



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



**GHENT UNIVERSITY
FACULDADE DE ENGENHARIA DE
BIOCIÊNCIA
DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA DE
BIOCIÊNCIAS: BIOTECNOLOGIA**

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

**CONSTRUÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA/LENTA BASEADA EM BIOCONJUGADOS DE CARBONATO
DE CÁLCIO E LECTINA DE *Dioclea violacea*: EFEITO EM CÉLULAS DE
CÂNCER CERVICAL**

FORTALEZA

2020

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

CONSTRUÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA/LENTA BASEADA EM BIOCONJUGADOS DE CARBONATO DE
CÁLCIO E LECTINA DE *Dioclea violacea*: EFEITO EM CÉLULAS DE CÂNCER
CERVICAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais e Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biociências: Biotecnologia como requisito parcial para obtenção dos seguintes títulos: Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais pela UFC e Doutor em Engenharia de Biociências: Biotecnologia pela UGent.

Orientadores: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (UFC)

Prof. Dr. Els Van Damme (UGent)

Coorientador: Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento (UFC)

FORTALEZA

2020

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)

- O94c Osterne, Vinicius José da Silva.
Construção e aplicação de um sistema de liberação controlada/lenta baseada em bioconjugados de carbonato de cálcio e lectina de *Dioclea violacea* : efeito em células de câncer cervical / Vinicius José da Silva Osterne. – 2020.
118 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
Coorientação: Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento.
1. Lectina. 2. *Dioclea violacea*. 3. Anticâncer. 4. Partículas. 5. Liberação controlada. I. Título.
- CDD 660.6
-

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

CONSTRUÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA/LENTA BASEADA EM BIOCONJUGADOS DE CARBONATO DE
CÁLCIO E LECTINA DE *Dioclea violacea*: EFEITO EM CÉLULAS DE CÂNCER
CERVICAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais e Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biociências: Biotecnologia como requisito parcial para obtenção dos seguintes títulos: Doutor em Biotecnologia de Recursos Naturais pela UFC e Doutor em Engenharia de Biociências: Biotecnologia pela UGent.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Andre Skirtach
Ghent University (UGent)

Prof. Dr. Els Van Damme (Orientadora)
Ghent University (UGent)

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

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

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

Prof. Dr. Pierre Basílio Almeida Fachine
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A todos que me ajudaram em minha jornada!!!

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer à minha família, em especial minha avó Lucia, minha mãe Alzenir, meu irmão Victor, meu pai Wladimir, minha segunda mãe Neide, meu amado irmão Enzo, meus primos Biel e Digo, minha tia Herbene entre vários outros, pelo profundo apoio que me é dado. Sou extremamente grato a todos.

Meus mais profundos agradecimentos ao Prof e Profa (eles conhecem o código) por me oferecerem a oportunidade de trabalhar em seu laboratório, a orientação por vários anos e um enorme apoio. O que foi dito para minha família também pode ser dito aqui, porque considero vocês dois como tais.

Meus agradecimentos a Profa Els Van Damme por me aceitar em seu grupo. Esses momentos foram incríveis. Como eu disse quando nos conhecemos, você é meu ídolo! Conhecê-la foi um dos destaques da minha carreira que eu não tenho dúvida que irei me gabar :)

Meus agradecimentos ao Prof. Andre Skirtach e ao Prof. Guy Smagghe por me darem a oportunidade de trabalhar em seus laboratórios. Um segundo obrigado ao Prof Andre por aceitar meu convite ao Júri.

Aos professores Wandemberg, Rodrigo e Pierre por aceitarem meu convite para a Banca.

Meus queridos amigos, Vanir, Mayara, Adolph e JV, é melhor você acreditar que as pessoas são incríveis. Amo vocês todos.

Graças à minha incrível segunda família de BioMol. Nosso grupo é excelente, cada um de vocês é especial para mim. Até Claudio (chocantemente). Infelizmente, existem pessoas que ainda não tomam café, mas há tempo para mudar isso !!!

Meus mais profundos agradecimentos ao Glyco group e aos outros grupos da UGent. Gernot, Gosia, Mariya, Simin, Andrea, Sinem, Jeroen, Jeroen Lambin, Pieter, Isabel, Koen, Chen, Kristof, Bogdan, Johannes (esse nome é super legal, você sabe?!), assim como todos os outros que eu tive. prazer em conhecer.

À FUNCAP e CNPq pelos recursos financeiros necessários para uma pesquisa bem-sucedida.

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

“O que antecipamos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

Benjamin Disraeli

RESUMO

As lectinas são proteínas que se ligam especificamente à carboidratos e são capazes de formar complexos com moléculas contendo sacarídeos sem alterar sua estrutura. Devido às muitas atividades biológicas exibidas por essas proteínas, elas possuem grande aplicabilidade na biotecnologia. A tecnologia de liberação controlada/lenta de medicamentos é uma das aplicações mais promissoras da nanotecnologia no tratamento e diagnóstico de doenças, visto que supera diversos problemas associados ao uso de macromoléculas, como proteínas e medicamentos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema para a liberação controlada da lectina de *Dioclea violacea* (DVL), uma lectina de leguminosa específica para manose/glicose com propriedades anticâncer, através da aplicação de dois tamanhos diferentes de partículas de CaCO_3 , um composto de baixo custo, amplamente disponível e biocompatível. Os resultados mostraram que os sistemas são viáveis e apresentam propriedades desejáveis de adsorção e liberação. A aplicação dos bioconjugados nas células HeLa mostrou que o sistema proposto é eficaz como agente citotóxico contra esse tipo de célula, mais potente inclusive que lectina livre. Os dados obtidos demonstram que o sistema tem uma aplicação potencial no tratamento do câncer e a metodologia permite o uso de outras lectinas/proteínas anticâncer.

Palavras-chave: Lectina. *Dioclea violacea*. Anticâncer. Partículas. Liberação controlada.

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind specifically to carbohydrates and are able to form complexes with molecules containing saccharides without changing their structure. Because of the many biological activities displayed by these proteins, they have great applicability in biotechnology. Controlled/slow drug release technology is one of the most promising applications of nanotechnology for disease treatment and diagnosis because it overcomes several problems associated with the use of macromolecules such as proteins as drugs. In this context, the present investigation aimed to develop a system for the controlled release of *Dioclea violacea* lectin (DVL), a mannose/glucose-specific legume lectin with anticancer properties, by applying two different sizes of CaCO₃ particles, a low-cost, broadly available and biocompatible compound. Results show that the systems are feasible and present desirable properties of adsorption and release. The application of the bioconjugates on HeLa cells indicates that the proposed system is effective as a cytotoxic agent against this cell type, even more than the free lectin. The present data demonstrate that the system has a potential application in cancer treatment and the methodology enables the use of other anticancer lectins/proteins.

Keywords: Lectin. *Dioclea violacea*. Anticancer. Particles. Controlled release.

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1 – Exemplos da estrutura dos três principais tipos de N-glicano. A) Tipo oligomanose, B) Tipo híbrido e C) Tipo complexo</p>	18
<p>Figura 2 – Estrutura tridimensional de uma lectina de cada família evolutivamente relacionada. A) Lectina de leguminosas - ConV (PDB id: 5F5Q), B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose - lectina de <i>Gastrodia elata</i> (PDB id: 1XDG), C) Lectinas ligantes à quitina compostas por domínios heveínicos - aglutinina de gérmen de trigo (PDB id: 2UVO), D) Proteína inativadora de ribossomo do tipo 2 - Abrina (PDB id: 2ZR1), E) Lectinas relacionadas à Jacalina - Jacalina (PDB id: 1UGW), F) Lectinas de <i>Amaranthaceae</i> - Amarantina (PDB id: 1JLY)</p>	25
<p>Figura 3 – Classificação estrutural de lectinas vegetais em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. A) Heveína (PDB: 1HEV), B) Lectina de <i>Dioclea wilsonii</i> (PDB: 3SH3), C) Lectina 2 de <i>Parkia platycephalla</i> (PDB: 2GSJ) e D) Lectina de <i>Musa acuminata</i> (PDB: 3MIT)</p>	26
<p>Figura 4 – Esquema de um jellyroll da estrutural da lectina de <i>Centrolobium microchaete</i> (PDB id: 5EYY)</p>	29
<p>Figura 5 – Taxonomia e imagens de sementes e plantas de <i>Dioclea violacea</i> (PDB id: 5EYY)</p>	33
<p>Figura 6 – Estruturas primária, secundária e terciária da lectina de <i>Dioclea violacea</i> (PDB id: 2GDF)</p>	34
<p>Figura 7 – <i>Docking</i> molecular entre a lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i> e um glicano de oligomanose. Representação em bastões do DRC da lectina em complexo com o glicano com carbonos em azul para a proteína e em amarelo para o ligante (à esquerda). Diagrama 2D do Ligplot das interações (à direita)</p>	43

Figura 8 – Adsorção DVL nos MPs e NPs ao longo do tempo. Barras de erro correspondem ao desvio padrão de três experimentos separados (PDB id: 5EYY)	54
Figura 9 – Porcentagem de partículas de calcita em diferentes tempos. MP s + DVL (em preto), somente MPs (em vermelho), NPs + DVL (em verde) e somente NPs (em azul). Estes experimentos foram realizadas em triplicata e uma centena de partículas foram contadas em cada tempo	56
Figura 10 – Gráfico mostrando a liberação de DVL das MPs e NPs ao longo do tempo. Os dados correspondem à média de três experimentos com barras de erro representando o desvio padrão	57
Figura 11 – Espectros de infravermelho da lectina, das partículas e dos bioconjugados. a) Espectros detalhados de 720-770 cm^{-1} de DVL (em azul) NPS-DVL (em preto) somente NPs (em vermelho), MPs-DVL (em verde) e somente MPs (em roxo). b) Faixas típicas para vaterita a 1085 cm^{-1} e 745 cm^{-1}	59
Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura das partículas de vaterita e bioconjugados mostrando sua morfologia esférica. a) somente NPs, b) somente MPs, c) NPs-DVL e d) MPs-DVL. DVL não parece alterar a morfologia geral das partículas	59
Figura 13 – Ensaio de viabilidade celular com células HeLa após 24 h, 48 h e 72 h de incubação com DVL, MPs-DVL, NPs-DVL, somente MPs e somente NPs. A quantidade de bioconjugados aplicada nessas experiências foi definida com base na concentração de DVL A) DVL a 1 μM , B) DVL a 0,5 μM , C) DVL a 0,25 μM , D) DVL a 0,12 μM e E) DVL a 0,06 μM .Os controle são repetidos em cada curva. Esses dados são a média de três repetições biológicas com três repetições técnicas cada	62
Figura 14 – Imagens representativas de células HeLa na presença de DVL, MPs-DVL e NPs-DVL, somente MPs, somente NPs e somente células 48h após o tratamento. A barra vermelha corresponde a 100 μM	63

Figura 15 – Imagens confocais de células HeLa após 48 h de incubação com A) MPs-DVL e B) NPs-DVL. As células foram coradas com calceína (verde) e DVL foi marcada com rodamina (TRITC). Nas imagens é possível ver que ambas as partículas podem ser encontradas dentro das células 64

Figura 16 – Melhores poses do *docking* molecular entre DVL e os três dos principais N-glicanos encontrados no glicoma das células HeLa. DVL é representada como *cartoon* (em verde) com superfície (em cinza). Todos os ligantes são apresentados como bastões com carbonos em azul (GP1_2), em rosa (GP3_3) e em amarelo (GP7_2). As poses foram selecionadas de acordo com o score de *docking* e os parâmetros geométricos 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Famílias de lectinas de plantas classificadas de acordo com as relações estruturais e evolutivas e a conservação do DRC	27
Tabela 2	– Estrutura tridimensional de uma lectina de cada família evolutivamente relacionada. A) Lectina de leguminosas - ConV (PDB id: 5F5Q), B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose - lectina de <i>Gastrodia elata</i> (PDB id: 1XDG), C) Lectinas ligantes à quitina compostas por domínios heveínicos - aglutinina de gérmen de trigo (PDB id: 2UVO), D) Proteína inativadora de ribossomo do tipo 2 - Abrina (PDB id: 2ZR1), E) Lectinas relacionadas à Jacalina - Jacalina (PDB id: 1UGW), F) Lectinas de <i>Amaranthaceae</i> - Amarantina (PDB id: 1JLY)	52
Tabela 3	– Efeito da concentração de lectina na adsorção em NPs. Os dados apresentados são a média de três experimentos	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asn	Asparagina
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DLL	Lectina de <i>Dioclea lasocarpa</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
RE	Retículo endoplasmático
SFB	Soro fetal bovino
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GalNAc	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
LCA	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>
LLs	Lectinas de Leguminosas
MPs	Partículas de CaCO ₃ maiores
NPs	Partículas de CaCO ₃ menores
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos
Ser	Serina
Thr	Treonina
WGA	Aglutinina de gérmen de trigo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Carboidratos e glicanos	17
1.2	Visão geral das lectinas	19
1.3	Classificação das lectinas	22
1.4	Lectinas de leguminosas	28
1.5	Lectinas de Diocleinae	31
1.6	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>	32
1.7	Aplicações das lectinas no diagnóstico e terapia do câncer	34
1.8	Nanotecnologia e e partículas de CaCO₃	36
1.9	Sistemas de liberação controlada	39
1.10	<i>Docking</i> molecular aplicado à lectinologia	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	Objetivo geral	44
2.2	Objetivos específicos	44
3	METODOLOGIA	45
3.1	Isolamento e purificação de DVL	45
3.2	Síntese das partículas	45
3.3	Bioconjugação	46
3.4	Caracterização dos bioconjugados	46
3.4.1	<i>Adsorção durante o tempo</i>	46
3.4.2	<i>Recristalização</i>	47
3.4.3	<i>Liberação de DVL das partículas</i>	47
3.4.4	<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</i>	48
3.4.5	<i>Microscopia eletrônica</i>	48
3.5	Ensaio com células	48
3.5.1	<i>Cultura de células</i>	48
3.5.2	<i>Ensaio de viabilidade</i>	48
3.5.3	<i>Internalização dos bioconjugados nas células</i>	49
3.6	Bioinformática - <i>Docking</i> molecular	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1	Purificação de DVL	51

4.2	Síntese das partículas	51
4.3	Bioconjugação	52
4.4	Dependência do tempo	54
4.5	Recristalização vaterita/calcita	55
4.6	Liberação de DVL das partículas	56
4.7	FTIR e microscopia eletrônica	58
4.8	Ensaio de toxicidade celular e internalização dos bioconjugados nas células	60
4.9	<i>Docking</i> molecular	65
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICE A – SUMÁRIO	82
	APÊNDICE B – SAMENVATTING	84
	APÊNDICE C – CURRICULUM VITAE	86
	ANEXO A – PAPER 1	88
	ANEXO B – PAPER 2	89
	ANEXO C – PAPER 3	90
	ANEXO D – PAPER 4	91
	ANEXO E – PAPER 5	92
	ANEXO F – PAPER 6	93
	ANEXO G – PAPER 7	94
	ANEXO H – PAPER 8	95
	ANEXO I – PAPER 9	96
	ANEXO J – PAPER 10	97
	ANEXO K – PAPER 11	98
	ANEXO L – PAPER 12	99
	ANEXO M – PAPER 13	100
	ANEXO N – PAPER 14	101
	ANEXO O – PAPER 15	102
	ANEXO P – PAPER 16	103
	ANEXO Q – PAPER 17	104
	ANEXO R – PAPER 18	105
	ANEXO S – PAPER 19	106

ANEXO T – PAPER 20	107
ANEXO U – PAPER 21	108
ANEXO V – PAPER 22	109
ANEXO W – PAPER 23	110
ANEXO X – PAPER 24	111
ANEXO Y – PAPER 25	112
ANEXO Z – PAPER 26	113
ANEXO AA – PAPER 27	114
ANEXO AB – PAPER 28	115
ANEXO AC – PAPER 29	116
ANEXO AD – PAPER 30	117
ANEXO AE – PAPER 31	118
ANEXO AF – PAPER 32	119

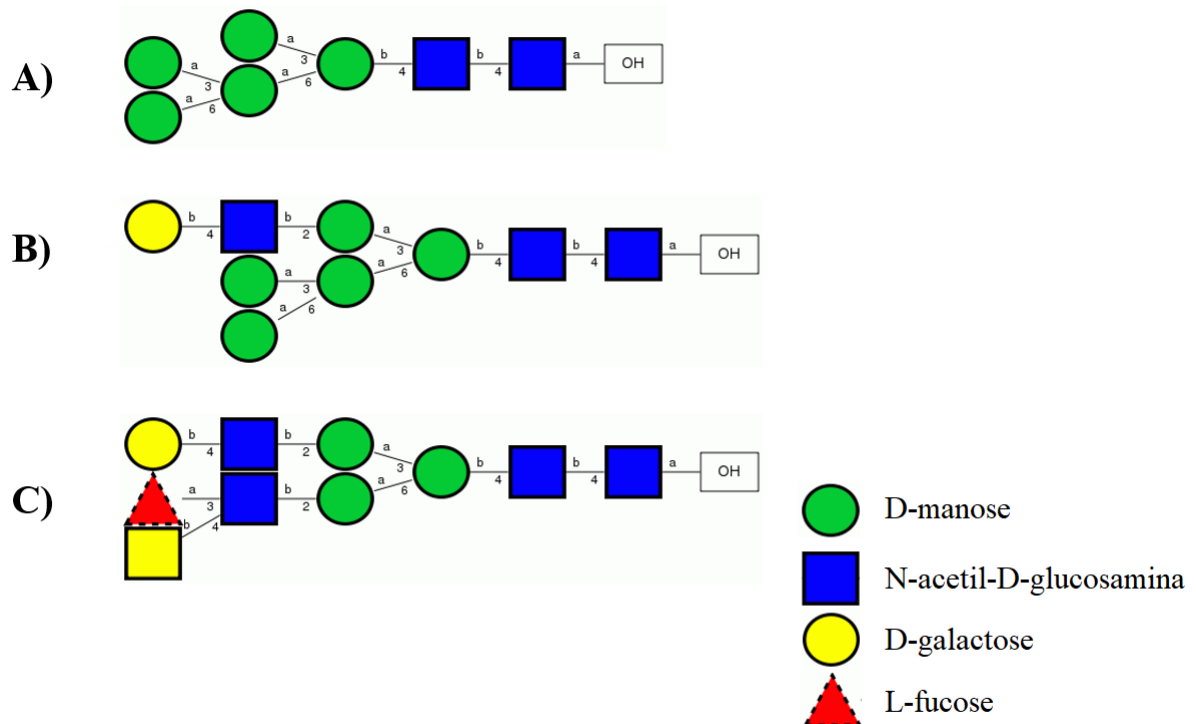
1 INTRODUÇÃO

1.1 Carboidratos e glicanos

As funções da porção de carboidrato dos glicoconjugados são tão numerosas quanto sua diversidade estrutural. Duas funções importantes podem ser destacadas são a função estrutural e o papel no reconhecimento molecular. Essas propriedades físicas dos carboidratos, como alta carga eletrostática e alta solubilidade, conferem a eles um papel na estabilização estrutural, solubilização e proteção contra a proteólise em glicoproteínas (JAYAPRAKASH; SUROLIA, 2017). A glicosilação de proteínas é uma das modificações pós-traducionais mais comuns, influenciando fortemente muitos aspectos funcionais, incluindo localização celular, degradação e controle de qualidade da proteína (SOLÁ; GRIEBENOW, 2009; VARKI et al., 2017). A glicosilação tem uma variedade de papéis importantes em muitos eventos celulares que variam de um papel estrutural a sinalização e reconhecimento. A chave para entender essas funções é o conhecimento da estrutura primária dos glicoconjugados. Existem dois tipos principais de glicosilação: glicosilação *N*-ligada e a *O*-ligada. Na *N*-glicosilação, um resíduo de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) é ligado por uma ligação amida a um resíduo de asparagina pertencente a uma sequência de consenso Asn-X-Ser/Thr, onde X pode ser qualquer aminoácido exceto prolina. A presença da sequência de consenso é necessária para a *N*-glicosilação, no entanto, a ocupação do sítio potencial não é obrigatória. Portanto, uma glicoproteína pode conter vários sítios potenciais de *N*-glicosilação, cada um dos quais pode ou não ser glicosilado (STANLEY; TANIGUCHI; AEBI, 2017). Os glicanos *N*-ligados são sintetizados no retículo endoplasmático (RE). Quando a proteína nascente entra no RE, um bloco de açúcares (Glc3Man9GlcNAc2) é transferido para o grupo amino na cadeia lateral da asparagina e o glicano é posteriormente processado e modificado no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, gerando os três tipos de *N*-glicanos encontrados em proteínas maduras: os tipos oligomanose, complexo e híbrido (STANLEY; TANIGUCHI; AEBI, 2017) (Figura 1). Geralmente, as cadeias encontradas nas glicoproteínas têm um núcleo comum $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$. Os glicanos oligomanose são aqueles nos quais apenas resíduos de manose estão ligados ao núcleo; *N*-glicanos complexos são aqueles em que ramificações iniciadas com uma *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) estão ligadas ao núcleo, normalmente com adição subsequente de resíduos de galactose em ligação $\beta 1-4$ com GlcNAc, formando uma *N*-acetilactosamina (LacNAc). As cadeias Poly-LacNAc são encontradas em vários tipos de células e podem

servir como suporte para a inserção de outras porções de glicanos. Não é incomum também a formação de ramos $\text{GalNAc}\beta 1\text{-4GlcNAc}$. *N*-glicanos híbridos têm características dos dois tipos anteriores, com algumas ramificações apresentando resíduos de manose e outros com ligação ao GlcNAc (MARQUES et al., 2017; PINTO-JUNIOR et al., 2017; STANLEY; TANIGUCHI; AEBI, 2017).

Figura 1 – Exemplos da estrutura dos três principais tipos de *N*-glicano. A) Tipo oligomanose, B) Tipo híbrido e C) Tipo complexo



Fonte: Elaborado pelo autor.

