



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CLÁUDIO HENRIQUE DAHNE DE SOUZA FILHO**

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DE *Bauhinia unguolata* POR  
FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA**

**FORTALEZA  
2019**

**CLÁUDIO HENRIQUE DAHNE DE SOUZA FILHO**

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DE *Bauhinia unguolata* POR  
FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA**

**Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.**

**Orientadora:** Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento

**Co-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)

---

- S237a Souza Filho, Cláudio Henrique Dahne de.  
Análise estrutural de uma lectina de Bauhinia unguolata por ferramentas de bioinformática / Cláudio Henrique Dahne de Souza Filho. – 2019.  
64 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.  
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Lectinas. 2. Antígeno Tn. 3. Bioinformática. 4. Estrutura tridimensional. 5. Carboidratos. I. Título.  
CDD 570
-

**CLÁUDIO HENRIQUE DAHNE DE SOUZA FILHO**

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE UMA LECTINA DE *Bauhinia unguolata* POR  
FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA**

**Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.**

**Aprovada em: 29/11/2019**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

Dr. Vanir Reis Pinto Júnior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Me. Vinícius José da Silva Osterne  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento deve ser direcionado, obrigatoriamente, à minha mãe. Obrigado por me apoiar em absolutamente tudo e estar do meu lado em todos os momentos, dos piores aos melhores. Obrigado por, acima de tudo, ser uma grande amiga para mim. Eu não teria chegado em metade do caminho que cheguei hoje se não fosse por ti. Você é um dos maiores exemplos de pessoa para mim, uma das melhores pessoas que eu conheço – tão trouxe quanto eu – e é, sem dúvida a pessoa mais importante na minha vida. Obrigado por tudo. Meu segundo agradecimento vai para os meus familiares mais próximos, em especial minha avó materna, que é a pessoa que sempre se mostrou mais entusiasmada e torcendo por mim por conta do curso que eu faço; ao meu pai, por todo o apoio financeiro e amor, e ao André, obrigado pela preocupação, apoio e amor.

Na UFC, meus principais agradecimentos são direcionados aos Colegas de Malaquias. Obrigado por terem tornado esses quatro anos de graduação mais suportáveis e terem sido meu primeiro grupo de amigos a longo prazo. Principalmente, obrigado por neste ano terem se mostrado tão preocupados comigo e dispostos a me ajudar em questões emocionais. Eu vou sempre levar isso com imenso carinho e nunca vou esquecer. Dentre os Malaquias, meu principal agradecimento é para a Alice. Eu me sinto bastante lisonjeado de você ter sido a pessoa mais próxima a mim nesses últimos quatro anos. Muito obrigado por absolutamente tudo, mas principalmente pelo carinho, pela amizade, e por ter contribuído tanto para que eu me tornasse uma pessoa melhor. Eu te amo, genuinamente. No mais, muito obrigado por tudo, a todos vocês: Ryan (pela nossa relação agridoce nesses 11 anos), Maiara, Alice, Mateus, Faima, Larissa Nayara, Otávio, Ariane, Mariana e Gabi.

Em ordem cronológica, obrigado aos amigos do Bioprospec, que fizeram com que minha primeira experiência em laboratório tivesse momentos bem divertidos. Obrigado Pedro, Léo, Thais, Luiz, Thiago. Entretanto, agradeço principalmente o Joaquim. Além de uma pessoa maravilhosa, você foi um ótimo primeiro orientador.

Meu imenso agradecimento ao Programa Aristides Pacheco Leão para o estímulo a vocações científicas, da Academia Brasileira de Ciências, que me selecionou em 2017 para estagiar no Laboratório de Reparo de DNA, da Universidade de São Paulo (USP), entre janeiro e fevereiro de 2018. Muito obrigado ao prof. Carlos Menck por ter me dado essa oportunidade e ter se mostrado sempre tão entusiasmado em relação à ciência. Entretanto, meu principal agradecimento vai para a minha orientadora. Obrigado, Clarissa, por toda a orientação e amizade. Você é uma pessoa e pesquisadora incrível e quero ser metade do que você é quando eu crescer. Agradeço muito, também, à Andressa. Obrigado por ter sido a primeira pessoa a me

receber no laboratório, ter sido extremamente prestativa e ter me ajudado – sem nem perceber - a segurar a barra que foi aquela primeira semana. Isso foi muito importante para mim e sempre guardarei isso com imenso carinho.

Meus maiores agradecimentos em termos de UFC vão, indubitavelmente, ao Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), que tem sido minha segunda casa nos últimos dois anos. Vocês são minha segunda família e eu nutro um carinho extremo por cada um de vocês. Obrigado à Cláudia, por me aguentar diariamente, estar sempre disposta a me ajudar e por ser uma pessoa que me causa uma sensação de “*home sweet home*” tão grande. À Gleiciane, por todos os ensinamentos, bons momentos e pela amizade. À Mayara Torquato, pela extrema prontidão para me ajudar e pelos bons momentos. Ao Alfa, obrigado por toda a ajuda, por ser uma pessoa sempre bem humorada e carinhosa comigo. Ao Vanir, obrigado por todos os ensinamentos e pela orientação em vários momentos, principalmente no decorrer da realização dessa monografia. Ao Vinícius, pela boa companhia e pela ajuda com a escrita deste trabalho. Ao Neto, por todas as piadas ruins compartilhadas entre nós. Aos meus queridos companheiros ICs, obrigado ao Hadson e Matheus, por terem sido meus primeiros companheiros de bancada, tenho um grande carinho por vocês até hoje. Obrigado à Ana, por ser sempre uma ótima companhia e uma pessoa bastante divertida. Meu muito obrigado à Laryssa. Você é uma pessoa extremamente importante para mim. Obrigado por todos os momentos e por todo o carinho. À Lara e à Paulete, obrigado pela amizade e por serem pessoas absurdamente maravilhosas. Vocês me ajudaram em momentos muito difíceis e eu vou sempre lembrar disso. Meu imenso obrigado à profa. Kyria e ao prof. Benildo. Obrigado pela confiança que sempre depositaram em mim e por orientarem seus alunos de forma única. Muito obrigado por todas as oportunidades que me forneceram. Entretanto, meus principais agradecimentos são para o Messias. Obrigado por ter sido meu primeiro orientador de bancada no laboratório, por todos os ensinamentos, companheirismo e, sobretudo, pela amizade. Você é uma pessoa muito especial para mim.

Meus agradecimentos ao 28º Programa Bolsas de Verão do CNPEM. Eu devo começar agradecendo à comissão organizadora. Obrigado por terem me escolhido e por ter proporcionado a melhor experiência que eu tive na minha graduação. Um grandiosíssimo agradecimento, também, a todos os colegas que me acompanharam nesse programa. Tenho certeza que fiz grandes amigos, que eu espero poder levar para a vida toda. Vocês certamente contribuíram de maneira ímpar para que essa experiência tenha sido ainda mais inesquecível. Especialmente, obrigado à Danieli, por ter sido uma ótima orientadora e por ter me ensinado tantas coisas. Obrigado à Ianka, por ter sido a pessoa quem mais esteve junto a mim nesses

dois meses, sendo uma ótima companhia e amiga para todos os momentos. Obrigado, mucura. Contudo, meu principal agradecimento vai para a Bruna. Você se tornou uma das pessoas mais importantes para mim. Você é uma pessoa e amiga maravilhosa, obrigado por todo o carinho, preocupação, amizade e bons momentos. Amo você, querida.

. Obrigado, antes de tudo, aos melhores professores que tive no decorrer da graduação, que são verdadeiros exemplos de profissionais que eu quero ser no futuro e que definitivamente me influenciaram de forma positiva nesses três anos dando aula. Meus agradecimentos, principalmente, para o Roberto, Arlete e Daniele. Obrigado ao Curso Pré-Vestibular Paulo Freire, onde ministrei a disciplina de Biologia I desde 2017, quando tinha recém-terminado o segundo semestre da graduação. Devo agradecer a todos os alunos que eu tive o prazer de ensinar. Muitos de vocês me ensinaram bastante coisa e alguns ainda acabaram virando meus amigos. Meus agradecimentos ao corpo administrativo e docente, em que fiz grandes amigos. Obrigado Murillo, Samuel, Davi Pessôa, Lucas Andrade, Débora, Cris, Ana Paula, Davi Gomes, Ramon, João Paulo, MUV e Lívia.

No mais, obrigado a todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu tenha chegado até aqui.

## RESUMO

Carboidratos podem ser moléculas envolvidas no armazenamento de informações. O papel de codificação de informações biológicas é desempenhado, principalmente, pelos carboidratos presentes na membrana plasmática, que constituem o glicocálice de uma célula. Glicanos de superfície estão envolvidos em diversas funções celulares, como no reconhecimento e na adesão entre células, na coagulação sanguínea, na resposta imune, migração celular, interação parasita-hospedeiro, metástase, entre outros. Alterações no padrão de glicosilação da superfície das células podem indicar anormalidades, como o que acontece em vários tipos de cânceres. Dentre essas alterações, uma que merece destaque é a superexpressão do antígeno Tn, cuja detecção prévia nessas doenças é de extrema importância. Essa detecção pode ser realizada utilizando lectinas. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos de maneira específica, reversível e sem alterar sua estrutura. Lectinas de origem vegetal, principalmente de plantas leguminosas (família Fabaceae) são as mais estudadas. Dentro das leguminosas, lectinas pertencentes à subfamília Caesalpinioideae ainda tem poucos dados em relação a estrutura-função. Nesta subfamília, um dos gêneros mais conhecidos é o *Bauhinia*, ao qual pertencem as plantas chamadas popularmente de “pata-de-vaca”. Várias lectinas de *Bauhinia* já foram purificadas e possuem várias atividades biológicas, como anti-inflamatória, anticoagulante, imunomodulatória, antitumoral e marcadoras de linhagens celulares de câncer. A fim de abordar de maneira mais minuciosa as duas últimas atividades e avaliar o potencial de lectinas deste gênero para estudos de oncologia, a lectina das sementes de *Bauhinia unguolata* (BUL) foi escolhida como objeto de estudo para se realizar uma análise estrutural por meio de ferramentas de bioinformática. Neste trabalho, objetivou-se determinar a estrutura tridimensional da BUL por modelagem por homologia e avaliar a sua interação a diferentes ligantes por meio de valores obtidos de *docking* molecular. Os resultados obtidos a partir da modelagem foram satisfatórios, de acordo com os parâmetros de validação. Observou-se que o monômero da BUL é composto por um motivo *jellyroll*, característico de lectinas de leguminosas. Os resultados de *docking* mostraram que a BUL interage de forma favorável a N-acetil-D-galactosamina (GalNAc),  $\alpha$ -lactose, antígeno Tn, peptídeos derivados do antígeno Tn e um trissacarídeo contendo fucose e GalNAc nas suas porções terminais. A partir desses resultados, pode-se inferir que esta lectina possa vir a ser uma potencial ferramenta no uso de marcação de linhagens celulares de câncer que expressam antígeno Tn e fucose. Entretanto, estudos estruturais mais avançados, como simulações de dinâmica molecular, além de testes *in vitro* e *in vivo*, são necessários para confirmar essas potenciais aplicações da BUL.

**Palavras-chave:** Bioinformática, lectina, antígeno Tn, *Bauhinia unguolata*



## ABSTRACT

Carbohydrates are multifunctional molecules involved in the storage information. The role of coding biological information is mainly played by the carbohydrates present in the plasma membrane, which constitute the glycocalyx of a cell. These surface glycans are involved in many functions, like cell recognition, cell adhesion, blood clotting, immune response, cell migration, parasite-host interaction, metastasis etc. Changes in the pattern of cell surface glycosylation may indicate abnormalities, as happens in many cancers. Among these changes, one that deserves attention is the overexpression of the Tn antigen, whose early detection in these diseases is extremely important for its diagnosis. Such detection can be performed using lectins. Lectins are proteins or glycoproteins that recognize carbohydrates in a specific manner without altering their structure. Plant lectins, mainly from leguminous plants (Fabaceae family) are the most studied ones. Within the legumes, lectins belonging to the Caesalpinioideae subfamily still have few data regarding their structure-function relationship. In this subfamily, one of the best known genera is *Bauhinia*, whose representatives are popularly called "cow's hoof". Several *Bauhinia* lectins have already been purified and have various biological activities, such as anti-inflammatory, anticoagulant, immunomodulatory, anti-tumor and cancer cell markers. In order to assess these latter activities more thoroughly and to evaluate the potential of *Bauhinia* lectins as tools in oncology studies, *Bauhinia unguolata* seed lectin (BUL) was chosen as the object of study to conduct a structural analysis through bioinformatics tools. This work aimed to determine the three-dimensional structure of BUL by homology modeling and to evaluate its interaction with different ligands through molecular docking. The results obtained from the modeling were satisfactory, according to the validation parameters. It was observed that the BUL monomer is composed of a  $\beta$ -sandwich fold or jellyroll motif, which is a characteristic of legume lectins. The docking results showed that BUL interacts favorably with N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc),  $\alpha$ -lactose, Tn antigen, Tn antigen-derived peptides and two forms of a trisaccharide, one containing fucose and one containing GalNAc on its terminal portion. From these results, it can be inferred that this lectin may be a potential marker in cell lines which overexpress Tn antigen and fucose on its surface. However, more advanced structural studies, such as molecular dynamics simulations, as well as *in vitro* and *in vivo* tests, are needed to confirm these potential applications of BUL.

**Keywords:** Bioinformatics, lectins, Tn antigen, *Bauhinia unguolata*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática das moléculas que compõem a superfície externa de uma célula eucariótica .....	13
Figura 2 - Representação esquemática de N- (A, B e C) e O-glicanos (D) .....	15
Figura 3 - Representação esquemática do antígeno Tn e de seus O-glicanos derivados ...	17
Figura 4 - Representação esquemática da classificação das lectinas vegetais de acordo com Peumans <i>et al.</i> (2001) .....	19
Figura 5 - Monômero da lectina de sementes de <i>Dioclea lasiocarpa</i> .....	22
Figura 6 - Oligomerização característica de lectinas de leguminosas .....	23
Figura 7 – <i>Bauhinia unguolata</i> .....	24
Figura 8. Alinhamento múltiplo de sequência da lectina de <i>Bauhinia unguolata</i> , de <i>Griffonia simplicifolia</i> , de <i>Phanera variegata</i> e de <i>Bauhinia forficata</i> -I .....	37
Figura 9. Superposição das estruturas tridimensionais da BUL (em verde) e da GSL (vermelho rubro) em cartoon .....	38
Figura 10. Representação da estrutura tridimensional obtida a partir de modelagem por homologia da BUL .....	39
Figura 11. Resíduos de aminoácidos da BUL que interagem com metais .....	40
Figura 12 - Representação das interações entre os <i>cis</i> -peptídeos e o ligante $\alpha$ -L-fuc(1 $\rightarrow$ 3)[ $\beta$ -D-GalNAc(1 $\rightarrow$ 4)] $\alpha$ -D-GlcNAc, representado pela sigla FucGalGlc .....	42
Figura 13. Representação bidimensional (LigPlot) (A) e tridimensional (PyMOL) (B) dos resíduos de aminoácidos que participam da interação com a $\alpha$ -lactose .....	45
Figura 14. Representação bidimensional (LigPlot) (A) e tridimensional (PyMOL) (B) dos resíduos de aminoácidos que participam da interação com N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) .....	46
Figura 15. Representação bidimensional (LigPlot) (A) e tridimensional (PyMOL) (B) dos resíduos de aminoácidos que participam da interação com o antígeno Tn .....	48
Figura 16. Peptídeos derivados do antígeno Tn (PDB ID: 5T5L – A – e 5T5O – B) .....	49
Figura 17. Representação bidimensional (LigPlot) (a – porção fucose, c – porção GalNAc) e tridimensional (PyMOL) (b – porção fucose, d – porção GalNAc) dos resíduos de aminoácidos da BUL que interagem com o trissacarídeo .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lectinas purificadas até o momento oriundas de diferentes espécies do gênero <i>Bauhinia</i> .....	25
Tabela 2 - Interação da BUL com diferentes carboidratos .....	54

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1. INTRODUÇÃO .....	12
1.1. A superfície das células: carboidratos e o glicocódigo .....	12
1.2. Alterações no glicocódigo celular: o câncer .....	15
1.3. Lectinas .....	18
1.3.1. Lectinas vegetais .....	18
1.3.2. Classificação estrutural e evolutiva das lectinas vegetais .....	19
1.3.2.1. Merolectinas .....	20
1.3.2.2. Hololectinas .....	20
1.3.2.3. Superlectinas .....	20
1.3.2.4. Quimerolectinas .....	20
1.3.3. Lectinas de leguminosas .....	21
1.3.4. O gênero <i>Bauhinia</i> e suas lectinas .....	23
1.4. Aplicação biotecnológica de lectinas vegetais .....	26
1.4.1. Aplicação biotecnológica das lectinas do gênero <i>Bauhinia</i> .....	26
1.4.1.1. Aplicação de lectinas como ferramentas na pesquisa oncológica .....	28
1.4.1.1.1. Aplicação de lectinas como moléculas de atividade antitumoral .....	28
1.4.1.1.2. Aplicação de lectinas como biossensores .....	30
1.5. Importância das ferramentas de bioinformática para o estudo da biologia estrutural de lectinas .....	30
2. OBJETIVOS .....	33
2.1. Objetivo geral .....	33
2.2. Objetivos específicos .....	33
3. METODOLOGIA .....	34
3.1. Modelagem molecular por homologia .....	34
3.2. <i>Docking</i> molecular .....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
4.1. Modelagem da estrutura tridimensional da BUL .....	36
4.2. <i>Docking</i> molecular .....	43
5. CONCLUSÃO .....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A superfície das células: carboidratos e o glicocódigo

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na Terra e apresentam diversas funções. Os açúcares simples, como a glicose, podem ser utilizados como substratos energéticos pelas células, sendo sua oxidação a principal via de conservação de energia utilizada por estas. Os açúcares complexos ou glicanos podem ser utilizados como elementos estruturais em paredes celulares, tanto de bactérias quanto de plantas, e nas membranas de células do tecido conjuntivo animal, além de participarem do processo de lubrificação das articulações em animais. Além disso, são moléculas essenciais na adesão entre células e no reconhecimento de outras moléculas (NELSON; COX, 2013).

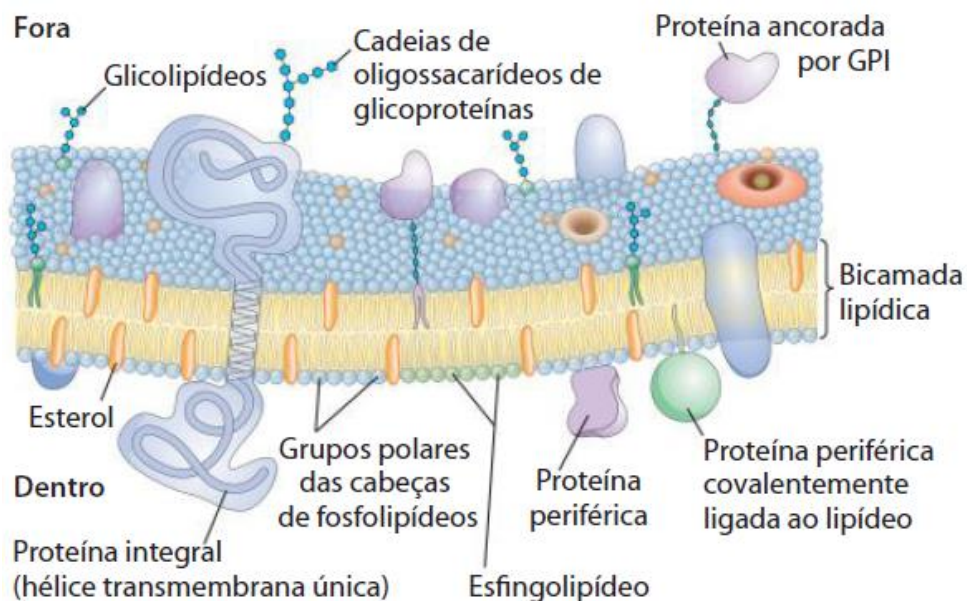
Em relação à sua estrutura, os carboidratos são definidos como poli-hidroxi aldeídos, poli-hidroxi cetonas ou substâncias que originam estes compostos quando sofrem hidrólise, possuindo fórmula empírica  $(CH_2O)_n$  – mas podendo ter outros elementos, como S, N ou P. Estes podem ser classificados, de forma geral, em três classes: os monossacarídeos, que são os açúcares simples, formados por apenas uma única unidade de poli-hidroxi aldeído ou poli-hidroxi cetona, cujo representante de maior abundância na natureza é a d-glicose (ou dextrose); os oligossacarídeos, formados por até 20 unidades de monossacarídeos; e os polissacarídeos, polímeros que contêm pelo menos mais de 20 unidades de monossacarídeos, podendo alcançar até milhares de unidades, como a celulose e o glicogênio (NELSON; COX, 2013). Nos organismos vivos, os carboidratos apresentam uma enorme e complexa heterogeneidade estrutural, o que pode ser vinculado às suas características, como a capacidade de diferentes resíduos de açúcar de formarem ligações glicosídicas entre si, o tipo de ligação anomérica que eles formam entre eles e a presença ou ausência de ramificações nas estruturas que eles formam (GHAZARIAN *et al.*, 2015).

