBo na migração de células de glioma C6.

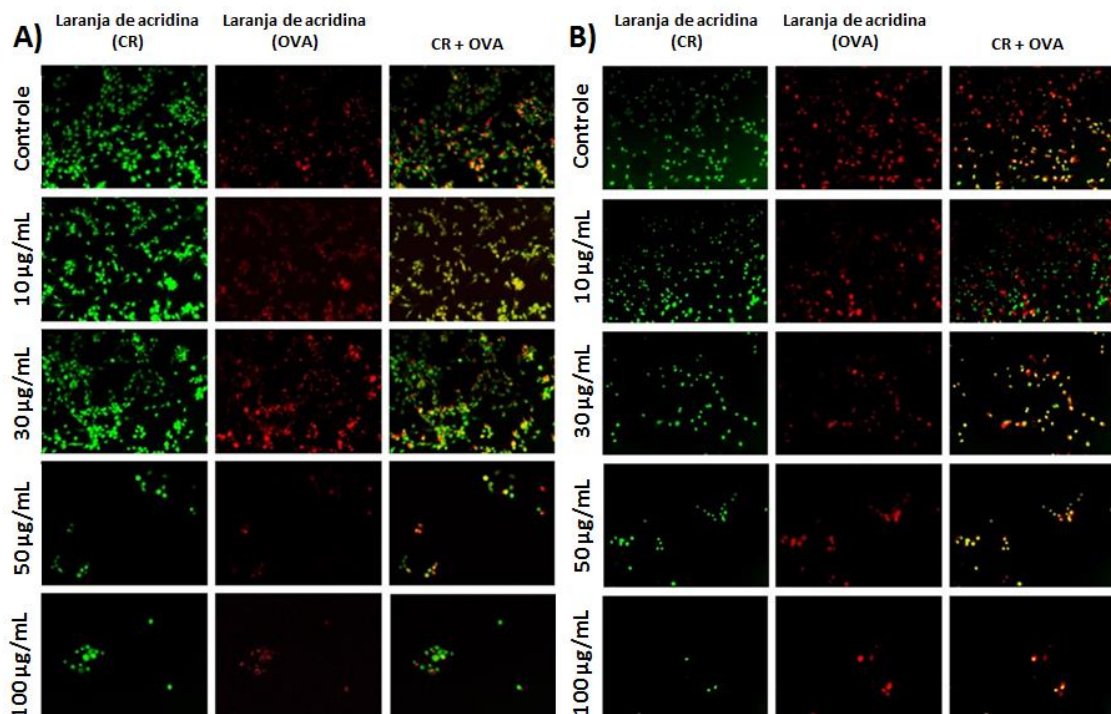


Fonte: Elaborada pelo autor. A) Imagens representativas do ensaio de migração celular. As linhas definem a área sem células. B) Magnitude da inibição da migração celular pela lectina CaBo nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os valores são apresentados como a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata.

Estudos anteriores indicaram a indução de autofagia em culturas de células de glioblastoma humano U87 pela lectina de leguminosa ConA (Pratt e Annabi, 2012; Pratt et al., 2014) e em células de glioma C6 de rato por ConV (Osterne et al., 2017). A fim de abordar a capacidade da CaBo em modular esse processo, realizamos uma coloração com laranja de acridina (LA) para detectar organelas vesiculares ácidas (OVA), uma característica do processo autofágico.

As imagens (FIGURA. 11A e B) mostram a coloração da cromatina (CR) e das organelas vesiculares ácidas (OVA) em verde e vermelho, respectivamente. A sobreposição representa as células que sofreram autofagia (laranja de acridina positiva para OVA). Os resultados indicaram que esse processo foi significativamente induzido pela CaBo no período de 24 h, quando comparado com a amostra controle. Digno de nota, a lectina a 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ causaram um declínio da coloração da cromatina, sugerindo uma diminuição na população de células por morte celular induzida pela CaBo nestas concentrações. Diferentemente, a CaBo a 30 $\mu\text{g/mL}$ (24 h) não alterou a coloração da cromatina, mas induziu um incremento significativo da relação OVA/CR (FIGURA. 11A), sugerindo a ocorrência de autofagia, em uma concentração e tempo cuja viabilidade celular estaria significativamente alterada (FIGURA 9B).

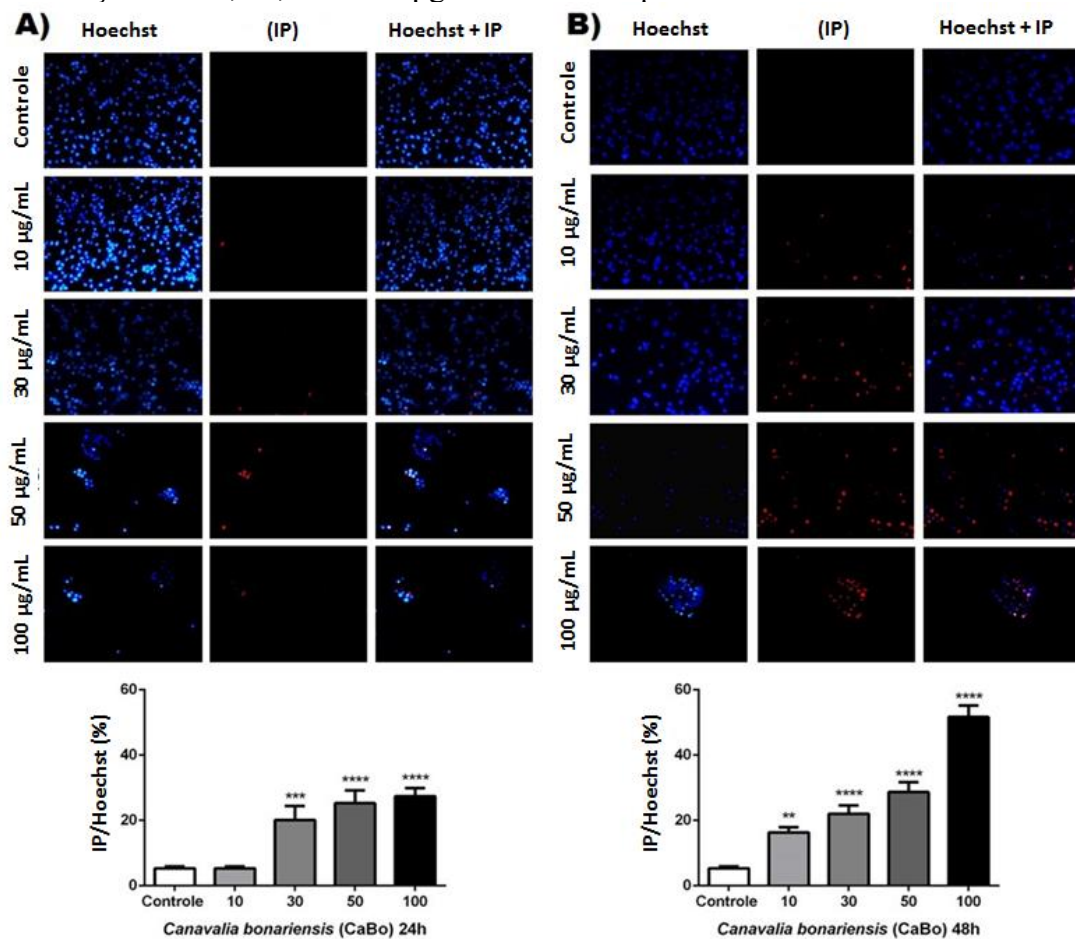
Figura 11 – Indução de autofagia por CaBo em células de glioma C6 com o fluorescente laranja de acridina.