As glicofomas de uma proteína, ou a variação estrutural e complexa associada à glicoproteína, acabam por definir sua função e atividade. Além disso, a comunicação celular, como interações célula-célula, matriz-célula, proteína-proteína e açúcar-açúcar, são controladas por meio de interações específicas entre glicanos e seus alvos (VARKI, 2017; VARKI et al., 2017). A modulação da glicosilação de proteínas por variações na ocupação de sítios na cadeia polipeptídica ou variação de estruturas de oligossacarídeos que ocupam um determinado sítio de glicosilação modulam a atividade biológica das glicoproteínas e a glicosilação anormal foi identificada em muitas doenças de mamíferos, incluindo distúrbios hereditários, imunodeficiências, doenças cardiovasculares e câncer (TONG et al., 2003). Estudos já mostraram que a identificação de padrões anormais de glicosilação nas células

pode ser usada para diagnosticar algumas doenças, como o câncer (PERACAULA et al., 2008; STOWELL; JU; CUMMINGS, 2015). O processo de transformação de células normais em células neoplásicas está relacionado a alterações na composição dos glicanos presentes na membrana celular, que determinam características relacionadas aos fenômenos de diferenciação e maturação. As alterações são detectadas com mais frequência nos processos de metástase, uma vez que no tumor primário, elas são mínimas, sugerindo que essas alterações podem proporcionar vantagens às células tumorais ao longo de seu processo de progressão tumoral (STOWELL; JU; CUMMINGS, 2015). Alterações nos glicoconjugados na superfície celular podem gerar ramificações em estruturas complexas de carboidratos e gerar glicanos estruturalmente incomuns. Assim, proteínas que reconhecem carboidratos têm sido utilizadas como ferramentas simples para reconhecer essas alterações, identificar e classificar tumores malignos e benignos, além de avaliar o grau de glicosilação associada à metástase (PERACAULA et al., 2008; TAYLOR-PAPADIMITRIOU; EPENETOS, 1994). Além disso, algumas dessas proteínas apresentam atividade antitumoral em certos tipos de neoplasias, induzindo a morte celular (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005). Um dos tipos mais frequentes de alterações na superfície das células neoplásicas é o aumento da presença de epítomos contendo resíduos de *N*-acetilgalactosamina, resultantes de alterações nas vias de glicosilação. Entre esses epítomos, o antígeno Tn (GalNAc- α -O-Ser / Thr) é uma das estruturas mais específicas associadas ao câncer em humanos e é frequentemente usado como biomarcador. Este epítipo está presente em mucinas *O*-glicosiladas nas células epiteliais e é acessível espacialmente na superfície celular na maioria dos carcinomas, diferentemente das células normais e dos tumores benignos, nos quais é inacessível (FU et al., 2016), a adição de resíduos de carboidratos a esses dissacarídeos dá origem às estruturas normalmente encontradas em células saudáveis e torna o antígeno Tn inacessível, funcionando como uma espécie de bloqueador molecular. O antígeno Tn é considerado um marcador biológico de grande potencial para diagnóstico e terapia do câncer, dada sua ampla distribuição e aparecimento precoce em diferentes tipos de câncer em humanos e animais, bem como sua capacidade de induzir respostas nas células T (JU et al. 2014). Estes foram alguns exemplos de alterações no padrão de glicosilação que ocorrem nas células malignas.

1.2 Visão geral das lectinas

Existe uma enorme variedade de glicanos expressa por organismos. Considerando apenas a *N*-glicosilação, estima-se que aproximadamente três quartos das proteínas

depositadas no banco de dados SWISS-PROT sejam modificadas dessa maneira (APWEILER, 1999). Aproveitando essa variedade, os organismos fazem uso de glicanos em uma série de processos fisiológicos, muitos deles com alta especificidade. A alta diversidade estrutural de glicanos gera um código específico, o chamado glicocódigo, envolvido em vários processos biológicos (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005). Para decifrar esse código, os organismos têm um arsenal de proteínas capazes de ligar carboidratos.

Proteínas de ligação a carboidratos são definidas como aquelas que as reconhecem e se ligam a elas sem exibir atividade enzimática no mesmo local de ligação. Com exceção dos anticorpos gerados com especificidade para certos glicanos, a maioria das proteínas com essa capacidade é denominada lectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME et al., 1998), que podem ser agrupadas em uma série de famílias filogeneticamente e estruturalmente distintas (VAN DAMME et al., 1998). As lectinas se ligam a mono- ou oligossacarídeos, geralmente com alta especificidade, mas baixa afinidade, uma afinidade normalmente aumentada pela aplicação de multivalência (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017; ROY; MURPHY; GABIUS, 2016).

Descobertas pela primeira vez em plantas há mais de cem anos, guiadas por sua capacidade de aglutinar eritrócitos, as lectinas são encontradas em todos os grupos taxonômicos e também estão presentes em vírus (GILBOA-GARBER; AVICHEZER; GARBER, 1996; WEIS, 1997). De fato, em vírus, lectinas ou hemaglutininas são essenciais para a fusão entre vírus e células e, portanto, são importantes para o campo da medicina, o que levou ao fato de que uma das primeiras estruturas 3D de uma lectina determinada experimentalmente era a hemaglutinina do vírus influenza (WILSON; SKEHEL; WILEY, 1981).

Historicamente, o primeiro relato de uma atividade com o envolvimento de lectinas foi feito em 1860 pelo psiquiatra e neurologista Silas Weir Mitchel, que descobriu que uma gota do veneno de *Crotalus durissus* era capaz de aglutinar rapidamente uma gota de sangue de um pombo (Van Damme et al., 1998). Em 1902, a atividade aglutinante foi confirmada por Simon Flexner e H. Noguchy, quando relataram com mais detalhes o processo de hemaglutinação (KILPATRICK, 2002). Em relação às lectinas de plantas, o primeiro relato data de 1888 por Peter Hermann Stillmark que, ao estudar os efeitos tóxicos da mamona (*Ricinus communis*), verificou que, ao misturar eritrócitos com o extrato dessa semente, ocorreu hemaglutinação. A aglutinina tóxica foi isolada e denominada Ricina. Mais tarde, em 1891, H. Hellin mostrou que o extrato de sementes de *Abrus precatorius* demonstrava as mesmas atividades que a ricina e, com base nessa observação, a hemaglutinina tóxica foi

isolada e denominada Abrina (SHARON; LIS, 2004). Em 1891, Paul Ehrlich fez uso das duas hemaglutininas tóxicas Ricina e Abrina e observou que os ratos se tornaram imunes a uma dose letal de ricina ou abrina através da aplicação repetida de pequenas doses subletais, e também descobriu que o anticorpo anti-ricina não protegia os animais contra o efeito tóxico da abrina e nem o anti-abrina os protegeu contra a ricina. Estes resultados foram uma evidência clara da especificidade da resposta imune. Esses anticorpos foram utilizados em diversas experiências e, com isso, foi possível estabelecer vários dos princípios fundamentais da imunologia, tais como: a especificidade da resposta do anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral da mãe para sua progênie. (SHARON; LIS, 2004).

No ano de 1907, em um trabalho realizado por Landsteiner e Raubischek, verificou-se que extratos de *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa* tinham atividades hemaglutinantes distintas contra o sangue de vários animais, indicando que as lectinas tinham diferenças em suas capacidades de aglutinação, além disso, esses extratos não eram tóxicos, o que demonstrou que a toxicidade não é uma propriedade intrínseca das lectinas (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, houve o primeiro relato da purificação de uma hemaglutinina vegetal, quando James B. Summer purificou a lectina chamada Concanavalina A ou ConA das sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Duas décadas depois, no ano de 1936, Summer e Howell relataram que a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) tinha a capacidade de aglutinar células como eritrócitos e leveduras e também era capaz de precipitar glicogênio em solução. Esses pesquisadores também demonstraram a inibição da atividade hemaglutinante da ConA com a adição de sacarose, sendo este o primeiro relato de que as lectinas são capazes de se ligar aos carboidratos. A partir desses dados, sugeriu-se que a lectina era capaz de interagir com os carboidratos encontrados na superfície celular (DAN; LIU; NG, 2016). Em seguida, Boyd e Shapleigh (1954) descobriram que extratos de proteínas de várias plantas tinham perfis de hemaglutinação diferentes quando testados com diferentes grupos sanguíneos humanos. As lectinas de plantas foram previamente designadas como aglutininas ou fitoaglutininas, mas após a observação de que essas proteínas tinham uma certa especificidade por tipo de sangue, foi proposto o nome de lectinas do latim 'legere', que significa selecionar (LAM; NG, 2011). O número de lectinas purificadas cresceu significativamente desde a década de 1970, com o desenvolvimento da cromatografia de afinidade aplicada na purificação dessas proteínas (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965). Houve um aumento no interesse pelas lectinas quando essas proteínas demonstraram apresentar

diversas aplicações biotecnológicas, tais como: detecção e caracterização de glicoconjugados (WU et al., 2009); análise de alterações que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos (AUB; SANFORD; COTE, 1965) e mitogenicidade para linfócitos (ASHRAF; KHAN, 2003). Devido às diversas aplicações biotecnológicas das lectinas, hoje já temos um grande número de lectinas de plantas, microorganismos, algas e animais, todos purificados e caracterizados.

1.3 Classificação das lectinas

As lectinas das plantas são ubíquas e de natureza muito diversificada, dificultando a classificação em diferentes grupos. Tentativas no passado subdividiram lectinas de plantas em grupos com base em vários critérios. Em um esforço inicial, Peumans e Van Damme (1998) propuseram uma classificação das lectinas com base em sua sequência e relações evolutivas. De acordo com esta divisão, as lectinas são separadas nas sete famílias: lectinas de leguminosas, lectinas de ligação à quitina compostas por domínios heveínicos, proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2, lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose, proteínas relacionadas à jacalina, lectinas de *Amaranthaceae* e lectinas do floema de *Cucurbitaceae*.

a) Lectinas de leguminosas: é a família de lectinas mais bem estudada, as proteínas desse grupo compartilham alta similaridade tanto na estrutura tridimensional quanto na sequência de aminoácidos. Dentro desse grupo, encontram-se as lectinas de *Canavalia* (CAVADA, BENILDO SOUSA; OSTERNE; PINTO-JUNIOR; et al., 2019), *Dioclea* (PINTO-JUNIOR et al., 2017), *Vatairea* (SOUSA et al., 2016), entre várias outras. A lectina de *Canavalia virosa* (ConV) é mostrada na Figura 2A.

b) Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose: um grupo de lectinas muito similares encontradas em várias famílias de monocotiledôneas: *Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Orchidaceae*, *Liliaceae* e *Bromeliaceae*. Ao comparar a sequência desse grupo de lectinas, parece que essas lectinas pertencem a uma única superfamília de proteínas evolutivamente relacionadas. Estruturalmente, essas lectinas são formadas por 1 a 4 subunidades de aproximadamente 12 kDa e são manose-específicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME et al., 1998). A Figura 2B mostra a estrutura da lectina manose-específica de *Gastrodia elata*.

c) Lectinas ligantes à quitina compostas por domínios heveínicos: um grupo de lectinas que têm especificidade para GlcNAc e sua principal característica é a presença de domínios heveínicos. A heveína é uma merolectina ligante à quitina com 43 resíduos de aminoácidos

extraídos do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (ITAKURA et al., 2017). Este grupo de lectinas tem como principal representante a lectina de gérmen de trigo (WGA), composta por duas subunidades de 18 kDa e composta por quatro domínios estruturalmente semelhantes aos de heveína (PORTILLO-TÉLLEZ et al., 2011). A estrutura da lectina WGA é mostrada na figura 2C.

d) Proteínas inativadoras de ribossomos do tipo 2: as RIPs do tipo 2 são formadas por duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B). A cadeia A é formada por um polipeptídeo que consiste em um domínio de adenosina glicosidase e a cadeia B possui propriedades de lectina que permitem a ligação dessas proteínas aos carboidratos da superfície celular. As cadeias A e B são inicialmente ligadas por ligações dissulfeto, mas quando a proteína entra nas células, a ligação é quebrada e a cadeia A adquire uma forte atividade de N-glicosidase e, com isso, a proteína é capaz de inativar ribossomos procarióticos e eucarióticos. (SCHROT; WENG; MELZIG, 2015). A atividade de inativação dos ribossomos elicitada por essas proteínas ocorre devido à sua capacidade de remover um resíduo de adenina específico de um loop na subunidade maior do RNA ribossômico 28S (ENDO, 1988). Exemplos clássicos incluem a ricina e a abrina extraídos de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*, respectivamente. A estrutura de abrina é mostrada na figura 2D.

e) Lectinas relacionadas à jacalina: o jacalin é uma das duas lectinas presentes nas sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). O termo "lectinas relacionadas à jacalina" é usado para todas as lectinas que estão estrutural e evolutivamente relacionadas à jacalina. Com base na especificidade dos carboidratos, essas lectinas são classificadas em dois grupos: as galactose-específicas e as manose-específicas. Lectinas pertencentes a esse grupo são encontradas em espécies de *Moraceae* e *Convolvulaceae* (VAN DAMME et al., 1998). A estrutura da jacalina é mostrada na figura 2E.

f) Lectinas de *Amaranthaceae*: esse grupo tem como principal representante a Amarantina, uma lectina extraída de *Amaranthus caudatus*, que não se assemelha a nenhuma outra lectina vegetal, tanto na sequência quanto na estrutura tridimensional. Estruturalmente, são proteínas homodiméricas compostas por duas subunidades de aproximadamente 30 kDa. Este grupo contém várias outras lectinas extraídas de plantas do gênero *Amaranthus*, todas elas específicas para GalNAc (KAUR et al., 2006; VAN DAMME et al., 1998). A estrutura da amarantina é mostrada na figura 2F.

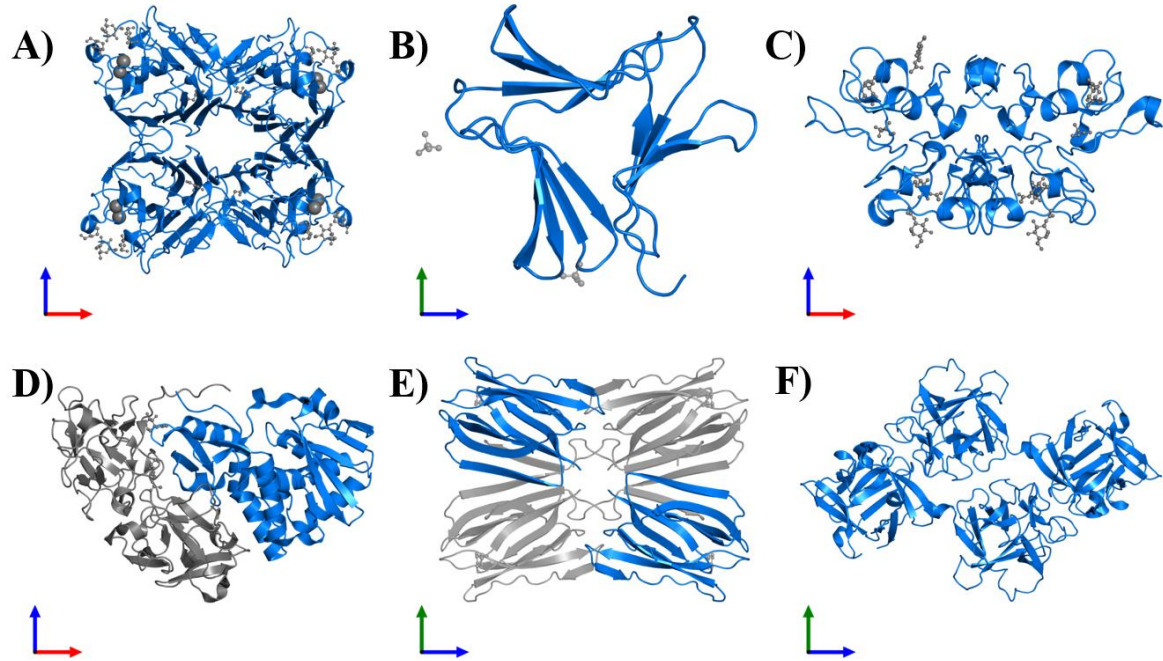
g) lectinas do floema de *Cucurbitaceae*: uma pequena família de lectinas de ligação à quitina que ocorre no floema de algumas plantas da família *Cucurbitaceae*. Estruturalmente, esse grupo contém lectinas diméricas compostas por duas subunidades de 24 kDa. Essas lectinas

têm grande semelhança sequencial entre si, mas são muito diferentes das outras lectinas vegetais (LANNON; VAN DAMME, 2014; VAN DAMME et al., 1998). Até o momento, não existem estruturas resolvidas de lectinas do floema de *Cucurbitaceae*.

A seguir, foram feitas tentativas para classificar as lectinas em quatro grupos com base em sua estrutura (VAN DAMME et al., 1998). Nesse sistema, as merolectinas são lectinas com apenas um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) em sua estrutura e, portanto, monovalentes em relação à ligação com carboidratos, não possuindo, portanto, capacidade de aglutinação. As hololectinas têm pelo menos dois DRCs sendo bi- ou multivalentes e, portanto, capazes de aglutinar células, bem como precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais pertence ao grupo das hololectinas. As quimerolectinas combinam um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos com domínios não-relacionados. Esses domínios funcionam independentemente e podem ter diferentes funções biológicas. Superlectinas são lectinas que possuem dois ou mais DRCs que ligam carboidratos estruturalmente não relacionados. A Figura 3 mostra um esquema, bem como exemplos de lectinas que podem ser classificadas em cada grupo.

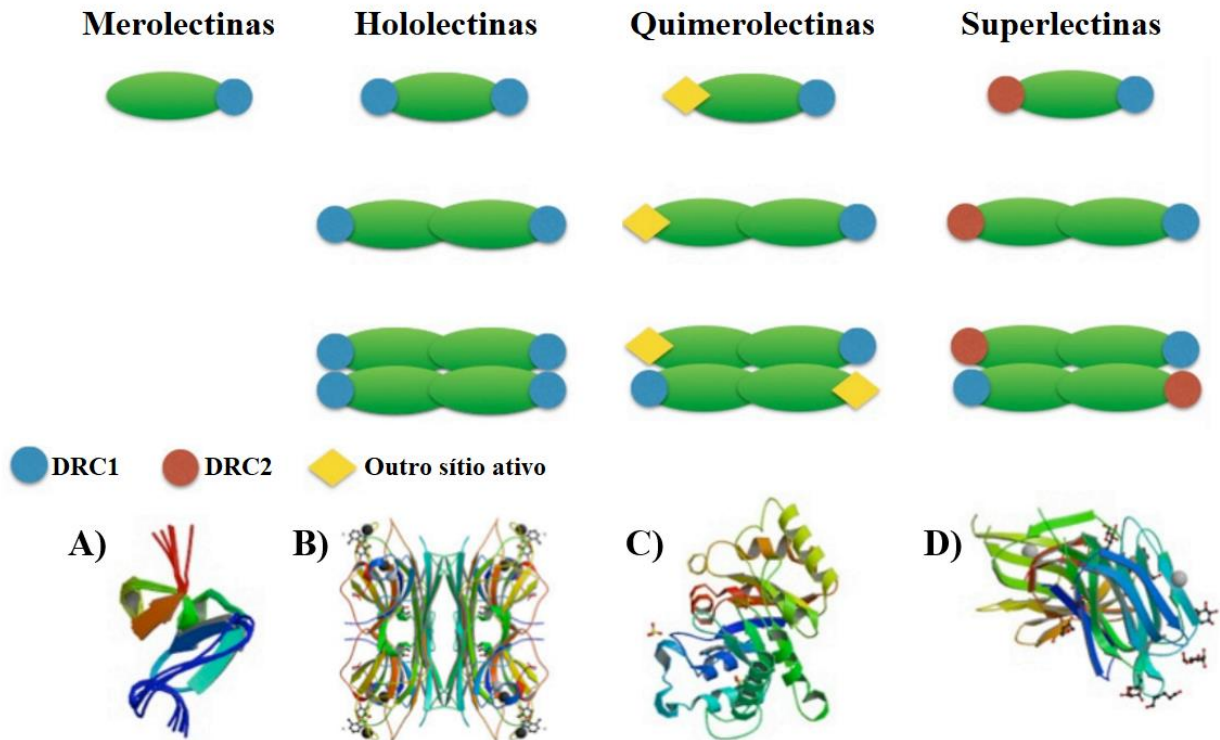
Outro método para a classificação de lectinas está relacionado à especificidade por carboidratos, tais como ligantes à: manose, manose/glicose, GlcNAc, manose/maltose, galactose/GalNAc e lectinas específicas à fucose (VAN DAMME et al., 1998). Este sistema de classificação é útil para a seleção de lectinas para aplicações específicas, mas é artificial e não fornece informações relevantes sobre sua similaridade ou história evolutiva. Mais recentemente, as lectinas de plantas foram agrupadas de acordo com sua relação evolutiva e semelhanças de sequência e considerando a conservação do DRC, aproveitando o rápido progresso na análise estrutural e no sequenciamento de DNA (JIANG; MA; RAMACHANDRAN, 2010). A comparação de sequências e análises filogenéticas das lectinas vegetais disponíveis distinguiu 12 famílias, como mostra a Tabela 1 (VAN DAMME et al., 2008; DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015).

Figura 2 – Estrutura tridimensional de uma lectina de cada família evolutivamente relacionada. A) Lectina de leguminosas - ConV (PDB id: 5F5Q), B) Lectinas de monocotiledôneas ligantes à manose - lectina *Gastrodia elata* (PDB id: 1XDG), C) Lectinas ligantes à quitina compostas por domínios heveínicos - aglutinina de gérmen de trigo (PDB id: 2UVO), D) Proteína inativadora de ribossomo do tipo 2 - Abrina (PDB id: 2ZR1), E) Lectinas relacionadas à Jacalina - Jacalina (PDB id: 1UGW), F) Lectinas de *Amaranthaceae* - Amarantina (PDB id: JLY)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Classificação estrutural de lectinas vegetais em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas. A) Heveína (PDB: 1HEV), B) Lectina de *Dioclea wilsonii* (PDB: 3SH3), C) Lectina 2 de *Parkia platycephalla* (PDB: 2GSJ) e D) Lectina de *Musa acuminata* (PDB: 3MIT)



Fonte: Elaborado pelo autor.

A ocorrência onipresente de lectinas e estruturas de carboidratos na natureza sugere que as lectinas provavelmente possuem várias funções. De fato, em muitos microrganismos, como vírus, bactérias e fungos, elas desempenham papéis importantes na infecção do hospedeiro e contribuem para a patogenicidade (SHARON; LIS, 2007). As lectinas de plantas contribuem para o crescimento, desenvolvimento, defesa e simbiose de plantas com bactérias fixadoras de nitrogênio. As lectinas animais estão envolvidas no controle da biossíntese de glicoproteínas, imunidade, regulação do crescimento e apoptose das células, regulação do ciclo celular, direcionamento de enzimas lisossômicas, *homing* de leucócitos, interações célula-célula nos sistemas imune e neural e interação esperma-óvulo (SHARON; LIS, 2004).