Entretanto, apesar do seu papel imprescindível como moléculas combustíveis, cabe dar ênfase a como essas moléculas estão envolvidas no armazenamento de informações; ou seja, no potencial que eles possuem como codificadores de informações biológicas. Essa capacidade se dá, principalmente, devido ao fato de monossacarídeos serem moléculas multifuncionais. Por conta de possuírem três a quatro hidroxilas, cada uma pode fazer uma ligação covalente com outro açúcar, seja por ligações do tipo  $\alpha$  ou  $\beta$  glicosídicas, e dessa forma os oligômeros formados podem ser lineares ou ramificados. Assim, duas hexoses, por exemplo, podem formar cerca de 11 tipos diferentes de dissacarídeos, enquanto dois aminoácidos ou dois nucleotídeos

podem formar apenas um dipeptídeo ou um dinucleotídeo, respectivamente (SHARON; LIS, 2004).

O papel de codificação de informações biológicas é desempenhado, principalmente, pelos carboidratos presentes na membrana plasmática (Fig. 1). A membrana celular de eucariotos, em especial a sua superfície mais externa, é constituída por uma camada de glicoconjugados, cadeias de oligossacarídeos ligados covalentemente a proteínas e a lipídeos da membrana, chamada de glicocálice, que contém alguns nanômetros de espessura. Estes glicoconjugados são formados como resultado da atividade de enzimas, as glicosidases e glicosiltransferases, que atuam de maneira conjunta no retículo endoplasmático rugoso e no complexo de Golgi, realizando modificações em proteínas e lipídeos antes de os direcionarem para a membrana plasmática. Nessa estrutura externa está presente um enorme repertório de informações biológicas que não são codificadas pelo genoma. Assim, estes glicanos de superfície estão envolvidos em diversas funções celulares, como no reconhecimento e na adesão entre células, na coagulação sanguínea, na resposta imune, migração celular, desenvolvimento embrionário normal, crescimento, inibição por contato, interação patógeno-hospedeiro, metástase, entre outras (NELSON; COX, 2013; GHAZARIAN *et al.*, 2015).

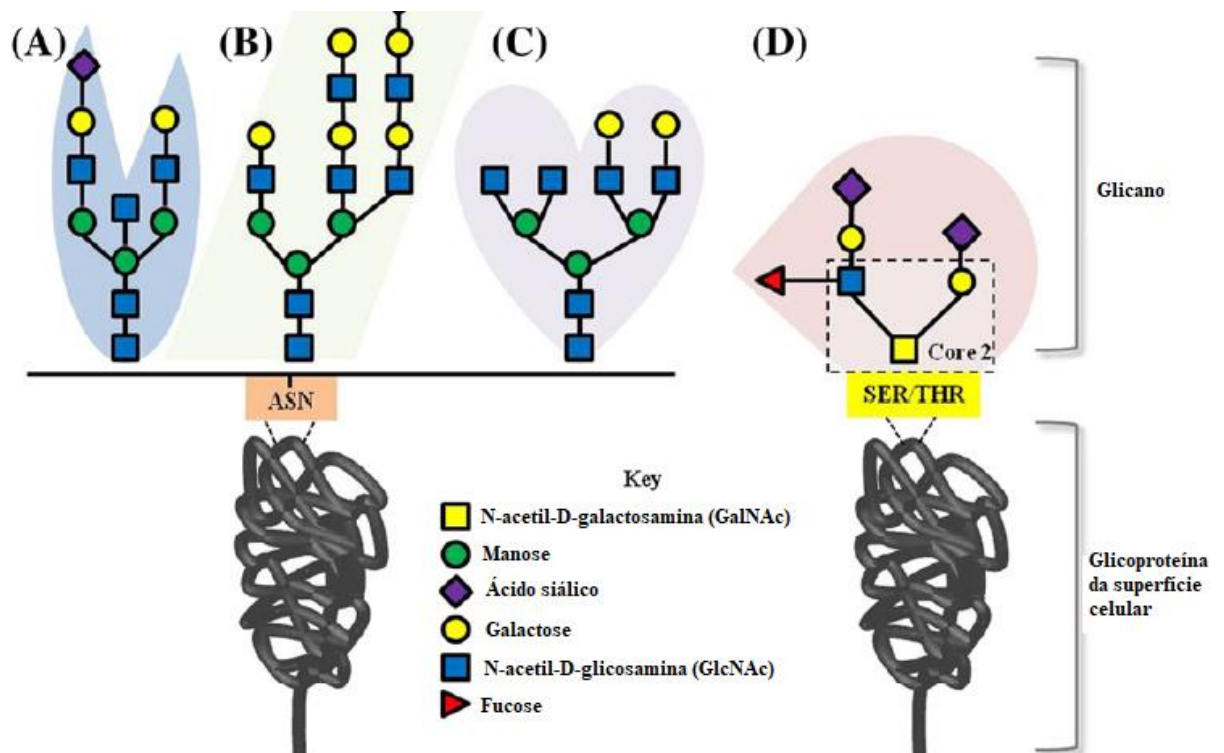
**Figura 1.** Representação esquemática das moléculas que compõem a superfície externa de uma célula eucariótica. Dentre essas moléculas, pode-se observar os glicolipídeos e glicoproteínas que constituem o glicocálice.



Fonte: Nelson; Cox (2013).

Estes glicoconjugados de superfície podem ser formados, principalmente, de duas formas (Fig. 2). Os oligossacarídeos podem formar ligações glicosídicas com proteínas por meio de dois tipos de ligações. No primeiro, ocorre a ligação de uma *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) à porção amida de uma asparagina (Asn) (oligossacarídeo *N*-ligado) na sequência consenso Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer resíduo, exceto prolina. No segundo tipo, ocorre a ligação do C-1 de uma *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) à hidroxila de uma serina ou treonina (oligossacarídeo *O*-ligado) mediante ação da enzima UDP-*N*-acetil-galactosamina transferase. Nos eucariotos, a glicosilação *N*-ligada inicia-se com a adição de um oligossacarídeo precursor comum, contendo 14 unidades (2 de *N*-acetilglicosamina, 9 de manose e 3 de glicose), à asparagina de uma cadeia polipeptídica alvo que foi recém-sintetizada, à medida que esta é translocada ao retículo endoplasmático. Três resíduos de glicose são removidos desse precursor e a glicoproteína é transportada para o complexo de Golgi, onde resíduos de manose podem ser removidos e outros monossacarídeos, como galactose, fucose, ácido siálico, *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilgalactosamina, podem ser adicionados, a fim de alongar o oligossacarídeo *N*-ligado. A *O*-glicosilação ocorre, principalmente, no complexo de Golgi. Após a adição de um resíduo de *N*-acetilgalactosamina à hidroxila de uma serina ou treonina de uma cadeia polipeptídica alvo, o alongamento desse oligossacarídeo *O*-ligado pode ocorrer pela adição de galactose, fucose, *N*-acetilglicosamina e ácido siálico (NELSON; COX, 2013; GHAZARIAN *et al.*, 2015; GLAVEY *et al.*, 2015).

**Figura 2.** Representação esquemática de *N*- (A, B e C) e *O*-glicanos (D).



Adaptado de Glavey (2015).

Alterações no padrão de glicosilação da superfície das células podem indicar anormalidades, como o que acontece em vários tipos de cânceres. Células normais precisam sobrepor vários níveis de regulação a fim de se tornarem células malignas metastáticas. Alterações de natureza genética permitem que células malignas respondam de forma descontrolada a fatores de crescimento e que não respondam a sinais inibitórios de proteínas supressoras de tumores, como p53 e Rb. Fora as alterações genéticas tradicionais, outras alterações fenotípicas também nesses tipos de células. Uma de grande importância ocorre no glicocálice, principalmente devido à atividade anormal de enzimas glicosidases e glicosiltransferases (GHAZARIAN *et al.*, 2015).

## 1.2. Alterações no glicocódigo celular: o câncer

Durante o processo de transformação maligna de uma célula, há mudanças consideráveis nos eventos de glicosilação, principalmente resultando em alterações nos glicanos de superfície. Essas alterações podem influenciar negativamente a interação com lectinas endógenas, o que facilita o processo de metástase destas células (GLAVEY *et al.*, 2015).

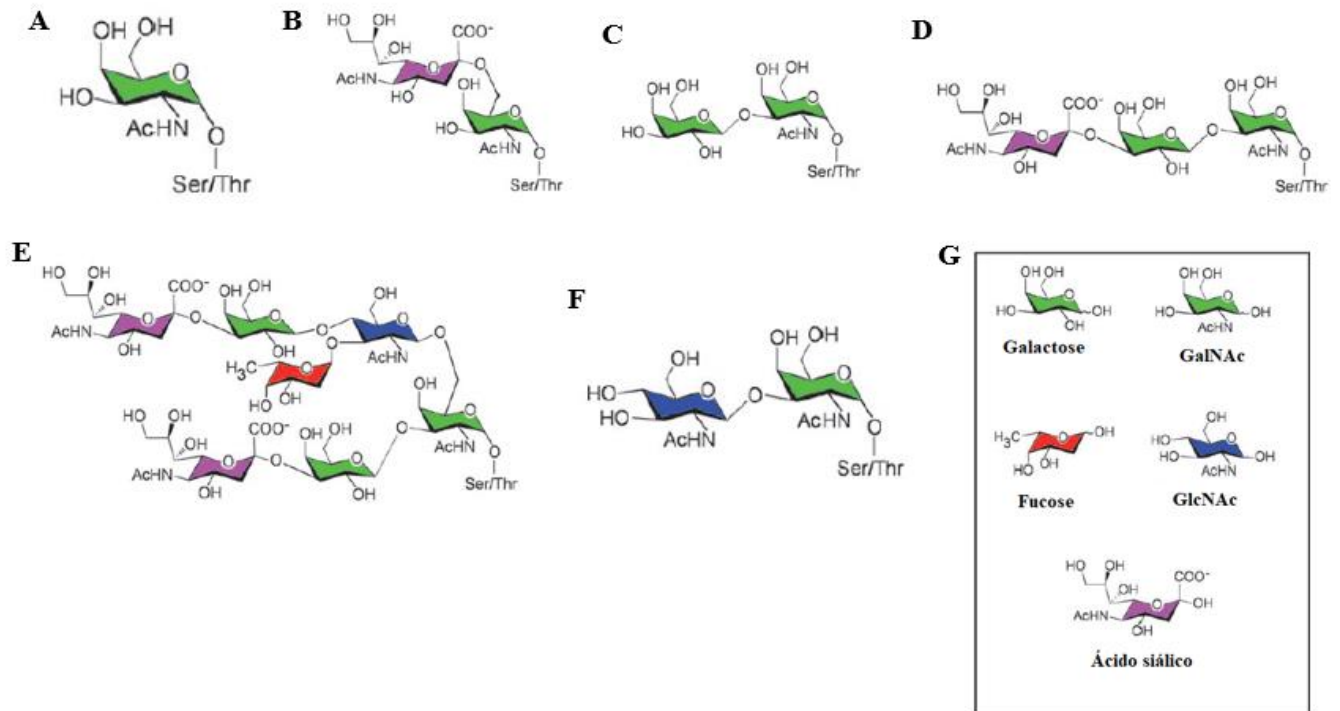
Dentre as alterações no padrão de glicosilação que são características de várias linhagens tumorais, destaca-se a superexpressão do antígeno Tn – explicado a seguir. Springer



*et al.* (1974) relataram alta expressão deste antígeno em mais de 90% dos tipos de carcinomas de mama, além de ter sido constatado por vários outros estudos que esta mesma molécula era também superexpressa em cerca de 10-90% nos tumores cervicais, de bexiga, ovário, cólon, pulmão, estômago e de próstata (SPRINGER, 1984, 1997; DESAI, 2000), enquanto que as células sadias apresentavam pouca ou nenhuma expressão. Além disso, alguns trabalhos associam este maior nível de expressão com o potencial metastático apresentado por alguns tipos de cânceres, como adenocarcinomas de pulmão (LAACK; NIKBAKHT; PETERS, 2002), câncer cervical (INOUE *et al.*, 1990; NUMA *et al.*, 1995), carcinomas colorretais (KONNO *et al.*, 2002), carcinomas gástricos (KAKEJI *et al.*, 1991) e carcinomas de mama (WELINDER *et al.*, 2013).

O antígeno Tn é formado pela adição de GalNAc a um resíduo de serina ou treonina em uma ligação  $\alpha$ -glicosídica (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr), sendo um tipo de *O*-glicosilação. O antígeno Tn é um precursor comum de vários *O*-glicanos (Fig. 3) e, uma vez que é formado no complexo de Golgi, ele pode servir como acceptor para pelo menos três tipos de glicosiltransferases também localizadas neste compartimento, sendo a modificação mais comum a formação do antígeno T pela adição de unidades de galactose - processo dependente da ação da enzima T-sintase. A biossíntese da T-sintase é dependente de uma chaperona, a proteína Cosmc, localizada no retículo endoplasmático. Durante a biossíntese da T-sintase, acredita-se que a Cosmc se ligue à T-sintase recém-sintetizada, previna sua agregação e posterior degradação via proteassoma, além de auxiliar no seu enovelamento nativo (JU; OTTO; CUMMINGS, 2011; FU *et al.*, 2016).

**Figura 3.** Representação esquemática do antígeno Tn e de seus *O*-glicanos derivados. A – antígeno Tn; B – antígeno sialil-Tn; C – antígeno Tn; D – antígeno sialil-T; E – *O*-glicano *core* 2 expressando antígeno sialil-Le<sup>x</sup>; F – *O*-glicano *core* 3; G – indicação de cada carboidrato no esquema.



Adaptado de Ju; Otto; Cummings (2011).

Atualmente, sabe-se que uma das bases moleculares que levam a uma maior expressão de antígeno Tn é a ausência de uma Cosmc funcional, principalmente devido a mutações no seu gene, resultando em um tipo de *O*-glicosilação incompleta (JU; OTTO; CUMMINGS, 2011). Assim como ocorre em alguns tipos de tumores humanos, observou-se que a linhagem de fibrosarcoma de camundongos expressa antígeno Tn como resultado da deleção de aminoácidos em Cosmc, já a linhagem de neuroblastoma de camundongos também expressa o antígeno pois o gene de sua Cosmc contém uma mutação que leva à produção de um códon de parada prematuro (SCHIETINGER *et al.*, 2006).

Uma vez que o antígeno Tn não é expresso em abundância em células saudáveis, sua detecção prévia é de extrema importância. Dentre as ferramentas utilizadas para fazê-lo, podem ser utilizados métodos químicos, métodos baseados em anticorpos e em lectinas (JU; OTTO; CUMMINGS, 2011).

### 1.3. Lectinas

Dentre as ferramentas disponíveis para se desvendar as informações contidas no glicocódigo das células, as lectinas merecem destaque. As lectinas são proteínas, ou glicoproteínas, ubíquas, que se ligam a carboidratos de maneira reversível e sem alterar sua estrutura, sendo as moléculas que conseguem melhor distinguir entre diferentes oligossacarídeos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; SHARON; LIS, 2004). Apesar da enorme variedade de carboidratos encontrados na natureza, a maioria das lectinas reconhece, principalmente: manose, glicose, galactose, *N*-acetilglicosamina (GlcNAc), *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), fucose e ácido *N*-acetilneuramínico, assim como seus derivados (SHARON; LIS, 2004).

#### 1.3.1. Lectinas vegetais

Na natureza, lectinas são conservadas na história evolutiva como famílias homólogas de proteínas. A função das lectinas em diferentes organismos é bastante diversa e baseia-se na sua capacidade de reconhecer carboidratos, seja em superfícies celulares ou seja em solução. Uma vez que carboidratos são específicos a determinados tipos de linhagens celulares ou a determinados tipos de tecidos, uma das funções das lectinas é discriminar o “próprio” do “não-próprio” no contexto da resposta imune inata (SHARON; LIS, 2004).

Existem duas teorias sobre quais funções as lectinas desempenham nas plantas. A primeira assume que essas proteínas são essenciais no estabelecimento da relação mutualística entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas leguminosas (HIRSCH *et al.*, 2001); a segunda, que engloba mais plantas além das leguminosas, admite que as lectinas vegetais atuem como proteínas de defesa contra diferentes tipos de patógenos, como fungos e insetos. Além disso, são armazenadas como proteínas de defesa, sendo mobilizadas quando as plantas sofrem herbivoria ou são atacadas por parasitas (VAN DAMME *et al.*, 1998). Brill *et al.* (2001) ainda sugerem que as lectinas possuam funções importantes no desenvolvimento embrionário das plantas (SHARON; LIS, 2004).

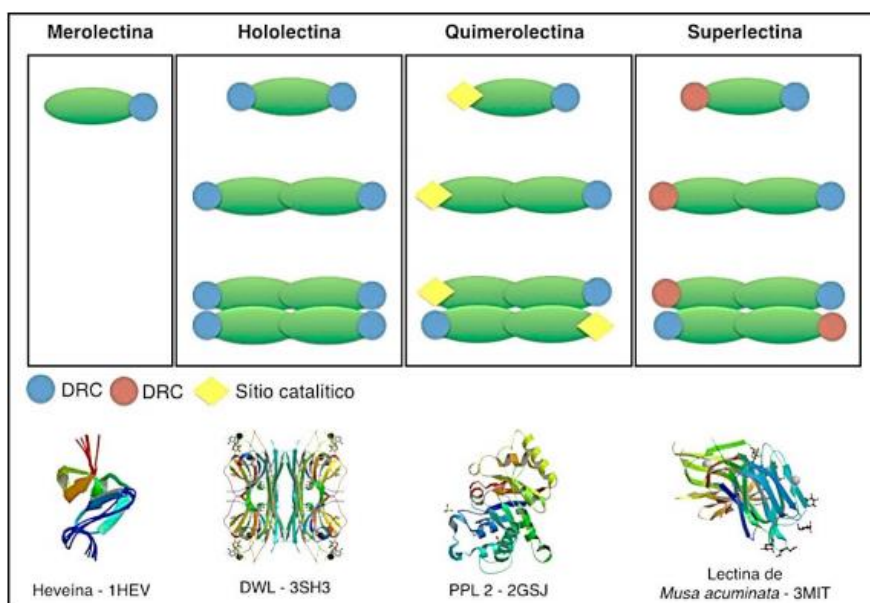
As bactérias da família dos rizóbios se ligam às raízes quando encontram os pêlos radiculares no solo e, a partir daí, desenvolvem-se vários eventos nas raízes da planta hospedeira, como deformação e dobramento dos pêlos radiculares, início da divisão celular, formação de linhas de infecção e nodulação. Ainda que vários dos mecanismos moleculares por trás desses eventos não sejam conhecidos, acredita-se que, para iniciarem, é necessário que haja uma associação altamente específica entre as bactérias e a superfície dos pêlos radiculares da planta (SHARON; LIS, 2004).