Fonte: Elaborada pelo autor. CaBo induziu um incremento de organelas de vesículas ácidas em células de glioma C6. As imagens mostram coloração de laranja de acridina de células de glioma C6 após incubação com veículo (controle) ou a lectina CaBo (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h (A) e 48 h (B). Cromatina (CR) e organelas vesicas ácidas (OVA) são identificadas pela coloração verde e vermelha, respectivamente.

Além disso, foi realizada uma coloração com iodeto de propídio (IP) para abordar a ocorrência de morte celular por necrose em resposta à exposição à CaBo. Os resultados (FIGURA 12) mostraram que a CaBo causou um incremento na coloração do IP de uma maneira dose-dependente, e este efeito foi mais pronunciado no período de exposição de 48 h (FIGURA. 12B). Tomados em conjunto, é possível verificar que a CaBo de um modo dependente da concentração e do tempo induz uma diminuição da viabilidade celular e provoca a morte celular. Além disso, a CaBo foi eficiente para induzir a autofagia e prejudicar a migração celular em uma concentração e período em que a viabilidade celular não foi significativamente alterada.

Figura 12 – Fluorescência de IP por Hoechst em células C6 expostas ao veículo (controle) ou às concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CaBo após 24 h e 48 h de tratamento.



Fonte: Elaborada pelo autor. Imagens representativas e quantificação da fluorescência de IP após A) 24 h e B) 48 h de tratamento.

As lectinas vegetais emergiram como potenciais moléculas anticancerígenas capazes de induzir a morte celular principalmente por mecanismos apoptóticos e autofágicos (FU et al., 2011; JIANG et al., 2015; LIU et al., 2013). Vale ressaltar que a lectina de leguminosa purificada de sementes de *Canavalia ensiformis* (Concanavalina A, ConA) é uma lectina glicose/manose específica bem estudada, capaz de induzir autofagia e morte de glioblastoma (LI et al., 2011; PRATT; ANNABI, 2014; PRATT; ROY; ANNABI, 2012). Além disso, a lectina purificada a partir de sementes de *Canavalia virosa* (ConV) também foi capaz de induzir autofagia e a morte celular das células de glioma C6 em altas concentrações (OSTERNE et al., 2017). No presente estudo, mostramos que a CaBo apresentou uma atividade maior quanto à indução de morte celular e inibição da migração celular quando comparada a ConV dentro das mesmas condições experimentais. Por outro lado, a indução da autofagia pela CaBo não foi tão proeminente quanto a observada para a ConV (OSTERNE et al., 2017).

Nossos achados concordam com o potencial anti-glioma das lectinas da subtribo Diocleinae e reforçam o nosso interesse em percorrer os diversos estudos sobre a lectina de *Canavalia bonariensis*.

É importante salientar que quanto as lectinas analisadas dentro deste modelo biológico, a CaBo e a ConV apresentam 92% de identidade na sua estrutura primária e essas pequenas substituições na sequência de aminoácidos resulta nessa variação do efeito anti-glioma das lectinas. A caracterização estrutural do CaBo intensifica portanto a importância de analisar de maneira sistemática a relação entre a estrutura da lectina e sua potência para promover o destino celular, como a indução de morte celular, autofagia e inibição da migração celular, eventos fundamentais para o desenvolvimento de estratégias anti-tumorais.

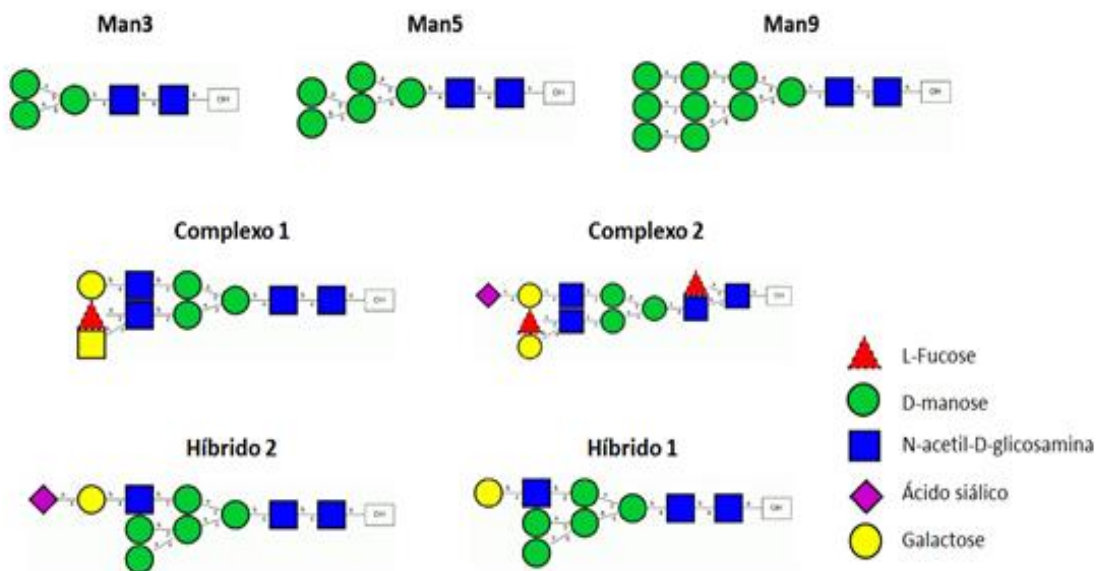
5.3 Análise da especificidade fina da CaBo por carboidratos

A glicosilação é uma modificação pós-traducional muito comum que pode alterar propriedades como solubilidade, proteção contra proteólise, ocultação de sítio antigênico, oligomerização e modulação de atividade (STANLEY; TANIGUCHI; AEBI, 2017). Na maioria das glicoproteínas, os glicanos são ligados à proteína por ligações *N*- ou *O*-glicosídicas.

No caso das *N*-glicosilações, os carboidratos estão ligados covalentemente na amida da asparagina. Quanto à sua estrutura basal, as sequências de *N*-glicanos compartilham um núcleo comum formado por resíduos de N-acetil-D-glicosamina e D-manose (Man α 1–6 (Man α 1–3) Man β 1–4GlcNAc β 1–4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr) (Pinho e Reis, 2015), e podem ser classificados em três tipos: glicanos oligomanose, complexos e híbridos.

As análises *in-silico* contribuem no sentido de somar novas informações sobre como as lectinas interagem com glicanos e demais carboidratos complexos presentes nas superfícies celulares. Na figura 13 estão representados os glicanos que foram selecionados para as análises de *docking* molecular com a CaBo, simulando possíveis interações entre a lectina e receptores celulares.

Figura 13 – Representação dos *N*-glicanos complexos usados nas simulações com a CaBo



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para os glicanos do tipo oligomanose, apenas resíduos de manose estão ligados ao núcleo. Man3 é o núcleo encontrado na maioria dos *N*-glicanos apresentando 3 porções de manose ligadas a uma diacetil-quitobiose. Man5 apresenta duas porções de manose acopladas a um núcleo Man3, e Man9 é um glicano triantenado apresentando nove porções de manose. Ao passo que Man3 é o núcleo da maioria dos *N*-glicanos, Man5 e Man9 são encontrados em várias glicoproteínas, incluindo o receptor de insulina (SPARROW et al., 2008), glicoproteínas do sistema imunológico e HIV gp120 (SIROIS et al., 2007).

CaBo apresentou interações muito favoráveis com Man3, Man5 e Man9 com escores de -57,04, -54,62 e -71,33, respectivamente. Estes resultados apresentam respaldo diante da própria especificidade do CaBo por manose e se confirmam a partir de trabalhos anteriores que demonstraram forte interação da CaBo com manosídeos (SILVA et al., 2016a).