Tabela 1 – Famílias de lectinas de plantas classificadas de acordo com as relações estruturais e evolutivas e a conservação do DRC

Família de lectinas	Especificidade
Família de lectinas de <i>Agaricus bisporus</i>	GlcNAc/GalNAc, Galactose
Família de aglutininas relacionadas à quitinase	<i>N</i> -glicanos oligomanose
Família da Amarantina	GalNAc
Família da Cianovirina	Manose
Família de lectinas de <i>Euonymus europaeus</i>	Galactosídeos, <i>N</i> -glicanos oligomanose
Família de lectinas de <i>Galanthus nivalis</i>	Manose
Família da Heveína	Quitina
Família da Jacalina	Subgrupos manose- e galactose-específicas
Família das lectinas de leguminosas	Manose
Família da LysM	Quitina, peptídeoglicanos
Família da lectina de <i>Nicotiana tabacum</i>	(GlcNAc) _n , <i>N</i> -glicanos oligomanoses e complexos
Família da Ricina-B	Gal/GalNAc, Gal/GalNAc-sializado

Fonte: Adaptado de DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015

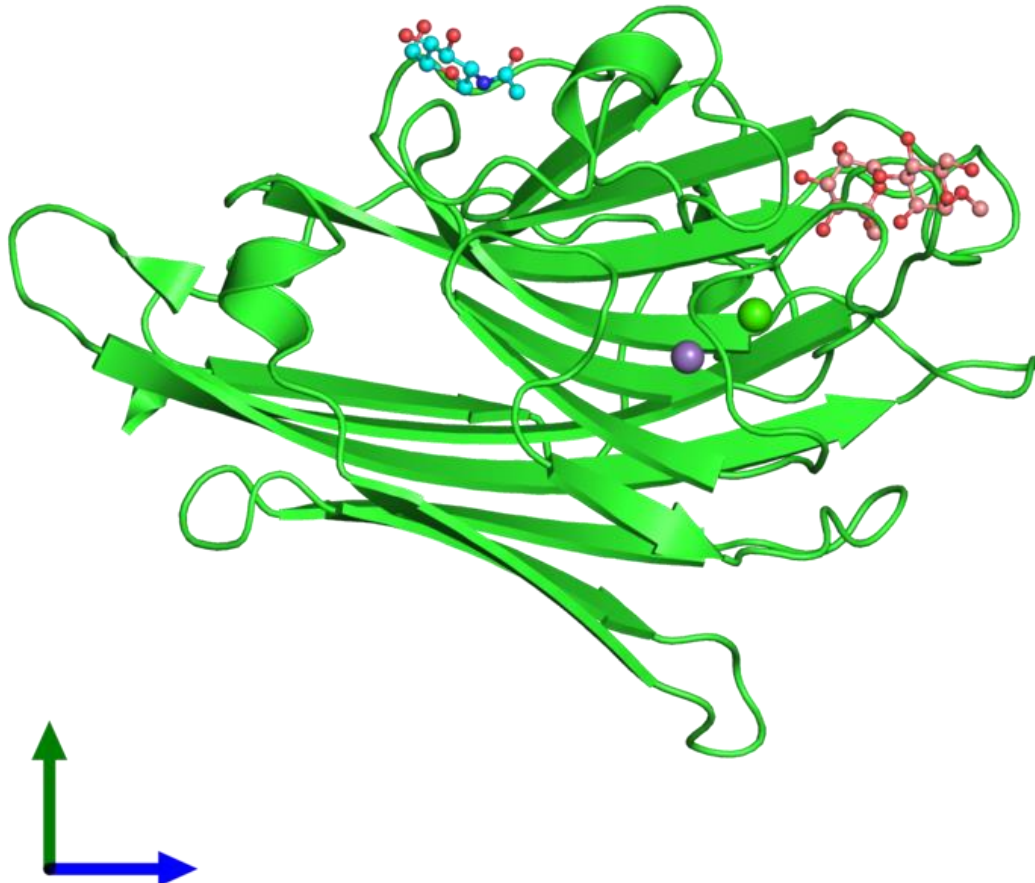
1.4 Lectinas de leguminosas

As mais bem estudadas de longe são aquelas extraídas de plantas da família *Leguminosae* (Lectinas de leguminosas - LL). Entre todas as lectinas, as LLs formam um grande grupo de lectinas relacionadas que, apesar de suas diferenças de especificidade para carboidratos, compartilham um alto grau de similaridade de sequência e regiões conservadas (GAUTAM et al., 2018; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). Além disso, as LLs geralmente são abundantes em sementes e significativamente menos abundantes em outros tecidos. As LLs geralmente se ligam a açúcares simples, como glicose/manose, *N*-acetil-galactosamina/galactose, fucose e *N*-acetil-glucosamina, além de açúcares mais complexos, como glicanos de tamanhos variados (FERNANDES et al., 2011; GAUTAM et al., 2018). Muitas LLs são hololectinas que têm potencial para aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Os domínios de reconhecimento de carboidratos nas LLs são altamente conservados e compostos por 4 alças diferentes na estrutura da proteína (SHARMA; SUROLIA, 1997). Caracteristicamente também, a atividade de ligação a carboidratos não ocorre sem a presença concomitante de cálcio e outro íon de transição nas proximidades do DRC para a vasta maioria das LLs (LORIS et al., 1998). Além da capacidade de ligar carboidratos, essas lectinas também são capazes de interagir com outros ligantes, como moléculas hidrofóbicas, em uma região distinta do DRC (DELATORRE et al., 2013; ROBERTS; GOLDSTEIN, 1983). Muitas, mas não todas, as LLs são glicosiladas e têm pelo menos uma glicosilação oligomanose ou complexa. A glicosilação nessas lectinas normalmente resulta na formação de complexos quaternários de LLs estabilizando ou desestabilizando a associação não-covalente das subunidades para auxiliar na formação de dímeros ou impedir a formação de tetrâmeros (PEUMANS et al., 2001). Até agora, não há evidências de que os glicanos desempenhem um papel estrutural no reconhecimento de ligantes.

As lectinas de leguminosas são bem caracterizadas em termos de suas estruturas terciárias e a interação com os carboidratos é muito conservada em termos de topologia estrutural semelhante a um *jellyroll* ou arquitetura β -sanduíche. Cada unidade estrutural contém aproximadamente 250 aminoácidos e é construída com 13 fitas- β , sete na face frontal e seis na face traseira interconectados por *loops* e β -voltas. As α -hélices não são encontradas e aproximadamente metade dos resíduos no domínio consiste em *loops* e voltas. Uma figura do *jellyroll* é apresentada na figura 4. O arranjo antiparalelo das fitas- β nas faces frontal e traseira tem, como consequência, uma conectividade muito forte dentro do monômero devido às

várias ligações de hidrogênio entre elas (BRINDA et al., 2004 ; HAMELRYCK, THOMAS W. et al., 1998; LORIS et al., 1998; OSTERNE et al., 2017).

Figura 4 – Esquema de um jellyroll da estrutura da lectina de *Centrolobium microchaete* (PDB id: 5EYY)



Fonte: Elaborado pelo autor.

À nível da estrutura quaternária, as LLs são encontradas principalmente nas formas de dímeros ou tetrâmeros. Algumas dessas oligomerizações geram um número de bolsões hidrofóbicos que podem acomodar ligantes hidrofóbicos como adenina e outros hormônios. A variação na associação de subunidades também resulta em um nível mais alto de especificidade e afinidade de ligação (HAMELRYCK, T. W. et al., 1999; MANOJ; SUGUNA, 2001; SHETTY et al., 2013). O domínio de reconhecimento à carboidratos é normalmente uma cavidade superficial na superfície da lectina com sequências contendo alguns aminoácidos invariantes comuns a todas as lectinas de leguminosas, como um ácido aspártico, uma asparagina, uma glicina e um resíduo aromático ou uma leucina (SHARON; LIS, 2001). Apesar da presença de resíduos-chave, há variabilidade na especificidade dentro

deste grupo com lectinas como ConA que se ligam amaranose e derivados, enquanto outras lectinas como a aglutinina de amendoim e aglutinina de soja que se ligam a galactose e derivados. Isso mostra claramente que os aminoácidos invariantes são muito importantes para a ligação, mas não são responsáveis pela especificidade que surge de outras regiões do domínio de ligação. A estrutura do DRC é formada por quatro loops geralmente designados como A, B, C e D, sendo o último bastante variável em comprimento, sequência e conformação e supõe-se que seja um fator importante na determinação da especificidade da lectina (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005; SHARMA; SUROLIA, 1997; SHARON; LIS, 2001). Nas proximidades do CRD, as LLs apresentam um sítio de ligação à metais contendo um Ca^{2+} e um Mn^{2+} por monômero. Esses cátions não estão diretamente envolvidos com a ligação com carboidratos, mas são essenciais para o posicionamento dos resíduos para interação com os mesmos (LORIS et al., 1998). A interação com carboidratos ocorre através de uma intrincada rede de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre a proteína e o ligante (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005; LORIS et al., 1998).

As lectinas de plantas, especialmente LLs, atraíram o interesse da comunidade científica, uma vez que são ferramentas muito úteis em biotecnologia, na indústria química e nas ciências médicas. Isso levou a uma situação em que se sabe muito sobre essas proteínas, suas especificidades/afinidades, estrutura etc., mas praticamente nada se sabe sobre suas funções biológicas no organismo do qual são extraídas. Portanto, embora as funções exatas dessas proteínas nas plantas permaneçam incertas, os dados da literatura sugerem uma variedade de papéis, como mediar a ligação de bactérias nas raízes (BREWIN; KARDAILSKY, 1997; HIRSCH, 1999, RAMOS et al., 2000). proteínas de armazenamento (GAUTAM et al., 2018), defesa contra patógenos (LANNOO; VAN DAMME, 2014; PEUMANS; VAN DAMME, 1995), entre outros.

Em relação à sua aplicabilidade, as lectinas podem ser aplicadas em diversas atividades biológicas e/como ferramentas biotecnológicas. Não é de surpreender que a grande maioria das aplicações dependa da interação lectina-carboidrato. Algumas de suas aplicações são: imunotoxinas (FRANZ; PFÜLLER, 1983), ferramentas para a investigação de receptores glicosilados (BELICKÝ; KATRLÍK; TKÁČ, 2016), microrganismos e tipagem sanguínea (HART, 1980; KHAN, FAUZIA et al., 2002), atividade inseticida (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; REYES-MONTAÑO; VEGA-CASTRO, 2018), antifúngica (GOMES et al., 2012), bactericida e antibiofilme (ALYOUSEF; ALQASIM; ALOAHD, 2018; VASCONCELOS et al., 2014), antiviral (MAZALOVSKA; KOUOKAM, 2018), efeito inflamatório (ALMEIDA et al., 2016; ASSREUY et al., 1997), efeito vasorelaxante (ALVES

et al., 2015), mapeamento e diagnóstico do câncer (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017), lectinas imunomodulatórias (SOUZA et al., 2013), captura de glicoconjugados para estudos de glicoproteômica (ALVES et al., 2015), bem como suas aplicações em nanobiotecnologia, visando o uso em terapia e pesquisa (SHARMA, ANJALI; SHARMA ; KHULLER, 2004; VENUGOPAL et al., 2016).

1.5 Lectinas de Diocleinae

As lectinas de leguminosas extraídas de plantas da subtribo Diocleinae normalmente têm especificidade para manose/glicose e carboidratos relacionados. Este grupo de lectinas, também chamadas de lectinas do tipo ConA, designadas por sua semelhança com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), é bastante estudado e vários trabalhos relataram suas purificações, caracterizações físico-químicas e estruturais, além de suas aplicações em diversas atividades biológicas (CAVADA et al., 2018; CAVADA et al., 2019; OSTERNE et al., 2017). Uma característica interessante sobre esse grupo de proteínas é seu alto grau de similaridade nos níveis de estrutura primária e terciária, o que não impede que eles apresentem resultados muito diferentes quando testados para atividades biológicas. A explicação para isso é o fato de que a substituição de alguns aminoácidos altera a posição de resíduos-chave, o que resulta em alterações na estrutura terciária e quaternária, alterando levemente a interação com carboidratos e, conseqüentemente, as atividades biológicas dependentes dessa interação (CAVADA et al., 2019; CAVADA et al., 2001).

As lectinas do tipo ConA têm a interessante propriedade de ter um conjunto de subunidades muito característico, resultantes de um processamento pós-traducional chamado permutação circular (GOODSELL, 2010; HEMPERLY; CUNNINGHAM, 1983). Nesse processamento, o gene da lectina é traduzido em uma pré-proteína glicosilada. No retículo endoplasmático, o precursor da lectina perde seu peptídeo sinal e agora é chamado de pró-lectina. No complexo de Golgi, a pró-lectina sofre clivagem proteolítica e perde um segmento glicosilado de quinze aminoácidos no centro de sua estrutura e um peptídeo na região C-terminal, esse processo libera uma quantidade suficiente de energia para posterior religação. Com esta perda na cadeia inicial, o polipeptídeo é agora clivado em dois peptídeos β e γ , que agora estão ligados, mas em ordem diferente. A subunidade que estava anteriormente na região N-terminal está ligada à subunidade β tendo uma inversão entre as regiões N e C-terminal formando a subunidade α , também chamada lectina madura. Este processo é catalisado por uma enzima asparaginil endopeptidase que não possui 100% de rendimento,

uma vez que algumas cadeias β e γ não ligadas estão sempre presentes na preparação dessas lectinas. Portanto, em um gel de SDS-PAGE, três bandas são observadas. Acredita-se que a maioria das lectinas do tipo ConA sofra o mesmo processamento (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985; OSTERNE et al., 2014; SHARON; LIS, 2007). A determinação das estruturas primárias e terciárias foi usada como uma maneira de entender essa diferença na especificação de proteínas purificadas a partir de amostras filogeneticamente estreitamente relacionadas e para obter informações sobre sua origem evolutiva.

Outra propriedade de algumas lectinas do tipo ConA é a oligomerização dependente de pH, na qual a proporção de proteínas na oligomerização dimérica e tetramérica pode ser alterada de acordo com o pH do meio (NAGANO et al., 2008). As alterações nesse equilíbrio dímero/tetrâmero podem influenciar diretamente as atividades biológicas, pois essas lectinas são capazes de interagir com glicanos de glicoconjugados com maior afinidade quando na forma tetramérica (OLIVEIRA et al., 2008; SOL et al., 2007; WAH et al., 2001).

Várias lectinas da subtribo Diocleinae podem elicitar atividades biológicas como inflamatória, vasoativa, antiproliferativa, imunomodulatória, entre outras. Essas atividades estão diretamente relacionadas à sua capacidade de interagir com ligantes de glicano na superfície celular e, por isso, o efeito é afetado de perto pela afinidade e pelo modo de ligação entre carboidratos e lectina, gerando variabilidade em efeito (CAVADA et al., 2019a , 2019b).

1.6 Lectina de *Dioclea violacea*

Dioclea violacea é uma leguminosa nativa do Brasil conhecida popularmente como olho-de-boi. A planta é uma videira lenhosa cujas folhas são compostas por três folíolos elípticos ovais, com inflorescência em forma de orelha, comprida com flores roxas e pétalas branco-amareladas na base. Os frutos são vagens contendo sementes globosas grandes, duras e marrons (QUEIROZ, 2015; ZAPPI et al., 2015). Esta planta é usada na medicina popular como tranquilizante, tônico, parasiticida e inseticida. Verifica-se também sua aplicação na prevenção de derrames e remoção de sequelas decorrentes desse problema, além de ser aplicada em casos de epilepsia (FERN, 2020). Imagens da semente e planta, bem como a taxonomia de *Dioclea violacea* são mostradas na figura 5.

Figura 5 – Taxonomia e imagens de sementes e plantas de *Dioclea violacea*

Reino: *Plantae*

Divisão: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Leguminosae*

Tribo: Phaseolae

Subtribo: Diocleinae

Gênero: *Dioclea*

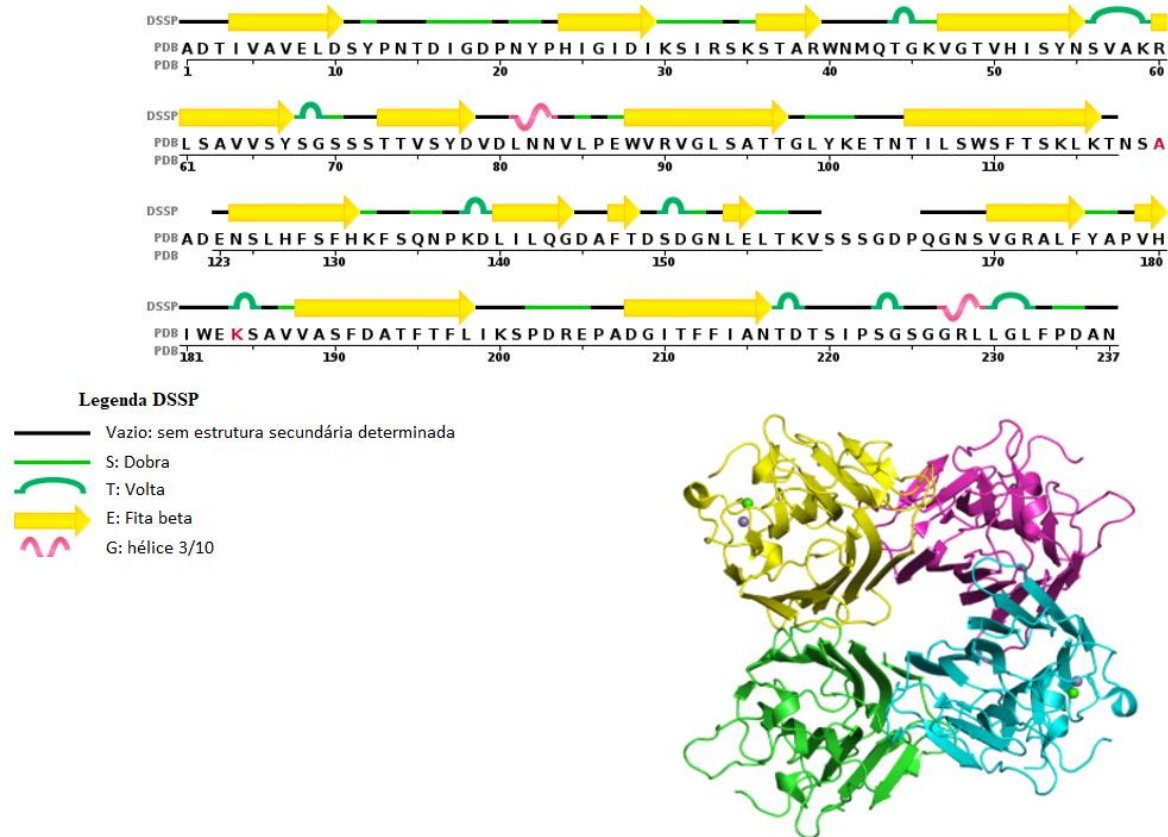
Espécie: *Dioclea violacea*



Fonte: Imagens de: <https://faunaefloradorn.blogspot.com/2018/07/olho-de-boi-dioclea-violacea-mart-ex.html>

A lectina de *Dioclea violacea* (DVL) é uma lectina do tipo ConA com afinidade para manose, glicose e açúcares relacionados, inicialmente purificada por Moreira et al. 1996. ConA e DVL mostraram ser bastante semelhantes, compartilhando mais de 80% de similaridade no nível da estrutura primária e também no nível da estrutura tridimensional, apesar de seus efeitos nos testes biológicos serem bastante diferentes em alguns trabalhos (NASCIMENTO et al., 2018, 2019). Estruturalmente, DVL se apresenta na oligomerização tetramérica, independentemente do pH do meio (BEZERRA et al., 2013). Em modelos animais, a administração de DVL foi associada com ambas as atividades anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (CLEMENTE-NAPIMOGA et al., 2019; DE ALENCAR et al., 2013). Além disso, DVL foi capaz de induzir o relaxamento das aortas de ratos, além de outras atividades biológicas. Em relação ao efeito antitumoral, foi relatado que o DVL tem efeito antitumoral nas células de glioma de camundongos da linha C6 e glioma humano da linha U87, um efeito envolvido na ativação dos fenômenos programados de morte celular, basicamente autofagia e apoptose (NASCIMENTO et al., 2018, 2019). A sequência e a estrutura tridimensional estão representadas na figura 6.

Figura 6 – Estruturas primária, secundária e terciária da lectina de *Dioclea violacea* lectin (PDB id: 2GDF)



Fonte: Elaborado pelo autor.

1.7 Aplicações das lectinas no diagnóstico e terapia do câncer

O termo câncer inclui diferentes patologias que têm características comuns: desregulação na divisão celular, perda da capacidade de diferenciação celular, aumento da sobrevivência celular e aumento da capacidade de migração celular (FOUAD; ANEI, 2017). A tumorigênese em humanos é um processo complexo que reflete alterações genéticas que levam a uma transformação progressiva de células normais em derivadas altamente malignas (TABASSUM; POLYAK, 2015). O processo pelo qual as células normais se transformam progressivamente em células tumorais pode ser o resultado de processos endógenos, como erros na replicação do DNA, instabilidade química intrínseca de algumas bases de DNA, perda de heterozigose ou ataque de radicais livres gerados durante o metabolismo. O dano ao DNA também pode ser o resultado de interações com agentes exógenos, como radiação ionizante, radiação UV e/ou agentes cancerígenos químicos. As células possuem mecanismos

para reparar esses danos, mas, por várias razões, podem ocorrer erros e, com isso, mutações no genoma dessas células (BERTRAM, 2000).

A transição das células normais para as células tumorais envolve a participação de genes envolvidos nos mecanismos de homeostase que controlam a proliferação e morte celular. Se essas alterações e mutações induzem a ativação de genes que estimulam a proliferação ou protegem a célula da morte, esses genes são chamados protooncogenes. Se mutações inativam genes que normalmente inibem a proliferação, esses genes são referidos como supressores de tumores (LEE; MULLER, 2010). As marcas de câncer são seis capacidades adquiridas durante o desenvolvimento de tumores. Eles incluem a manutenção da sinalização proliferativa, evasão de supressores proliferativos, resistência à morte celular, ativação da imortalidade replicativa, indução da angiogênese e capacidade de invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

As abordagens atuais para o tratamento do câncer e seus efeitos inevitavelmente acabam causando várias condições nocivas e perigosas para o paciente, por isso há uma demanda por uma alternativa eficaz e específica contra essas doenças que gerariam menos efeitos adversos. Para diminuir essas condições prejudiciais, sugerem-se alguns alvos específicos, abrindo portas para novas terapias e métodos de diagnóstico.

Como existem estruturas aberrantes e o aparecimento de glicoconjugados com estruturas incomuns nos glicanos encontrados nas células cancerígenas, a detecção desses glicoconjugados é facilmente realizada pela aplicação de lectinas (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017). As lectinas vegetais também têm sido utilizadas como ferramentas para o reconhecimento de tumores, considerando sua capacidade de diferenciar tumores benignos e malignos com base no grau de glicosilação (PIHÍKOVÁ; KASÁK; TKAC, 2015). Como exemplo, a lectina de *Lens culinaris* (LCA) é útil na discriminação de carcinoma hepatocelular de doenças hepáticas benignas e também é vantajosa no diagnóstico de algumas condições de metástase do hepatoma (ALSALLOOM, 2016). O desenvolvimento de novos microarranjos com lectinas ajuda na determinação de estruturas de glicanos e fornece uma plataforma útil para análises com alto rendimento de amostras biológicas, fornecendo uma nova dimensão para o diagnóstico e prognóstico do câncer.