Por meio de experimentos que observaram a toxicidade de algumas lectinas vegetais perante insetos e outros animais, e de que causam inibição do crescimento de fungos, hipotetizou-se que uma outra função predominante dessas proteínas nas plantas seria a de defesa contra patógenos. Observou-se que animais de laboratório sofreram de hiperplasia e hipertrofia do intestino delgado ao ingerirem PHA e, uma vez que foram apresentados a ela novamente como fonte alimentar, foram relutantes em comê-la e preferiram passar fome. Também foi observado que plantas cujas cascas possuem um alto teor de lectinas, como sabugueiros (pertencentes ao gênero *Sambucus*) e acácia-bastarda (*Robinia pseudoacacia*) nunca são atacados por roedores (SHARON; LIS, 2004). Da mesma forma, observou-se que as lectinas WGA, PNA e SBA inibem a esporulação e o crescimento de fungos como *Trichoderma viride*, *Penicillium notatum* e *Aspergillus niger* (MIRELMAN *et al.*, 1975; CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991).

### 1.3.2. Classificação estrutural e evolutiva das lectinas vegetais

As lectinas vegetais nativas apresentam uma grande diversidade estrutural. Essas diferenças podem se dar devido a modificações pós-traducionais ou à associação entre duas ou mais subunidades (protômeros). Essas lectinas, portanto, subdividem-se, com base em sua estrutura geral, em: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS *et al.*, 2001) (Fig. 4).

**Figura 4.** Representação esquemática da classificação das lectinas vegetais de acordo com Peumans *et al.* (2001).



Fonte: Osterne (2016).

### **1.3.2.1. Merolectinas**

As merolectinas são proteínas que consistem, apenas, de um domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD). São proteínas monovalentes e, dessa forma, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. O maior exemplo dessa classe são proteínas ligantes de quitina, que possuem um domínio heveínico (PEUMANS *et al.*, 2001).

### **1.3.2.2. Hololectinas**

É a classe à qual pertence a maioria das lectinas vegetais. As hololectinas, embora sejam compostas por apenas um tipo de CRD, este domínio se repete pelo menos duas vezes ou é muito similar. Por conta de serem *di*- ou multivalentes, elas podem aglutinar células e precipitar glicoconjugados (PEUMANS *et al.*, 2001).

### **1.3.2.3. Superlectinas**

As superlectinas são uma classe especial de hololectinas. Elas consistem de, pelo menos, dois CRDs, que não são idênticos ou similares, mas que reconhecem açúcares estruturalmente diferentes. Um exemplo é a lectina do bulbo da tulipa (TxLCI), que contém dois CRDs, em que um reconhece manose e o outro reconhece GalNAc (PEUMANS *et al.*, 2001).

### **1.3.2.4. Quimerolectinas**

As quimerolectinas não são constituídas apenas por CRDs. Além do tradicional CRD, elas possuem um domínio não-relacionado ao CRD com atividade catalítica - ou alguma outra atividade biológica. Dependendo do número de CRDs presentes em sua estrutura, essas lectinas podem atuar como merolectinas ou hololectinas (PEUMANS *et al.*, 2001).

Peumans *et al.* (2001) subdividem as lectinas vegetais em famílias de proteínas relacionadas evolutivamente e estruturalmente: (I) amarantinas, (II) lectinas ligantes a quitina contendo domínios do tipo heveína, (III) lectinas do floema de Curcubitaceae, (IV) lectinas relacionadas à jacalina, (V) lectinas de leguminosas, (VI) lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose e (VII) proteínas inativadoras de ribossomo do tipo 2. Dessas, a que merece maior destaque nesse trabalho são as lectinas de leguminosas.

### 1.3.3. Lectinas de leguminosas

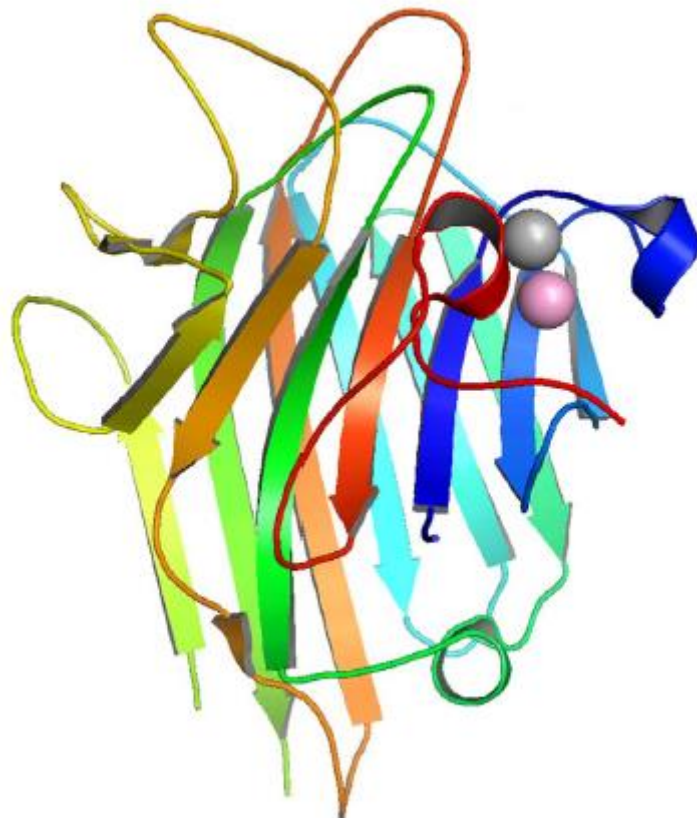
As lectinas de leguminosas pertencem a um vasto e homogêneo grupo de proteínas que reconhecem carboidratos. Várias lectinas desse grupo se tornaram ferramentas indispensáveis na pesquisa biológica e biomédica e são vastamente utilizadas como moléculas bioativas na pesquisa e medicina (VAN DAMME *et al.*, 1998). Até o presente momento, mais de uma centena dessas lectinas já foram isoladas e caracterizadas, de vários grupos taxonômicos e também de vários órgãos vegetais, embora as sementes sejam os órgãos mais tradicionais dos quais essas proteínas são purificadas, onde constituem cerca de 1 a 10% da quantidade de proteínas solúveis - podendo chegar até a 50% em algumas espécies (VAN DAMME *et al.*, 1998). Toda essa família de lectinas é constituída de protômeros de, aproximadamente, 30 kDa com cerca de 250-300 resíduos de aminoácidos por cadeia. A grande maioria das lectinas de leguminosas são proteínas *N*-glicosiladas, com geralmente dois glicanos por protômero. (PEUMANS *et al.*, 2001).

Geralmente, todas as lectinas de leguminosas consistem de dois ou quatro protômeros ligados de forma não-covalente. Todas são sintetizadas no retículo endoplasmático como pré-pró-proteínas. A clivagem do peptídeo sinal converte a pré-pró-lectina em pró-lectina, que é transportada, via complexo de Golgi, para os vacúolos de armazenamento proteico. Lá, ocorre a conversão em lectina madura pela remoção do pró-peptídeo localizado na porção C-terminal da cadeia polipeptídica (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Até o momento, várias lectinas de leguminosas já possuem sua estrutura tridimensional elucidada e os dados confirmam que todos os protômeros dessa família de lectinas são bastante similares quanto à sua conformação tridimensional. Os monômeros das lectinas de leguminosas possuem duas regiões de grande importância para a sua função. Uma delas é o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD, do inglês *carbohydrate recognition domain*) e a outra é o domínio de ligação a metais (do inglês, *metal binding site*). Neste, ligam-se cátions bivalentes, em que um é o  $\text{Ca}^{2+}$  e o outro é, geralmente,  $\text{Mn}^{2+}$ . O MBS é responsável por estabilizar resíduos que participam da formação do CRD. Estes dois domínios são altamente conservados entre as lectinas de leguminosas. O  $\text{Ca}^{2+}$ , por meio de uma molécula de água, interage com um resíduo de ácido aspártico localizado na base do CRD, estabilizando uma ligação *cis*-peptídica entre os resíduos Ala-Asp. Este resíduo de ácido aspártico na posição *cis* é responsável por direcionar e estabilizar o ligante ao CRD (LORIS *et al.*, 1998, 2004). Dentre todas as lectinas vegetais, as lectinas de leguminosas são as únicas classificadas como metaloproteínas (PEUMANS *et al.*, 2001).

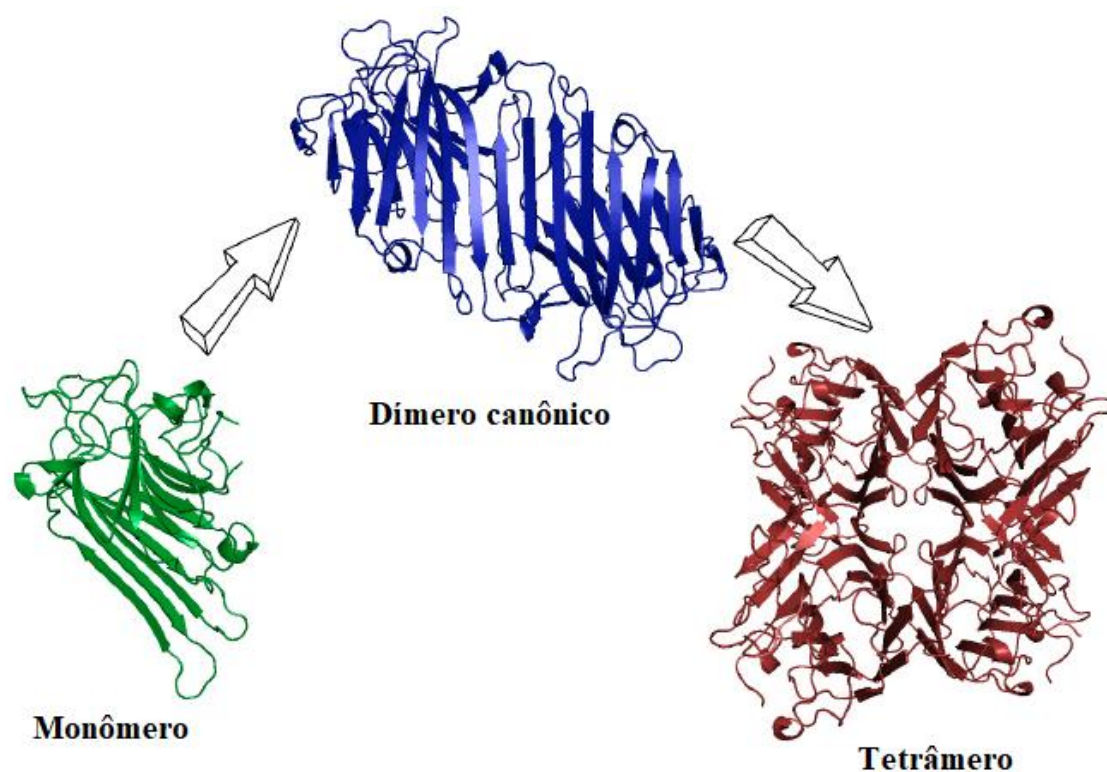
Estes protômeros possuem uma estrutura característica, o motivo *jellyroll* ou  $\beta$ -sanduíche (Figs. 5 e 6), formada por uma folha  $\beta$  curvada de sete fitas na parte frontal e uma folha  $\beta$  plana composta por seis fitas na parte traseira, interconectadas por voltas e rotações. Uma vez que as orientações das fitas antiparalelas de folhas- $\beta$  mudam de uma face para outra, uma estrutura altamente rígida é criada. O CRD é formado por quatro *loops* localizados na parte superior da estrutura (PEUMANS *et al.*, 2001). Nesta estrutura, não há presença de  $\alpha$ -hélice, 50% dos resíduos estão em regiões de *loops* e o principal sítio hidrofóbico está localizado entre as folhas traseira e dianteira (LORIS *et al.*, 1998). A maioria das lectinas de leguminosas são formadas por dois protômeros que interagem entre si num plano de simetria dupla. Como resultado disso, uma estrutura  $\beta$ -sanduíche de 12 fitas é formada na qual os dois monômeros se associam, formando o chamado dímero canônico (LORIS *et al.*, 1998). Esses dímeros podem interagir entre si, formando tetrâmeros (dímeros de dímeros) (CAVADA *et al.*, 2019) (Fig. 6).

**Figura 5.** Monômero da lectina de sementes de *Dioclea lasiocarpa*. O motivo *jellyroll* é evidenciado e as esferas representam os metais  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ .



Adaptado de Nascimento *et al.* (2017).

**Figura 6.** Oligomerização característica de lectinas de leguminosas.



Adaptado de Cavada *et al.* (2019).

As lectinas de leguminosas podem interagir com açúcares simples e complexos. A interação com açúcares simples e derivados aparentemente depende da presença de um sítio de interação com monossacarídeos na superfície do protômero. Esse grupo de lectinas pode, também, interagir com glicanos mais complexos, como oligossacarídeos *N*- e *O*-ligados presentes nas cadeias laterais de glicoproteínas. Entretanto, a família das lectinas de leguminosas são bastante heterogêneas com respeito à sua especificidade a açúcares, inclusive mais do que qualquer outra família de lectinas vegetais (PEUMANS *et al.*, 2001).

#### **1.3.4. O gênero *Bauhinia* e suas lectinas**

Dentro da família Fabaceae (subfamília Caesalpinioideae), o gênero *Bauhinia* abriga cerca de 300 espécies de plantas ornamentais, que são conhecidas como “pata-de-vaca” por conta do formato de suas folhas. Essas espécies são distribuídas ao longo de zonas tropicais, principalmente na África, Ásia e América do Sul, fazendo inclusive parte da medicina popular dos povos nativos dessas regiões (CECHINEL-FILHO, 2009). Extratos obtidos a partir de diferentes órgãos dessas plantas são utilizados como medicamentos contra várias enfermidades, como diabetes, inflamação, infecções e dor (NEGI; SHARMA; SINGH, 2012). Dentre as



moléculas bioativas já purificadas a partir dessas plantas, já se sabe que as lectinas fazem parte dessas moléculas que podem causar esses efeitos terapêuticos.

Até agora, já foram purificadas dez lectinas de plantas pertencentes a esse gênero, num total de sete diferentes espécies, como pode ser observado na Tabela 1. Dentre as lectinas de leguminosas, aquelas que são mais estudadas são as que pertencem à subfamília Papilionoideae. Até o momento, poucas lectinas da subfamília Caesalpinioideae foram purificadas e estudadas mais a fundo. Como exemplo, pode-se citar a lectina das sementes de *Delonix regia* (DRL) (GUPTA; NARULA; SRIVASTAVA, 2004), as três obtidas das sementes de *Cassia fistula* (CSL-1, CSL-2 e CSL-3) (ALI; SAYEEND; ABSAR, 2004), a das sementes de *Apuleia leiocarpa* (ApulSL) (CARVALHO *et al.*, 2014) e a de sementes de *Dialium guineense* (BARI *et al.*, 2013). Dessa forma, estudar lectinas de plantas da subfamília Caesalpinioideae representa um importante avanço no conhecimento acerca das lectinas de leguminosas, pois ainda é um grupo pouco estudado e pode fornecer informações valiosas acerca da evolução dessa classe de proteínas nas leguminosas, e também podem ter aplicações biotecnológicas completamente novas.

A BUL, objeto de estudo deste trabalho, já foi purificada a partir das sementes de *Bauhinia unguolata* (Fig. 7) e caracterizada parcialmente (SILVA *et al.*, 2013). Esta proteína detém forte atividade hemaglutinante contra sangue de coelho, sendo inibida pelos açúcares D-galactose (2.1 mM), lactose (0.96 mM) e N-acetil-D-galactosamina (0.63 mM). Em gel de eletroforese em poliácridamida na presença de SDS, a BUL apresenta-se como uma banda única, na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol e, de acordo com análises por espectrometria de massas, possui uma massa molecular média de  $28,583 \pm 2$  Da.

**Figura**                      7.                      *Bauhinia*                      *ungulata*.                      Fonte:  
<https://appverde.files.wordpress.com/2015/11/dsc07361.jpg>                      e  
<https://appverde.files.wordpress.com/2015/11/dsc07361.jpg>.



**Tabela 1.** Lectinas purificadas até o momento oriundas de diferentes espécies do gênero *Bauhinia*.

<b>Espécie</b>	<b>Fonte de purificação</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Sigla</b>	<b>Referência</b>
<i>Bauhinia bauhinioides</i>	Semente	$\alpha$ -Metil-D-galactopiranosídeo > D-galactose	BBL	SILVA <i>et al.</i> (2011)
<i>Bauhinia forficata</i>	Semente	N-acetil-D-galactosamina	BFL	SILVA <i>et al.</i> (2012)
<i>Bauhinia monandra</i>	Raiz	D-galactose, D-rafinose > estaquiose	BmoroL	SOUZA <i>et al.</i> (2011)
<i>Bauhinia monandra</i>	Folha	D-galactose, D-rafinose > alfa-Metil-D-galactopiranosídeo	BmolL	COELHO <i>et al.</i> (2000)
<i>Bauhinia purpurea</i>	Semente	N-acetil-D-galactosamina	BPA	OSAWA; IRIMURA; KAWAGUCHI (1978)
<i>Bauhinia unguolata</i>	Semente	N-acetil-D-galactosamina > D-galactose, D-lactose	BUL	SILVA <i>et al.</i> (2014)
<i>Bauhinia variegata</i>	Semente	$\alpha$ -D-Melibiose > D-galactose, ácido	BVL1 e BVL2 (isoformas)	PINTO <i>et al.</i> (2008)

		glucurônico		
<i>Bauhinia pentandra</i>	Semente	$\alpha$ -D-Melibiose > D-galactose, D-rafinose, D-lactose	BPL	DA SILVA; HORTA; MOREIRA (2001)
<i>Bauhinia variegata var. variegata</i>	Semente	D-Glucose, D-galactose, D-lactose, D-rafinose	BvvL	CHAN; NG (2014)
<i>Bauhinia variegata var. cãndida</i>	Semente	D-galactosamina > D-galactose > D-lactose	BvcL	SILVA <i>et al.</i> (2007)

#### 1.4. Aplicação biotecnológica de lectinas vegetais

Devido à capacidade de reconhecerem carboidratos e este reconhecimento desencadear uma série de processos biológicos, as lectinas podem ser extraídas dos seus organismos de origem para serem aplicadas como moléculas bioativas em outros organismos ou ainda serem produzidas em sua forma recombinante. As lectinas purificadas a partir de tecidos vegetais possuem uma enorme diversidade de aplicações biotecnológicas, como efeito inflamatório e de nocicepção, vasorrelaxamento, antiproliferativo, antimicrobiano, mitogênico, imunomodulatório, antidepressivo, neuroprotetor, inseticida, entre outros (CAVADA *et al.*, 2019).

##### 1.4.1. Aplicação biotecnológica das lectinas do gênero *Bauhinia*

Até o presente momento, várias lectinas obtidas a partir de diferentes fontes do gênero *Bauhinia* já foram purificadas (Tabela 1). A lectina de *Bauhinia bauhinoides* (BBL), por exemplo, demonstrou intenso efeito vasodilatador, possivelmente mediante liberação de óxido nítrico (SILVA *et al.*, 2011). Entretanto, a mesma lectina já demonstrou ter atividade anti-inflamatória, sendo provavelmente devido a um decréscimo causado na liberação de citocinas primárias, como TNF- $\alpha$  e IL-1b (BOUGHTON-SMITH *et al.*, 1993). A lectina purificada a

partir das folhas de *Bauhinia monandra* (BmolL) também demonstrou efeito anti-inflamatório em ratos por meio da adesão mediada por lectinas das células imunes no endotélio (GIRÃO *et al.*, 2015). Interessante destacar que esses resultados estão de acordo com o uso de algumas plantas do gênero *Bauhinia* na medicina tradicional para tratar inflamação, podendo essa atividade ser devido às suas lectinas (CAGLIARI *et al.*, 2018).

Outra atividade biológica já descrita para lectinas deste gênero é a anticoagulante. A lectina de *Bauhinia forficata* (BFL) demonstrou prolongar o tempo de coagulação em testes realizados *in vitro* ao atuar na via intrínseca da cascata de coagulação (SILVA *et al.*, 2012). Cabe notar que esta foi a única lectina dentre o gênero que apresentou tal atividade, que costuma ser incomum para lectinas de forma geral, pois parece não estar relacionada com a sua capacidade de reconhecer carboidratos (CAGLIARI *et al.*, 2018).