N-glicanos do tipo complexo apresentam ramificações começando com N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) seguido por resíduos de D-galactose na posição β 1-4, caracterizando uma N-acetil-Lactosamina (LacNAc), ligada ao núcleo Man3. Várias glicoproteínas celulares

apresentam cadeias poli-LacNAc em glicanos complexos, permitindo a inserção de porções glicosídicas específicas. (Stanley et al. 2009). Além disso, os ramos GalNAc β 1–4GlcNAc são comuns neste tipo de glicano. Para este trabalho, o Complexo 1 representa um glicano biantenado apresentando ramos LacNAc com um ramo apresentando um grupo fucosil, enquanto o Complexo 2 é similar ao Complexo 1 com ácido siálico em cada terminal galactosil. CaBo apresentou escores de -54,71 e -35,39, respectivamente, indicando uma ligação favorável com o Complexo 1, ao contrário do que é observado no Complexo 2, sugerindo que a ligação do ácido siálico afeta negativamente a ligação do CaBo com oligossacarídeos.

Os *N*-glicanos híbridos apresentam características de glicanos ricos em manose e glicanos complexos, apresentando uma ramificação com resíduos de manose e uma outra ramificação com GlcNAc ligados (SUN et al., 2012). O Híbrido 1 é composto de duas manoses ligadas ao núcleo comum e outra ramificação de LacNAc ligado a ácido siálico. O Híbrido 2 tem uma estrutura similar sem o ácido siálico.

CaBo apresentou escores de ligação de -47,59 e -60,80 para o híbrido1 e híbrido2, respectivamente, corroborando com o que foi observado para glicanos complexos cuja ligação foi afetada pelo ácido siálico. Todos os resultados dos escores de ligação da CaBo com os *N*-glicanos avaliados neste trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Escore das interações entre a CaBo e diferentes *N*-glicanos obtidos por *docking molecular*.

<i>N</i>-glicano	Escore
Man3	-57,04
Man6	-54,62
Man9	-71,33
Complexo1	-54,71
Complexo2	-35,39
Híbrido1	-47,59
Híbrido2	-60,80

Fonte: Elaborada pelo autor.

Análises semelhantes já foram realizadas com outras lectinas da subtribo Diocleinae, é o caso da DLL (lectina de *Dioclea lasiocarpa*) e DLyl (lectina de *Dioclea lasiophylla*) (LEAL et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2017). Em ambos os casos o *Docking molecular* foi realizado com o mesmo grupo de *N*-glicanos e dentro das mesmas condições do

ensaio *in silico*, demonstrando a forte tendência de ligação dessas lectinas com esses grupos de carboidratos específicos. Destacamos a CaBo por ter apresentado uma maior tendência de interação com o Man9 (Escore para DLL: -58,10; Escore para DLyl: -46,35).

A análise via dinâmica molecular complementa o ensaio de *docking* por verificar a estabilidade da ligação da CaBo com seus açúcares específicos. Para tanto foram realizadas simulações prevendo o contato e interação entre as moléculas em uma caixa d'água previamente delimitada. As simulações, monitoradas dentro de um intervalo de tempo de 50 ns, foram feitas comparando-se a lectina sem ligante e ligada com os carboidratos α -metil-D-manosídeo (α MM) e o dimanosídeo manose-1,3- α -D-manose (M13). O comportamento da lectina dentro do sistema analisado pôde ser avaliado através dos parâmetros RMSD, RMSF e ligações de H representados graficamente.

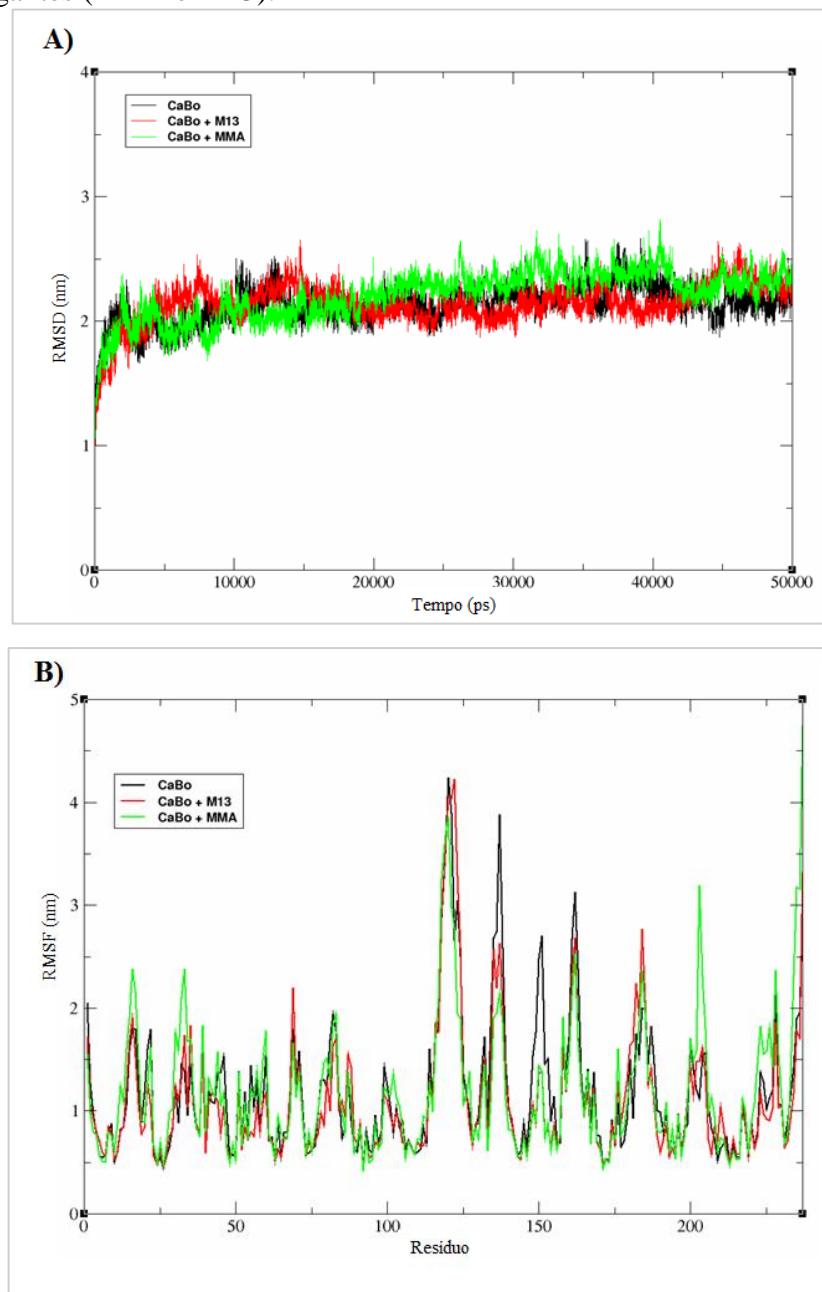
A estabilidade da CaBo durante as simulações de dinâmica molecular foi avaliada através do gráfico de RMSD. Neste gráfico, é possível observar o comportamento do esqueleto proteico da CaBo durante o tempo, em relação à sua estrutura inicial (FIGURA 14A). A lectina, tanto na sua forma isolada, como complexada ao glicano M13 alcançaram o equilíbrio mais rapidamente, em torno de 10000 ps respectivamente, enquanto que a CaBo complexada ao α MM alcançou o mesmo equilíbrio em um tempo maior, de aproximadamente 15000 ps.

A lectina ao interagir com os açúcares sofrem pequenas alterações conformacionais, que podem, por conseguinte, ser observadas através do seu RMSD, de modo que, na análise desse comportamento é possível inferir que a CaBo ao interagir com o α MM sofreu mais alterações conformacionais do que ao interagir com o M13, necessitando assim de mais tempo para atingir o equilíbrio do sistema. A convergência desses resultados para o α MM é observada experimentalmente na própria condição de cristalização na qual a estrutura tridimensional da CaBo foi resolvida, entretanto para o dimanosídeo, o que se revela é uma tendência da lectina interagir também com ligantes manosídicos mais complexos.