Além de reconhecer os glicanos nas células cancerígenas, várias lectinas também demonstram atividade antiproliferativa diretamente, esse efeito geralmente é causado pela ligação à glicanos nos na membrana celular desencadeando processos de aglutinação ou agregação concomitantemente ou não com citotoxicidade através de mecanismos tais como apoptose, autofagia e/ou necrose (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005). Além do que foi dito

anteriormente, as lectinas também podem induzir atividade imunomodulatória por meio da interação com glicanos presentes na superfície das células do sistema imune, o que ativa a liberação de citocinas que exercem um efeito tumoricida (SOUZA et al., 2013) . Da mesma forma, novas estratégias foram estabelecidas em investigações pré-clínicas e clínicas para desenvolver um tratamento combinatório que consiste em imunoterapia juntamente com outras terapias anticâncer. As lectinas vegetais também têm sido amplamente utilizadas para direcionamento específico nos sistemas de *drug-delivery*. Como exemplo disso tem-se a aplicação de WGA em terapias para câncer de bexiga como agente para entregar doxorrubicina diretamente no tumor (APFELTHALER et al., 2018), além de lectinas imobilizadas em estruturas nanoestruturadas para administração de medicamentos.

Além de serem utilizadas na administração de medicamentos, estudos mostraram que as próprias lectinas podem ser aplicadas como agentes antineoplásicos devido a seus potentes efeitos antiproliferativos e à capacidade de induzir apoptose e autofagia em várias linhagens de células tumorais (CATANZARO et al., 2019). O efeito dessas lectinas está relacionado à sua capacidade de se ligar a proteínas glicosiladas na membrana das células cancerígenas e é sabido que os glicoconjugados têm funções importantes em vários processos biológicos, sendo o desenvolvimento e manutenção do câncer um deles.

Estudos têm demonstrado o efeito antiproliferativo de lectinas como as lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia bonariensis* (CaBo), *Dioclea violacea* (DVL) e *Dioclea lasiocarpa* (DLL) contra células de glioblastoma. Todas essas lectinas induziram uma redução significativa na viabilidade celular. Em adição, algumas delas afetaram o potencial da membrana mitocondrial, a migração celular e induziram alterações morfológicas nas células. A análise colorimétrica indicou morte celular por autofagia, apoptose e necrose induzida pela via mitocondrial e modulação de metaloproteinases (CAVADA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019; PRATT; ROY; ANNABI, 2012). As lectinas também foram testadas contra linhagens de células cancerígenas de ovário, pulmão, próstata, mama, pele, entre outras e, em praticamente todos os casos, algum nível de indução de morte celular foi geralmente observado pela indução de alguma via de morte celular programada (CAVADA et al., 2018; DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; GONDIM et al., 2017).

1.8 Nanotecnologia e partículas de CaCO₃

A nanotecnologia é definida como qualquer tecnologia em nanoescala que tenha aplicação no mundo real. A nanotecnologia abrange a produção e aplicação de sistemas

físicos, químicos e biológicos em escalas que variam de um átomo individual a vários átomos ou moléculas em dimensões nanométricas, bem como a integração das nanoestruturas resultantes em sistemas maiores. É provável que a nanotecnologia tenha um impacto profundo em nossa economia e sociedade no início do século XXI, comparável ao da tecnologia de semicondutores, tecnologia da informação e biologia celular/molecular. A nanotecnologia promete avanços em áreas como materiais e manufatura, nanoeletrônica, medicina e saúde, energia, biotecnologia, tecnologia da informação e segurança nacional. A nanotecnologia é amplamente considerada a próxima Revolução Industrial (JEEVANANDAM et al., 2018; RAI; RAI 2015).

Os recursos em nanoescala são construídos principalmente a partir de seus constituintes elementares (KHAN, IBRAHIM; SAEED; KHAN, 2019). Exemplos incluem síntese química, automontagem a partir de reagentes simples em solução, biomoléculas como DNA e proteínas usadas como blocos de construção para produzir nanoestruturas e pontos quânticos (BHUSHAN, 2007).

A descoberta de novos materiais e processos em escala nanométrica e o desenvolvimento de novas técnicas experimentais e teóricas criam novas oportunidades para o desenvolvimento de nanossistemas inovadores e materiais nanoestruturados. As propriedades dos nanomateriais podem ser dramaticamente diferentes daquelas em uma escala maior. Quando o tamanho de um material é pequeno, ocorrem mudanças consideráveis nas suas propriedades. Se apenas um comprimento de uma nanoestrutura tridimensional é de dimensões nanométricas, a estrutura é chamada de poço quântico; se dois lados têm um nanômetro de comprimento, a estrutura é chamada de fio quântico; se todas as três dimensões estão na faixa nano, a estrutura é chamada de ponto quântico. O termo quantum está associado a esses três tipos de nanoestruturas porque alterações nas propriedades surgem da natureza mecânica da física no domínio nanométrico (OWENS; POOLE, 2008). Os materiais podem ser nanoestruturados para obtenção de novas propriedades e desempenho inovador. Este campo está abrindo novos caminhos em ciência, tecnologia e saúde.

Na nanotecnologia, candidatos promissores para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada e liberação de medicamentos são nanopartículas porosas feitas de materiais inorgânicos (PATRA et al., 2018). Nesse contexto, o carbonato de cálcio (CaCO_3) é um biomaterial inorgânico promissor devido à sua estabilidade química, bioatividade, biocompatibilidade e potencial de aplicação na administração de medicamentos (DIZAJ et al., 2015). CaCO_3 existe em três modificações polimórficas anidras: vaterita, aragonita e calcita, com estruturas romboédrica, ortorrômbica e hexagonal, respectivamente (ERCAN; ORAL;

KAPUSUZ, 2019). Dentre esses polimorfos, a vaterita é o mais promissor devido à sua tendência a formar agregados policristalinos com alta porosidade e área superficial, resultando em alta capacidade de carga de medicamentos e na possibilidade de liberação lenta/controlada da substância terapêutica (TRUSHINA et al., 2014). O tamanho e a forma das partículas têm uma alta influência na recristalização, propriedades de dissolução e estabilidade na solução. Em aplicações de administração de medicamentos, o formato das partículas mostrou-se fortemente relacionado às respostas celulares, absorção de partículas pelas células, efeito na viabilidade celular, apoptose, adesão, migração e formação de citoesqueleto (JINDAL, 2017; ZHENG; YU, 2016)

As partículas de carbonato de cálcio têm uma ampla gama de aplicações como modelos para a montagem de micropartículas a partir de hidroxiapatita (TRUSHINA et al., 2014) ou em complexos com biomoléculas como proteínas (ERGUL YILMAZ et al., 2016), além de microcápsulas e nanocápsulas criadas pela técnica conhecida como camada por camada (JOSHI; SRIVASTAVA, 2009; SUKHORUKOV et al., 2004). Para a fabricação de cápsulas, as partículas de carbonato de cálcio são amplamente reconhecidas como estando entre os núcleos mais atraentes. Isso se deve principalmente aos métodos simples e de baixo custo disponíveis para sua fabricação. A estrutura da cápsula é determinada pelo tamanho, forma e propriedades do molde (BISWAS; NAGARAJA; MCSHANE, 2014; LIU et al., 2009) e a porosidade do molde sólido determina a estrutura interna da cápsula, a morfologia da casca e das propriedades de liberação do material final (LIU et al., 2009; YOW; ROUTH, 2006). Partículas porosas, como as de carbonato de cálcio, permitem um encapsulamento mais eficaz de moléculas do que partículas não-porosas, como sílica e poliestireno (RENDER et al., 2016; SUKHORUKOV et al., 2004; TROFIMOV et al., 2018).

Várias morfologias de partículas de carbonato de cálcio na faixa de tamanho de micrômetros, incluindo esferas ocas (CAI et al., 2008), hexágonos (POUGET et al., 2010), microanéis (MAO et al., 2013) entre outras. Muitas abordagens têm sido amplamente utilizadas para controlar as fases e a morfologia das partículas e aditivos solúveis em água, tais como surfactantes aniônicos, têm sido tipicamente usados para modificar polimorfos de cristais de CaCO_3 (KANG et al., 2005). Partículas de vaterita com diferentes morfologias (como amendoim, tipo haltere, etc.) foram produzidas com fatias hexagonais. Nessas abordagens, os copolímeros geralmente eram produzidos durante a fabricação (BOYJOO; PAREEK; LIU, 2014). No entanto, a presença de aditivos solúveis pode afetar a estrutura final e levar a propriedades interessantes, principalmente no que diz respeito à biocompatibilidade.

O tamanho dos cristais esféricos das partículas de CaCO_3 pode ser regulado por condições de agitação, principalmente tempo e velocidade de agitação durante a mistura direta dos sais precursores (CaCl_2 e Na_2CO_3) em supersaturação (YAN et al., 2009), esse fenômeno pode ser explicado por um efeito de agitação na formação de núcleos durante o processo de nucleação heterogênea. Uma abordagem alternativa que pode ser usada para controlar a forma e o tamanho das partículas de vaterita é baseada na diminuição da taxa de solubilização dos sais, substituindo parcialmente o solvente; de fato, a influência do solvente no tamanho das partículas esféricas de vaterita e o mecanismo de sua formação já foram relatados anteriormente (KONOPACKA-YSYSWAWA, 2019). Além disso, a síntese de partículas anisotrópicas foi recentemente demonstrada (PARAKHONSKIY et al., 2015). Algumas das aplicações mais avançadas dessas partículas, bem como cápsulas modeladas nessas partículas, estão previstas na área de administração de medicamentos e liberação controlada.

Biomoléculas e partículas podem interagir de diferentes maneiras, geralmente através de algum tipo de funcionalização e vários tipos de estratégias de conjugação foram desenvolvidos. Um dos métodos mais antigos de ligação de moléculas e partículas é a adsorção direta. As biomoléculas podem interagir com partículas de maneira direta com diferentes tipos de partículas. Entretanto, a interação desse tipo é geralmente fraca e inespecífica e, por isso, poucas aplicações fazem uso desse tipo de conjugação (CAGLIANI; GATTO; BARDI, 2019), embora essa característica possa ser desejável, como no caso de sistemas de liberação lenta. O acoplamento covalente, em contraste com o método de adsorção, fornece uma conjugação específica e estável de biomoléculas com partículas. Normalmente, grupos funcionais na superfície das partículas, incluindo grupos carboxílicos, amidas e tióis, podem fazer conexões com biomoléculas por meio de várias estratégias cujo resultado final é a formação de uma ligação química forte entre a partícula e a biomolécula (AUBIN-TAM, 2013; CAGLIANI; GATTO; BARDI, 2019; MOLAVIPORDANJANI; HOSSEINIMEHR, 2019).

1.9 Sistemas de liberação controlada

Os métodos convencionais de administração de medicamentos são desenvolvidos de maneira a liberar o agente ativo rapidamente. Nesses sistemas, geralmente, compostos diluentes são empregados para ajudar na solubilização do agente e, nesses sistemas, manter o medicamento dentro de uma faixa terapêutica às vezes é difícil (WEN; JUNG; LI, 2015). Nos métodos convencionais de administração, a concentração do medicamento aumenta até a

dissolução completa e começa a baixar pouco tempo depois, exigindo uma nova dose, isso pode levar a alguns problemas. Altas concentrações da droga, acima da faixa terapêutica, podem ser tóxicas, enquanto baixas concentrações podem não ser eficazes e têm o problema adicional de levar à resistência. Uma das maneiras de minimizar esses problemas é a criação de sistemas de liberação controlada, geralmente aplicando sistemas nanoestruturados para encapsular e modular a liberação do medicamento e mantendo sua concentração na faixa terapêutica pelo maior tempo possível (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012; WEN; JUNG; LI, 2015).

Os sistemas de liberação controlada emergem como uma nova estratégia para a administração de medicamentos, com grandes vantagens, como um melhor controle da liberação do medicamento, tempos reduzidos em doses tóxicas e subterapêuticas, possibilidade de verificar os níveis do medicamento no local da aplicação, obtenção de altas concentrações do medicamento no local específico a ser tratado, direcionando o princípio ativo a alvos específicos sem passar por locais problemáticos, como o trato gastrointestinal, que podem ser um obstáculo se o medicamento não for absorvido por essa via. Alguns desses sistemas também podem apresentar a capacidade de proteger a substância ativa da degradação que, em um método de administração convencional, exigiria aplicações repetidas da substância (HOMAYUN; LIN; CHOI, 2019; TIWARI et al., 2012) . Um dos principais fatores a serem considerados nos sistemas de liberação controlada é a degradação do sistema encapsulante, que influencia diretamente a liberação do medicamento, tornando a estabilidade do sistema um dos principais fatores a serem considerados para evitar uma degradação prematura. Os sistemas poliméricos aplicados em sistemas de liberação controlada podem ser sintetizados a partir de vários polímeros, biodegradáveis ou não. Esses polímeros precisam ser biocompatíveis, quimicamente inertes, não-carcinogênicos e hipoalergênicos. Além disso, o material não deve ser física ou quimicamente alterado pelo tecido local ou provocar qualquer resposta inflamatória (KAMALY et al., 2016; LEE; YEO, 2015; YANG; PIERSTORFF, 2012). Diferentes tipos de materiais e sistemas coloidais podem e influenciarão a cinética, a distribuição e a liberação da substância ativa, por exemplo medicamento, vacina ou proteína terapêutica.

Os principais sistemas aplicados para entrega e liberação de drogas são aqueles em que o medicamento é encontrado incorporado ou adsorvido na estrutura do transportador. A droga pode ser liberada no organismo principalmente por dois mecanismos diferentes, a difusão e a erosão (LIECHTY et al., 2010; RAVAL; PARIKH; ENGINEER, 2010). Na difusão, o agente ativo difunde-se do agente encapsulante devido à diferença de concentração.

Na erosão, o controle químico ocorre devido à degradação do transportador. Um terceiro tipo de liberação envolve o processo de ativação do solvente, no qual as cadeias poliméricas são quebradas pela clivagem das ligações químicas, resultando na liberação da droga. Outra estratégia é aplicada quando o fármaco é covalentemente ligado ao polímero e pode ser liberado por enzimas específicas (LIECHTY et al., 2010).

1.10 Docking molecular aplicado à lectinologia

Com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento, várias espécies tiveram seu genoma sequenciado, revelando o conhecimento sobre várias proteínas mesmo antes de sua purificação. A obtenção da estrutura da proteína e sua análise geral ainda são muito dependentes de metodologias caras e trabalhosas, como a cristalografia de raios-X. O campo da bioinformática aplicado às proteínas é um ótimo complemento para esses estudos, devido à sua capacidade de prever alguns resultados, direcionando e reduzindo e direcionando os experimentos de bancada necessários. A bioinformática aplicada em estudos de proteínas concentra-se na modelagem molecular para prever a estrutura tridimensional, geralmente baseando-se em outras estruturas resolvidas experimentalmente com um alto grau de identidade, *docking* molecular para prever a ligação entre proteínas e ligantes e a dinâmica molecular para estudar os estados da proteína em solução, esta última técnica complementa as outras duas, ajudando na validação e gerando muitos dados sobre a dinâmica da proteína.

O *docking* molecular surgiu devido às necessidades da biologia estrutural e da descoberta de drogas. Essa técnica foi facilitada pelo aumento dramático no poder computacional e pela facilitação no acesso a estruturas de ligantes na literatura e nas bases de dados (PINZI; RASTELLI, 2019). O objetivo do *docking* molecular é prever o reconhecimento molecular, estruturalmente, encontrando-se posições favoráveis de ligação e energeticamente, predizendo a afinidade de ligação. Esta técnica tem uma variedade de aplicações, incluindo previsão da localização de sítios de ligação nas proteínas, localização das regiões para interações com drogas, análise de ligação entre lectinas e carboidratos, estimativa da força das interações entre moléculas. Além disso, é possível verificar como as alterações estruturais podem afetar a ligação das proteínas aos ligantes, por meio de análise comparativa com moléculas mutadas (FAN; FU; ZHANG, 2019; JAIN et al., 2018).

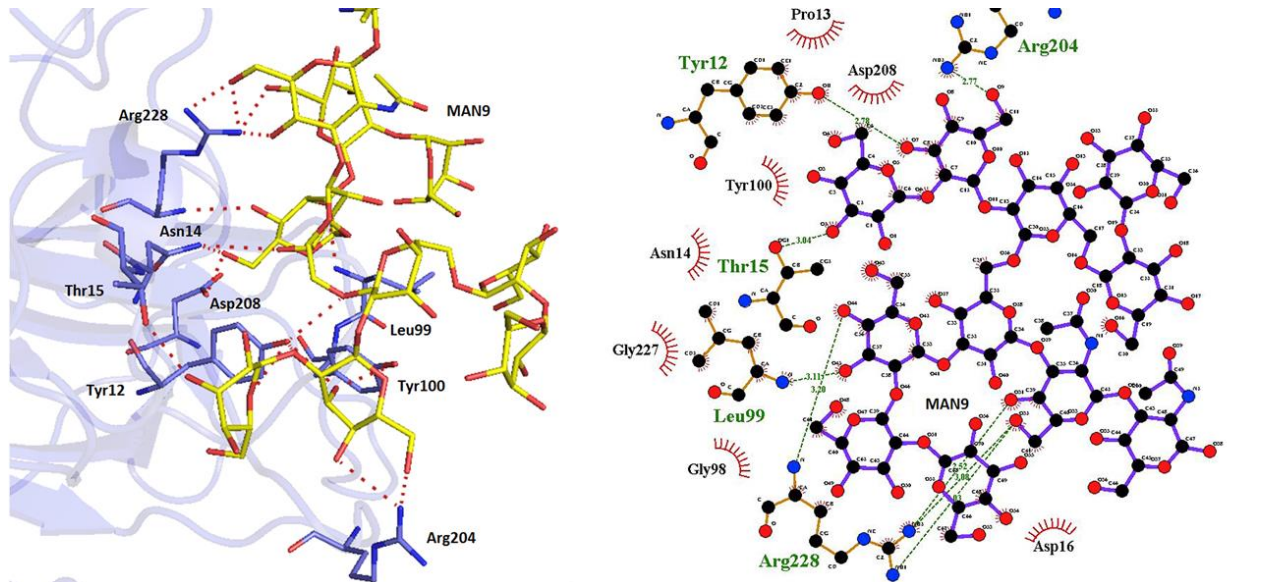
Essa técnica permite a triagem de grandes bibliotecas de compostos, avaliação da afinidade e especificidade com base em propriedades estruturais e químicas, como tamanho, geometria, distribuição de carga, polaridade e potencial para interações hidrofóbicas e

ligações de hidrogênio. O objetivo de testar bancos de possíveis ligantes é identificar compostos que se ligam a uma proteína-alvo. Dessa forma, a reação bioquímica que a proteína alvo realiza pode ser alterada, permitindo a descoberta de possíveis ferramentas médicas e/ou biotecnológicas (CHEN et al., 2012; COLEMAN et al., 2013). Atualmente, o acesso a um banco de dados de estruturas de proteínas (Protein Data Bank) e grandes bibliotecas de pequenas moléculas comercialmente acessíveis, como o banco de dados ZINC (IRWIN; SHOICHET, 2005), fornecem um grande número de possíveis novos ligantes e alvos a serem testados. Uma vez testados *in silico*, esses ligantes podem ser comprados ou sintetizados para testes *in vitro* e/ou *in vivo*, acelerando a pesquisa farmacêutica e biotecnológica (LORBER; SHOICHET, 2005). Essa abordagem de testar um grande número de compostos usando *docking* molecular é chamada de *screening* virtual.

O encaixe de moléculas com possíveis ligantes segue uma ordem. Primeiro, é feita a separação dos prováveis sítios de ligação, depois é feita a sobreposição dessas regiões e, por meio de funções de análise estatística e pontuação, tenta-se obter os complexos mais próximos do que ocorre experimentalmente. A análise das inserções é feita pontuando a formação de cada complexo. A partir desse escore, é realizada uma análise comparativa, na qual cada complexo formado é avaliado e, ao final, são posicionados em um ranking (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2005, 2012).

O *docking* molecular tem sido amplamente aplicado no estudo com lectinas, a fim de buscar estruturas de carboidratos capazes de ligar a lectinas de interesse. Alguns exemplos de aplicação dessa técnica são: uso na lectina de *Dolichos lablab* para análise da interação entre a proteína e oligomanosídeos (TEIXEIRA et al., 2014), busca de ligantes para lectinas bacterianas (TOPIN et al., 2013), para a análise da interação entre lectinas e vários glicanos (CAVADA et al., 2018; MARQUES et al., 2017), entre outros. Uma imagem de um acoplamento molecular entre a lectina de *Dioclea lasiophylla* e um glicano é mostrada na figura 7.

Figura 7 — *Docking* molecular entre a lectina de *Dioclea lasiophylla* e um glicano de oligomanose. Representação em bastões do DRC da lectina em complexo com o glicano com carbonos em azul para a proteína e em amarelo para o ligante (à esquerda). Diagrama 2D do Ligplot das interações (à direita)



Fonte: Pinto-Junior e colegas (2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Esta pesquisa faz parte de um projeto maior que foca na purificação, caracterização físico-química e estrutural, atividades biológicas e estudos de bioinformática de várias lectinas. Os resultados gerados no projeto atual podem ser acessados nos artigos listados na seção anexos. Com relação ao presente trabalho, o principal objetivo foi construir um sistema de liberação controlada/lenta para a lectina de *Dioclea violacea* aplicando partículas de carbonato de cálcio e investigar os efeitos da lectina e dos bioconjugados contra células cancerígenas cervicais da linhagem HeLa .

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina das sementes de *Dioclea violacea* aplicando técnicas consolidadas de química de proteínas.
- Sintetizar 2 tamanhos de partículas de carbonato de cálcio.
- Avaliar a capacidade das partículas de adsorver DVL, bem como o rendimento de adsorção.
- Caracterizar a adsorção em relação à dependência do tempo e à concentração da lectina.
- Comparar o processo de recristalização das partículas isoladamente e dos bioconjugados.
- Avaliar a liberação de DVL das partículas.
- Caracterizar os bioconjugados por FITR e microscopia eletrônica.
- Avaliar o potencial citotóxico do DVL e dos bioconjugados contra células HeLa.
- Estudar a interação entre DVL e glicanos encontrados na superfície das células HeLa usando simulações in silico de *docking* molecular.
- Investigar a internalização de bioconjugados pelas células HeLa usando microscopia confocal.