Uma atividade apresentada por lectinas desse gênero que merece citação é a inseticida. Algumas lectinas, ao serem ingeridas por insetos, causam interferência numa série de processos que envolvem digestão e assimilação de nutrientes e podem acabar comprometendo o desenvolvimento larval (MACEDO; OLIVEIRA, 2015). Observou-se que o consumo de pequenas quantidades da BmolL conseguiu diminuir a taxa de sobrevivência de *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* em 50%, além de ter conseguido diminuir o tamanho corporal de *Anagasta kuehniella* em 40% (MACEDO *et al.*, 2007). Esta lectina foi colocada na dieta de ratos e nenhum dano intestinal foi observado, o que pode indicar uma baixa toxicidade em humanos (CAGLIARI *et al.*, 2018).

Outra atividade apresentada por lectinas do gênero é a antifúngica, cujo mecanismo ainda não está completamente elucidado. Constatou-se que a lectina das sementes de *Bauhinia unguolata* (BUL) foi capaz de inibir cerca de 40% do crescimento do fungo *Fusarium solani*, conhecido por causar uma série de doenças em plantas, podendo ser inclusive patógeno humano devido à produção de algumas micotoxinas. A lectina das raízes de *Bauhinia monandra* (BmorolL) também apresentou esta atividade, levando a uma inibição de 30% no crescimento do mesmo fungo (CAGLIARI *et al.*, 2018).

Lectinas deste mesmo gênero podem apresentar, também, atividade imunomodulatória, que decorre do fato dessas proteínas interagirem com glicanos presentes na superfície das células do sistema imune, acarretando a produção de citocinas (SOUZA *et al.*, 2013). Esta atividade foi observada utilizando a lectina purificada a partir das sementes de *Bauhinia purpurea* (BPA) em modelo murino, em que foi possível constatar um aumento na produção de interleucina-2 (IL-2) pelas células-T do rato (IMAI; OSAWA, 1983).

Lectinas do gênero *Bauhinia* também podem ter um significado relevante no tratamento de feridas, mostrando-se como um método alternativo para acelerar o processo de cura. A lectina purificada a partir das sementes de *Bauhinia variegata* (BVL), quando aplicada de maneira tópica em feridas induzidas em ratos, e observou-se que esta proteína conseguiu acelerar o processo de regeneração tecidual, podendo futuramente vir a ser utilizada como uma molécula cicatrizante em potencial (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2011). Outra atividade apresentada pela BVL é a de inibição de biofilmes formados pelas bactérias *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguis*, que podem causar cárie dental (KLAFKE *et al.*, 2013). Acredita-se que essa inibição seja causada mediante a interação desta lectina com os glicoconjugados presentes na superfície dessas bactérias, que desempenham um papel crucial na formação do biofilme (CAGLIARI *et al.*, 2018).

Essas lectinas são potenciais marcadores para tipos específicos de células, capazes de distinguir, por exemplo, células tumorais de células saudáveis. Experimentos realizados por Sarker *et al.* (1993; 1994) demonstraram que a BPA conseguiu se ligar ao centro germinativo de linfócitos e macrófagos de tonsilas neoplásicas de pacientes afetadas com tonsilite; e também a células neoplásicas de adenoma folicular tireoideano, enquanto exibia fraca interação com células saudáveis do mesmo tecido.

#### **1.4.1.1. Aplicação de lectinas como ferramentas na pesquisa oncológica**

##### **1.4.1.1.1. Aplicação de lectinas como moléculas de atividade antitumoral**

Uma vez que, como já comentado, alterações no padrão de glicosilação da superfície celular podem ser um indicativo de carcinogênese, lectinas podem ser utilizadas nesse caso como drogas antitumorais ou como ferramentas para diagnóstico precoce de alguns tipos de cânceres. Sua possível utilização como drogas antitumorais para terapia alternativa é bastante valiosa, pois resulta na diminuição de efeitos colaterais associados aos tratamentos clássicos com agentes adjuvantes durante quimioterapia e radioterapia (LIU *et al.*, 2010).

Os mecanismos pelos quais as lectinas vegetais podem exercer atividade antitumoral são diversos, embora os principais são aqueles que induzem a morte celular programada nas células. A apoptose, também chamada de morte celular programada do tipo 1, é caracterizada pela condensação do citoplasma e do núcleo, fragmentação do DNA, imersão da cromatina na periferia nuclear, contração celular, formação de bolhas (“*blebbing*”) e fagocitose (HENGARTNER, 2000). Em relação às lectinas de leguminosas, já foi observado que a concanavalina A (ConA) conseguiu induzir apoptose em uma linhagem de células de

macrófagos PU5-1.8 (SUEN *et al.*, 2000) e em uma linhagem de células de melanoma humano A375, causando colapso do potencial transmembrana mitocondrial, ativação da caspase e ativando apoptose mediada pela mitocôndria (LIU *et al.*, 2009). Outra lectina de leguminosa capaz de induzir morte celular em tumores é aquela obtida a partir das raízes de *Sophora flavescens* (SFL). Foi observado que a SFL realizou esse mecanismo de uma forma caspase-dependente contra uma linhagem de células HeLa (LIU *et al.*, 2008).

A autofagia é um processo que, junto à apoptose, participam da morte celular programada em mamíferos. A autofagia é uma forma de resposta a condições estressantes, como privação de nutrientes, calor, estresse oxidativo, acúmulo de dano em organelas e componentes celulares anormais. Assim, esse processo é responsável pela eliminação de componentes tóxicos, assim como também pela reciclagem de nutrientes que auxiliem a sobrevivência das células, sendo assim um componente importante para o suicídio de células tumorais (LEVINE; KLIONSKY, 2004). A indução de apoptose e autofagia por parte das lectinas vegetais conectam-se entre si ao induzir células cancerosas à morte

A lectina obtida a partir da semente de *Bauhinia forficata* (BFL) apresentou efeito citotóxico contra linhagens de célula MCF7 de câncer de mama, mediante indução de morte celular dependente da inibição de caspase-9 e fragmentação do DNA, levando a uma parada no ciclo celular em G2/M. Observou-se também, que no mesmo ensaio, houve redução da adesão dessa linhagem celular a moléculas da matriz extracelular que são envolvidas na progressão do câncer, como laminina, fibronectina e colágeno tipo 1 (SILVA *et al.*, 2014). Essa mesma lectina demonstrou atividade similar para outras linhagens de células tumorais, como a linhagem de melanoma LOX IMVI em cerca de 95%, e em pelo menos 50% contra as linhagens A549/ATCC (câncer de pulmão), OVCAR-8 (câncer de ovário), RXF 393 (câncer renal), T-47D (câncer de mama) (CAGLIARI *et al.*, 2018). Importante salientar que, ainda em relação à BFL, sua forma recombinante foi testada contra o painel NCI-60 Human Tumor Cell Line screen, que contém 60 diferentes linhagens de câncer, e observou-se que ela apresentou efeito citostático contra várias das linhagens (LUBKOWSKI *et al.*, 2017). Além da BFL, outras duas lectinas pertencentes ao mesmo gênero apresentaram atividade antitumoral. A lectina obtida a partir das sementes de *Bauhinia variegata* (BVL) apresentou redução de crescimento em cerca de 50% contra as linhagens MCF7 e HepG2 (hepatoma) (LIN *et al.*, 2008) e a lectina obtida a partir das sementes de *Bauhinia unguolata* (BUL) exibiu efeito antiproliferativo de forma dose-dependente contra a linhagem de células de adenocarcinoma de cólon HT-29 (SILVA *et al.*, 2014).

#### **1.4.1.1.2. Aplicação de lectinas como biossensores**

A prevenção é a abordagem mais lógica para lidar com os diversos tipos de câncer, e uma das melhores formas de prevenir esta doença é conseguir detectar, de forma ainda precoce, as fases iniciais de um processo neoplásico em uma população de células, por diversos métodos. Dessa forma, há uma necessidade crescente de desenvolvimento de novos biomarcadores de câncer para realizar esse diagnóstico o quanto antes, a fim do tratamento ser iniciado o mais rápido possível (SILVA; RANGEL, 2017).

Devido ao já comentado fato de células de câncer apresentarem glicosilação alterada, alguns tipos de glicanos podem ser superexpressos, como o antígeno Tn, que surge a partir de uma *O*-glicosilação incompleta. Até o momento, já foram propostos alguns biossensores baseados em lectinas que conseguem detectar *O*-glicanos alterados. Dai *et al.* (2006) desenvolveram um biossensor baseado na lectina de *Arachis hypogaea* (PNA), capaz de reconhecer o epítipo do antígeno T, que é relacionado a alguns tipos de células de câncer. La Belle *et al.* (2007) desenvolveram outro biossensor, baseado na lectina de *Sambucus nigra* (SNA), capaz de detectar os glicoconjugados presentes nos epítipos dos antígenos T e sTn. Silva e Rangel (2017) desenvolveram um biossensor para antígeno Tn, baseando-se na lectina de *Vicia villosa*. Esses biossensores mostraram-se ferramentas eficazes na detecção de glicanos que são biomarcadores de câncer.

A utilização desses biossensores baseados em lectinas apresenta uma série de vantagens. Pelo fato de não serem completamente específicas - não detectarem apenas um tipo de glicoproteína, por exemplo -, podem detectar um amplo grupo de glicanos que são predominantes em alguns tipos de células de câncer, o que é importante para a sensibilidade do biossensor. Além disso, ao comparar os biossensores baseados em lectinas com aqueles baseados em anticorpos, aqueles mostram-se mais estáveis quimicamente do que estes. Uma outra vantagem ao se escolher esta categoria de biossensores em detrimento dos baseados em ferramentas imunológicas é que, uma vez que carboidratos são estruturas pouco imunogênicas, anticorpos desenvolvidos para detectar glicanos têm baixa afinidade se comparado o seu uso para detectar epítipos proteicos, por exemplo (SILVA; RANGEL, 2017).

### **1.5. Importância das ferramentas de bioinformática para o estudo da biologia estrutural de lectinas**

A função das proteínas nos organismos está diretamente relacionada à sua estrutura nativa e à sua dinâmica de interação com diferentes ligantes, como os carboidratos, por exemplo. Atualmente, a utilização de ferramentas de bioinformática permite o estudo da

estrutura de uma proteína (modelagem molecular por homologia), a sua afinidade por um determinado ligante (*docking* molecular) e como a interação dessa proteína com o ligante se comporta ao longo de uma faixa de tempo (dinâmica molecular).

Apesar do notável e significativo progresso da cristalografia de raios-X e outros métodos para resolver estruturas tridimensionais de proteínas, muitos receptores celulares de importância terapêutica não possuem sua estrutura resolvida. Essas estruturas são de grande interesse nas fases iniciais da descoberta de novas drogas e, uma vez indisponíveis por métodos experimentais, modelos tridimensionais baseados em modelagem comparativa são construídos.

A MMH pode fornecer uma estrutura tridimensional útil de uma proteína de interesse que é relacionada a uma estrutura de proteína conhecida. De acordo com Martí-Renom *et al.* (2000), duas condições devem ser satisfeitas para que uma proteína seja modelada por este método. Primeiramente, deve haver similaridade entre a sequência da proteína de interesse e a que será usada como modelo. A segunda condição é que um alinhamento correto seja calculado entre a proteína-alvo e o modelo. A MMH baseia-se, geralmente, em cinco passos: a procura estruturas de proteínas relacionadas à de interesse, seleção de um ou mais modelos (*templates*), alinhamento do modelo com a proteína-alvo, construção de um modelo tridimensional para a proteína-alvo, baseando-se em informações do *template* e validação deste. Atualmente, a modelagem comparativa tem sido usada para diversos fins, como o desenho de mutantes para testes sobre função, a identificação de sítios de ligação, predição de epítomos antigênicos, simulações de *docking*, entre outros (FISER; SALI, 2003).

Contudo, a MMH pode apresentar alguns problemas. Os erros mais frequentes da modelagem comparativa surgem quando há baixa similaridade entre a sequência-alvo e o *template*. Pode-se citar, por exemplo, erros relacionados ao empacotamento das cadeias laterais dos aminoácidos, distorções que ocorrem em regiões alinhadas corretamente, erros em segmentos da proteína-alvo que não possuem regiões equivalentes à estrutura do *template*, erros devido a um mal alinhamento e a utilização de *templates* incorretos, que geralmente possuem menos de 25% de identidade de sequência (MARTÍ-RENOM *et al.*, 2000).

Avaliando-se a estrutura de uma proteína obtida por modelagem, pode-se prever várias de suas características. Dentro dessas características, a predição de afinidade de um determinado composto por uma proteína e como este interage com o sítio de ligação desta é de extrema importância, sendo o princípio por trás do desenho de fármacos baseados em estrutura. Assim, o *docking* é uma ferramenta computacional que prediz a orientação de um ligante quando este se liga a um receptor ou a uma enzima, apresentando resultados por meio de valores de *score* (CHEN, 2015). Uma das áreas em que há maior vantagem de usar o *docking*



é a farmacologia de produtos naturais. Quando se realiza triagem virtual de vários compostos, a afinidade de ligação destes a uma proteína-alvo, medida por valores de escores de *docking*, é uma prioridade, pois permite ao pesquisador inferir quais desses compostos podem vir a apresentar bons resultados em pesquisas realizadas *in vitro* e *in vivo*.

Existem, atualmente, diversos softwares que podem ser empregados para se realizar *docking*. A maioria dos *softwares* disponíveis partem de abordagens ditas rígidas, em que consideram a proteína rígida, não havendo mudança nos ângulos e nos comprimentos das ligações. A abordagem utilizada neste trabalho, é a do *docking* rígido-flexível, que considera a proteína rígida enquanto interage com o ligante, que é flexível. Porém, esta abordagem requer um maior custo computacional. Bons *softwares* de *docking* devem possuir a capacidade de reproduzir de forma bastante acurada a afinidade de ligação experimental de uma proteína a um ligante e ranquear ligantes quanto às suas afinidades de ligação por meio de um determinado valor de escore (VERDONK *et al.*, 2003; CHEN, 2015).

Contudo, o *docking* pode apresentar alguns problemas. Dentre estes, os mais frequentes são a ligação inespecífica de um ligante a uma proteína-alvo, uma simulação de dinâmica molecular malsucedida mesmo quando uma proteína apresentou alto valor de escore por um determinado ligante, pouca clareza em testes de fármacos cujo objetivo é saber se o composto que está sendo testado é um agonista ou um antagonista ou, ainda mesmo, inconsistência entre resultados obtidos por *docking* e ensaios realizados *in vitro* ou *in vivo* (CHEN, 2015).

As simulações de dinâmica molecular, por fim, são utilizadas quando se deseja avaliar a interação entre uma proteína e ligante de maneira mais aprofundada, em que são avaliadas a estabilidade de interação e mudanças conformacionais ao longo do tempo (ADCOCK; MCCAMMON, 2006).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho consiste em determinar a estrutura tridimensional da lectina de sementes de *Bauhinia unguolata* (BUL) e avaliar sua afinidade de interação a diferentes ligantes por meio de ferramentas de bioinformática.

### 2.2. Objetivos específicos

- Busca da estrutura primária da BUL em banco de dados;
- Alinhar a sequência da BUL via *BLASTp* para encontrar alguma proteína com alta identidade de sequência e com estrutura tridimensional resolvida para utilizá-la como modelo;
- Alinhar a BUL com outras lectinas de alta similaridade;
- Utilização de modelagem molecular por homologia para gerar as possíveis estruturas tridimensionais da BUL;
- Avaliar os modelos gerados com base em vários parâmetros e selecionar o modelo representativo da BUL;
- Com o modelo definitivo selecionado, realizar *docking* molecular com os ligantes N-acetil-D-galactosamina,  $\alpha$ -lactose, antígeno Tn, peptídeos derivados do antígeno Tn,  $\alpha$ -L-fuc(1→3)[ $\beta$ -D-GalNAc(1→4)] $\alpha$ -D-GlcNAc e avaliar os valores de escore.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Modelagem molecular por homologia e alinhamento de sequências

O primeiro passo realizado consistiu em obter a estrutura primária da proteína (UniProt: Q2EN03 [17-253] - <https://www.uniprot.org/>). Uma vez obtida, esta sequência foi alinhada via *BLASTp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com várias proteínas presentes no banco de dados (PDB) e foi escolhida uma que apresentava alta identidade de sequência (modelo) e com uma estrutura tridimensional já resolvida. Essa estrutura tridimensional, depositada no PDB (<https://www.rcsb.org/>) (PDB ID: 1GSL), foi analisada quanto a alguns parâmetros, como resolução do modelo, geometria e presença de ligante.

Realizou-se um alinhamento entre a sequência da BUL e de três outras lectinas, dentre elas a que foi utilizada como modelo de homologia. Primeiramente, a estrutura primária da BUL foi inserida no *BLASTp* para procurar outras lectinas com elevado grau de similaridade de sequência. Em seguida, realizou-se um alinhamento múltiplo de sequência por meio do Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (SIEVERS *et al.*, 2011) entre a BUL (UniProt ID: Q2EN03), GSL (UniProt ID: P24146), lectina de *Phanera variegata* (UniProt ID: B2LYE8) e BFL-I (UniProt ID: P86993). O resultado obtido foi analisado no *software* ESPript 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) (ROBERT; GOUET, 2014).

O *software* MODELLER v 9.17 (WEBB; SALI, 2016) foi utilizado para gerar a estrutura tridimensional da BUL, utilizando a lectina de *Griffonia simplicifolia* (GSL) como modelo (PDB ID: 1GSL). Este *software* gera modelos baseados em homologia que satisfazem restrições espaciais. O programa gerou 200 modelos, dos quais foram escolhidos 8 baseados nos melhores valores de escore de *molpdf* e *DOPE*. Em seguida, utilizou-se as ferramentas de avaliação de modelo e de estrutura proteica presentes no *Swiss Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>) (BIASINI *et al.*, 2014) para avaliar os parâmetros Qmean (BENKERT; TOSATTO; SCHOMBURG, 2008) e *Z-score* (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2010), a fim de realizar validação dos modelos. A estrutura selecionada sofreu uma minimização energética de 100 passos de *steepest descent* e 10 passos de *conjugate gradiente* utilizando-se o *software* UCSF Chimera v. 1.13 (PETTERSEN *et al.*, 2004).

Além disso, utilizou-se as ferramentas *Verify 3D* (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992) para correlacionar a estrutura primária com a terciária da proteína, *PROCHECK* (LASKOWSKI *et al.*, 1993) para avaliar a aceitação do ambiente das cadeias laterais de aminoácidos e o *Swiss Model* para avaliar os parâmetros geométricos. Após todas essas

validações, o melhor modelo dentre os oito gerados foi utilizado para representar a estrutura tridimensional da BUL.

### 3.2. *Docking* molecular

A fim de avaliar a capacidade da BUL em interagir com diferentes carboidratos, realizou-se simulações de *docking* molecular. Para tal, utilizou-se o software GOLD, v. 5.5 (CDCC, Cambridge, England). A vantagem em utilizá-lo consiste no fato de que ele testa várias conformações dos ligantes, enquanto permite uma flexibilização parcial dos resíduos da proteína (JONES *et al.*, 1997). Além disso, uma característica do *software* é de se basear em um algoritmo genético. Os seguintes parâmetros foram utilizados no programa: 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 *crossover* de 95, número de posições de 20 e PLANTPLP como função de escore (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009). As menores posições de energia foram escolhidas combinando-se os escores de *docking*, penalidades de geometria do ligante, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (ÁVILA *et al.*, 2017; HECK *et al.*, 2017; XAVIER *et al.*, 2016; HEBERLE; AZEVEDO, 2011).