O gráfico de RMSF permite verificar as regiões flexíveis da proteína durante a simulação através da avaliação da movimentação das cadeias laterais de cada resíduo na presença dos respectivos ligantes. A análise é feita comparando os resíduos de aminoácidos da proteína ligada com a proteína não ligada. Alterações no valor de RMSF foram evidentes nos resíduos 133-135 e 147-150 na ligação da CaBo como o α MM e M13 e no resíduo 225 para o sistema CaBo-AMM. Esses resíduos não estão, aparentemente, envolvidos diretamente no processo de reconhecimento da lectina aos carboidratos, entretanto essa ligação foi responsável por todas essas alterações devido à modificação estrutural necessária para acomodar o açúcar no CRD. (FIGURA 14B).

A diferença do comportamento das ligações da CaBo com o α MM e o M13 se deve provavelmente a presença do grupo metil ligado a manose. Durante a ligação entre a lectina e o carboidrato metilado é notado um aumento do número de interações hidrofóbicas entre a proteína e o ligante, o que justifica o comportamento observado nos gráficos de RMSD e RMSF.

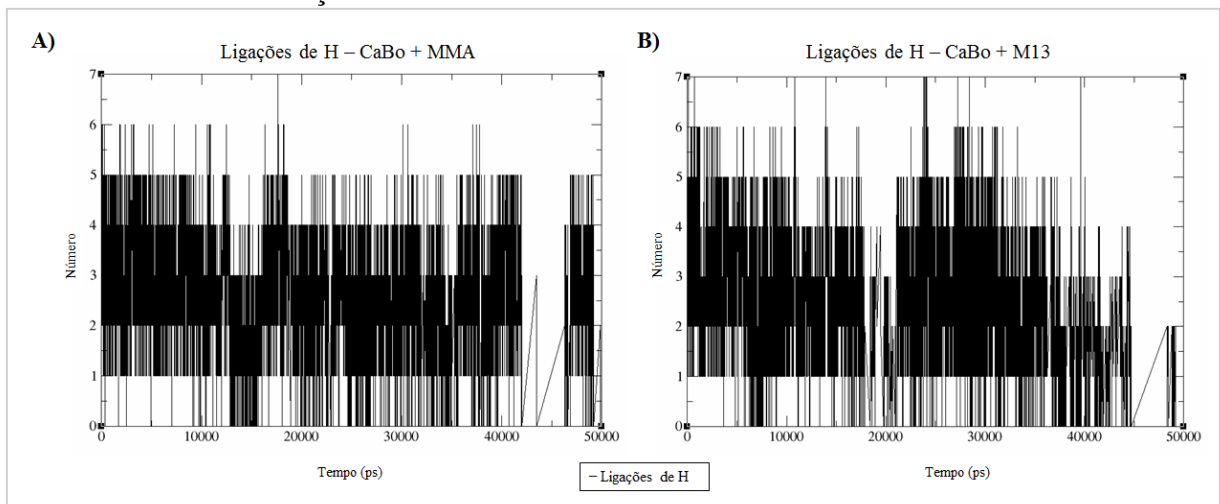
Figura 14 - Resultados das simulações de dinâmica molecular entre CaBo isolada e complexada a diferentes ligantes (α MM e M13).



Fonte: Elaborada pelo autor via XMGrace. A- Gráfico de RMSD resultante das simulações de dinâmica molecular para o esqueleto proteico da CaBo; B- Gráfico de RMSF resultante da dinâmica molecular para todos os resíduos constituintes da CaBo.

A análise da ligação de hidrogênio é um dos fatores mais importantes na manutenção da ligação de carboidratos da lectina. Durante a simulação de dinâmica molecular, o número médio de ligações de hidrogênio flutuou majoritariamente entre 2-5 em ambos os sistemas analisados, tendo se mantido mais constante durante a simulação da CaBo com o α MM (FIGURA 15). Esses resultados corroboram com os dados de *docking* molecular que demonstram a forte tendência de ligação da CaBo com ligantes manosídicos.

Figura 15 - Número de pontes de hidrogênio durante as simulações de dinâmica molecular entre a CaBo e os diferentes açúcares.



Fonte: Elaborada pelo autor. A- CaBo + AMM; B- CaBo+ M13.

No gráfico representativo das ligações de hidrogênio é possível observar pontos em que o número de interações chegou a 0 embora os ligantes tenham permanecido no CRD durante todo o tempo da simulação. Nesses instantes os ligantes possivelmente se mantiveram conectados a estrutura da proteína através de interações hidrofóbicas e de van der Waals além de possíveis pontes de água que não são capturadas pelo gráfico, mas também são responsáveis por manter a interação do ligante no sítio de reconhecimento a carboidrato.

A maioria dos efeitos biológicos provocados pelas lectinas dependem da capacidade de ligação a carboidratos, e os resultados destacados nessa sessão nos dão informações sobre como a lectina interage com *N*-glicanos, preferencialmente os oligomanose. Os resultados da dinâmica molecular também nos dão informações acerca da estabilidade dessas ligações. Esses achados levam a conclusão de que provavelmente o efeito antiglioma da CaBo é conduzido fortemente por interação com receptores glicosilados na superfície das células alvo.

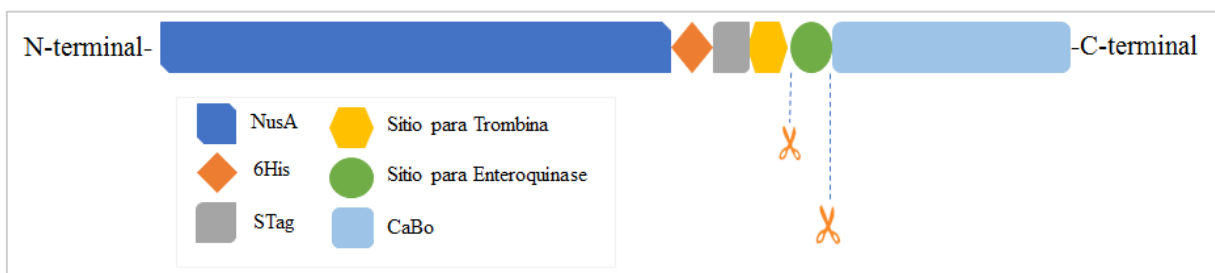
5.4 Produção e purificação da lectina recombinante de *Canavalia bonariensis*

Frente a todas as propriedades já descritas para a lectina de *Canavalia bonariensis* a produção desta proteína recombinante em sistema heterólogo desponta como uma possibilidade para explorar e perpetuar suas potencialidades biotecnológicas. Para tanto, neste trabalho o gene da cadeia α da CaBo foi clonado e expresso em células de *E. coli*.

Inicialmente, o gene referente a lectina de *Canavalia bonariensis* (Código Uniprot: P58906) foi sintetizado e teve seus códons otimizados para a expressão em *E. coli*. Essa otimização visa solucionar o problema de *codons bias* de modo a obter uma taxa de tradução proteica mais rápida e com uma maior acurácia.

O gene sintético foi obtido comercialmente no vetor pET 43.1a (Merck ®) com o sítios de restrição XhoI e BamHI, de maneira que a lectina recombinante de *Canavalia bonariensis* foi expressa com adição de elementos no seu N-terminal visando a produção da proteína de forma solúvel. A proteína NusA (*N-utilization substance protein A*), elemento principal desta cauda de fusão confere estabilidade e alta solubilidade às suas proteínas-alvo. A figura 16 demonstra uma representação esquemática da construção da proteína de fusão NusA-His₆-rCaBo.