3 METODOLOGIA

3.1 Isolamento e purificação de DVL

A purificação da lectina a partir de sementes de *Dioclea violacea* foi realizada de acordo com protocolo adaptado de Moreira et al. (1996) (MOREIRA et al., 1996). Inicialmente, as sementes descascadas foram moídas em um moedor de café até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, a farinha foi ressuspensa em NaCl 150 mM (1:10 p / v) e mantida sob agitação constante por 4 h em temperatura ambiente para extração de proteína solúvel. A suspensão foi então centrifugada a 10.000 x g por 20 min, o sedimento foi descartado, o sobrenadante filtrado em um filtro de papel (Whatman TM), coletado e designado como extrato bruto. A seguir, este extrato foi aplicado em cromatografia de afinidade na matriz Sephadex®-G50 previamente equilibrada com NaCl 150 mM contendo CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM. As proteínas não retidas (P1) foram eluídas com a mesma solução e a fração retida (P2) foi eluído com glicose 100 mM em NaCl 150 mM. Frações de 1,5 mL foram coletadas com fluxo de 2 mL/min e todas as frações foram monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm. As frações retidas foram reunidas, dialisadas contra água destilada e liofilizadas. Testes de hemaglutinação foram aplicados para determinar a atividade da lectina durante as etapas de purificação. Este teste foi realizado em placas de 96 poços em que Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 + NaCl 150 mM, foi adicionado em cada poço, seguido pela adição da amostra no primeiro poço, a solução foi então diluída seriadamente e uma suspensão de eritrócitos de coelho a 3% em NaCl 150 mM foi adicionado em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 30 min, seguidas de 30 min de incubação à temperatura ambiente, após o qual a aglutinação foi observada macroscopicamente. Este ensaio foi realizado em triplicata e o tampão foi aplicado como controle.

3.2 Síntese das partículas

Partículas esféricas de CaCO₃ foram obtidas como resultado da reação de agregação coloidal devido à mistura rápida de CaCl₂ e Na₂CO₃ (PARAKHONSKIY et al., 2014). Para a preparação das partículas maiores de CaCO₃ (MPs), soluções previamente preparadas de CaCl₂ e Na₂CO₃, ambas na concentração de 330 mM, foram misturadas em proporções iguais e mantidas sob agitação em um agitador magnético (500 rpm) à temperatura

ambiente por 1 h. Após o que, as partículas foram separadas da suspensão por centrifugação a 3200 x g por 3 min, lavadas com etanol a 100% e secas em estufa a 50 °C.

Para a preparação das partículas menores (NPs), CaCl₂ e Na₂CO₃, ambos a 330 mM foram misturados em proporções iguais, seguidos pela adição de etilenoglicol na reação em uma concentração final de 83%. A suspensão foi mantida sob agitação constante (500 rpm). Do mesmo modo que as partículas maiores, as partículas menores foram separadas da suspensão por centrifugação a 3200 x g por 10 min, lavadas com etanol a 100% e secas em estufa a 50 °C.

3.3 Bioconjugação

Inicialmente, soluções de DVL nas concentrações 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL foram preparadas solubilizando a lectina liofilizada em Tris-HCl 50 mM, pH 7,6 + NaCl 150 mM. Para verificar a adsorção de DVL nas MPs e NPs, 1 mL de cada solução foi misturado com 10 mg de MPs e NPs e a suspensão foi mantida sob agitação constante em um agitador orbital por 1 h. A seguir, o sólido foi separado do líquido por centrifugação a 5000 x g por 5 min. A quantidade de lectina adsorvida em cada condição foi calculada por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm em que o sobrenadante foi medido, a absorbância aplicada em uma curva padrão previamente preparada e a concentração foi estimada e removida do valor inicial para determinar a quantidade de lectina adsorvida nas partículas. A concentração com maior rendimento de adsorção sem grande desperdício de lectina foi escolhida para os próximos passos da caracterização. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Caracterização dos bioconjugados

3.4.1 Adsorção durante o tempo

A dependência do tempo para o rendimento de adsorção foi verificada da seguinte forma: 1 mL de uma solução recém-preparada de DVL em Tris-HCl 50 mM pH 7,6 + NaCl 150 mM a 1 mg/mL foi misturada com 10 mg de MPs e NPs e a suspensão foi mantida sob agitação constante por diferentes tempos (5 min, 30 min, 1 h, 2 h e 3 h) à temperatura ambiente. Após cada tempo, a suspensão foi centrifugada a 5000 x g por 5 min, o sobrenadante foi removido e a concentração de lectina foi medida por espectrofotometria a

280 nm, a fim de determinar a quantidade de lectina nas partículas após cada tempo. Cada tempo foi testado três vezes.

3.4.2 Recristalização

The time required for the particles to recrystallize in a calcite phase was calculated for non-conjugated and DVL-conjugated particles to verify if the conjugates are compatible with the time needed for biological activities as well as verify if the lectin can affect the crystallization time. For this, MPs-DVL and NPs-DVL were freshly prepared by mixing 1 mL of a 1 mg/mL solution of DVL with 10 mg of MPs and NPs and stirring the suspension in an orbital shaker until maximum adsorption yield. After the removal of the supernatant, both MPs-DVL and NPs-DVL conjugates and MPs-only and NPs-only were mixed with 1 mL of 50 mM Tris-HCl pH 7.6 + 150 mM NaCl and kept under stirring for several days. At regular intervals, a drop of the suspension was removed and observed by optical microscopy (100x magnification) with a 100x/1.4-0.7-oil immersion objective. The number of particles in vaterite and calcite were then manually counted. A minimum of 100 particles have been counted each time. The results were expressed as a percentage of calcite particles. This experiment was performed in triplicate.

3.4.3 DVL release assays

O tempo necessário para a recristalização das partículas para uma fase de calcita foi calculado para partículas não-conjugadas e conjugadas com DVL para verificar se os conjugados são compatíveis com as atividades biológicas a serem realizadas, bem como verificar se a lectina pode afetar o tempo de recristalização. Para isso, MPs-DVL e NPs-DVL foram preparados misturando 1 mL de uma solução de 1 mg/mL de DVL com 10 mg de MPs e NPs e agitando a suspensão em um agitador orbital até o máximo rendimento de adsorção. Após a remoção do sobrenadante, os conjugados MPs-DVL e NPs-DVL e MPs- apenas e NPs- apenas foram misturados com 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6 + NaCl 150 mM e mantidos sob agitação por vários dias. Em intervalos regulares, uma gota da suspensão foi removida e observada em microscópio óptico (ampliação de 100x) com uma objetiva de imersão em óleo 100x/1,4-0,7-óleo. O número de partículas em vaterita e calcita foi então contado manualmente. Um mínimo de 100 partículas foram contadas de cada vez. Os resultados foram

expressos como uma porcentagem de partículas de calcita. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

3.4.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A estrutura molecular de MPs e NPs com e sem DVL foi examinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier. Conjugados foram preparados misturando 1 mL de uma solução de DVL a 1 mg/mL com 10 mg de MPs e NPs e agitando a suspensão em um agitador orbital por 1 h, após o qual as partículas foram separadas da solução por centrifugação a 5000 x g por 5 min. As partículas foram então secas em estufa a 50 °C e um espectro por amostra foi coletado na faixa espectral de 400 e 1500 cm⁻¹, com resolução de 2 cm⁻¹ e média de 25 varreduras.

3.4.5 Microscopia eletrônica

A morfologia das partículas foi determinada por microscopia eletrônica em um Microscópio eletrônico de varredura ambiental com fonte por emissão de campo com ampliação de 5000x a 50000x.

3.5 Ensaaios com células

3.5.1 Cultura de células

A linhagem de células HeLa de câncer cervical humano (LANDRY et al., 2013) foi mantida em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 95% de O₂ e CO₂ a 5% até 80-90% de confluência, ponto em que foram aplicadas nos testes subsequentes.

3.5.2 Ensaaios de viabilidade

DVL e os bioconjugados foram solubilizados/suspensos em tampão fosfato-salino pH 7,4 na concentração inicial de 1 mg/mL de lectina. Para os testes, placas de 96 poços foram semeadas com meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB),

seguido por lectina/bioconjugado em diferentes concentrações de DVL, variando de 6,25 µg/mL (0,062 µM) a 100 µg/mL (1 µM) ou veículo (controle) seguido pela adição de células em um número final de 10.000 células/poço. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h, 48 h e 72 h a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Após o período de tratamento, o reagente PrestoBlue™ Cell Viability (ThermoFisher Scientific) foi adicionado e as placas foram incubadas por 2 h a 37 °C, protegidas da luz para a determinação da viabilidade celular. A fluorescência foi medida no equipamento Infinite 200 PRO (Tecan) com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. O número de células em cada poço foi determinado comparando o valor da fluorescência com uma curva padrão previamente preparada. Foram realizadas três repetições biológicas cada uma com três repetições técnicas. O efeito do tratamento da morfologia celular foi avaliado por microscopia óptica em microscópio de campo amplo (ampliação de 40x).

3.5.3 Internalização dos bioconjugados nas células

A visualização da internalização de bioconjugados nas células HeLa foi realizada por microscopia confocal. Para a marcação de DVL com rodamina, foi preparada uma solução de lectina a 4 mg/mL em tampão bicarbonato de sódio, enquanto 1 mg/mL de tetrametilrodamina (TRITC) foi preparada em DMSO. A solução TRITC foi adicionada à lectina na proporção de 50 µL de TRITC por mL de solução de lectina.

Para adsorção da proteína marcada nas partículas, 10 miligramas de MPs e NPs foram incubados cada um com 1 mL de DVL-TRITC por 30 min sob agitação constante. Posteriormente, as partículas foram centrifugadas por 3 min a 3.000 x g e lavadas duas vezes com PBS (Sigma-Aldrich) para remover o excesso de DVL-TRITC. O controle foi preparado com BSA-TRITC. Antes das experiências confocais, as partículas foram contadas usando um hemocítmetro e diluídas em meio DMEM para atingir uma concentração final de 10 partículas por célula.

Os ensaios foram realizados da seguinte forma: As células HeLa foram cultivadas conforme explicado na seção 3.5.1, semeadas em placas de cultura de células de fundo de vidro (35.000 células/placa) e incubadas durante a noite a 37 °C em atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂ para adesão celular. Posteriormente, o meio de cultura de células foi descartado, as células foram lavadas com PBS e as partículas dos conjugados DVL-TRITC foram adicionadas às placas e incubadas por 48 h. As células foram coradas com calceína

(Thermofisher) por 45 min a 37 °C e lavadas duas vezes com PBS antes das análises ao microscópio confocal.

As imagens confocais foram obtidas usando um microscópio confocal A1 da Nikon Instruments. O software NIS-Elements C (Laboratory Imaging) foi utilizado para coleta de dados e análise de imagens. Os comprimentos de onda das emissões/excitação foram 525/488 para calceína e 595/560 para TRITC.

3.6 Bioinformática - *Docking* molecular

Para verificar a potencial capacidade de DVL de interagir com os *N*-glicanos presentes na membrana celular das células HeLa, foi aplicada a técnica de *docking* molecular. Inicialmente, a estrutura dos glicanos presentes nas células foi obtida da literatura (HORVAT et al., 2013) e desenhada com a ajuda do servidor *Carbohydrate Builder* (<http://glycam.org>) (KIRSCHNER et al., 2008) e todas as estruturas geradas foram submetidas à minimização de energia com módulo integrado no servidor. As simulações de *docking* molecular foram realizadas usando o programa GOLD v. 5.5 (CDCC, Cambridge, Inglaterra), um programa que testa várias conformações de ligantes, permitindo flexibilidade parcial dos resíduos do receptor (JONES et al., 1997). A região de interação foi definida como o centro sendo o domínio de reconhecimento de carboidratos de DVL, bem como todos os átomos dentro de um raio de 11 Å a partir dele. Os parâmetros utilizados para o *docking* foram: tamanho da população de 100, pressão de seleção de 1,1, número de operações de 10.000, número de ilhas 5, tamanho de nicho 2, frequência de cruzamento 95, um total de 20 poses para cada ligante e função de pontuação Chemscore (ELDRIDGE et al., 1997). As melhores poses foram escolhidas combinando a pontuação do *docking*, penalidades na geometria do ligante, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (DE ÁVILA et al., 2017; HEBERLÉ; AZEVEDO, 2011; HECK et al., 2017; XAVIER et al., 2016) As figuras foram geradas no software PyMol (Schrodinger).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação de DVL

A lectina das sementes de *Dioclea violacea* foi purificada por cromatografia de afinidade em uma matriz de afinidade por dextrana. A proteína retida foi eluída com D-glicose 100 mM. A atividade hemaglutinante de cada fração após a cromatografia foi determinada usando ensaios de aglutinação com eritrócitos de coelho, e a hemaglutinação foi observada apenas na fração retida na matriz, indicando que o DVL foi completamente separada das outras proteínas no extrato bruto.

4.2 Síntese das partículas

No presente trabalho, dois tamanhos diferentes de partículas de CaCO_3 foram obtidos. As partículas maiores (MPs) apresentaram diâmetro médio de 4 μm e foram obtidas pela mistura de quantidades equimolares de CaCl_2 e Na_2CO_3 , enquanto a síntese de partículas menores (NPs), com cerca de 700 nm de diâmetro, incluiu etilenoglicol na reação o que favoreceu a síntese de partículas menores, como explicado abaixo.

As partículas de CaCO_3 foram obtidas utilizando uma mistura rápida de sais de cloreto de cálcio e carbonato de sódio. Essas partículas emergem devido aos processos de nucleação, crescimento e agregação de carbonato de cálcio (PARAKHONSKIY et al., 2014). O tamanho das partículas durante esse processo é inversamente proporcional ao tempo de reação, mas esse processo é afetado negativamente pela formação de partículas na fase de calcita com uma estrutura não-porosa da ordem dos micrômetros. Os cristais policristalinos de vaterita têm maior energia livre do que as partículas de calcita. Isso acaba por induzir naturalmente a transição das fases de vaterita para uma fase de calcita mais estável e menos energética.

Quando partículas em fases metaestáveis, como vaterita, são colocadas em meio aquoso, elas naturalmente recristalizam na forma de partículas de calcita, que possuem uma solubilidade muito menor. A adição de etilenoglicol na solução diminui a solubilidade de ambas as fases, reduzindo a energia de transformação e a taxa de recristalização. A solubilidade reduzida pelo etileno glicol, em combinação com a alta atividade de carbonato resultante da alta alcalinidade, favorece a precipitação de partículas de carbonato de cálcio com tamanhos menores.

4.3 Bioconjugação

A adsorção de DVL em MPs e NPs é mostrada nas tabelas 2 e 3. Nos MPs, DVL adsorve mais na concentração de 1 mg/mL, com aproximadamente 0,35 mg de lectina adsorvida em 10 mg de partículas, enquanto nas concentrações de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL de DVL, a quantidade de lectina adsorvida foi de 0,3 e 0,085 mg em 10 mg de partículas respectivamente (Tabela 2).

Para NPs, na concentração de 1 mg/mL, a quantidade de lectina adsorvida foi de aproximadamente 0,4 mg em 10 mL de nanopartículas, enquanto nas concentrações de 0,5 e 0,1 mg mL, as quantidades de 0,32 e 0,062 mg foram adsorvidas na mesma quantidade de partículas (Tabela 3).

Tabela 2 – Efeito da concentração de lectina na adsorção em MPs. Os dados apresentados são a média de três experimentos

Concentração inicial de DVL (mg/mL)	Concentração média de DVL adsorvida nas partículas (mg/mL)
1,0	0,35 ± 0,025
0,5	0,3 ± 0,02
0,1	0,085 ± 0,005

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3 – Efeito da concentração de lectina na adsorção em NPs. Os dados apresentados são a média de três experimentos

Concentração inicial de DVL (mg/mL)	Concentração média de DVL adsorvida nas partículas (mg/mL)
1,0	0,40 ± 0,03
0,5	0,32 ± 0,024
0,1	0,062 ± 0,004

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que, nos dois casos, a lectina na concentração de 1 mg mL adsorveu a maior quantidade de lectina nas partículas, embora ainda permaneça uma quantidade considerável de lectina no sobrenadante, o que mostra que um ponto de saturação foi atingido. Além disso, é claro que uma concentração mais alta de lectina aumenta a adsorção devido a uma maior quantidade de proteína no meio reacional, até que um limite máximo seja alcançado. Em nenhum dos casos, 100% de adsorção foi alcançada, mesmo em concentrações muito baixas. Os NPs mostraram uma maior capacidade de adsorver DVL, o que pode ser explicado por sua maior área superficial. A capacidade de partículas menores se conjugarem com maiores quantidades de biomoléculas já foi relatada anteriormente e é um fenômeno conhecido na nanotecnologia (KOHANE, 2007). O protocolo que permitiu adsorver a maior quantidade de lectina para as partículas foi aplicado em testes subsequentes. Todos os bioconjugados foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho, indicando que a adsorção não desnaturou a lectina.

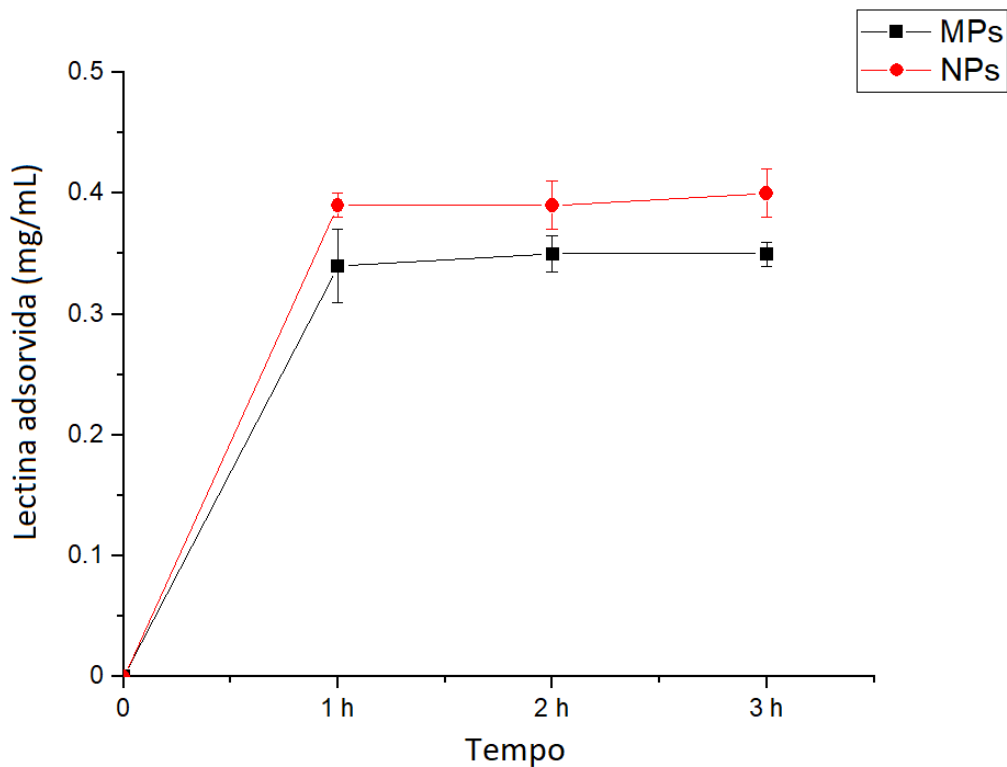
Em geral, proteínas e biomoléculas podem interagir diretamente com diferentes tipos de partículas. Partículas, mesmo sem funcionalização adicional, são capazes de interagir com moléculas, mesmo no interior das células (AURÍA-SORO et al., 2019; BEHZADI et al., 2017). Essa interação geralmente é fraca e inespecífica e tem uso limitado, mas ainda é importante para a geração de sistemas de liberação controlada. Trabalhos anteriores mostraram claramente que (nano)partículas geralmente adsorvem proteínas em sua superfície, formando o que é chamado de corona ao redor da partícula. Adicionalmente, lectinas foram usadas em combinação com nanopartículas para uma série de aplicações, incluindo

imunoterapia oral, biossensores, detecção de tumores e entrega de drogas (DEVI; BASIL-ROSE, 2018; DIESNER et al., 2012; NGUYEN; LEE, 2017; SIMÃO et al., 2020; TERÄVÄ et al., 2019).

4.4 Dependência do tempo

O tempo necessário para a adsorção de lectina às partículas foi verificado para otimizar os experimentos subsequentes e verificar as melhores condições. Os resultados são mostrados na figura 8. Pode-se observar que grande parte do processo de adsorção ocorre rapidamente, uma vez que após 5 minutos, cerca de 0,3 mg (ou 85%) do total de DVL adsorvida interagiram com os MPs e cerca de 0,25 mg (ou 62%) interagiram com os NPs. A adsorção parece ocorrer mais rapidamente nos MPs do que nos NPs. Os resultados obtidos foram interessantes do ponto de vista de aplicação, considerando que o processo é rápido e tem um rendimento aceitável.