Após identificar o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) por superposição com a estrutura-modelo, suas coordenadas foram utilizadas como centro da aplicação do algoritmo do programa e o *docking* foi realizado utilizando os seguintes ligantes:  $\alpha$ -L-fuc(1 $\rightarrow$ 3)[ $\beta$ -D-GalNAc(1 $\rightarrow$ 4)] $\alpha$ -D-GlcNAc (um trissacarídeo), N-acetil-D-galactosamina,  $\alpha$ -lactose, antígeno Tn e peptídeos derivados do antígeno Tn (PDB ID: 5T5L e 5T5O – estrutura mostrada adiante no texto). A fim de saber quais ligantes seriam utilizados para realizar o *docking*, adotou-se como padrão os ligantes utilizados por Lubkowski *et al.* (2017) em seu trabalho sobre análise estrutural de uma lectina de *Bauhinia forficata*. Todos os ligantes foram gerados e energeticamente minimizados utilizando o *Carbohydrate builder server* (Woods Group, Glycan Web, University of Georgia at Athens, GA, <http://glycam.org>) e o campo de força GLYCAM\_06 (KIRSCHNER *et al.*, 2007), respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

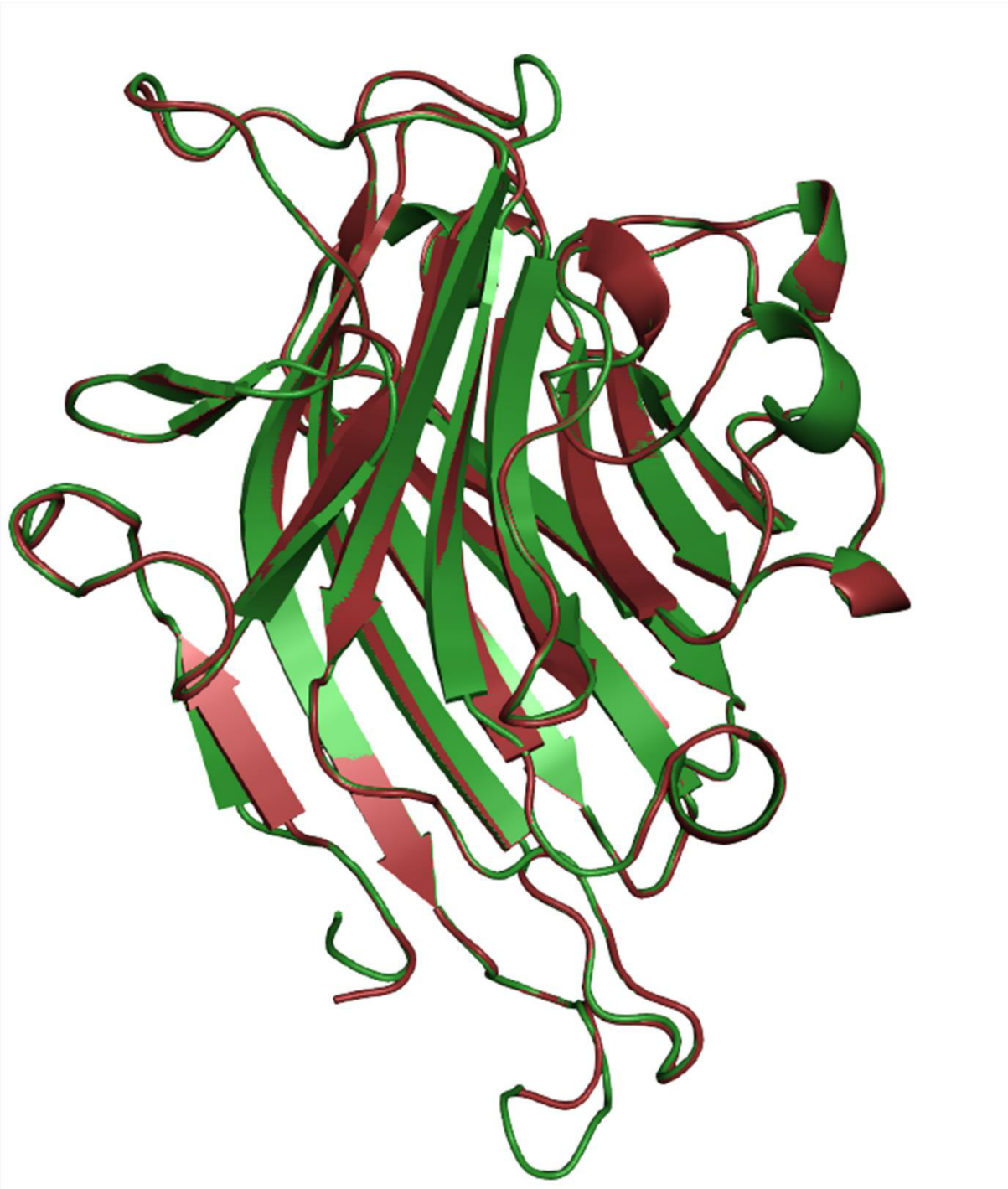
### 4.1. Modelagem da estrutura tridimensional da BUL

O modelo que melhor representa a estrutura tridimensional da BUL foi escolhido com base em alguns parâmetros de validação. A estrutura escolhida como modelo de homologia foi a lectina de *Griffonia simplicifolia* (PDB ID: 1GSL), uma planta também pertencente à subfamília Caesalpinioideae e que apresenta 70,17% de identidade de sequência com a BUL e possui estrutura tridimensional já resolvida. Em relação ao alinhamento (Fig. 8), além de observar enorme similaridade de sequência, também foi visto que domínios importantes, como o CRD e o MBS compartilham resíduos entre as lectinas alinhadas. Realizou-se, também, a sobreposição de estruturas tridimensionais entre a BUL e a GSL (*template*) (Fig. 9).

Os valores de *molpdf* e *DOPE score* foram, respectivamente, 1494,53 e -29050,97. Dentre as ferramentas utilizadas para validação do modelo gerado, o *Verify 3D* relatou que 95,75% dos resíduos de aminoácidos possuem escores maiores que 0.2, sugerindo que o ambiente das cadeias laterais é aceitável. O *Swiss-Model* demonstrou valores de QMEAN6 = -1,57, QMEAN4 = -1,84 e *Z-score* = 0,702. Esses valores são considerados suficientemente adequados para um modelo de boa qualidade. A análise com PROCHECK revelou que os parâmetros geométricos estão dentro da normalidade. O gráfico de Ramachandran revelou que 88,9% dos resíduos de aminoácidos estão dentro de regiões favorecidas e 10,2% em regiões permitidas, além de haver 3 cis-peptídeos.



**Figura 9.** Superposição das estruturas tridimensionais da BUL (em verde) e da GSL (vermelho rubro) em *cartoon*.



O modelo gerado apresentou o motivo *jellyroll* ou enovelamento  $\beta$ -sanduíche (Fig. 10), característico de lectinas de leguminosas. Esse motivo consiste em uma folha- $\beta$  antiparalela de seis fitas parcialmente estendida e outra folha curvada, antiparalela, com 7 fitas. As duas folhas  $\beta$  são conectadas por *loops* e este tipo de enovelamento é estabilizado por interações não covalentes entre as folhas e dois núcleos hidrofóbicos (CAVADA *et al.*, 2018). Até o momento,

apenas uma única lectina de *Bauhinia* (BFL-I) foi caracterizada estruturalmente a nível de estrutura terciária, que também possui o enovelamento característico do tipo  $\beta$ -sanduíche (LUBKOWSKI *et al.*, 2017). Importante notar que este tipo de enovelamento é tão conservado que, apesar das diferenças marcantes de estrutura primária entre BFL-I e BFL-II, este arranjo estrutural é compartilhado entre as duas lectinas (PINTO *et al.*, 2019).

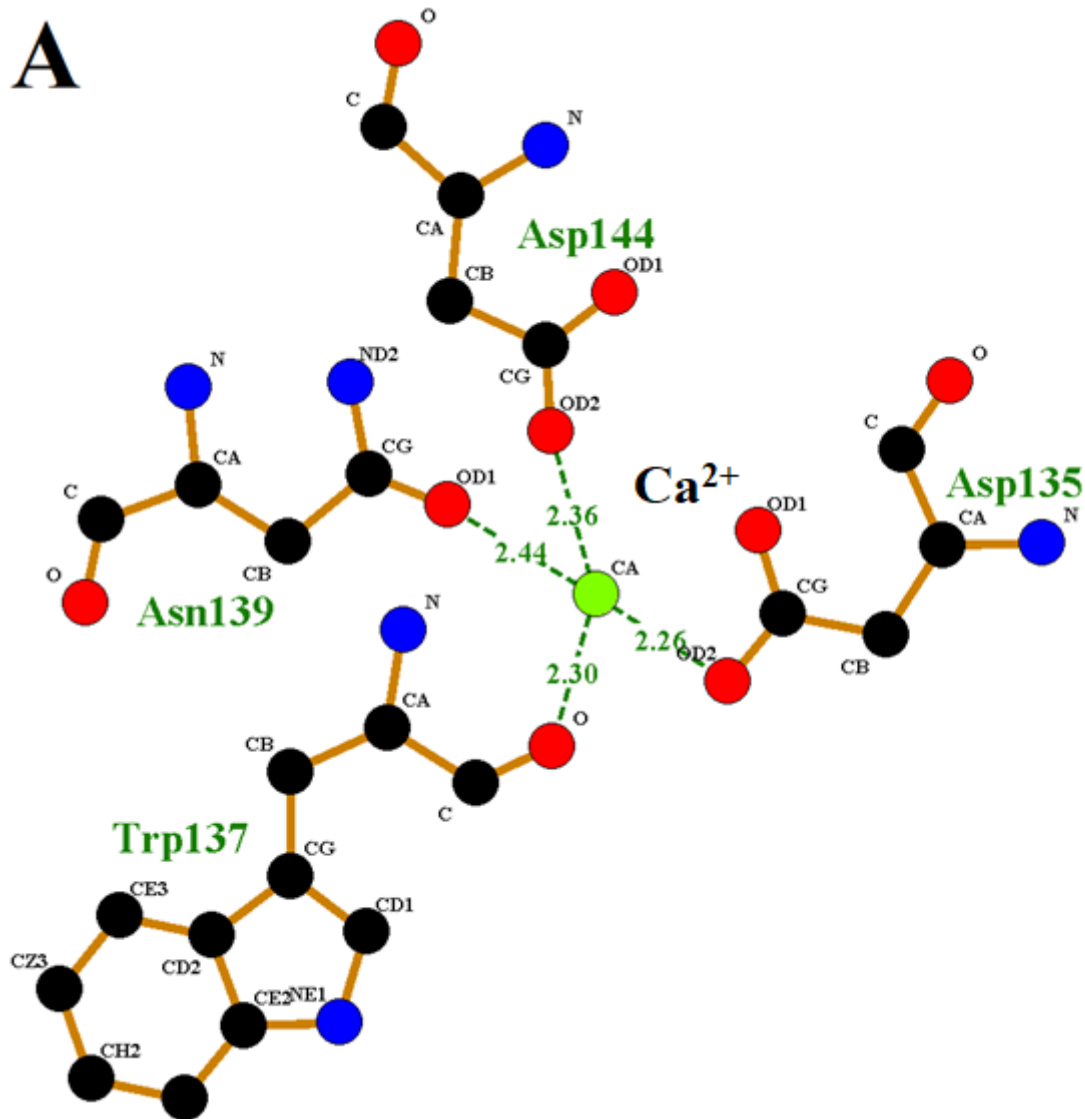
**Figura 10.** Representação da estrutura tridimensional obtida a partir de modelagem por homologia da BUL. As esferas de coloração verde e roxa representam os metais.

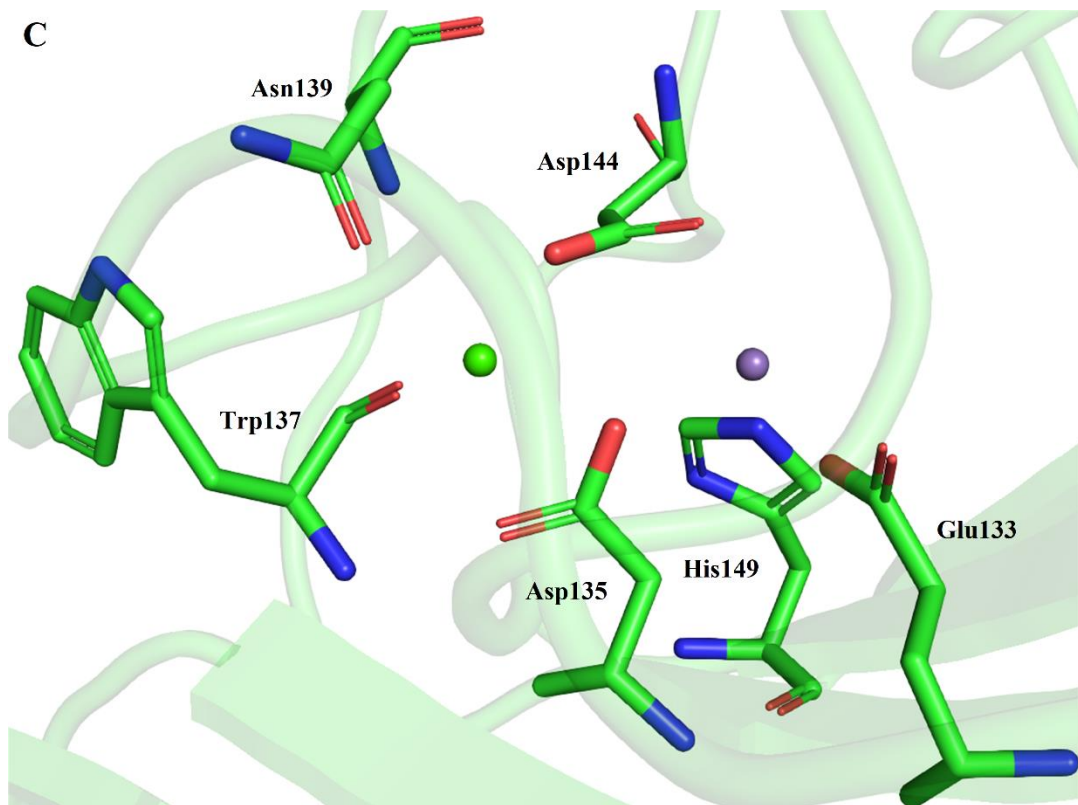
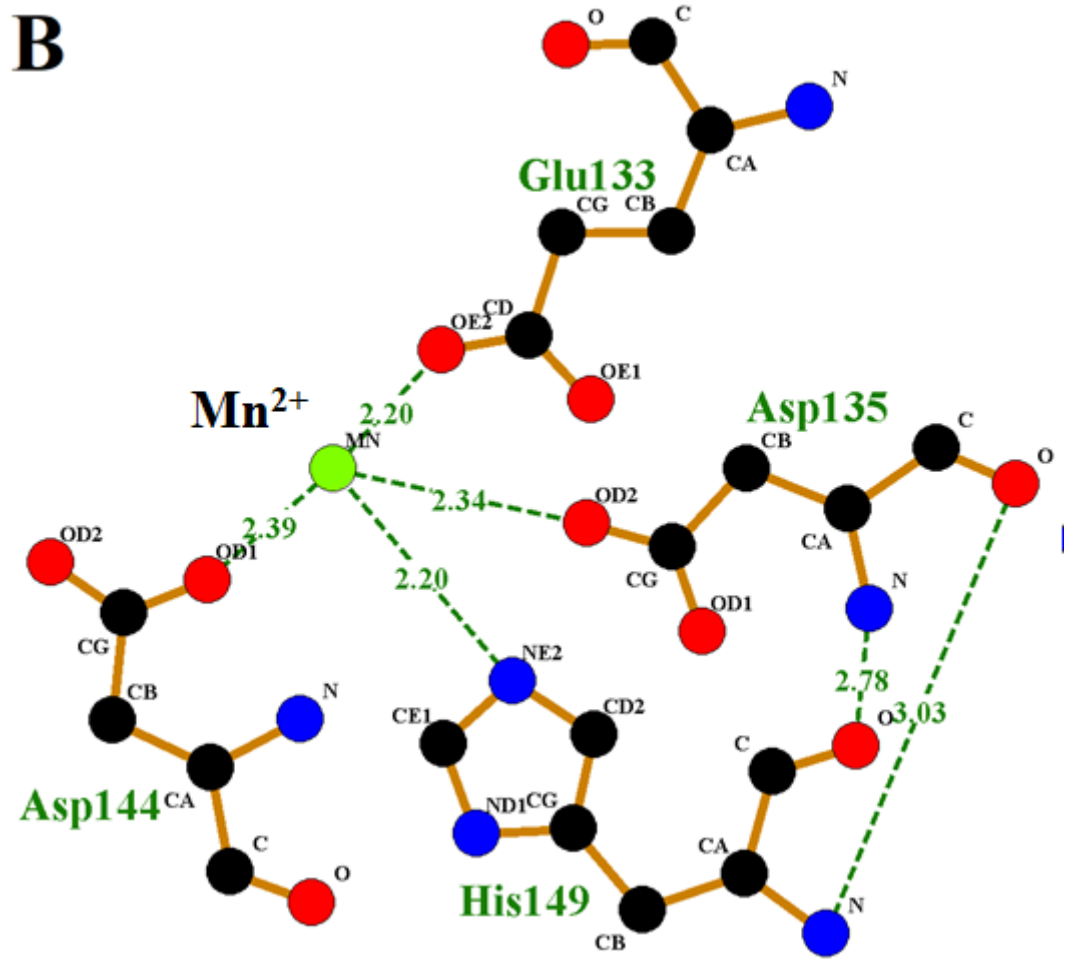


Em relação ao sítio de ligação a metais, os resíduos de aminoácidos da BUL que interagem com  $\text{Ca}^{2+}$  são Asp135, Trp137, Asn139 e Asp144, enquanto os que interagem com  $\text{Mn}^{2+}$  são Glu133, Asp135, Asp144 e His149 (Fig. 11). Entretanto, embora a maioria das lectinas de leguminosas sejam metaloproteínas, dependendo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  nos seus sítios de ligação, a maioria das lectinas de *Bauhinia* não parecem ser dependentes desses cátions. Até o momento, apenas a BPL, BPA e BUL foram relatadas por possuírem atividade hemaglutinante dependente de metais (CAGLIARI *et al.*, 2018).



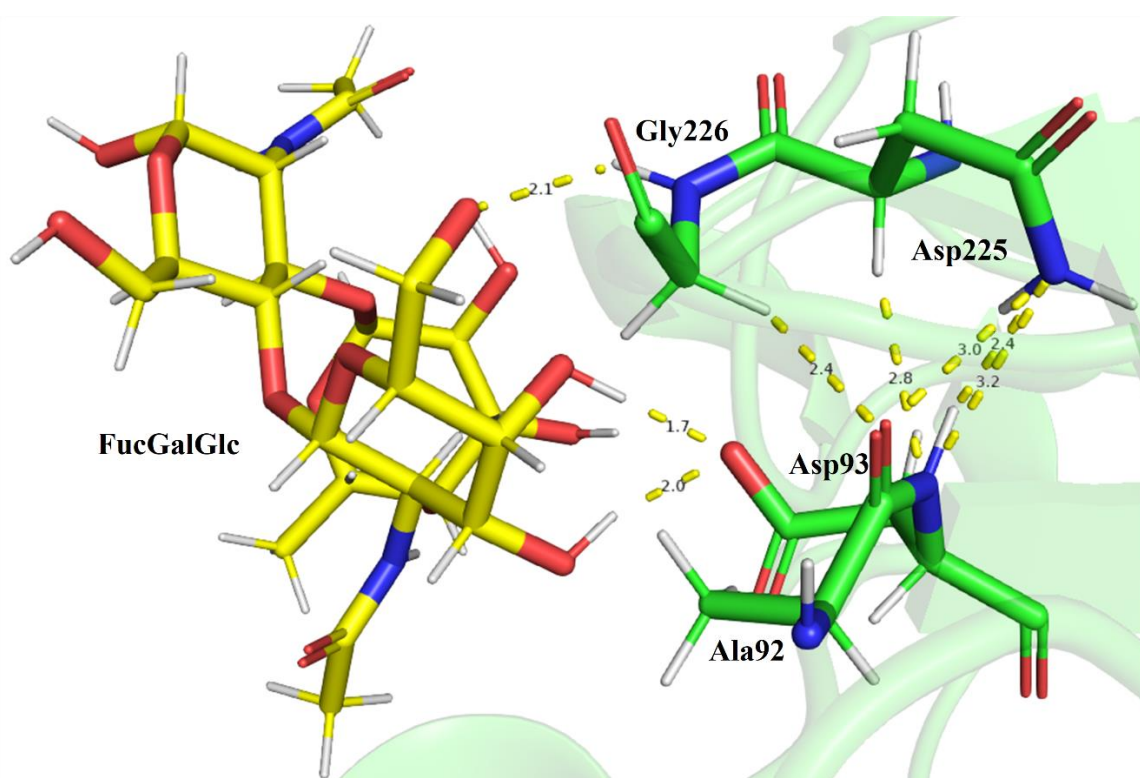
**Figura 11.** Resíduos de aminoácidos da BUL que interagem com metais. Representação bidimensional dos resíduos de aminoácidos que interagem com  $\text{Ca}^{2+}$  (A) e  $\text{Mn}^{2+}$  (B) por meio do *software* LigPlot e representação tridimensional destes resíduos por meio do *software* PyMOL (C).