Figura 16 – Construção da proteína de fusão NusA-His₆-rCaBo



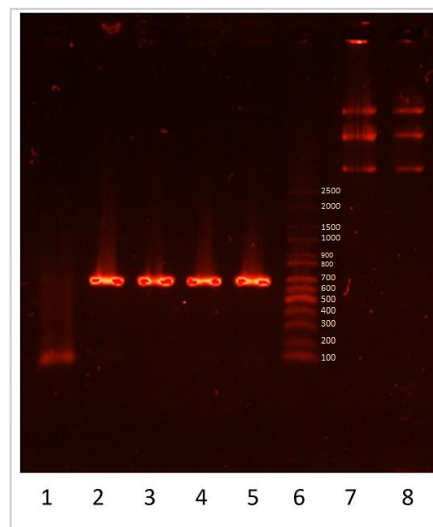
Fonte: Elaborada pelo autor. Representação esquemática da proteína recombinante NusA-His₆-rCaBo. Legenda: NusA - (*N-utilization substance protein A*), 6His – motivo de aminoácidos com seis resíduos de histidina, Stag - oligopeptídeo derivado da ribonuclease pancreática A, sítios de reconhecimento enzimático para trombina e enteroquinase.

5.4.1 Transformação bacteriana e confirmação dos clones positivos

Após a construção do gene de interesse o vetor recombinante foi utilizado nas transformações bacterianas nas cepas de clonagem *E. coli* One Shot TOP10 (Thermo Scientific®) e expressão *E. coli* BL21 (DE3) (Merk®). A metodologia de choque térmico foi

empregada com sucesso para esses procedimentos. A confirmação da transformação se deu através da análise do DNA plasmidial das células transformadas e amplificação do nosso gene de interesse. Na reação de polimerização em cadeia (PCR) utilizou-se iniciadores específicos para a proteína de fusão NusA-His₆-rCaBo. As bandas obtidas apresentaram tamanho esperado para a construção do pET43.1a-CaBo (Figura 17, raias 7 e 8) e para o produto da amplificação de aproximadamente 700 pb (Figura 17, raias 2 a 5).

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1%: Extração do DNA plasmidial e PCR da *C. bonariensis*.

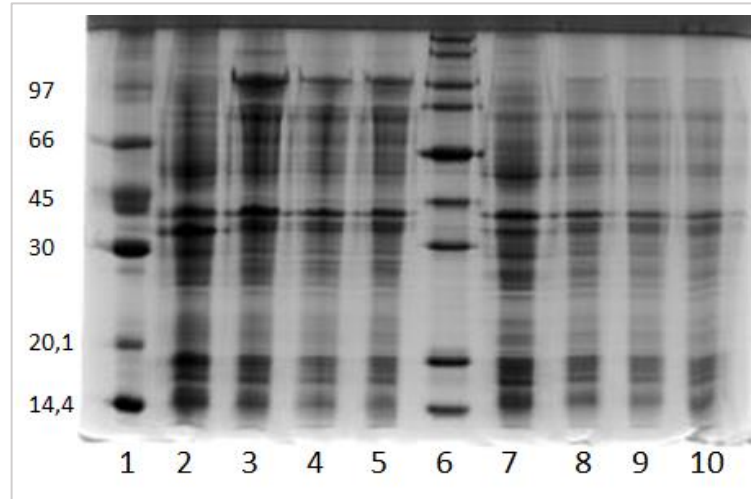


Fonte: Elaborada pelo autor. 1 – Controle negativo da PCR; 2 a 5 – Amplificação do DNAp pET43.1a-CaBo; 6 – Marcador molecular de baixo peso; 7,8 – DNAp pET43.1a-CaBo

Os testes de expressão foram realizados a fim de obter a melhor condição de expressão da NusA-His₆-rCaBo. Foram testadas duas condições de temperatura (20 e 37° C), a indução com IPTG nas concentrações 0,5, 1,0 e 1,5mM e sem IPTG (controle não induzido – N.I.) nos tempos de indução de 2 e 16 horas após adição do IPTG ao meio de cultura. As células bacterianas foram recuperadas por centrifugação e os extratos proteicos foram avaliados por SDS-PAGE quando a presença da proteína de interesse.

A proteína esperada (NusA-His₆-rCaBo) apresenta um perfil eletroforético de aproximadamente 100 kDa e conforme pôde ser observado na SDS-PAGE (FIGURA 18) foi expressa em todas as condições em que foram adicionadas o IPTG, porém sua expressão foi notavelmente acentuada a 20° C, com 0,5 mM de IPTG após 16 h de indução. Essa condição se mostra favorável também por utilizar uma quantidade reduzida do agente indutor e ser em temperaturas mais baixas, o que evita a formação de corpos de inclusão, dessa forma foi mantida para a produção da proteína recombinante em larga escala.

Figura 18 – SDS-PAGE 10 %: Perfil de expressão da NusA-His₆-rCaBo em *E. coli* BL21 (DE3) em diferentes condições



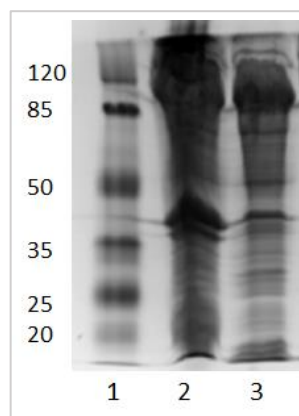
Fonte: Elaborada pelo autor. 1 - Marcador molecular 1; 2 – 20°C N.I.; 3 20°C 0,5 mM IPTG; 4 20°C 1 mM IPTG; 5- 20°C 1,5 mM IPTG; 6 – Marcador molecular 2; 7 – 37 °C N.I.; 8 –37 °C 0,5 mM IPTG; 9 – 37 °C 1 mM IPTG; 10 – 37 °C 1,5 mM IPTG.

5.4.2 Purificação da rCaBo

Após seleção da melhor condição de expressão da NusA-His₆-rCaBo prosseguiu-se para o cultivo celular em escala ampliada seguido da purificação da proteína.

Conforme pode ser observado, após a extração, a proteína de fusão esteve devidamente expressa na fração solúvel (FIGURA 19), de modo que a NusA e as condições de expressão foram eficientes para solucionar um problema comumente recorrente a produção de proteínas recombinantes, que é a formação dos corpos de inclusão como resultado do dobramento impróprio de proteínas.

Figura 19 – SDS-PAGE 12 %: Extração de proteínas totais

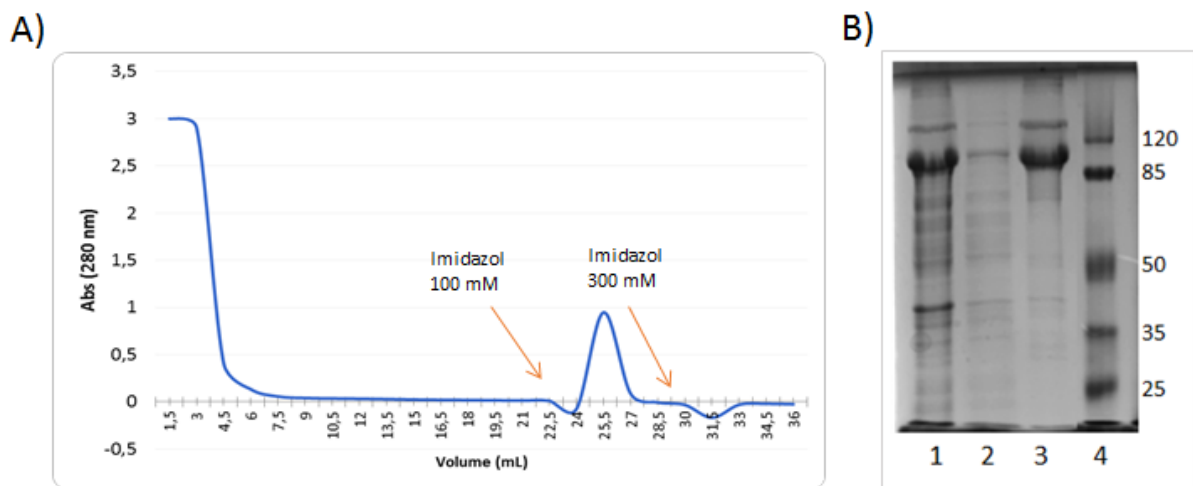


Fonte: Elaborada pelo autor. 1 – Marcador molecular; 2 – Precipitado proteico após a extração de proteínas; 3 – Fração solúvel após a extração de proteínas