Figura 8 — Adsorção DVL nos MPs e NPs ao longo do tempo. Barras de erro correspondem ao desvio padrão de três experimentos separados

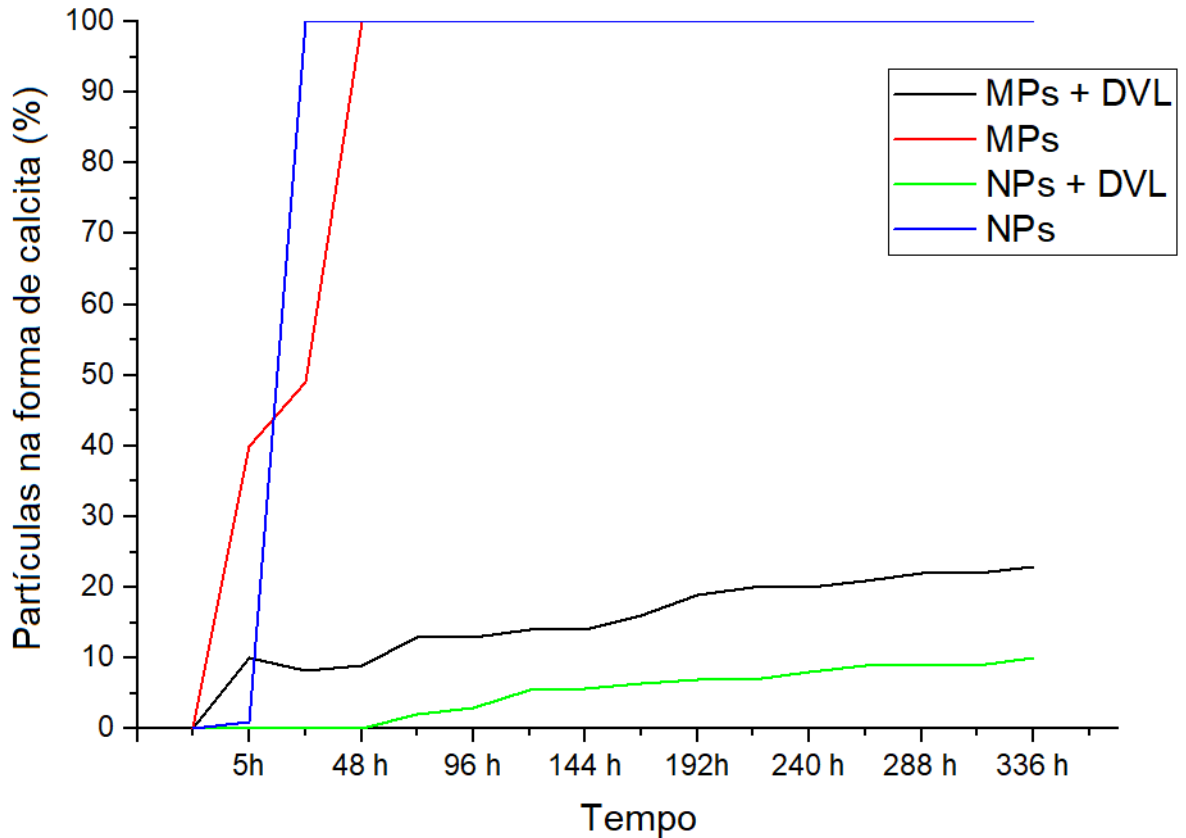


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Recristalização vaterita/calcita

Como afirmado anteriormente, quando partículas de carbonato de cálcio em fases metaestáveis, como o vaterita, são colocadas em meio aquoso, elas naturalmente recristalizam na forma de partículas de calcita que possuem uma solubilidade muito menor. No presente trabalho, a transição de vaterita para calcita dos bioconjugados foi avaliada, a fim de identificar se a adsorção de lectina afeta o perfil de transição natural das partículas (Figura 9). Como resultado, observou-se que a adsorção estabiliza as partículas fortemente. MPs e NPs sem a presença de lectina recristalizaram em tempos relativamente curtos, 48h para MPs e 24h para NPs. Como pode ser visto na figura 9, foi observado um atraso altamente significativo no processo de recristalização nos conjugados em comparação com as partículas não conjugadas, após 336 h (ou 14 dias), apenas 23% dos MPs-DVL estavam na forma de calcita enquanto apenas 10% dos NPs-DVL estavam nesta forma. Para as partículas não conjugadas, as MPs recristalizaram completamente após cerca de 48 h, enquanto o mesmo fenômeno ocorreu com as NPs após cerca de 5 h. Verifica-se que a presença de DVL resulta na estabilização das partículas, mesmo após muitos dias, o que é desejável para a sua aplicação. A estabilização de partículas por proteínas é algo que geralmente ocorre, uma vez que sua presença pode reduzir consideravelmente a agregação de partículas, um fator responsável por um aumento no tamanho das partículas, que pode levar a tempos de precipitação mais curtos visto que a agregação atinge um ponto em que as partículas se tornam muito grandes e pesadas, perturbando assim o equilíbrio coloidal e precipitando.

Figura 9 – Porcentagem de partículas de calcita em diferentes tempos. MP s + DVL (em preto), somente MPs (em vermelho), NPs + DVL (em verde) e somente NPs (em azul). Estes experimentos foram realizadas em triplicata e uma centena de partículas foram contadas em cada tempo

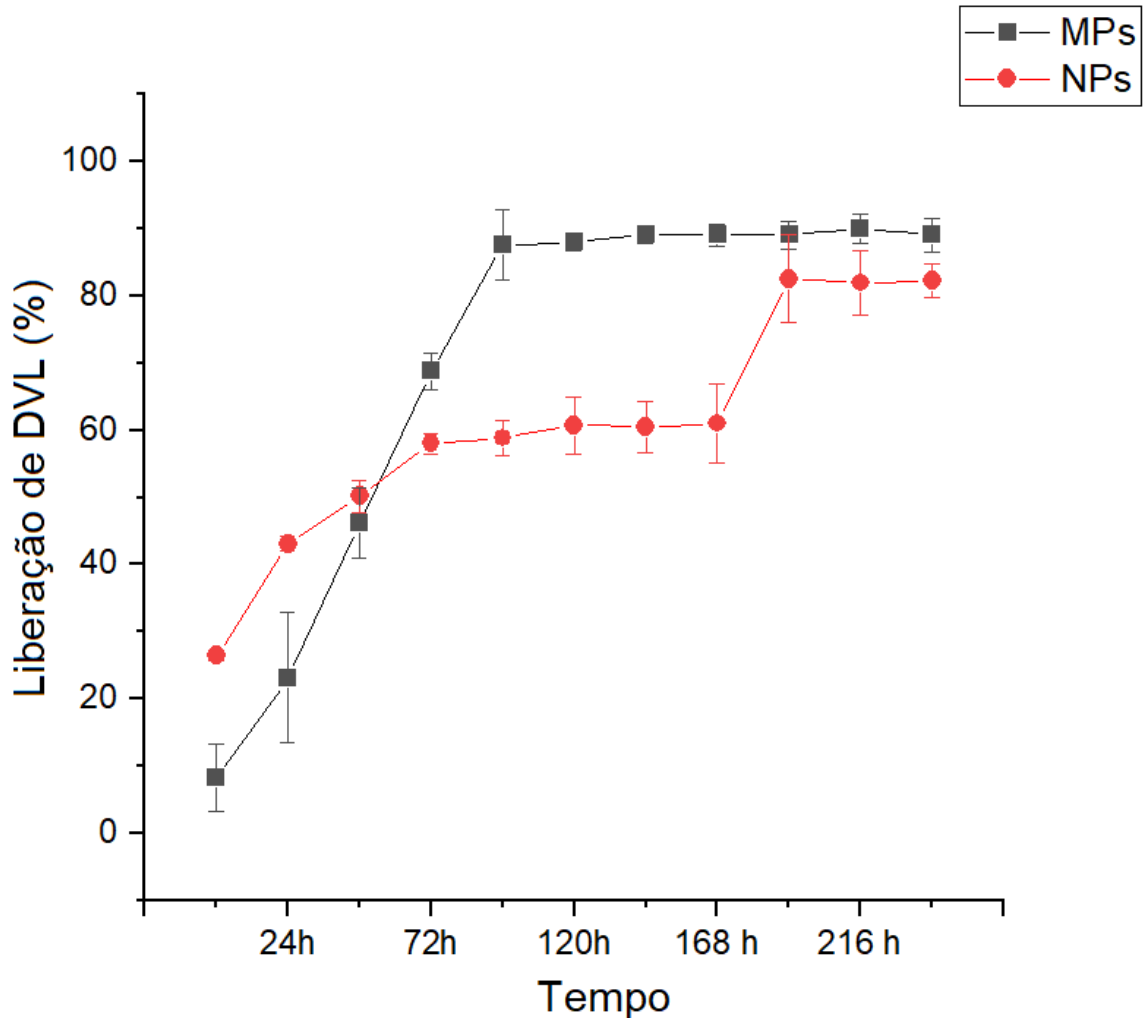


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Liberação de DVL das partículas

O perfil de liberação de DVL das MPs e NPs em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 com NaCl 150 mM, em temperatura ambiente, mostrou uma liberação inicial seguida por uma liberação mais lenta, como mostrado na figura 10. A liberação inicial foi mais alta para NPs, com aproximadamente 27% de liberação, enquanto as MPs liberaram cerca de 8% de DVL dentro de 5 minutos após o contato dos bioconjugados com o tampão. Para bioconjugados de MPs, a liberação ocorreu de tempo-dependente, com liberação máxima após 96 horas, com mais de 90% do DVL liberada das partículas. Para as NPs, a liberação de DVL ocorreu mais lentamente, atingindo o máximo após aproximadamente 8 dias, com uma liberação de aproximadamente 82%. Também foi observado que, para as NPs, o aumento na liberação ocorreu de maneira tempo-dependente até 4 dias, permanecendo praticamente estacionário de 4 a 7 dias, com um aumento drástico na liberação no 8º dia.

Figura 10 — Gráfico mostrando a liberação do DVL das MPs e NPs ao longo do tempo. Os dados correspondem à média de três experimentos com barras de erro representando o desvio padrão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A lectina é liberada das partículas como resultado de vários fatores, sendo os principais: difusão de proteínas das partículas e a degradação natural da partícula, além da mudança gradual da partículas de carbonato de cálcio de forma esférica porosa a uma forma cúbica não porosa. O efeito cumulativo desses fatores resulta no perfil de liberação observado, formado por uma liberação inicial seguida por uma liberação mais constante ao longo do tempo. A liberação inicial pode ser explicada pela difusão das moléculas de lectina acopladas à superfície das partículas. O perfil de liberação lenta pode ser explicado pela difusão lenta da lectina através dos poros das partículas. O aumento no tamanho das partículas diminui o tempo necessário para a liberação máxima de DVL, o que pode ser explicado por uma

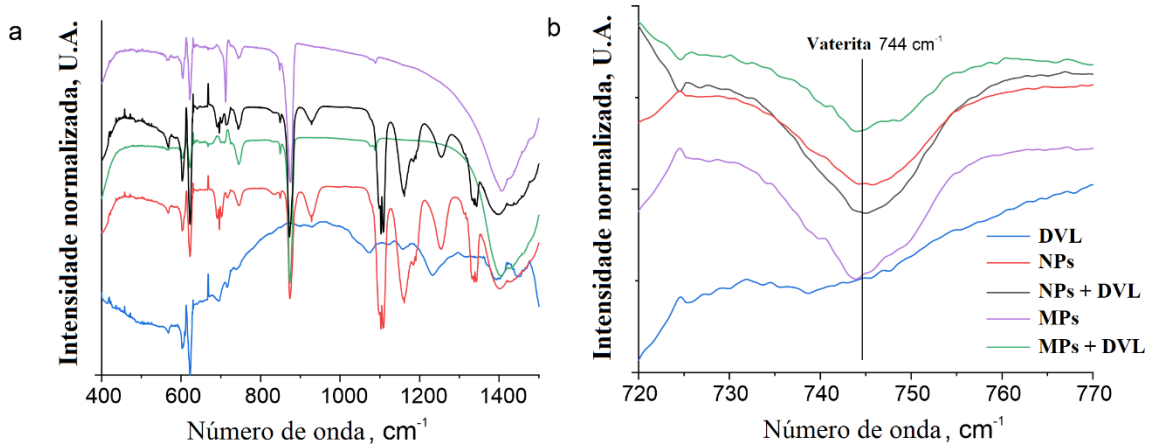
diferença na organização interna em comparação aos NPs que afetariam a difusão e a retardariam (MUKHERJEE et al., 2008). O tempo de liberação do DVL é compatível com ensaios celulares, o que aumenta as chances de aplicação desses bioconjugados na construção de protótipos de sistemas de liberação lenta.

4.7 FTIR e microscopia eletrônica

Os espectros de FTIR de NPs e MPs conjugados e não-conjugados são mostrados em comparação com DVL (Figura 11). Para analisar a fase do carbonato de cálcio, foram investigadas as bandas de absorção do íon CO_3^{2-} planar. Existem quatro modos de vibração no íon CO_3^{2-} livre, a saber, o alongamento simétrico a 1080 cm^{-1} (v1), a flexão fora do plano a 870 cm^{-1} (v2), o alongamento assimétrico a 1400 cm^{-1} (v3) e as vibrações de flexão no plano divididas a 700 cm^{-1} (v4). Os espectros com bandas centradas em 712 cm^{-1} (v4) e 873 cm^{-1} (v2) revelam a presença de calcita, enquanto as bandas centralizadas em 744 cm^{-1} (v4), 878 cm^{-1} (v2) e 1085 cm^{-1} (v1) são característicos de vaterita e se tem uma banda larga em 1400 cm^{-1} (v3) que indica um estiramento assimétrico do íon carbonato. A Figura 11B mostra claramente uma banda v4 em 744 cm^{-1} , que confirma que as partículas existem em uma fase de vaterita e a presença de DVL não influencia a fase do carbonato. Devido ao número relativamente pequeno de moléculas adsorvidas de DVL em relação à massa da matriz inorgânica, o impacto das moléculas orgânicas não aparece no espectro.

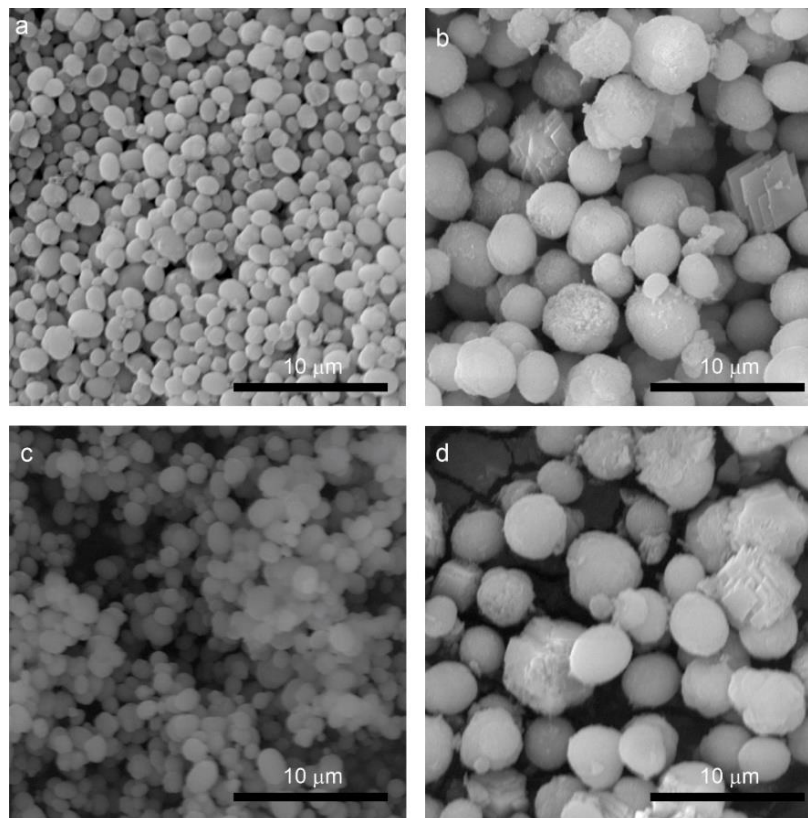
A microscopia eletrônica de varredura foi empregada para visualizar de perto a forma das partículas e bioconjugados. Não foram observadas diferenças indicando que a adsorção de DVL não afetou a forma das partículas (Figura 12)

Figura 11 – Espectros de infravermelho da lectina, das partículas e dos bioconjugados. a) Espectros detalhados de 720-770 cm^{-1} de DVL (em azul) NPS-DVL (em preto) somente NPs (em vermelho), MPs-DVL (em verde) e somente MPs (em roxo). b) Faixas típicas para vaterita a 1085 cm^{-1} e 745 cm^{-1}



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Microscopia eletrônica de varredura das partículas de vaterita e bioconjugados mostrando sua morfologia esférica. a) somente NPs, b) somente MPs, c) NPs-DVL e d) MPs-DVL. DVL não parece alterar a morfologia geral das partículas



Fonte: Elaborado pelo autor.

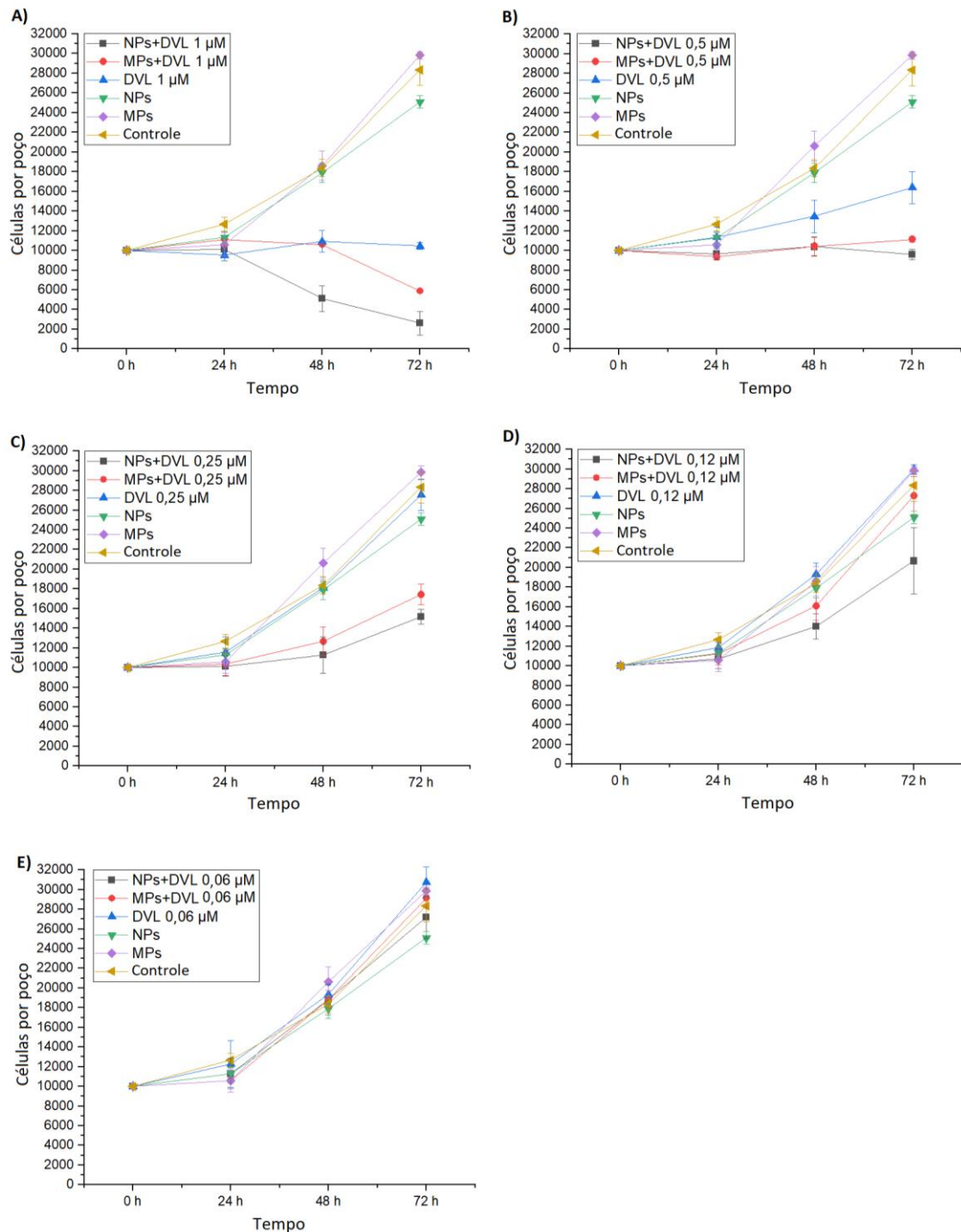
4.8 Ensaios de toxicidade celular e internalização dos bioconjugados nas células

O efeito de DVL e dos bioconjugados foi avaliado através da análise da viabilidade e morfologia das células HeLa. Os resultados mostram que DVL e os bioconjugados afetaram a viabilidade das células em comparação aos controles, principalmente nos períodos de 48 e 72 horas (Figura 13). Na concentração mais alta testada (1 μM), DVL não-conjugada apresentou um efeito bioestático no qual o número de células não ficou abaixo do valor inicial de 10.000, mas a divisão celular foi muito mais lenta do que no controle. Para os bioconjugados MPs-DVL e NPs-DVL, foi observado um efeito severo na viabilidade celular após 48h e 72h, com contagens de células chegando a 2.500 células, uma diminuição de aproximadamente 75% na viabilidade, considerando o número inicial de 10.000 células. O efeito citotóxico dos conjugados apresentou dose-dependência, em todas as concentrações, o conjugado NPs-DVL apresentou o maior efeito citotóxico em comparação com DVL não-conjugada, MPs-DVL e os controles. Na presença de DVL a 1 μM e 0,5 μM , a morfologia celular mudou para uma forma esférica, indicativa da perda de adesão, também podem ser observados aglomerados celulares que sugerem uma aglutinação induzida pela lectina (Figura 14). Em relação aos controles, o controle somente de MPs parece não afetar as células e o efeito de NPs é bastante limitado em comparação com os bioconjugados e DVL não-conjugada.