A análise da estrutura tridimensional da BUL mostra que ela possui três *cis*-peptídeos, localizados entre os resíduos Val87-Pro88, Ala92-Asp93 e Asp225-Gly226. Em relação ao primeiro, observa-se que embora esteja próximo ao CRD, ele não participa da interação com o ligante e não se pode afirmar que ele participe da formação da cavidade. No segundo *cis*-peptídeo, há presença do resíduo Asp93, que é a base do CRD e participa da interação com o ligante. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  interage com este resíduo por meio de uma molécula de água – não mostrado aqui pois a estrutura foi modelada no vácuo -, estabilizando a ligação *cis*-peptídica em questão (Ala92-Asp93) e levando este *cis*-peptídeo a interagir com o terceiro (Asp225-Gly226) e estabilizá-lo, de forma que ele irá também interagir com o ligante. É válido observar que a interação entre o segundo e terceiro *cis*-peptídeos se dá tanto pela cadeia lateral quanto pela cadeia polipeptídica principal (Fig. 12). A estrutura utilizada como modelo (GSL) também apresenta três *cis*-peptídeos.

**Figura 12.** Representação das interações entre os *cis*-peptídeos e o ligante  $\alpha\text{-L-fuc}(1\rightarrow3)[\beta\text{-D-GalNAc}(1\rightarrow4)]\alpha\text{-D-GlcNAc}$ , representado pela sigla FucGalGlc. Importante observar que o *cis*-peptídeo Ala92-Asp93, além de interagir com o ligante e exercer papel fundamental na formação do CRD, também estabiliza o outro *cis*-peptídeo (Gly226-Asp225), que também interage com o ligante.



Nas lectinas de leguminosas, é comum a ocorrência de uma ligação *cis*-peptídica em resíduos de ácido aspártico e, como já comentado, cátions divalentes são necessários para estabilizar a conformação funcional do sítio de ligação a carboidratos. Dessa forma, a presença do *cis*-peptídeo neste resíduo orienta a sua cadeia lateral de um jeito que o permite interagir com o ligante, e isso ocorre devido à estabilização realizada pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes cátions estão a 4,5 Å de distância e estão em ponte com dois resíduos de aspartato. O cálcio interage com duas moléculas de água e uma delas forma uma ponte com o grupo carbonila do resíduo de aspartato, que é precedido pela ligação *cis*-peptídica (LORIS *et al.*, 1998; PEUMANS *et al.*, 2001).

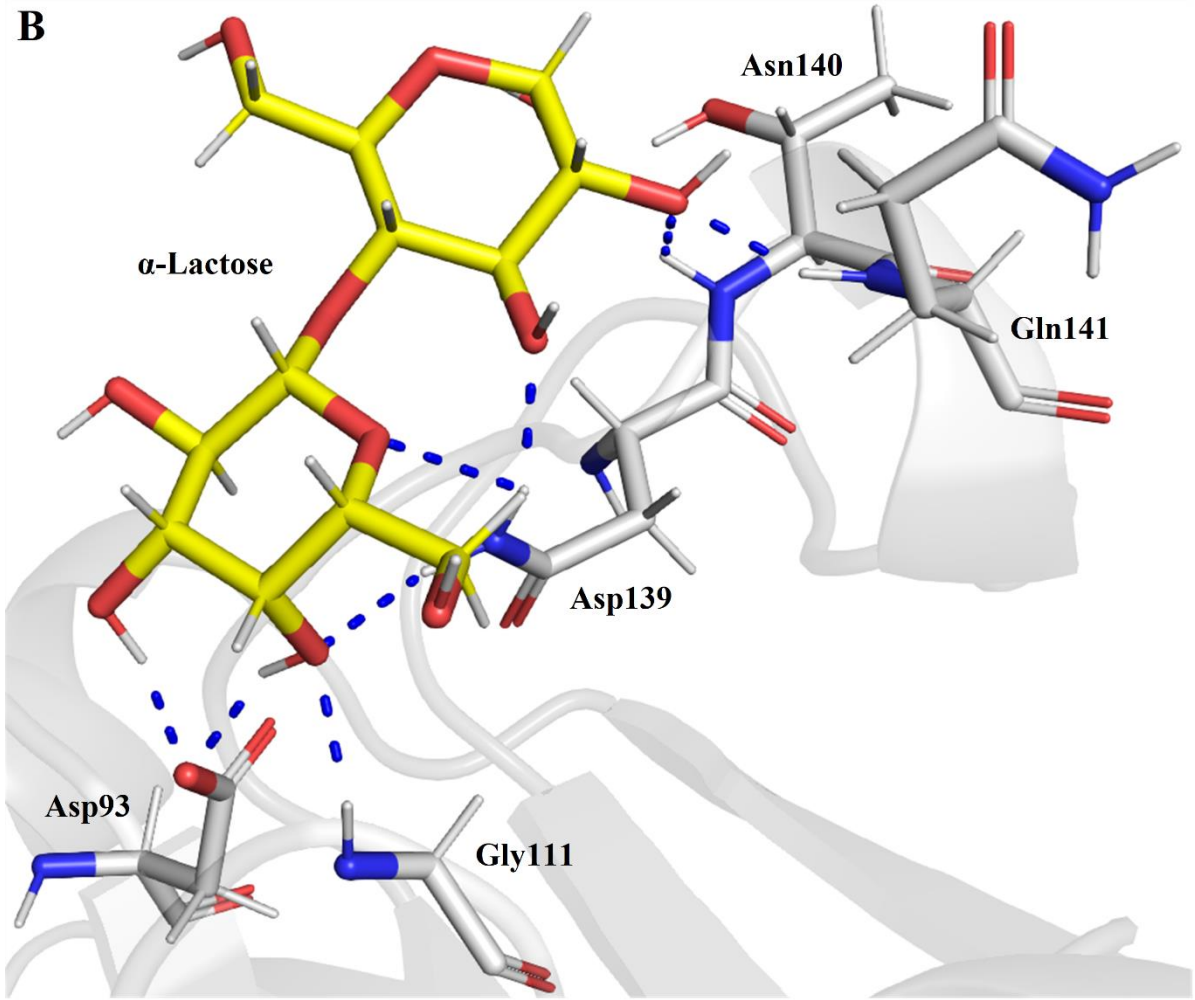
Na lectina Concanavalina A (ConA), por exemplo, o evento chave na ativação induzida por metais é a isomerização de *trans* para *cis* de uma ligação peptídica Ala-Asp (assim como na BUL) e a presença de metais ligados ao seu sítio é essencial para a formação de *loops* presentes neste próprio sítio, no CRD e na formação da ligação *cis*-peptídica entre os resíduos Ala207 e Asp208 (LORIS *et al.*, 1998).

#### 4.2. Docking molecular

Os valores de escores de *docking* obtidos para a BUL em interação com diferentes ligantes estão representados na Tabela 3. A BUL apresentou um melhor escore nas interações com carboidratos mais complexos e o dissacarídeo (lactose); entretanto, é importante observar que ao analisar os ensaios de inibição de atividade hemaglutinante realizados por Silva *et al.* (2014), nota-se que a BUL possui maior afinidade a GalNAc do que a lactose, embora o valor de escore indique o contrário. Silva *et al.* (2014) relataram atividade antifúngica para a BUL, principalmente contra fungos do gênero *Fusarium* e contra *Aspergillus niger*. Dentre as moléculas que estão associadas à virulência de fungos do gênero *Aspergillus*, algumas delas estão presentes na parede celular, como galactomananas, complexos de proteína com galactomananas, sintetases de quitina etc (REMENTERIA *et al.*, 2005), o que pode explicar a interação da BUL a fungos deste gênero. Inclusive, há relatos de lectinas específicas a D-galactose e GalNAc que já foram utilizadas para detectar *Aspergillus fumigatus* em tecidos humanos (LEAL *et al.*, 2012). Outras lectinas com a mesma especificidade a açúcares também já foram relatadas por se ligar a espécies deste gênero de fungo (BARKAI-GOLAN; MIRELMAN; SHARON, 1978; LEAL *et al.*, 2012). Os valores de escore para GALNAC e lactose também estão de acordo com a especificidade a açúcar de várias outras lectinas de *Bauhinia* que, de forma geral, são específicas a galactosídeos (CAGLIARI *et al.*, 2018). A representação da interação da BUL com lactose e com GalNAc estão representadas nas figs.

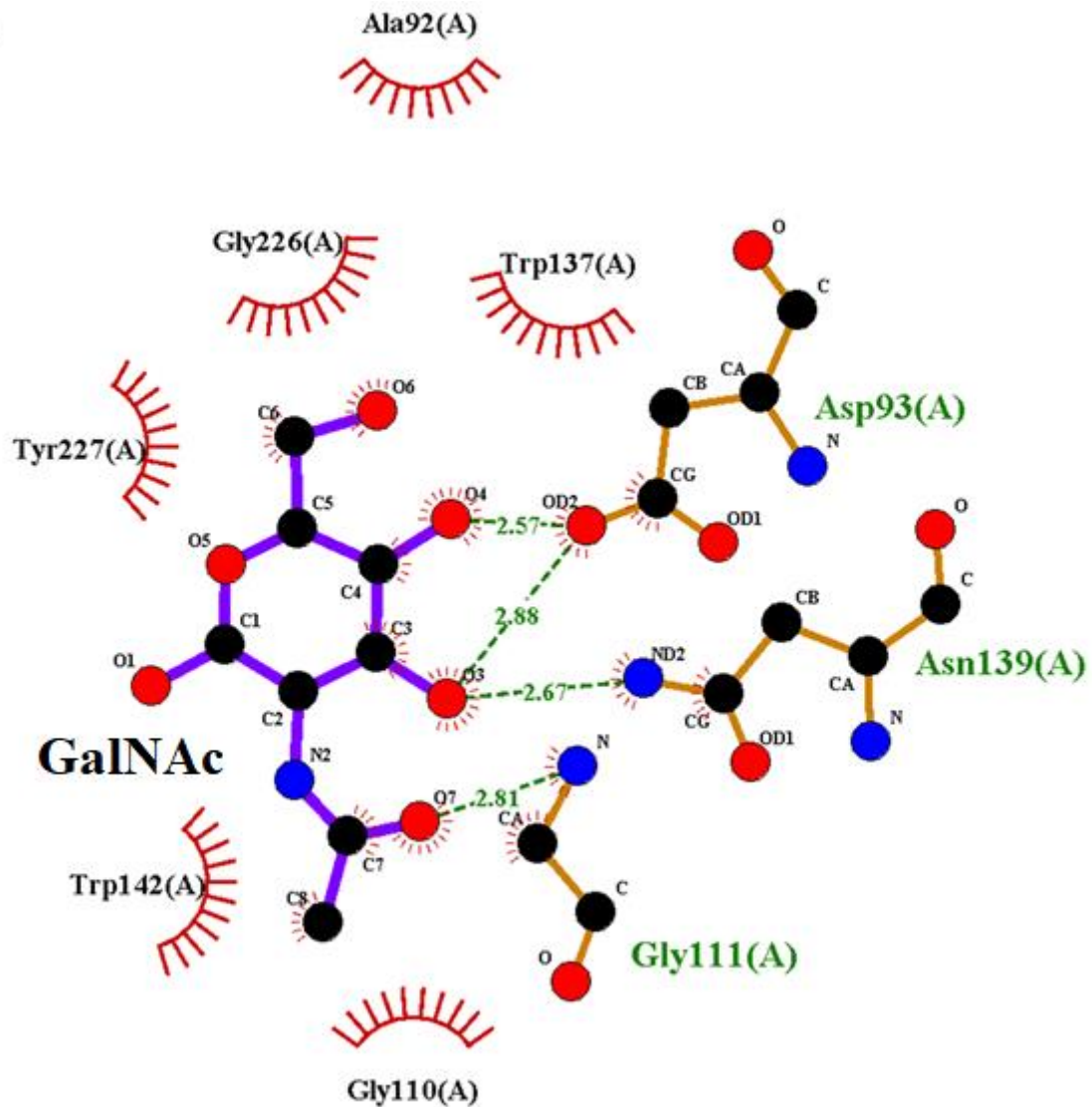


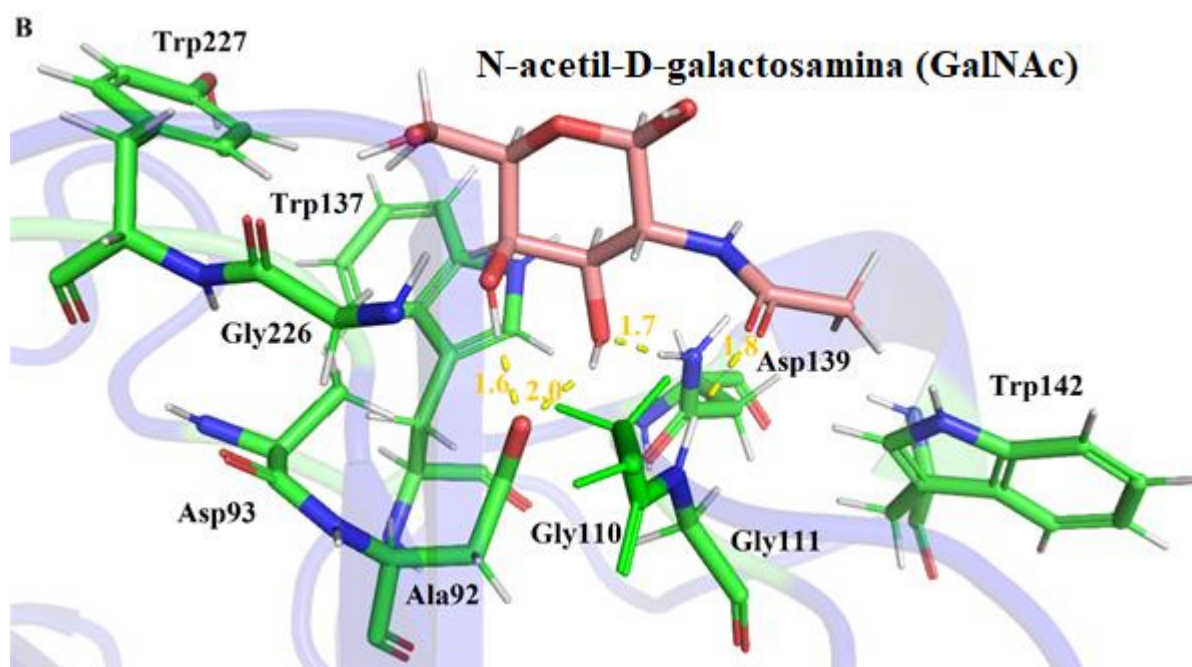
**B**



**Figura 14.** Representação bidimensional (LigPlot) (A) e tridimensional (PyMOL) (B) dos resíduos de aminoácidos que participam da interação com N-acetil-D-galactosamina (GalNAc).

**A**

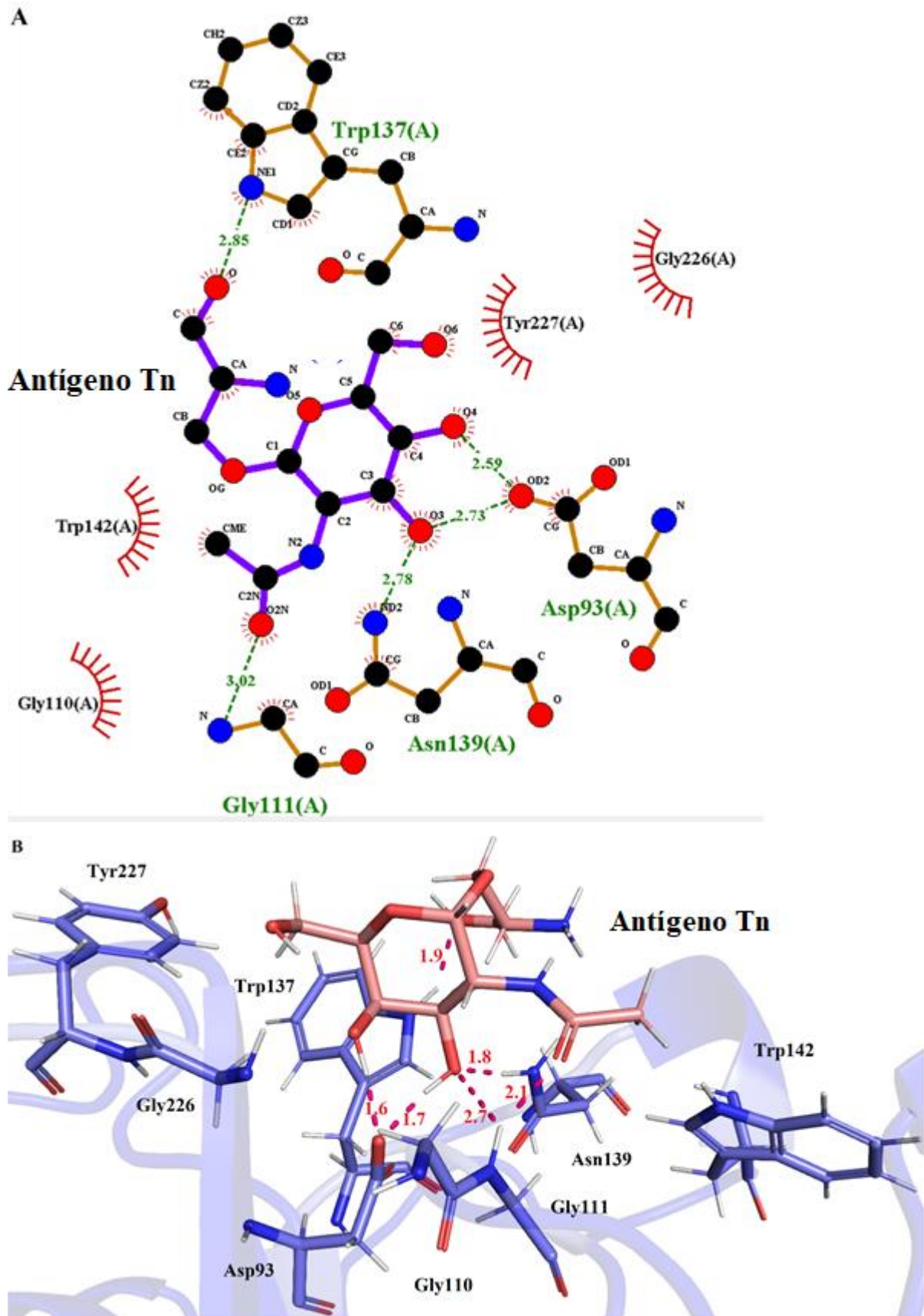




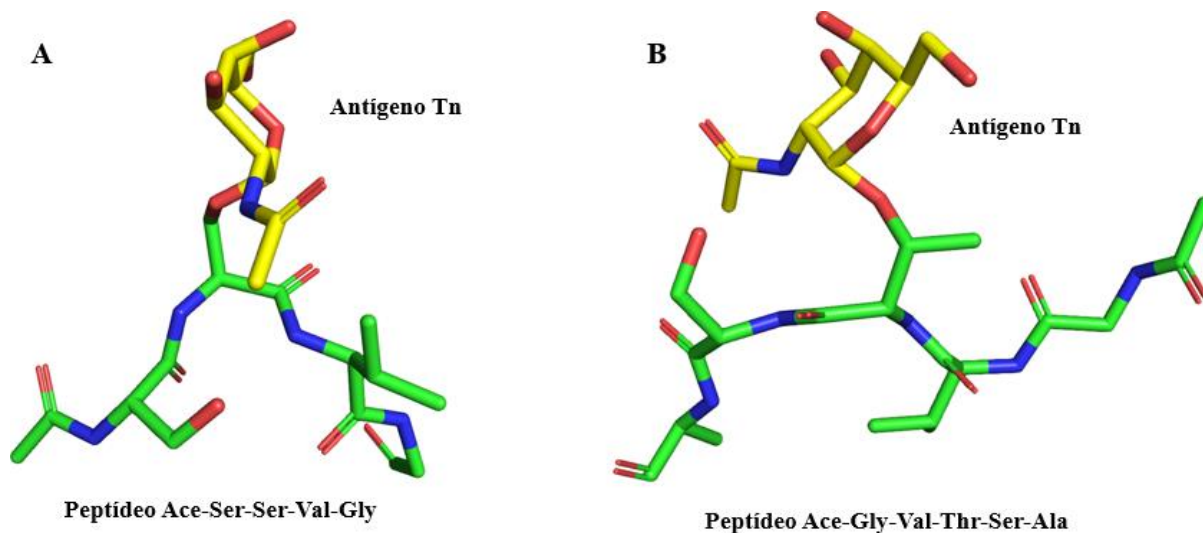
Em relação ao antígeno Tn, o valor de escore foi maior que para GalNAc, sugerindo uma forte afinidade a esta molécula. Como já comentado, este antígeno representa um caso de *O*-glicosilação incompleta e sua superexpressão pode ocorrer em algumas doenças, como certos tipos de cânceres e na síndrome Tn. Estruturalmente, o antígeno Tn é uma molécula de GalNAc ligada, por meio de uma ligação glicosídica do tipo  $\alpha$  a um resíduo de serina ou treonina em glicoproteínas. A afinidade da BUL a esta molécula se dá devido ao monossacarídeo *O*-ligado (Fig. 15). A BUL também apresentou considerável valor de escore para peptídeos derivados do antígeno Tn (Fig. 16), testados por Lubkowski *et al.* (2017) ao avaliar a atividade antiproliferativa da BFL.