Embora a lectina de *Canavalia bonariensis* seja bem caracterizada quanto a sua especificidade por glicose/manose, para a purificação da proteína de fusão foram exploradas as propriedades de ligação da etiqueta de histidina. O anel imidazólico da histidina interage com as cargas positivas do níquel presente na resina cromatográfica, permitindo a purificação da proteína através de uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). Para evitar interações específicas do extrato bacteriano com a coluna foram adicionados 20 mM de imidazol no tampão de equilíbrio e a eluição da proteína de fusão se deu através da adição de imidazol nas concentrações de 100 mM e 300 mM ao tampão de eluição.

Conforme pode ser observado na análise do cromatograma toda a proteína de fusão foi eluída com a concentração mais baixa de imidazol (FIGURA 20 – A). O processo de purificação foi monitorado por SDS-PAGE, que demonstrou a eficiência do método para concentrar a proteína de fusão (FIGURA 20 – B). Os passos seguintes foram realizados para remover a cauda de fusão e purificar a rCaBo.

Figura 20 – Purificação da NusA-His₆-rCaBo.

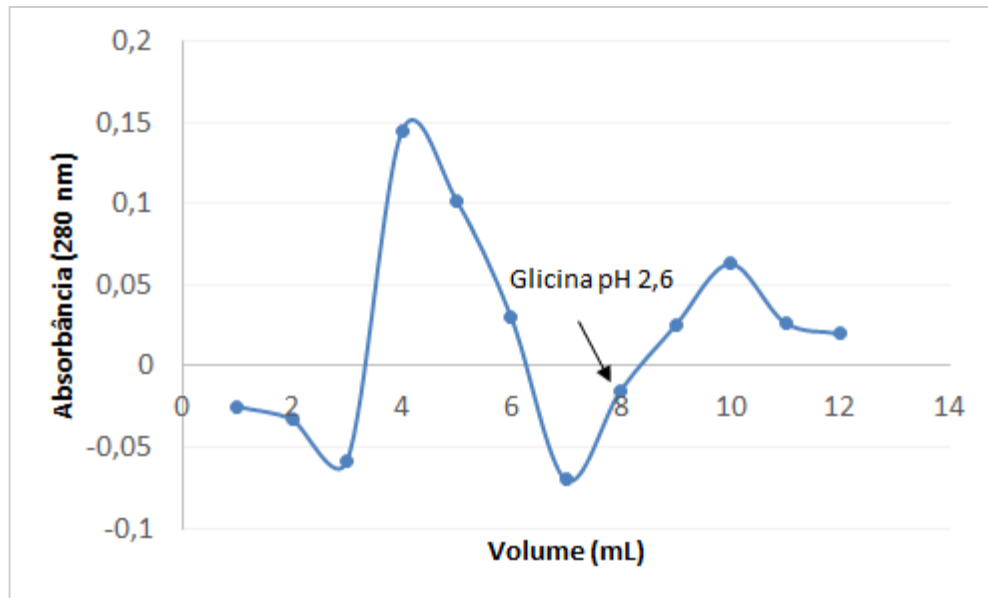


Fonte: Elaborada pelo autor. A – Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em matriz HisPur™ Ni-NTA (Thermo Scientific®). Amostra referente a 5 g de pellet bacteriano ressuspendidos em solução de equilíbrio (Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 500 mM e Imidazol 20 mM) em matriz previamente equilibrada com a mesma solução. A fração não retida foi lavada com a solução de equilíbrio, enquanto que, a fração retida foi eluída com Fosfato de Sódio 20 mM pH 7,4 com NaCl 500 mM e imidazol nas concentrações de 100 e 300 mM. Frações de aproximadamente 1,5 mL foram coletadas manualmente e analisadas por espectrofotometria com leitura a 280 nm. B – SDS-PAGE 10% das diferentes frações cromatográficas. 1 – Extrato total; 2 – Fração não retida; 3 – Fração retida (eluído com 100 mM de imidazol); 4 – Marcador molecular.

A fim de obter a proteína recombinante de *Canavalia bonariensis* livre da cauda de fusão, a proteína isolada no passo cromatográfico anterior foi submetida a clivagem proteolítica utilizando a enteroquinase. Após a incubação com a enzima, a solução de proteína

passou por uma nova cromatografia de afinidade, dessa vez em matriz Sephadex G-50, utilizando-se a própria especificidade da lectina para a purificação. A rCaBo se manteve retida na coluna e foi eluída por choque de pH, seguindo o mesmo protocolo já estabelecido para a lectina tipo selvagem (FIGURA 21).

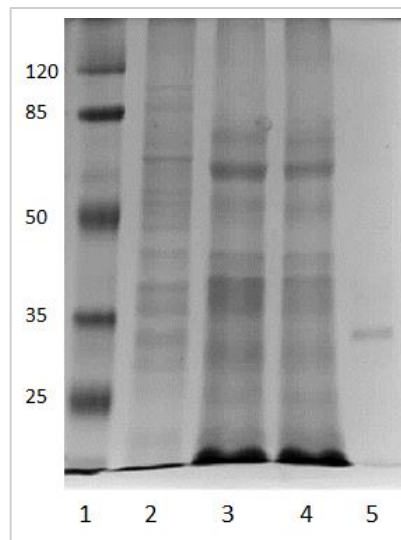
Figura 21 – Purificação da rCaBo.



Fonte: Elaborada pelo autor. Perfil de eluição da cromatografia de afinidade em matriz Sephadex G-50 (GE Healthcare ®). Amostra referente a 2 mL da solução de proteína após digestão com enteroquinase em 5 mL de matriz previamente equilibrada com solução de NaCl 150 mM com CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM. A fração não retida foi lavada com a solução de equilíbrio, enquanto que, a fração retida foi eluída com Glicina 100 mM pH 2,6 em NaCl 150 mM. Frações de aproximadamente 1 mL foram coletadas manualmente e analisadas por espectrofotometria com leitura a 280 nm.

A purificação da rCaBo foi monitorada por SDS-PAGE e ao final da cromatografia, a fração retida exibiu um perfil eletroforético com massa molecular aparente de aproximadamente 30 kDa e livre de contaminantes, em concordância com o resultado esperado para a lectina recombinante (FIGURA 22).

Figura 22 - SDS-PAGE 12 %: Monitoramento da purificação da rCaBo



1 – Marcador molecular; 2 - Solução de proteína após digestão com enteroquinase; 3,4 – Frações não retidas; 5 – Fração retida.

Trabalhos anteriores já demonstraram o sucesso na produção e purificação de lectinas da subtribo Diocleinae em células de *E. coli*. As lectinas recombinantes de *Dioclea guianensis*, *Dioclea grandiflora* (NAGANO et al., 2008) e de *Dioclea sclerocarpa* (ANDRADE, 2015) também tiveram sua cadeia α produzidas de forma recombinante apresentando rendimento satisfatório. Com relação a lectina de *Canavalia brasiliensis*, a proteína recombinante foi produzida nos corpos de inclusão (agregados insolúveis) como pré-pro-ConBr (precursor) (NOGUEIRA et al., 2002).