Estudos anteriores relataram o efeito antiproliferativo de várias lectinas do tipo ConA contra células cancerígenas, com a maioria dessas lectinas ativando vias de morte celular programadas, como apoptose e autofagia. Sugere-se que esses efeitos estejam relacionados à interação de lectinas com alvos glicosilados específicos. Foi relatado que o DVL apresenta alta citotoxicidade para as linhas de glioma de ratos e humanos, conforme publicado por (NASCIMENTO et al., 2018) e (NASCIMENTO et al., 2019). Em ambos os casos, o DVL reduziu a viabilidade celular em cerca de 60% em ambos os casos, alterando a morfologia celular de uma forma poligonal para uma forma esférica e reduzindo severamente a migração celular. A morte celular induzida por DVL mostra-se principalmente relacionada à indução de autofagia, corroborando com foi observada por (PRATT; ROY; ANNABI, 2012), (OSTERNE et al., 2017; CAVADA et al., 2018) em outros tipos de lectinas do tipo ConA. Além disso, o DVL não apresenta toxicidade para astrócitos não-malignos, sugerindo um efeito direcionado sobre células malignas, um efeito relacionado à glicosilação diferencial em sua superfície (NASCIMENTO et al., 2019). Existem poucos relatos na literatura com detalhes sobre a liberação controlada de uma lectina para melhorar a citotoxicidade contra

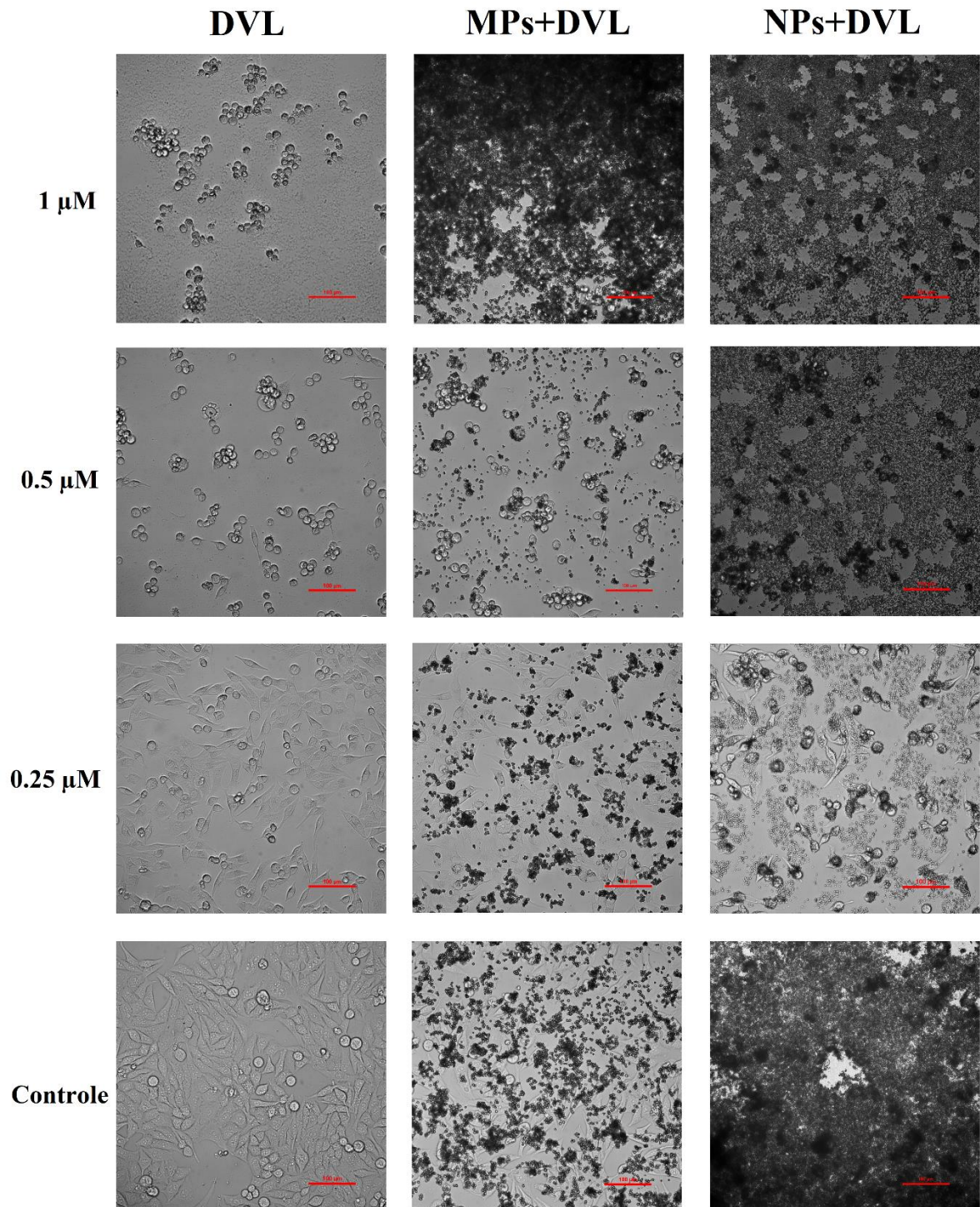
células cancerígenas, a maioria dos trabalhos relata o uso de lectinas visando a aplicação de medicamentos e/ou detecção de tumores (BRUSCHI, 2019; DEVI; BASIL- ROSE, 2018; TERÄVÄ et al., 2019). O aumento local da concentração e a proteção da lectina da desnaturação podem ser responsáveis pelo efeito superior nos bioconjugados de MPs e NPs. Além disso, dados preliminares sobre a captação de bioconjugados nas células HeLa foram obtidos usando microscopia confocal (Figura 15). Os dados de fluorescência coletados no período de 48 horas indicam que tanto MPs-DVL quanto NPs-DVL são internalizados pelas células. Essa internalização pode explicar as diferenças observadas ao comparar a lectina não conjugada com os bioconjugados. A internalização das partículas de CaCO_3 nas células HeLa foi observada anteriormente e depende do tamanho, forma, química, estado de agregação, estabilidade e rigidez (PARAKHONSKIY et al., 2015). Os dados de captação ainda precisam ser completados para fornecer uma boa visão sobre o efeito dos bioconjugados nas células.

Figura 13 – Ensaio de viabilidade celular com células HeLa após 24 h, 48 h e 72 h de incubação com DVL, MPs-DVL, NPs-DVL, somente MPs e somente NPs. A quantidade de bioconjugados aplicada nessas experiências foi definida com base na concentração de DVL A) DVL a 1 μM , B) DVL a 0,5 μM , C) DVL a 0,25 μM , D) DVL a 0,12 μM e E) DVL a 0,06 μM . Os controle são repetidos em cada curva. Esses dados são a média de três repetições biológicas com três repetições técnicas cada



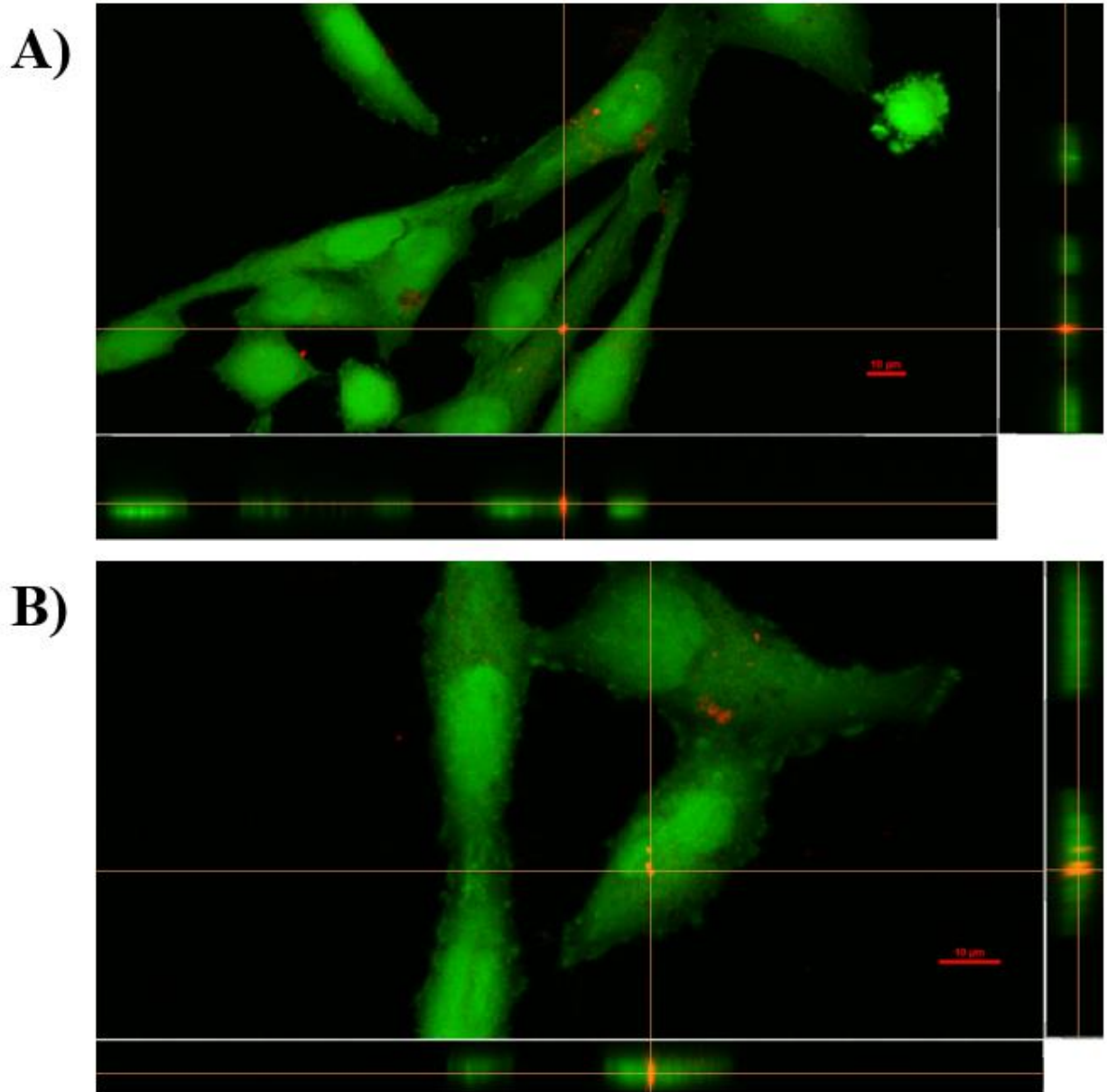
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 – Imagens representativas de células HeLa na presença de DVL, MPs-DVL e NPs-DVL, somente MPs, somente NPs e somente células 48h após o tratamento. A barra vermelha corresponde a 100 μ M



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 – Imagens confocais de células HeLa após 48 h de incubação com A) MPs-DVL e B) NPs-DVL. As células foram coradas com calceína (verde) e DVL foi marcada com rodamina (TRITC). Nas imagens é possível ver que ambas as partículas podem ser encontradas dentro das células

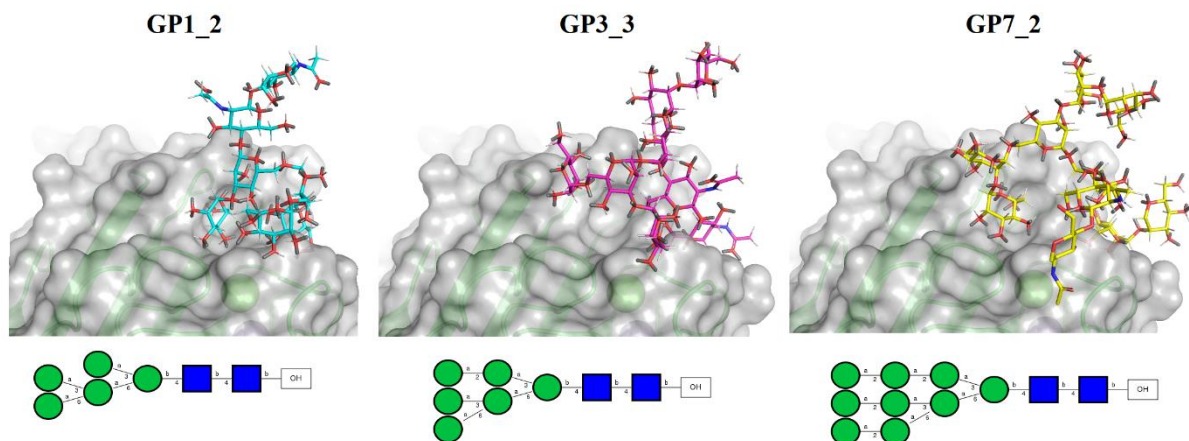


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.9 Docking molecular

Os presentes resultados de *docking* molecular sugerem que o DVL pode interagir favoravelmente com os glicanos oligomanose de alta prevalência nas células HeLa. GP1_2 (Escore: -56) é um glicano Man5, GP3_3 (Escore: -58,12) é um glicano Man6 e GP7_2 (Escore: -61) é um glicano Man9. Os escores de *docking* foram consideravelmente mais altos que o ligante experimental X-man que apresentou escore de -41, indicando assim uma ligação muito favorável. DVL também interagiu bem com outros glicanos de HeLa, embora com pontuações mais baixas, mas validações manuais sugerem que as interações com glicanos oligomanose são mais prováveis como esperado para uma lectina específica para manose (Figura 16).

Figura 16 – Melhores poses do *docking* molecular entre DVL e os três dos principais *N*-glicanos encontrados no glicoma das células HeLa. DVL é representada como *cartoon* (em verde) com superfície (em cinza). Todos os ligantes são apresentados como bastões com carbonos em azul (GP1_2), em rosa (GP3_3) e em amarelo (GP7_2). As poses foram selecionadas de acordo com o escore de *docking* e os parâmetros geométricos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma grande proporção dos glicanos na superfície HeLa é do tipo oligomanose, o que torna bastante provável a ligação de DVL com eles (HORVAT et al., 2013). O alvo molecular para DVL na superfície das células ainda não foi identificado, mas é provável que esse alvo apresente alguma glicosilação oligomanose em sua superfície. A interação lectina-glicoconjugado é provavelmente o primeiro passo para explicar a atividade antiproliferativa. O efeito provocado pelas lectinas está quase invariavelmente relacionado à sua capacidade de

ligação de carboidratos à um alvo glicosilado (MARQUES et al., 2017; PRATT; ROY; ANNABI, 2012).

5 CONCLUSÕES

Com este trabalho, pode-se concluir que é possível construir um sistema para liberação controlada/lenta para a lectina de *Dioclea violacea* empregando partículas de CaCO_3 para serem usadas contra células HeLa. A construção dos sistemas é simples e rápida, com o sistema NPs-DVL apresentando o mais potente efeito citotóxico contra células cancerígenas, reduzindo sua viabilidade em até 75%. É provável que esse efeito esteja relacionado à capacidade de DVL de ligar glicoconjugados nas células HeLa e potencializado pela internalização dos conjugados pelas células, conforme sugerido por acoplamento molecular e microscopia confocal, respectivamente. Como conclusão final, esses sistemas e metodologias são muito promissores em várias áreas nas quais as lectinas podem ser aplicadas, principalmente em pesquisas, diagnósticos e terapêuticas do câncer, mas são necessários mais trabalhos para avaliar a segurança das partículas e dos conjugados nas células normais. como abordar os mecanismos por trás do efeito elicitado por DVL e os conjugados com o objetivo de otimizar suas aplicações. Outras lectinas também podem ser testadas visando um efeito ainda melhor.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 96, n. 3, p. 23contd–5c, set. 1965.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Neutrophil-infiltrated paw edema induced by mannose-binding *Dioclea violacea* lectin. **Pharmacological reports: PR**, [s.l.], v. 65, n. 1, p. 220–225, 2013.
- ALMEIDA, A. C. et al. Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s.l.], v. 596, p. 73–83, 2016.
- ALSALLOOM, A. A. M. An update of biochemical markers of hepatocellular carcinoma. **International journal of health sciences**, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 121–136, 2016.
- ALVES, A. C. et al. A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s.l.], v. 588, p. 33–40, 2015.
- ALYOUSEF, A. A.; ALQASIM, A.; ALOAHD, M. S. Isolation and characterization of lectin with antibacterial, antibiofilm and antiproliferative activities from *Acinetobacter baumannii* of environmental origin. **Journal of applied microbiology**, [s.l.], v. 124, n. 5, p. 1139–1146, 2018.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & biomolecular chemistry**, [s.l.], v. 3, n. 9, p. 1593–1608, 2005.
- APFELTHALER, C.; SKOLL, K.; CIOLA, R.; GABOR, F.; WIRTH, M. A doxorubicin loaded colloidal delivery system for the intravesical therapy of non-muscle invasive bladder cancer using wheat germ agglutinin as targeter. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, [s.l.], v. 130, p. 177–184, 2018.
- APWEILER, R. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1473, n. 1, p. 4–8, 17 1999.
- ASHRAF, M. T.; KHAN, R. H. Mitogenic lectins. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, [s.l.], v. 9, n. 11, p. RA265–9, 2003.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, [s.l.], v. 6, p. 201–210, 1997.
- AUBIN-TAM, M. E. Conjugation of Nanoparticles to Proteins, **Nanomaterial Interfaces in Biology**, [s.l.], v. 1023, p. 19–27, 2013.
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 54, n. 2, p. 396–399, 1965.

AURÍA-SORO, C. et al. Interactions of Nanoparticles and Biosystems: Microenvironment of Nanoparticles and Biomolecules in Nanomedicine. **Nanomaterials**, Switzerland, v. 9, n. 10, 24, 2019.

ÁVILA, M. B. DE; XAVIER, M. M.; PINTRO, V. O.; AZEVEDO-JUNIOR, W. F. 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, 2017.

BEHZADI, S. et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell, **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 46, n. 14, p. 4218-4244, 2017.

BELICKÝ, Š.; KATRLÍK, J.; TKÁČ, J. Glycan and lectin biosensors. **Essays in biochemistry**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 37–47, 2016.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular aspects of medicine**, [s.l.], v. 21, n. 6, p. 167–223, 2000.

BEZERRA, M. J. B. et al. Crystal Structure of *Dioclea violacea* lectin and a Comparative Study of Vasorelaxant Properties with *Dioclea rostrata* Lectin, **International journal of biochemistry and cell biology**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 807-815, 2013.

BISWAS, A.; NAGARAJA, A. T.; MCSHANE, M. J. Fabrication of nanocapsule carriers from multilayer-coated vaterite calcium carbonate nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, [s.l.], v. 6, n. 23, p. 21193–21201, 2014.

BOYJOO, Y.; PAREEK, V. K.; LIU, J. Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications. **Journal of material chemistry A**, [s.l.], v. 2, n. 35, p. 14270-14288, 2014.

BREWIN, N. J.; KARDAILSKY, I. V. Legume lectins and nodulation by Rhizobium, **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 92-98, 1997.

BRINDA, K. V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein science**, [s.l.], v. 13, n. 7, p. 1735–1749, 2004.

BRUSCHI, M. L. Lectins and Nanostructured Drug Delivery Systems, **Current Drug Delivery**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 268 - 269, 2019.

CAGLIANI, R.; GATTO, F.; BARDI, G. Protein Adsorption: A Feasible Method for Nanoparticle Functionalization?. **Materials**, [s.l.], v. 12, n. 12, 21 jun. 2019.

CAI, A. et al. Direct Synthesis of Hollow Vaterite Nanospheres from Amorphous Calcium Carbonate Nanoparticles via Phase Transformation. **Journal of Physical Chemistry C**, [s.l.], v. 112, n. 30, p. 11324–11330, 2008.

CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, [s.l.], v. 313, n. 5997, p. 64–67, 1985.

CATANZARO, E.; CALCABRINI, C.; BISHAYEE, A.; FIMOIGNARI, C. Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. **Marine drugs**, [s.l.], v. 18, n. 1, 2019.

CAVADA, B. S. et al. Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 106, p. 369–378, 2018.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current protein & peptide science**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.

CAVADA, B. S. et al. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 134, p. 901–911, 2019a.

CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; NASCIMENTO, K. S. ConBr, the Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Seeds: Forty Years of Research. **Current protein & peptide science**, [s.l.], v. 20, n. 6, p. 600–613, 2019b.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; NASCIMENTO, K. S. 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, 21 2018.

CHEN, H.; YAO, K.; NADAS, J.; BODE, A. M.; MALAKHOVA, M.; OI, N.; LI, H.; LUBET, R. A.; DONG, Z. Prediction of molecular targets of cancer preventing flavonoid compounds using computational methods. **PloS one**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. e38261, 2012.

CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. et al. *Dioclea violacea* lectin ameliorates inflammation in the temporomandibular joint of rats by suppressing intercellular adhesion molecule-1 expression. **Biochimie**, [s.l.], v. 158, p. 34–42, 2019.

COLEMAN, R. G.; CARCHIA, M.; STERLING, T.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Ligand Pose and Orientational Sampling in Molecular Docking, **PLoS ONE**, [s.l.], v. 8, p. e75992, 2013.

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

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

DE MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Critical reviews in food science and nutrition**, [s.l.], v. 45, n. 6, p. 425–445, 2005.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. J. M. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 5, p. 9029–9053, 2015.

DEVI, R. V.; BASIL-ROSE, M. R. Lectins as Ligands for Directing Nanostructured Systems. **Current drug delivery**, [s.l.], v. 15, n. 4, p. 448–452, 2018.

DIESNER, S. C.; WANG, X.-Y.; JENSEN-JAROLIM, E.; UNTERSMAAYR, E.; GABOR, F. Use of lectin-functionalized particles for oral immunotherapy. **Therapeutic delivery**, [s.l.], v. 3, n. 2, p. 277–290, 2012.

DIZAJ, S. M.; BARZEGAR-JALALI, M.; ZARRINTAN, M. H.; ADIBKIA, K.; LOTFIPOUR, F. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system, **Expert Opinion on Drug Delivery**, [s.l.], v. 12, n. 10, p. 1649-1660, 2015

ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G. V.; MEE, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of computer-aided molecular design**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 425–445, 1997.

ENDO, Y. Mechanism of action of ricin and related toxins on the inactivation of eukaryotic ribosomes, **Immunotoxins**, [s.l.], v. 37, p. 75-89, 1988.

ERCAN, B.; ORAL, Ç. M.; KAPUSUZ, D. Enhanced vaterite and aragonite crystallization at controlled ethylene glycol concentrations, **Sakarya University Journal of Science**, [s.l.], v. 23, n. 2, p. 129-138, 2019.

ERGUL YILMAZ, Z.; CORDONNIER, T.; DEBUIGNE, A.; CALVIGNAC, B.; JEROME, C.; BOURY, F. Protein encapsulation and release from PEO-b-polyphosphoester templated calcium carbonate particles. **International journal of pharmaceuticals**, [s.l.], v. 513, n. 1-2, p. 130–137, 2016.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking, **Quantitative Biology**, [s.l.], v. 7, p. 83-89, 2019.

FERNANDES, A. V.; RAMOS, M. V.; GONÇALVES, J. F. C.; MARANHÃO, P. A. C.; CHEVREUIL, L. R.; SOUZA, L. A. G. Seeds of Amazonian Fabaceae as a source of new lectins, **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p. 237-244, 2011.

FERN, K. **Tropical Plants Database**. Disponível em: <<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Dioclea+violacea>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, United States, v. 7, n. 5, p. 1016–1036, 2017.

FRANZ, H.; PFÜLLER, K. [Use of toxic plant lectins in preparing immunotoxins (affinotoxins)]. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, Russia, n. 5, p. 18–25, 1983.

- FU, C.; ZHAO, H.; WANG, Y.; CAI, H.; XIAO, Y.; ZENG, Y.; CHEN, H. Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. **Hladnikia**, [s.l.], v. 88, n. 6, p. 275–286, 2016.
- GAUTAM, A. K.; SHRIVASTAVA, N.; SHARMA, B.; BHAGYAWANT, S. S. Current Scenario of Legume Lectins and Their Practical Applications. **Journal of crop science and biotechnology**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 217–227, 2018.
- GILBOA-GARBER, N.; AVICHEZER, D.; GARBER, N. C. Bacterial Lectins: Properties, Structure, Effects, Function and Applications. *In*: GABIUS, H. J.; GABIUS, S. (Eds.). **Glycosciences**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1996. p. 369–396.
- GOMES, B. S. et al. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian journal of microbiology**, [s.l.], 43, n. 2, p. 770–778, 2012.
- GONDIM, A. C. S. et al. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of inorganic biochemistry**, [s.l.], v. 175, p. 179–189, 2017.
- GOODSELL, D. S. Concanavalin A and Circular Permutation, **RCSB Protein Data Bank**, 2010. Available in: http://dx.doi.org/10.2210/rcsb_pdb/mom_2010_4
- HAMELRYCK, T. W. et al. Carbohydrate binding, quaternary structure and a novel hydrophobic binding site in two legume lectin oligomers from *Dolichos biflorus*, **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 286, n. 4, p. 1161–1177, 1999.
- HAMELRYCK, T. W.; LORIS, R.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Structural Features of the Legume Lectins, **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, [s.l.], v. 10, n. 55, p. 349–360, 1998.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HART, D. A. Lectins in biological systems: applications to microbiology, **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 33, n. 11, p. 2416–2425, 1980.
- HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. **PeerJ**, [s.l.], v. 5, p. e3784, 2017.
- HEBERLÉ, G.; AZEVEDO, W. F. DE, Jr. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. **Current medicinal chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 9, p. 1339–1352, 2011.
- HECK, G. S.; PINTRO, V. O.; PEREIRA, R. R.; ÁVILA, M. B. DE; LEVIN, N. M. B.; AZEVEDO, W. F. DE. Supervised Machine Learning Methods Applied to Predict Ligand-Binding Affinity. **Current medicinal chemistry**, [s.l.], v. 24, n. 23, p. 2459–2470, 2017.
- HEMPERLY, J. J.; CUNNINGHAM, B. A. Circular permutation of amino acid sequences among legume lectins, **Trends in Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 8, n. 3, p. 100–102, 1983.
- HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current opinion in plant biology**, [s.l.], v. 2, n. 4, p. 320–326, 1999.