**Figura 15.** Representação bidimensional (LigPlot) (A) e tridimensional (PyMOL) (B) dos resíduos de aminoácidos que participam da interação com o antígeno Tn.



**Figura 16.** Peptídeos derivados do antígeno Tn (PDB ID: 5T5L – A – e 5T5O – B).



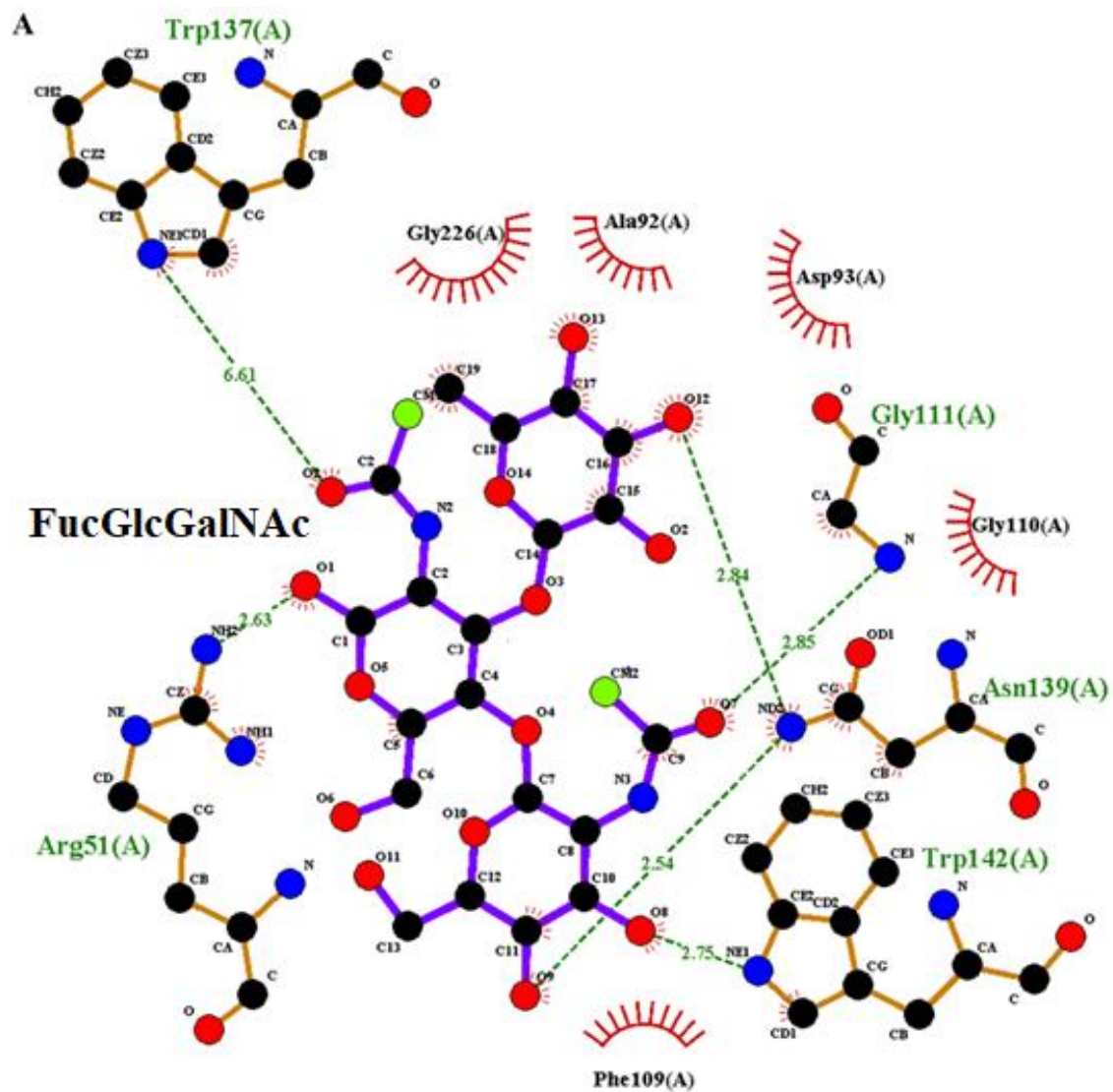
Por meio de um ensaio utilizando *glycan array*, Lubkowski *et al.* (2017) relataram que a forma recombinante da BFL possui intensa afinidade ao antígeno Tn, tendo se ligado a ele firmemente e apresentando valores de Kd variando entre 0,4 a 1,2 nM. Os autores observaram que, em alguns análogos de Tn em que o GalNAc era modificado, havia perda da afinidade da lectina por eles. Este resultado confirma a dependência do resíduo de GalNAc no antígeno Tn para haver a ligação específica da lectina, indicando que a BUL pode apresentar afinidade bastante similar frente a esses mesmos ligantes. Resultado similar pode ser encontrado para outras lectinas específicas a GalNAc e que também são específicas a antígeno Tn, como a lectina de *Dolichos biflorus* (DBA), de *Maclura pomifera* (MPL), de *Salvia horminum* (SHA), entre outros (JU; OTTO; CUMMINGS, 2011).

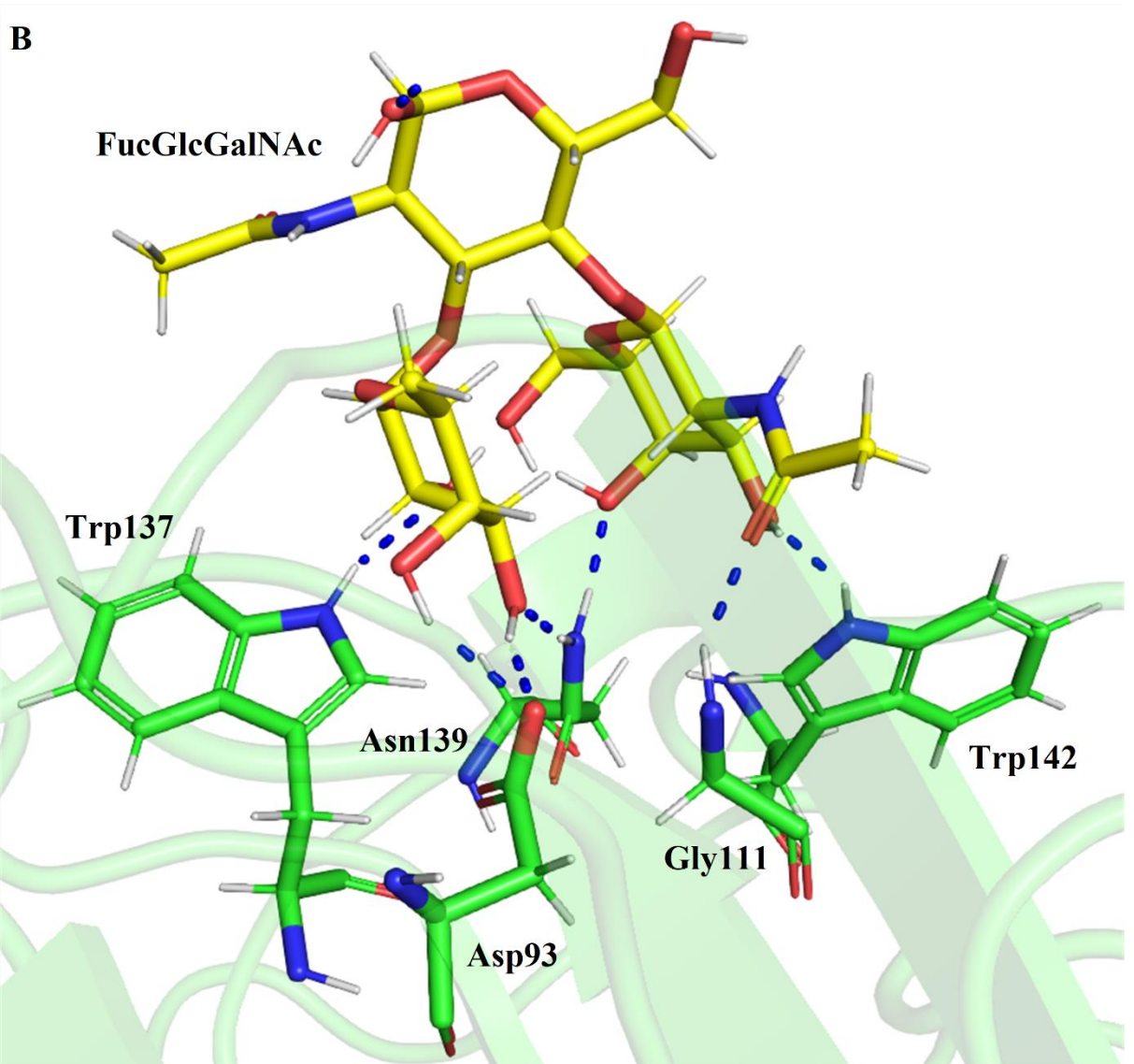
Esta potencial especificidade a antígeno Tn está de acordo com resultados encontrados por Silva *et al.* (2014). Os autores testaram a BUL contra uma linhagem de células HT-29 de adenocarcinoma de cólon e demonstraram que a lectina exerce efeito antiproliferativo de uma maneira dose-dependente, chegando a inibir cerca de 80% do crescimento de células viáveis. Importante notar que esta linhagem foi estudada por Yu *et al.* (2015), que observaram que ela possuía atividade deficiente da enzima T-sintase devido a uma alteração na expressão de Cosmc, levando a uma superexpressão de antígeno Tn. Essa expressão aberrante pode ser um indicativo da especificidade e efeito antiproliferativo que a BUL exerce sobre esta linhagem.

Ensaios de bancada utilizando *glycan array* com outras lectinas de *Bauhinia* (dados não mostrados) mostraram uma considerável interação destas com trissacarídeos contendo fucose.

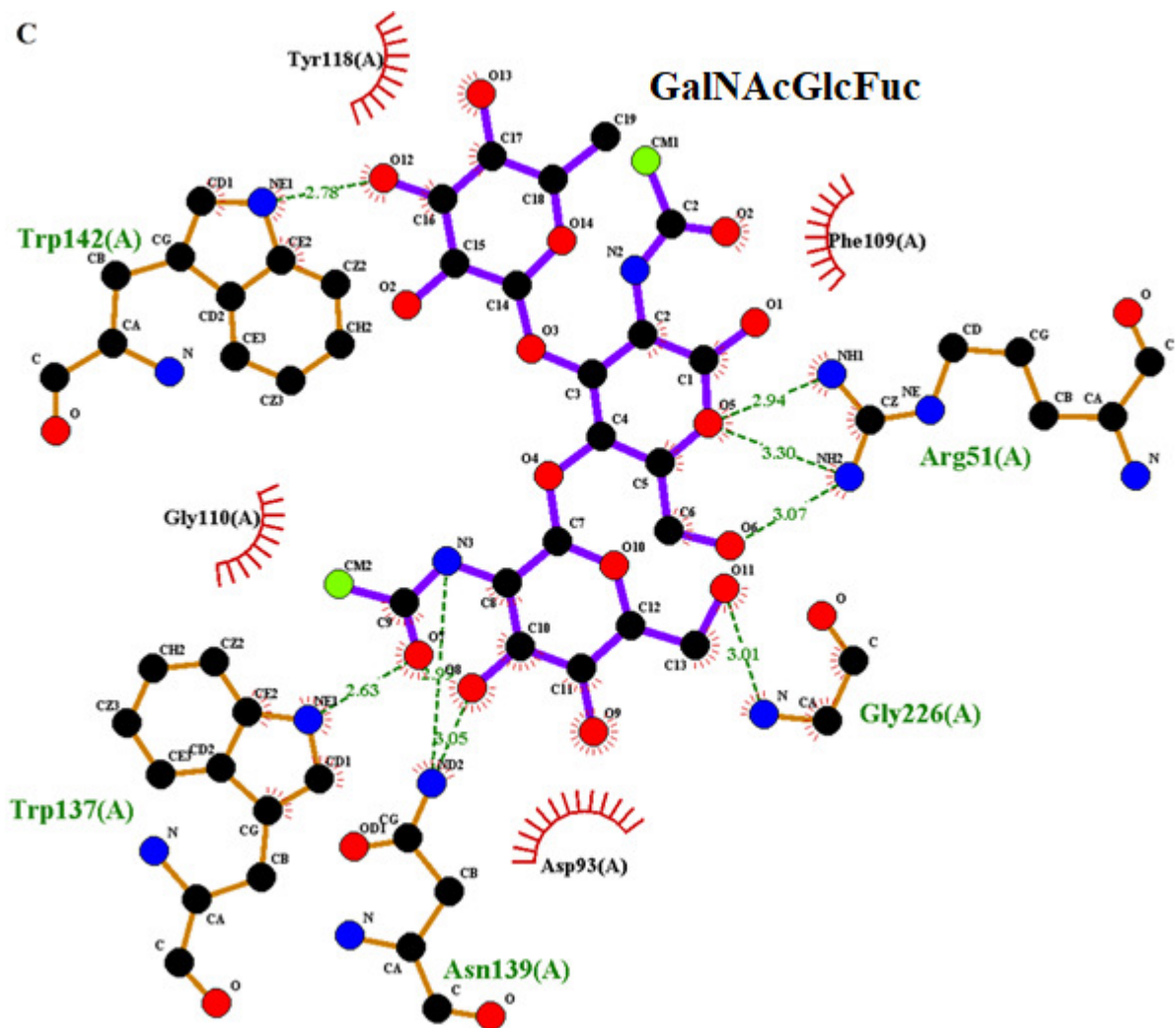
Dessa forma, um trissacarídeo contendo GalNAc, GlcNAc e fucose foi desenhado de duas maneiras para os ensaios de *docking*. Em uma delas, o açúcar interage com a BUL pela porção fucose (Fig. 17, a e b); na outra, interage pela porção GalNAc (Fig. 17, c e d). Os resultados mostram que houve forte interação a este trissacarídeo, em ambos os testes, embora o que tenha fucose na porção terminal tenha tido um maior valor de escore.

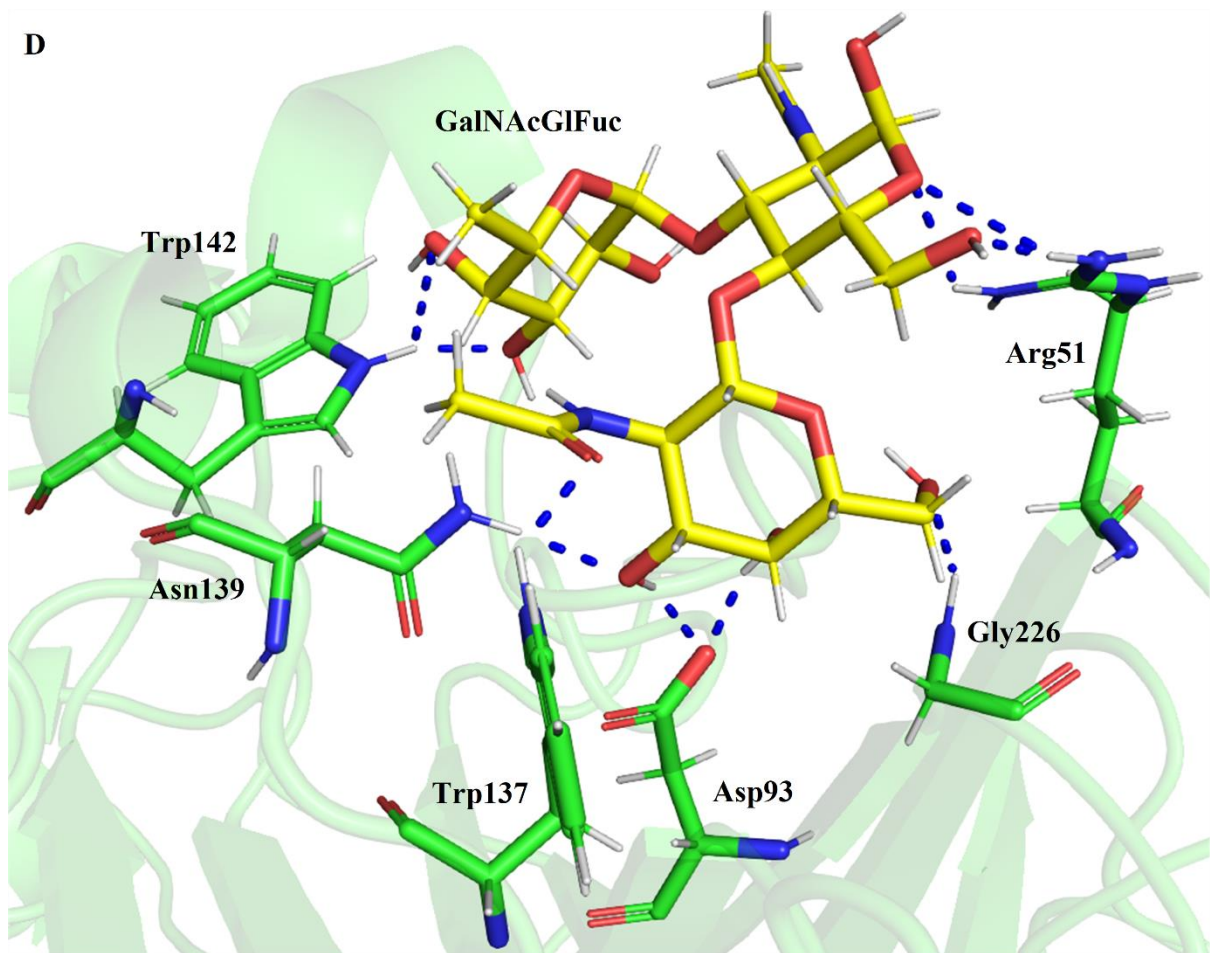
**Figura 17.** Representação bidimensional (LigPlot) (a – porção fucose, c – porção GalNAc) e tridimensional (PyMOL) (b – porção fucose, d – porção GalNAc) dos resíduos de aminoácidos da BUL que interagem com o trissacarídeo.





C





A fucose (6-desoxi-L-galactose) é um monossacarídeo componente de vários *N*- e *O*-glicanos presentes no glicocálice de células animais. A fucosilação, que consiste na modificação de glicanos terminais por adição de fucose, é regulada durante a diferenciação celular e ontogenia animal e tem um papel determinante em vários processos dos organismos. Os glicanos fucosilados são importantes na determinação dos antígenos ABO, nas interações parasita-hospedeiro, adesão de leucócitos e, também, têm sido identificados em várias doenças humanas, como alguns tipos de cânceres (BECKER; LOWE, 2003).