Para confirmar se a lectina recombinante se encontrava ativa, foram realizados testes de atividade hemaglutinante com suspensão de hemácias de coelho a 3 % em solução salina. A rCaBo, preparada a uma concentração de 1 mg/mL em NaCl 150 mM, apresentou melhor atividade hemaglutinante quando em contato com eritrócitos tratados com a enzima papaína, sendo detectada atividade até uma diluição de 2^9 , o que confere a proteína uma atividade específica de 528 U.H./mgP (TABELA 4).

Tabela 4: Atividade hemaglutinante da rCaBo contra eritrócitos de coelho

Eritrócitos	Atividade específica (U.H./mgP)
Nativos	8
Tratados com tripsina	128
Tratados com papaína	512

Fonte: Elaborada pelo autor.

É importante atentar que esse valor de atividade específica da rCaBo é muito inferior ao observado em trabalhos anteriores para a lectina tipo selvagem, que foi de 4096 U.H./mgP (SILVA, 2015) de modo que algumas hipóteses podem ser levantadas para esclarecer tal efeito. Primeiramente, ressaltando que a CaBo selvagem é formada pela mistura dos seus fragmentos α , β e γ e das isolectinas, enquanto que a lectina recombinante é uma proteína homogênea formada apenas pela sua cadeia α , essas múltiplas subunidades podem influenciar diretamente na potência da atividade hemaglutinante, justificando a discrepância dos resultados. Além disso a síntese da proteína recombinante em sistema heterólogo pode resultar em um *folding* diferente do observado para a proteína nativa (BANEYX; MUJACIC, 2004), promovendo inclusive um arranjo diferente no CRD da lectina. Para se confirmar tais hipóteses, se fazem necessários novos experimentos para a caracterização estrutural da rCaBo.

Com relação a especificidade por açúcar da rCaBo, a julgar pela sua purificação por cromatografia de afinidade na matriz de dextrana, temos a *priori* evidências de que a lectina recombinante se ligue a carboidratos de modo semelhante a lectina selvagem. Confirmando esses efeitos, a atividade hemaglutinante da rCaBo foi inibida pelos açúcares glicose, D-manose, α -metil-D-manosídeo e α -metil-glicopiranosídeo, apresentando uma especificidade maior para α -metil-D-manosídeo que inibiu a atividade da proteína a uma concentração de 3,125 mM e confirmando a especificidade já registrada para CaBo tipo selvagem (TABELA 5).

Tabela 5: Inibição da atividade hemaglutinante da rCaBo

Carboidrato (100 mM)	C. M. I.* (mM)
D-glicose	50
D-manose	6,25
D-galactose	N.I.**
α -metil-D-manosídeo	3,125
α-metil-glicopiranosídeo	6,25
N-acetilglicosamina	N.I. **

Fonte: Elaborada pelo autor. *C.M.I.: Concentração Mínima Inibitória; ** N.I.: Não houve inibição da atividade hemaglutinante.

Destarte, a partir da análise dos resultados foi possível obter satisfatoriamente uma proteína recombinante referente a cadeia α da lectina de *Canavalia bonariensis*. O processo de produção da rCaBo mostrou-se bastante eficiente, uma vez que a proteína foi expressa na fração solúvel e após todos os passos de purificação se apresentou ativa e com especificidade para glicose/manose e açúcares derivados. Não obstante, esse trabalho se mostra promissor no sentido de preservar uma molécula biologicamente ativa, lançando um modelo experimental

para a produção contínua da proteína recombinante. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para avaliar os efeitos biológicos desta lectina, com o intuito de comparar com aqueles já destacados neste trabalho e em estudos anteriores para a lectina selvagem.

6 CONCLUSÃO

A lectina selvagem de *Canavalia bonariensis* (CaBo) foi cristalizada com sucesso e teve a sua estrutura tridimensional resolvida e seu modelo estrutural depositado no PDB (PDB code: 5U3E). A análise da estrutura bem como dos dados relacionados com a especificidade da lectina se correlacionaram de modo adequado com os já descritos para outras lectinas da mesma subtribo.

Com relação a suas potencialidades biotecnológicas, dentro do modelo biológico testado, a CaBo demonstrou ser citotóxica para células C6 de glioma de rato. O ensaio demonstrou que a lectina possui a capacidade de diminuir a viabilidade celular e a migração por indução de autofagia e morte celular, desencadeando autofagia seguida de apoptose nas células neoplásicas.

Dentro das análises de *docking* molecular, estas demonstraram a afinidade de ligação da CaBo a diferentes N-glicanos complexos, com preferência aos ligantes oligomanose. Esses dados fornecem informações importantes sobre como a lectina consegue interagir com glicanos representativos, além disso, a observação do comportamento estrutural da lectina em solução através das simulações de dinâmica molecular demonstrou alta estabilidade na interação com os açúcares testados.

Essas caracterizações quanto ao comportamento molecular da CaBo fornecem portanto, informações importantes sobre a sua interação proteína-açúcar e especificidade a oligossacarídeos complexos, sugerindo que a lectina pode interagir com alvos glicosilados das células e promover uma atividade antiglioma.

Além disso, dentro do objetivo proposto para esse trabalho foi possível produzir a lectina recombinante de *Canavalia bonariensis* em sistema heterólogo de *Escherichia coli*. A produção da proteína recombinante foi considerada satisfatória uma vez que a lectina foi expressa de forma solúvel, ativa e com especificidade de ligação semelhante a lectina selvagem. Tomando com base esses resultados, a rCaBo poderá contribuir para a produção dessa proteína mesmo diante da escassez de sementes de *Canavalia bonariensis*, e ainda permitirá explorar seu potencial antiglioma, podendo inclusive ser utilizada como uma ferramenta biotecnológica na detecção e diagnóstico do câncer.

REFERÊNCIAS

- 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. 2, p. 213–221, 2010.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s.l.]. v. 3, n. 9, p. 1593, 2005.
- ARNOLD, J. N. *et al.* The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. **Annual review of immunology**, [s.l.]. v. 25, p. 21–50, 2007.
- AROUI, S. *et al.* Naringin suppresses cell metastasis and the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) via the inhibition of ERK-P38-JNK signaling pathway in human glioblastoma. **Chemico-biological interactions**, [s.l.]. v. 244, p. 195–203, jan. 2016.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, [s.l.]. v. 22, p. 1399, 4 nov. 2004.
- BARROSO-NETO, I. L. *et al.* Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s.l.]. v. 543, p. 31–39, 2014.
- BEAMAN, I. B. S. *et al.* United States Patent. 1996.
- BECKER, J. W. *et al.* The Covalent Concanavalin Structure of the monomer. **Biological Chemistry**, [s.l.]. v. 260, n. 4, p. 1513–1524, 1975.
- BELICKY, TEFAN; KATRLIK, J.; TKA, J. Glycan and lectin biosensors. **Essays In Biochemistry**, [s.l.]. v. 60, n. 1, p. 37–47, 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, 1986.
- BROCKHAUSEN, I.; SCHACHTER, H.; STANLEY, P. O-GalNAc Glycans. In: VARKI, A. *et al.* (Eds.). Cold Spring Harbor (NY): [s.n.].
- BRÜNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, [s.l.]. v. 355, n. 6359, p. 472, 1992.
- CALVETE, J. J. *et al.* Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.]. v. 1430, n. 2, p. 367–375, 1999.
- CARVALHO, F. C. *et al.* Evaluating the Equilibrium Association Constant between ArtinM Lectin and Myeloid Leukemia Cells by Impedimetric and Piezoelectric Label Free Approaches. **Biosensors**, [s.l.]. v. 4, n. 4, p. 358–369, dez. 2014.
- CASE, D. A. *et al.* AMBER 9. **University of California, San Francisco**, [s.l.]. v. 45, 2006.