Baumann *et al.* (1979) compararam, pela primeira vez, a evidente discrepância entre os níveis de fucosilação de uma linhagem celular de hepatócitos normal para uma de células de hepatoma, mostrando que estas superexpressavam fucose em suas superfícies. Por conta de apresentar alto valor de escore, o que é um indicativo de forte interação à fucose, a BUL possui potencial para ser utilizada em estudos oncológicos para linhagens de câncer de fígado, podendo vir a ser utilizada tanto como marcador de células como uma molécula de atividade antitumoral. Em relação a esta última, é válido observar que Lin *et al.* (2008) relataram atividade antiproliferativa para a BVL- específica a melibiose - contra a linhagem de hepatoma

HepG2. Devido às semelhanças estruturais em relação à melibiose e fucose, pode-se hipotetizar que que essa atividade seja devido à interação com fucose presente em altas quantidades na superfície dessas células.

**Tabela 2.** Interação da BUL com diferentes carboidratos.

Carboidrato	Escore*	Título de inibição de hemaglutinação **
N-acetil-D-galactosamina (GalNAc)	-31,00	0,63 mMx
$\alpha$ -lactose	-40,91	0,96 mM
Antígeno Tn	-34,95	-
Peptídeo Ace-Ser-Ser-Val-Gly(Tn) (PDB ID: 5T5L)	-45,83	-
Peptídeo Ace-Gly-Val-Thr-Ser-Ala(Tn) (PDB ID: 5T5O)	-46,38	-
FucGlcGalNAc <sup>1</sup>	-31,31	-
GalNAcGlcFuc <sup>2</sup>	-33,60	-

<sup>1</sup> Interação da BUL com a porção fucose do trissacarídeo.

<sup>2</sup> Interação da BUL com a porção GalNAc do trissacarídeo.

\* O escore do *docking* é representado pela equação  $E_{inter} + E_{intra}$ , em que  $E_{inter}$  é a energia de interação da proteína ao ligante, definida por:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} [ E_{PLP} (r_{ij}) + 332.0 (q_i q_j / 4r_{ij}^2) ]$$

\*\* valores presentes trabalho de Silva *et al.* (2014).

## 5. CONCLUSÃO

Por meio de ensaios de bioinformática, foi possível determinar a estrutura tridimensional do monômero da BUL e apresentou o enovelamento  $\beta$ -sanduíche característico das lectinas de leguminosas. Esta lectina provavelmente é dependente de metais, como sugere o modelo gerado e resultados de bancada obtidos anteriormente. A partir dos valores de escore de *docking*, foi possível observar que a BUL interage favoravelmente com antígeno Tn, peptídeos derivados dele, e com um trissacarídeo contendo fucose e GalNAc na porção terminal. Esses resultados permitiram fazer inferências acerca de algumas atividades biológicas já testadas com a BUL, como atividade antiproliferativa. Dessa forma, os objetivos propostos no início do trabalho foram cumpridos. Estes resultados são de evidente importância para futuros estudos de aplicações biotecnológicas de lectinas de *Bauhinia*. Eles permitem inferir que a BUL pode ser um potencial marcador para células tumorais que apresentem estes ligantes em sua superfície e uma potente molécula antitumoral para células com esta mesma característica. Entretanto, apenas resultados de modelagem comparativa e de valores de escore de *docking* não são suficientes para afirmar que a BUL pode ter essas aplicações citadas, pois embora sejam métodos preditivos úteis e confiáveis, ainda são modelos teóricos e apresentam limitações. Portanto, outros métodos computacionais complementares, como simulações de dinâmica molecular, são essenciais para realizar uma análise estrutural mais minuciosa da BUL com os ligantes testados e, a partir disso, realizar ensaios *in vitro* e *in vivo* para confirmar suas potenciais aplicações.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADCOCK, Stewart A.; MCCAMMON, J. Andrew. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 106, n. 5, p.1589-1615, maio 2006. American Chemical Society (ACS).  
<http://dx.doi.org/10.1021/cr040426m>.

ALI, M. Abbas; SAYEED, M. Abu; ABSAR, Nurul. Purification and Characterization of Three Lectins Extracted from Cassia Fistula Seeds and Effect of Various Physical and Chemical Agents on Their Stability. **Journal Of The Chinese Chemical Society**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.647-654, jun. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jccs.200400097>.

ÁVILA, Maurício Boff de et al. Supervised machine learning techniques to predict binding affinity. A study for cyclin-dependent kinase 2. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 494, n. 1-2, p.305-310, dez. 2017. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.035>.

BARI, Alfa U. et al. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. **Journal Of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.351-356, 19 jun. 2013. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1002/jmr.2279>.

BARKAI-GOLAN, Rivka; MIRELMAN, David; SHARON, Nathan. Studies on growth inhibition by lectins of penicillia and aspergilli. **Archives Of Microbiology**, [s.l.], v. 116, n. 2, p.119-124, fev. 1978. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00406026>.

BAUMANN, Heinz et al. Neutral Fucolipids and Fucogangliosides of Rat Hepatoma HTC and H35 Cells, Rat Liver, and Hepatocytes'. **Cancer Research**, S.l., v. 7, n. 39, p.2637-2643, 10 abr. 1979.

BECKER, D. J.; LOWE, J. B.. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. **Glycobiology**, [s.l.], v. 13, n. 7, p.41-53, 19 mar. 2003. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwg054>.

BENKERT, Pascal; BIASINI, Marco; SCHWEDE, Torsten. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.343-350, 5 dez. 2010. Oxford University Press (OUP).  
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>.

BENKERT, Pascal; TOSATTO, Silvio C. E.; SCHOMBURG, Dietmar. QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.261-277, abr. 2008. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1002/prot.21715>.

BIASINI, Marco et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.252-258, 29 abr. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku340>

BOUGHTON-SMITH, N.k. et al. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p.896-902, out. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13897.x>

BRILL, Laurence M.; EVANS, Cory J.; HIRSCH, Ann M.. Expression of MsLEC1- and MsLEC2-antisense genes in alfalfa plant lines causes severe embryogenic, developmental and reproductive abnormalities. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.453-461, 23 dez. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.00979.x>.

CAGLIARI, Rafael; KREMER, Frederico Schmitt; PINTO, Luciano da Silva. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 119, p.811-820, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.156>.

CARVALHO, Aline de Souza et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 75, p.402-408, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.001>.

CAVADA, Benildo et al. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.30-54, 21 dez. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010030>.

CECHINEL FILHO, Valdir. Chemical composition and biological potential of plants from the genus *Bauhinia*. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 23, n. 10, p.1347-1354, out. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.2756>.

CHAN, Yau Sang; NG, Tzi Bun. Bauhinia variegata var. variegata Lectin: Isolation, Characterization, and Comparison. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 175, n. 1, p.75-84, 21 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-014-1261-z>.

CHEN, Yu-chian. Beware of docking! **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.78-95, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2014.12.001>.

CHRISPEELS, M J; RAIKHEL, N V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **The Plant Cell**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.1-9, jan. 1991. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.3.1.1>.

COELHO, Luana C. B. B.; SILVA, Maria B. R. da. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.295-300, 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1099-1565\(200009/10\)11:53.0.co;2-s](http://dx.doi.org/10.1002/1099-1565(200009/10)11:53.0.co;2-s).

DAI, Zong et al. Nanoparticle-Based Sensing of Glycan–Lectin Interactions. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 128, n. 31, p.10018-10019, ago. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja063565p>.

DESAI, Parimal R.. Immunoreactive T and Tn antigens in malignancy: role in carcinoma diagnosis, prognosis, and immunotherapy. **Transfusion Medicine Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.312-325, out. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/tmrv.2000.16229>.

FISER, András; BALI, Andrej. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.461-491, 2003. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(03\)74020-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(03)74020-8).

FU, C. et al. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. **Hla**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.275-286, 28 set. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tan.12900>.

GHAZARIAN, Haike; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B.. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [s.l.], v. 113, n. 3, p.236-247, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>.

GIRÃO, Deysen Kerlla Fernandes Bezerra et al. The galactose-binding lectin isolated from *Bauhinia bauhinioides* Mart seeds inhibits neutrophil rolling and adhesion via primary cytokines. **Journal Of Molecular Recognition**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.285-292, 23 fev. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.2441>.

GLAVEY, Siobhan V. et al. The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. **Blood Reviews**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.269-279, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2015.01.003>.

GUPTA, Nisha; NARULA, Alka; SRIVASTAVA, P. S.. Purification and Characterization of Lectin from Seeds of *Delonix regia*. **Journal Of Plant Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.141-144, jul. 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03263210>.

HEBERLE, G.; AZEVEDO, W. F. de. Bio-Inspired Algorithms Applied to Molecular Docking Simulations. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.1339-1352, 1 mar. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986711795029573>.

HECK, Gabriela S. et al. Supervised Machine Learning Methods Applied to Predict Ligand-Binding Affinity. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 23, p.2459-2470, 11 set.

2017. Bentham Science Publishers Ltd..  
<http://dx.doi.org/10.2174/0929867324666170623092503>.

HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, [s.l.], v. 407, n. 6805, p.770-776, out. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/35037710>.

HIRSCH, Ann M.; LUM, Michelle R.; DOWNIE, J. Allan. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? **Plant Physiology**, [s.l.], v. 127, n. 4, p.1484-1492, 1 dez. 2001. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010866>.

IMAI, Y.; OSAWA, T. Enrichment of IL-2-Producer T Cells from Mouse Spleen by Use of Bauhiniapurpurea Lectin. **Scandinavian Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.217-224, set. 1983. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.1983.tb00860.x>.

INOUE, M et al. Clinical value of sialyl Tn antigen in patients with gynecologic tumors. **Obstetrics And Gynecology**, S.l., v. 6, n. 75, p.1032-1036, 01 nov. 1990.

JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 267, n. 3, p.727-748, abr. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897>.

JU, Tongzhong; OTTO, Vivianne I.; CUMMINGS, Richard D.. The Tn Antigen-Structural Simplicity and Biological Complexity. **Angewandte Chemie International Edition**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.1770-1791, 21 jan. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201002313>.

KAKEJI, y et al. Helix pomatia agglutinin binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. **Cancer**, S.l., v. 11, n. 68, p.2438-2442, 1 dez. 1991..

KIRSCHNER, Karl N. et al. GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.622-655, 11 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20820>.

KLAFKE, G.b. et al. Inhibition of initial adhesion of oral bacteria through a lectin from Bauhinia variegata L. var. variegata expressed in Escherichia coli. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 115, n. 5, p.1222-1230, 3 set. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12318>.

KONNO, Akira et al. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. **Clinical And Experimental Metastasis**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.61-70, 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1013879702702>.

KORB, Oliver; STÜTZLE, Thomas; EXNER, Thomas E.. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein-Ligand Docking with PLANTS. **Journal Of Chemical Information And**

**Modeling**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.84-96, 26 jan. 2009. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci800298z>.

LA BELLE, Jeffrey T. et al. Label-Free Impedimetric Detection of Glycan–Lectin Interactions. **Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 79, n. 18, p.6959-6964, set. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ac070651e>.

LAACK, Eckart et al. Lectin Histochemistry of Resected Adenocarcinoma of the Lung. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 160, n. 3, p.1001-1008, mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64921-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64921-8).

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal Of Applied Crystallography**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.283-291, 1 abr. 1993. International Union of Crystallography (IUCr). <http://dx.doi.org/10.1107/s0021889892009944>.

LEAL, André F. G. et al. Carbohydrate profiling of fuGalNAcl cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry. **Medical Mycology**, [s.l.], v. 50, n. 7, p.756-759, out. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.631946>.

LEVINE, Beth; KLIONSKY, Daniel J. Development by Self-Digestion. **Developmental Cell**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.463-477, abr. 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1534-5807\(04\)00099-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1534-5807(04)00099-1).

LIN, Peng; NG, Tzi Bun. Preparation and Biological Properties of a Melibiose Binding Lectin from *Bauhinia variegata* Seeds. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 22, p.10481-10486, 26 nov. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf8016332>.

LIU, Bo et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [s.l.], v. 482, n. 1-2, p.1-6, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.003>.

LIU, Bo; BIAN, He-jiao; BAO, Jin-ku. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 287, n. 1, p.1-12, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.013>.

LIU, Zhen et al. A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 15, n. 10, p.867-875, out. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2008.02.025>

LORIS, Remy et al. Legume lectin structure. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Protein Structure And Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1383, n. 1, p.9-36, mar. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838\(97\)00182-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00182-9).

LORIS, Remy et al. Structural Basis of Oligomannose Recognition by the Pterocarpus angolensis Seed Lectin. **Journal Of Molecular Biology**, [s.l.], v. 335, n. 5, p.1227-1240, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.043>.

LUBKOWSKI, Jacek et al. Structural analysis and unique molecular recognition properties of a Bauhinia forficata lectin that inhibits cancer cell growth. **The Febs Journal**, [s.l.], v. 284, n. 3, p.429-450, fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.13989>.

LÜTHY, Roland; BOWIE, James U.; EISENBERG, David. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, [s.l.], v. 356, n. 6364, p.83-85, mar. 1992. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/356083a0>

MACEDO, Maria Lígia Rodrigues et al. Insecticidal action of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL) against Anagasta kuehniella (Lepidoptera: Pyralidae), Zabrotes subfasciatus and Callosobruchus maculatus (Coleoptera. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 146, n. 4, p.486-498, abr. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.020>.

MACEDO, Maria; OLIVEIRA, Caio; OLIVEIRA, Carolina. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 2014-2033, 27 jan. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20022014>.

MARTÍ-RENOM, Marc A. et al. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. **Annual Review Of Biophysics And Biomolecular Structure**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.291-325, jun. 2000. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.291>.

MIRELMAN, David et al. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature**, [s.l.], v. 256, n. 5516, p.414-416, jul. 1975. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/256414a0>.

NASCIMENTO NETO, Luiz Gonzaga do et al. Effect of the Lectin of Bauhinia variegata and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model. **Molecules**, [s.l.], v. 16, n. 11, p.9298-9315, 7 nov. 2011. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules16119298>.

NASCIMENTO, Kyria Santiago et al. Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 92, p.79-89, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.014>.

NAYEEM, A. *et al.* A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: From sequence alignments to structural models. **Protein Science**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.808-824, 7 mar. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1110/ps.051892906>.

NEGI, Arvind; SHARMA, Nimisha; SINGH, Mamta F. Spectrum of Pharmacological Activities from *Bauhinia variegata*: A Review. **Journal Of Pharmacy Research**, S.l., v. 2, n. 5, p.792-797, 12 jan. 2012.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NUMA, Fumitaka *et al.* Tissue Expression of Sialyl Tn Antigen in Gynecologic Tumors. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology**, [s.l.], v. 21, n. 4, p.385-389, ago. 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1447-0756.1995.tb01027.x>.

OSAWA, Toshiaki; IRIMURA, Tatsuro; KAWAGUCHI, Tsutomu. [42] *Bauhinia purpurea* agglutinin. **Methods In Enzymology**, [s.l.], p.367-372, 1978. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879\(78\)50044-x](http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(78)50044-x).

Osterne, Vinícius José da Silva. Estudos de estrutura-função da lectina de sementes de *Canavalia virosa* com atividade inflamatória e citotóxica: uma potencial ferramenta anti-câncer. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2016.

PETTERSEN, Eric F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal Of Computational Chemistry**, [s.l.], v. 25, n. 13, p.1605-1612, 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>.

PEUMANS, Willy J. *et al.* Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins. **The Molecular Immunology Of Complex Carbohydrates —2**, [s.l.], p.27-54, 2001. Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1267-7\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1267-7_3).

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, Els J.m.. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology And Genetic Engineering Reviews**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.199-228, abr. 1998. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/02648725.1998.10647956>.

PINTO, Luciano S. *et al.* Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal Of Biosciences**, [s.l.], v. 33, n. 3, p.355-363, set. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-008-0055-2>.

REMENTERIA, Aitor et al. Genes y moléculas implicados en la virulencia de *Aspergillus fumigatus*. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.1-23, mar. 2005. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1130-1406\(05\)70001-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1130-1406(05)70001-2).

ROBERT, Xavier; GOUET, Patrice. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.320-324, 21 abr. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku316>.

SARKER, A B et al. Bauhinia purpurea lectin (BPA) binding spectra in hyperplastic human tonsil and in peripheral blood: immunohistochemical, immunoelectron microscopic, and flow cytometric analyses.. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.811-817, jun. 1993. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/41.6.8315273>.

SARKER, A.b. et al. Bauhinia Purpurea (BPA) Binding to Normal and Neoplastic Thyroid Glands. **Pathology - Research And Practice**, [s.l.], v. 190, n. 11, p.1005-1011, nov. 1994. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0344-0338\(11\)80894-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0344-0338(11)80894-0).

SCHIETINGER, A. et al. A Mutant Chaperone Converts a Wild-Type Protein into a Tumor-Specific Antigen. **Science**, [s.l.], v. 314, n. 5797, p.304-308, 13 out. 2006. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129200>.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. **Lectins**. 2. ed. Dordrecht (netherlands): Springer, 2007. 463 p.

SIEVERS, Fabian et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.539-545, jan. 2011. EMBO. <http://dx.doi.org/10.1038/msb.2011.75>.

SILVA, André Luis Coelho da; HORTA, Ana Cecília Goés; MOREIRA, Renato de Azevedo. Isolation and partial characterization of a lectin from Bauhinia pentandra (bong) vog. Ex. Steua. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.262-269, 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-31312001000300002>.

SILVA, Helton C. et al. BUL: A novel lectin from Bauhinia unguolata L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.203-209, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.020>.

SILVA, Helton C. et al. Purification and Partial Characterization of a New Pro-Inflammatory Lectin from Bauhinia bauhinioides Mart (Caesalpinoideae) Seeds. **Protein & Peptide Letters**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.396-402, 1 abr. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/092986611794653987>.



SILVA, José A. et al. Isolation and Biochemical Characterization of a Galactoside Binding Lectin from Bauhinia variegata Candida (BvCL) Seeds. **The Protein Journal**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.193-201, 4 jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10930-006-9061-0>.

SILVA, M. Luísa S.; RANGEL, María G.h.. A Vicia villosa agglutinin biosensor for cancer-associated Tn antigen. **Sensors And Actuators B: Chemical**, [s.l.], v. 252, p.777-784, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.021>.

SILVA, Mariana C.c. et al. Bauhinia forficata lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, [s.l.], v. 1840, n. 7, p.2262-2271, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.03.009>.

SILVA, Mariana C.c. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from Bauhinia forficata seeds. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 7, p.1049-1059, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.008>.

SOUZA, Jayra D. et al. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [s.l.], v. 65, n. 5, p.696-702, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.02.009>.

SOUZA, Maria A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.641-657, 9 jan. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-012-9464-4>.

SPRINGER, G. F.; DESAI, P. R.; BANATWALA, I.. Blood group MN specific substances and precursors in normal and malignant human breast tissues. **Die Naturwissenschaften**, [s.l.], v. 61, n. 10, p.457-458, out. 1974. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00597216>.

SPRINGER, G. T and Tn, general carcinoma autoantigens. **Science**, [s.l.], v. 224, n. 4654, p.1198-1206, 15 jun. 1984. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.6729450>.

SPRINGER, Georg F. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. **Journal Of Molecular Medicine**, [s.l.], v. 75, n. 8, p.594-602, 11 ago. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s001090050144>.

SUEN, Y. K. et al. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.369-377, 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1009691727077>.

VAN DAMME, Els J. M. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews In Plant Sciences*, [s.l.], v. 17, n. 6, p.575-692, nov. 1998. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/07352689891304276>

VERDONK, Marcel L. et al. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 52, n. 4, p.609-623, 1 ago. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.10465>.

WEBB, Benjamin; SALI, Andrej. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols In Bioinformatics**, [s.l.], p.1-37, 20 jun. 2016. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/cpbi.3>.

WELINDER, Charlotte et al. Primary Breast Cancer Tumours Contain High Amounts of IgA1 Immunoglobulin: An Immunohistochemical Analysis of a Possible Carrier of the Tumour-Associated Tn Antigen. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.1-9, 18 abr. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061749>.

XAVIER, Mariana Morrone et al. SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [s.l.], v. 19, n. 10, p.801-812, 20 dez. 2016. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1386207319666160927111347>.

YU, Xiaofeng et al. Aberrant Cosmc genes result in Tn antigen expression in human colorectal carcinoma cell line HT-29. **International Journal Of Clinical & Experimental Pathology**, S.l., v. 3, n. 8, p.2590-2602, 1 mar. 2015.