CAVADA, B. S. *et al.* Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Textop, Hellerup, Denmark, [s.n.], 1996.

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. 30, 2019.

COCINERO, E. J.; ÇARÇABAL, P. Carbohydrates. **Topics in current chemistry**, [s.l.]. v. 364, p. 299—333, 2015.

DAI, C.; HOLLAND, E. C. Glioma models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, [s.l.]. v. 1551, n. 1, p. M19--M27, 2001.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Medicinal Research Reviews**, [s.l.]. v. 36, n. 2, p. 221–247, mar. 2016.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N log (N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, [s.l.]. v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993.

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.

DELANO, W. L. The PyMOL molecular graphics system. <http://www.pymol.org>, 2002.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation - Potential for therapeutics and diagnostics. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.]. v. 4, n. 6, p. 477–488, 2005.

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

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, 1987.

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**, [s.l.]. v. 6, n. November, p. 1–2, 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.

GEMEINER, P. *et al.* Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, [s.l.]. v. 27, n. 1, p. 1–15, 2009.

- GRANGEIRO, T. B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European journal of biochemistry / FEBS**, [*s.l.*]. v. 248, n. 1, p. 43–48, 1997.
- GROBBEN, B.; DE DEYN, P. P.; SLEGGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, [*s.l.*]. v. 310, n. 3, p. 257–270, 2002.
- HESS, B. *et al.* LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. **J. Comput. Chem**, [*s.l.*]. v. 18, p. 18–1463, 1997.
- 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.
- JAYARAJ, R.; SMOOKER, P. M. So you Need a Protein - A Guide to the Production of Recombinant Proteins. **The Open Veterinary Science Journal**, [*s.l.*]. v. 3, n. 1, p. 28–34, 2009.
- 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, 2015.
- 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, 1997.
- KANEDA, Y. *et al.* The high specificities of Phaseolus vulgaris erythro- and leukoagglutinating lectins for bisecting GlcNAc or beta 1-6-linked branch structures, respectively, are attributable to loop B. **The Journal of biological chemistry**, [*s.l.*]. v. 277, n. 19, p. 16928–16935, maio 2002.
- KITCHEN, D. B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature reviews. Drug discovery**, [*s.l.*]. v. 3, n. 11, p. 935–949, nov. 2004.
- KÖLBL, A. C.; ANDERGASSEN, U.; JESCHKE, U. The Role of Glycosylation in Breast Cancer Metastasis and Cancer Control. **Frontiers in Oncology**, [*s.l.*]. v. 5, p. 219, 2015.
- LEAL, R. B. *et al.* Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*s.l.*]. v. 114, p. 64–76, 2018.
- LEATHER, A.; DOKAL, I.; ATKINS, N. Lectin binding to normal and malignant breast tissue. **Diagnostic histopathology**, v. 6, n. 3–4, p. 171–180, 1983.
- LEI, H. Y.; CHANG, C. P. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. **Autophagy**, [*s.l.*]. v. 3, n. 4, p. 402–404, 2007.
- LI, W. *et al.* Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and biophysical research communications**, [*s.l.*]. v. 414, n. 2, p. 282–286, out. 2011.
- 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.

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 - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.]. v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998.

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, 2007.

MEEZAN, E. *et al.* Comparative Studies on the Carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II. Separation of glycoproteins and glycopeptides by Sephadex chromatography. **Biochemistry**, [s.l.]. v. 8, n. 6, p. 2518–2524, 1969.

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. 417–28, 2008.

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, n. August, p. 79–89, 2017.

NOGUEIRA, N. A. P. *et al.* Expression and purification of the recombinant ConBr (Canavalia brasiliensis lectin) produced in Escherichia coli cells. **Protein and peptide letters**, [s.l.]. v. 9, n. 1, p. 59–66, fev. 2002.

NOVAGEN. pET System Manual Novagen pET System Manual Novagen. **Biosystems**, [s.l.]. p. 1–68, 2003.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant lectins: An array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, [s.l.]. v. 33, n. 1, p. 66–80, 2013.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application: the frutalin case study. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. August, p. 1–6, 2014.

OOI, L. **Principles of X-ray Crystallography**. [s.l.] Oxford University Press, 2010.

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, p. 271–282, 2017.

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, 2013.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. **Physical Review Letters**, [s.l.]. v. 45, n. 14, p. 1196, 1980.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, [s.l.]. v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.].v. 15, p. 540, 20 ago. 2015.

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, p. 126–136, 2017.

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.

READ, R. J. *et al.* A new generation of crystallographic validation tools for the protein data bank. **Structure**, [s.l.]. v. 19, n. 10, p. 1395–1412, 2011.

RODRIGUES, R. P. *et al.* Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. **Revista Virtual de Química**, [s.l.]. v. 4, n. 6, p. 739–776, 2012.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.]. v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.

RUDD, P. M. *et al.* Glycosylation and the immune system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5512, p. 2370–2376, mar. 2001.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, [s.l.]. v. 18, n. 8, p. 589–613, ago. 2001.

SCHMALTZ, R. M.; HANSON, S. R.; WONG, C.-H. Enzymes in the synthesis of glycoconjugates. **Chemical reviews**, v. 111, n. [s.l.].4259–4307, jul. 2011.

SCHRAEN-MASCHKE, S.; ZANETTA, J. P. Role of oligomannosidic N-glycans in the proliferation, adhesion and signalling of C6 glioblastoma cells. **Biochimie**, [s.l.]. v. 85, n. 1–2, p. 219–229, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s.l.]. v. 14, n. 11, p. 53–62, 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, M. T. L. *et al.* Structural Characterization , Docking and Dynamics Simulations of Canavalia Bonariensis Lectin. **Journal of Drug Design and Research**, [s.l.]. v. 3, p. 1–8, 2016a.
- SILVA, P. M. S. *et al.* Cratylia mollis lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors & bioelectronics**, [s.l.]. v. 85, p. 171–177, nov. 2016b.
- SINCLAIR, A. M.; ELLIOTT, S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. **Journal of pharmaceutical sciences**, [s.l.]. v. 94, n. 8, p. 1626–1635, ago. 2005.
- 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.
- SOARES, C. Simulação de proteínas usando métodos de mecânica/dinâmica molecular. **Química**, [s.l.]. v. 64, p. 33–44, 1997.
- SPARROW, L. G. *et al.* N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure. **Proteins**, [s.l.]. v. 71, n. 1, p. 426–439, abr. 2008.
- STANLEY, P.; TANIGUCHI, N.; AEBI, M. N-glycans. In: **Essentials of Glycobiology**. 3rd edition. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- 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.
- TANIGUCHI, N.; KIZUKA, Y. Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. **Advances in cancer research**, [s.l.]. v. 126, p. 11–51, 2015.
- 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.
- VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Moleküldynamik-Computersimulationen; Methodik, Anwendungen und Perspektiven in der Chemie. **Angewandte Chemie**, [s.l.]. v. 102, n. 9, p. 1020–1055, 1990.
- VARKI, A. *et al.* **Essentials of Glycobiology**. THIRD EDITION. [s.l.]. 2017.
- 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.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. **Biochemistry**, [s.l.]. v. 78, n. 7, p. 679–696, 2013.
- WU, C.-Y.; WONG, C.-H. Chemistry and glycobiology. **Chemical Communications**, [s.l.].

v. 47, n. 22, p. 6201, 2011.