HOMAYUN, B.; LIN, X.; CHOI, H.-J. Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 11, n. 3, 2019.

HORVAT, T. et al. Reversibility of membrane N-glycome of HeLa cells upon treatment with epigenetic inhibitors. **PloS one**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. e54672, 2013.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening, **Journal of Chemical Information and Modeling**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.

ITAKURA, Y.; NAKAMURA-TSURUTA, S.; KOMINAMI, J.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J. Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 18, p. 1160-1183, 2017.

JAIN, R. Review on Computational Bioinformatics and Molecular Modelling: Novel Tool for Drug Discovery, **International Journal of Trend in Scientific Research and Development**, [s.l.], v. 3, n. 1, p. 51-56, 2018.

JAYAPRAKASH, N. G.; SUROLIA, A. Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 474, n. 14, p. 2333–2347, 2017.

JEEVANANDAM, J.; BARHOUM, A.; CHAN, Y. S.; DUFRESNE, A.; DANQUAH, M. K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, [s.l.], v. 9, p. 1050–1074, 2018.

JIANG, S.-Y.; MA, Z.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC evolutionary biology**, [s.l.], v. 10, p. 79, 2010.

JINDAL, A. B. The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro- and nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, [s.l.], v. 532, n. 1, p. 450–465, 2017.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

JOSHI, A. B.; SRIVASTAVA, R. Polyelectrolyte Coated Calcium Carbonate Microparticles as Templates for Enzyme Encapsulation, **Advanced Science Letters**, [s.l.], v. 2, n. 3, p. 329-336, 2009.

JU, T.; ARYAL, R. P.; KUDELKA, M. R.; WANG, Y.; CUMMINGS, R. D. The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. **Cancer biomarkers: section A of Disease markers**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 63–81, 2014.

KAMALY, N.; YAMEEN, B.; WU, J.; FAROKHZAD, O. C. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chemical reviews**, [s.l.], v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

- KANG, S. H.; HIRASAWA, I.; KIM, W.-S.; CHOI, C. K. Morphological control of calcium carbonate crystallized in reverse micelle system with anionic surfactants SDS and AOT. **Journal of colloid and interface science**, [s.l.], v. 288, n. 2, p. 496–502, 2005.
- KAUR, N.; DHUNA, V.; KAMBOJ, S. S.; AGREWALA, J. N.; SINGH, J. A novel antiproliferative and antifungal lectin from *Amaranthus viridis* Linn seeds. **Protein and peptide letters**, [s.l.], v. 13, n. 9, p. 897–905, 2006.
- KHAN, F.; KHAN, R. H.; SHERWANI, A.; MOHMOOD, S.; AZFER, M. A. Lectins as markers for blood grouping. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, [s.l.], v. 8, n. 12, p. RA293–300, 2002.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019.
- KILPATRICK, D. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [s.l.], v. 1572, n. 2-3, p. 187–197, 2002.
- KIRSCHNER, K. N. et al. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates. **Journal of computational chemistry**, [s.l.], v. 29, n. 4, p. 622–655, mar. 2008.
- KOHANE, D. S. Microparticles and nanoparticles for drug delivery, **Biotechnology and Bioengineering**, [s.l.], v. 96, n. 2, p. 203-209, 2007.
- KONOPACKA-ŁYSKAWA, D. Synthesis Methods and Favorable Conditions for Spherical Vaterite Precipitation: A Review, **Crystals**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 223-239, 2019
- LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 18, n. 6, 2017.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied microbiology and biotechnology**, [s.l.], v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011.
- LANDRY, J. J. M. et al. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. **G3**, [s.l.], v. 3, n. 8, p. 1213–1224, 2013.
- LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in plant science**, [s.l.], v. 5, p. 397, 2014.
- LEE, J. H.; YEO, Y. Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers. **Chemical engineering science**, [s.l.], v. 125, p. 75–84, 2015.
- LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s.l.], v. 2, n. 10, p. a003236, 2010.

LIECHTY, W. B.; KRYSCIO, D. R.; SLAUGHTER, B. V.; PEPPAS, N. A. Polymers for drug delivery systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, [s.l.], v. 1, p. 149–173, 2010.

LIU, J.; LIU, F.; GAO, K.; WU, J.; XUE, D. Recent developments in the chemical synthesis of inorganic porous capsules, **Journal of Materials Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 34, p. 6073–6084, 2009.

LORBER, D. M.; SHOICHET, B. K. Hierarchical docking of databases of multiple ligand conformations. **Current topics in medicinal chemistry**, [s.l.], v. 5, n. 8, p. 739–749, 2005.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s.l.], v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 2, p. 2014–2033, 2015.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein engineering**, [s.l.], v. 14, n. 10, p. 735–745, 2001.

MAO, B. G.; et al. Fabrication of Flowerlike Vaterite Calcium Carbonate Crystal Aggregates by Self-Assembly in Water/Ethanol Mixtures, **European Journal of Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 2013, p. 5958–5963, 2013.

MARQUES, G. F. O. et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of *Vatairea guianensis* lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, [s.l.], v. 140, p. 58–65, 2017.

MAZALOVSKA, M.; KOUOKAM, J. C. Lectins as Promising Therapeutics for the Prevention and Treatment of HIV and Other Potential Coinfections. **BioMed research international**, [s.l.], v. 2018, p. 3750646, 2018.

MOLAVIPORDANJANI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J. Strategies for Conjugation of Biomolecules to Nanoparticles as Tumor Targeting Agents. **Current pharmaceutical design**, [s.l.], v. 25, n. 37, p. 3917–3926, 2019.

MOREIRA R. A.; CORDEIRO E.; RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. **Revista brasileira de fisiologia vegetal**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 23–29, 1996.

MUKHERJEE, B.; SANTRA, K.; PATTNAIK, G.; GHOSH, S. Preparation, characterization and in-vitro evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. **International journal of nanomedicine**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 487–496, 2008.

NAGANO, C. S.; CALVETE, J. J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B. S.; SANZ, L. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through

crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 409, n. 2, p. 417–428, 2008.

NASCIMENTO, A. P. M. et al. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 120, p. 566–577, 2018.

NASCIMENTO, A. P. M. et al. Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 134, p. 660–672, 2019.

NGUYEN, V. H.; LEE, B.-J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. **International journal of nanomedicine**, [s.l.], v. 12, p. 3137–3151, 2017.

OLIVEIRA, T. M. et al. Crystal structure of *Dioclea rostrata* lectin: Insights into understanding the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium and the structural basis for carbohydrate recognition in Diocleinae lectins, **Journal of Structural Biology**, [s.l.], v. 164, n. 2, p. 177–182, 2008

OSTERNE, V. J. S. et al. Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied biochemistry and biotechnology**, [s.l.], v. 172, n. 7, p. 3342–3353, 2014.

OSTERNE, V. J. S. et al. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 94, p. 271–282, 2017.

OWENS, F. J.; POOLE, C. P. **The Physics and Chemistry of Nanosolids**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

PARAKHONSKIY, B. V. et al. Macromolecule loading into spherical, elliptical, star-like and cubic calcium carbonate carriers. **Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry**, [s.l.], v. 15, n. 13, p. 2817–2822, 2014.

PARAKHONSKIY, B. et al. The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells. **Journal of nanobiotechnology**, [s.l.], v. 13, p. 53, 2015.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of nanobiotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 1, p. 71, 2018.

PERACLAULA, R.; BARRABÉS, S.; SARRATS, A.; RUDD, P. M.; LLORENS, R. DE. Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. **Disease markers**, [s.l.], v. 25, n. 4-5, p. 207–218, 2008.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in experimental medicine and biology**, [s.l.], v. 491, p. 27–54, 2001.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The role of lectins in plant defence, **The Histochemical Journal**, [s.l.], v. 27, p. 253-271, 1995.

PIHÍKOVÁ, D.; KASÁK, P.; TKAC, J. Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. **Open Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 13, n. 1, p. 636–655, 2015.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International journal of biological macromolecules**, [s.l.], v. 98, p. 12–23, 2017.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. **International journal of molecular sciences**, [s.l.], v. 20, n. 18, 2019.

PORTILLO-TÉLLEZ, M. D. C. et al. Folding and homodimerization of wheat germ agglutinin. **Biophysical journal**, [s.l.], v. 101, n. 6, p. 1423–1431, 2011.

POUGET, E. M. et al. The development of morphology and structure in hexagonal vaterite. **Journal of the American Chemical Society**, [s.l.], v. 132, n. 33, p. 11560–11565, 2010.

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

QUEIROZ, L. P. **Dioclea in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83108>>. Acesso em: 5 mar. 2020.

RAI, S., RAI, A. Nanotechnology - The secret of fifth industrial revolution and the future of next generation. **Nusantara Bioscience**, [s.l.], v. 7, n. 2, p. 61-66, 2015.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SHEPHERD, I.; MELO LOPES, R. O.; SAMPAIO, A. H. Carbohydrate/glycan-binding specificity of legume lectins in respect to their proposed biological functions, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 43, n. 4, 2000.

RAVAL, A.; PARIKH, J.; ENGINEER, C. Mechanism of controlled release kinetics from medical devices. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Brazil, v. 27, n. 2, p. 211–225, 2010.

RENDER, D. et al. Biomaterial-Derived Calcium Carbonate Nanoparticles for Enteric Drug Delivery. **Journal of nanomaterials**, [s.l.], v. 2016, 2016.

REYES-MONTAÑO, E. A.; VEGA-CASTRO, N. A. Plant Lectins with Insecticidal and Insectistatic Activities. In: BEGUM, G. (Ed.). **Insecticides - Agriculture and Toxicology**. [s.l.] InTech, 2018.

ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Binding of hydrophobic ligands to plant lectins: titration with arylaminonaphthalene sulfonates. **Archives of biochemistry and biophysics**, [s.l.], v. 224, n. 2, p. 479-484, 1983.

ROY, R.; MURPHY, P. V.; GABIUS, H. J. Multivalent Carbohydrate-Lectin Interactions: How Synthetic Chemistry Enables Insights into Nanometric Recognition. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 5, 2016.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug solubility: importance and enhancement techniques. **ISRN pharmaceutics**, [s.l.], v. 2012, p. 195727, 2012.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D. et al. A method for integrative structure determination of protein-protein complexes. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 28, n. 24, p. 3282–3289, 2012.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H. J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic acids research**, [s.l.], v. 33, p. W363–7, 2005.

SCHROT, J.; WENG, A.; MELZIG, M. F. Ribosome-inactivating and related proteins. **Toxins**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 1556–1615, 2015.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n. 4, p. 761–766, 2004.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **Journal of molecular biology**, [s.l.], v. 267, n. 2, p. 433–445, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. The Structural Basis for Carbohydrate Recognition By Lectins, **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, [s.l.], v. 2, p. 1–16, 2001.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [s.l.], v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**, Springer, 2007. Available in: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6953-6>

SHETTY, K. N.; LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K.; SUGUNA, K. Affinity of a galactose-specific legume lectin from *Dolichos lablab* to adenine revealed by X-ray crystallography. **IUBMB life**, [s.l.], v. 65, n. 7, p. 633–644, 2013.

SIMÃO, E. P. et al. Nanostructured impedimetric lectin-based biosensor for arboviruses detection. **Talanta**, [s.l.], v. 208, p. 120338, 2020.

SOLÁ, R. J.; GRIEBENOW, K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 98, n. 4, 1223-1245, 2009.

GALLEGO-DEL-SOL, F.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-

- dependent dimer–tetramer transition, **Journal of Structural Biology**, [s.l.], v. 158, n. 1, p. 1–9, 2007.
- SOUSA, B. L. et al. Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: A new tool for cancer research. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s.l.], v. 72, p. 27–39, mar. 2016.
- SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate journal**, [s.l.], v. 30, n. 7, p. 641–657, 2013.
- BHUSHAN, B. **Springer Handbook of Nanotechnology**, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-29857-1>>
- STANLEY, P.; TANIGUCHI, N.; AEBI, M. N-Glycans. *In*: VARKI, A. et al. (Eds.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- STOWELL, S. R.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. Protein glycosylation in cancer. **Annual review of pathology**, [s.l.], v. 10, p. 473–510, 2015.
- SUKHORUKOV, G. B.; VOLODKIN, D. V.; GÜNTHER, A. M.; PETROV, A. I.; SHENOY, D. B.; MÖHWALD, H. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds, **Journal of material chemistry**, [s.l.], v. 14, p. 2073–2081, 2004.
- TABASSUM, D. P.; POLYAK, K. Tumorigenesis: it takes a village. **Nature reviews. Cancer**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 473–483, 2015.
- TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; EPENETOS, A. A. Exploiting altered glycosylation patterns in cancer: Progress and challenges in diagnosis and therapy. **Trends in biotechnology**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 227–233, 1994.
- TEIXEIRA, C. S. et al. Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 49, n. 3, p. 529–534, 2014.
- TERÄVÄ, J.; TIAINEN, L.; LAMMINMÄKI, U.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P. L.; PETTERSSON, K.; GIDWANI, K. Lectin nanoparticle assays for detecting breast cancer-associated glycovariants of cancer antigen 15-3 (CA15-3) in human plasma. **PloS one**, [s.l.], v. 14, n. 7, p. e0219480, 2019.
- TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S. K. Drug delivery systems: An updated review. **International journal of pharmaceutical investigation**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 2–11, 2012.
- TONG, L.; BASKARAN, G.; JONES, M. B.; RHEE, J. K.; YAREMA, K. J. Glycosylation changes as markers for the diagnosis and treatment of human disease. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, [s.l.], v. 20, p. 199–244, 2003.

TOPIN, J. et al. Deciphering the glycan preference of bacterial lectins by glycan array and molecular docking with validation by microcalorimetry and crystallography. **PloS one**, [s.l.], v. 8, n. 8, p. e71149, 2013.

TROFIMOV, A. D.; IVANOVA, A. A.; ZYUZIN, M. V.; TIMIN, A. S. Porous Inorganic Carriers Based on Silica, Calcium Carbonate and Calcium Phosphate for Controlled/Modulated Drug Delivery: Fresh Outlook and Future Perspectives. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 10, n. 4, 2018.

TRUSHINA, D. B.; BUKREEVA, T. V.; KOVALCHUK, M. V.; ANTIPINA, M. N. CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications, **Materials Science and Engineering: C**, 2014.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical reviews in plant sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VAN DAMME, E.J.M.; LANNON, N.; PEUMANS, W.J. Plant lectins. **Advances in botanical research**, [s.l.], v. 48, p. 107–209, 2008.

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

VARKI, A. et al. **Essentials of Glycobiology, Third Edition**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015–2017.

VASCONCELOS, M. A. et al. Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts. **BioMed research international**, [s.l.], v. 2014, p. 365272, 2014.

VENUGOPAL, A.; GNANESH KUMAR, B. S.; AHAMAD MOHIDDON, M.; GHANASHYAM KRISHNA, M.; SIVA KUMAR, N. Facile synthesis of biodegradable affinity-purified lectin nanoparticles. **Cogent Chemistry**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 37, 2016.

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

WEIS, W. I. Cell-surface carbohydrate recognition by animal and viral lectins. **Current opinion in structural biology**, [s.l.], v. 7, n. 5, p. 624–630, 1997.

WEN, H.; JUNG, H.; LI, X. Drug Delivery Approaches in Addressing Clinical Pharmacology-Related Issues: Opportunities and Challenges. **The AAPS journal**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 1327–1340, 2015.

WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution, **Nature**, [s.l.], v. 289, p. 366-373, 1981.

WU, A. M.; LISOWSKA, E.; DUK, M.; YANG, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. **Glycoconjugate journal**, [s.l.], v. 26, n. 8, p. 899–913, 2009.

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

YAN, F. W.; ZHANG, S. F.; GUO, C. Y.; ZHANG, X. H.; CHEN, G. C.; YAN, F.; YUAN, G. Q. Influence of stirring speed on the crystallization of calcium carbonate. **Crystal Research and Technology**, [s.l.], v. 44, n. 7, p. 725–728, 2009.

YANG, W.-W.; PIERSTORFF, E. Reservoir-based polymer drug delivery systems. **Journal of laboratory automation**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 50–58, 2012.

YOW, H. N.; ROUTH, A. F. Formation of liquid core–polymer shell microcapsules. **Soft matter**, [s.l.], v. 2, n. 11, p. 940–949, 2006.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, Brazil, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZHENG, M.; YU, J. The effect of particle shape and size on cellular uptake, **Drug Delivery and Translational Research**, [s.l.], v. 6, p. 67-72, 2016.

APÊNDICE A – SUMÁRIO

Dados recentes indicam que a mortalidade induzida por câncer está aumentando significativamente nos últimos anos, sendo considerada uma grave preocupação de saúde pública. As células cancerígenas apresentam várias alterações em seus perfis de glicosilação em comparação com as contrapartes normais. Nesse contexto, as lectinas, proteínas capazes de ligação específica e reversível aos carboidratos, são importantes devido às suas propriedades de decodificação de glicocódigo e à elicitação de diversas atividades biológicas. Estudos recentes indicam a capacidade de lectinas *ConA-like* de induzir a morte em células tumorais com um alto grau de seletividade e eficiência.

Uma das maneiras mais eficientes de usar essas lectinas é em conjunto com a nanotecnologia. Um material promissor a aplicar são as partículas de carbonato de cálcio, um material barato e não tóxico que permite o encapsulamento de biomoléculas em sua estrutura porosa, o que permite uma infinidade de aplicações. Esta pesquisa faz parte de um projeto muito maior, com foco na purificação, caracterização físico-química e estrutural, atividades biológicas e estudos de bioinformática de várias lectinas. O presente trabalho tem como objetivo construir um sistema de liberação controlada/lenta aplicando dois tamanhos de partículas de CaCO_3 para adsorver a lectina de *Dioclea violacea* (DVL), investigar o efeito da lectina e dos conjugados contra células cancerígenas cervicais (linhagem HeLa) e avaliar a ligação de lectina com glicanos de HeLa por meio de simulações de bioinformática.

A Seção 1 apresenta o assunto de glicanos e glicosilação, lectinas com foco em lectinas *ConA-like* e as propriedades e atividades de DVL. Além disso, são apresentados os assuntos de câncer, nanotecnologia com foco em partículas de CaCO_3 e simulações de *docking* molecular.

A Seção 2 apresenta os objetivos gerais e específicos da pesquisa.

A Seção 3 aborda os materiais e a metodologia aplicada para a purificação de DVL, síntese de partículas, adsorção e caracterização de DVL de conjugados, ensaios de células com células HeLa e acoplamento molecular.

A seção 4 relata os resultados e a discussão do trabalho de pesquisa. Resumidamente, a adsorção de DVL em dois tipos de partículas foi bem-sucedida com parâmetros como rendimento de adsorção, liberação de DVL e recristalização sendo compatíveis com a aplicação. A lectina e os conjugados apresentaram efeitos antiproliferativos, além de induzirem aglutinação e alterações na morfologia celular. Os experimentos *in silico* corroboram com os resultados sugerindo uma ligação favorável com

glicanos comuns das células HeLa. Finalmente, a microscopia confocal com conjugados marcados mostra a internalização dos conjugados nas células HeLa.

A seção 5 formula a conclusão do trabalho e algumas sugestões para pesquisas futuras.

APÊNDICE B – SAMENVATTING

Uit recente gegevens blijkt dat de sterfte als gevolg van kanker de laatste jaren aanzienlijk toeneemt, dit is een ernstig probleem voor de volksgezondheid. Kankercellen vertonen verschillende veranderingen in hun glycosyleringsprofielen in vergelijking met de normale cellen. In deze context zijn lectines, eiwitten die in staat zijn tot specifieke herkenning en omkeerbare binding met koolhydraten, belangrijk vanwege hun glycode-decoderingseigenschappen en het uitlokken van verschillende biologische activiteiten. Recente studies wijzen op het vermogen van ConA-achtige lectines om met een grote mate van selectiviteit en efficiëntie de dood in tumorcellen te induceren.

Een van de meest efficiënte manieren om deze lectines te gebruiken, is in combinatie met nanotechnologie. Een veelbelovend materiaal om te gebruiken zijn calciumcarbonaatdeeltjes, een goedkoop, niet-giftig materiaal dat de inkapseling van biomoleculen in hun poreuze structuur mogelijk maakt, wat een overvloed aan toepassingen mogelijk maakt. Dit doctoraatsonderzoek maakt deel uit van een veel groter project dat zich richt op de zuivering, fysicochemische en structurele karakterisering, biologische activiteiten en bio-informatica-analyse van meerdere lectines. Het huidige werk heeft tot doel een systeem met gecontroleerde / langzame afgifte op te zetten door CaCO₃-deeltjes van twee groottes toe te passen om het lectine van *Dioclea violacea* (DVL) te adsorberen, het effect van het lectine en de conjugaten tegen baarmoederhalskankercellen (HeLa cellen) te onderzoeken en de lectinebinding te evalueren met de glycanen op het celoppervlak van de HeLa cellen via bioinformatica-simulaties.

Sectie 1 introduceert de onderwerpen glycanen en glycosylering, lectines met de nadruk op ConA-achtige lectines, en de eigenschappen en activiteiten van DVL. Daarnaast worden de onderwerpen kanker, nanotechnologie met focus op CaCO₃-deeltjes en moleculaire docking-simulaties geïntroduceerd.

Hoofdstuk 2 presenteert de algemene en specifieke doelstellingen van het onderzoek.

Hoofdstuk 3 beschrijft de gebruikte materialen en methodologie voor de zuivering van DVL, deeltjessynthese, DVL-adsorptie en karakterisering van conjugaten, de cell assays met HeLa-cellen en de moleculaire docking.

Hoofdstuk 4 rapporteert over de resultaten en bespreking van het onderzoekswerk. Kort samengevat was de adsorptie van DVL op twee soorten deeltjes succesvol, waarbij parameters zoals adsorptieopbrengst, DVL-afgifte en herkristallisatie compatibel waren met

de toepassing. Het lectine en de conjugaten vertoonden antiproliferatieve effecten en veroorzaakten ook agglutinatie en veranderingen in celmorfologie. In silico-experimenten bevestigen de resultaten door een gunstige binding te suggereren met gewone glycanen van HeLa-cellen. Tot slot toont confocale microscopie met gelabelde conjugaten aan dat de conjugaten in HeLa-cellen worden opgenomen.

Hoofdstuk 5 formuleert de conclusie van het werk en enkele suggesties voor toekomstig onderzoek.

APÊNDICE C – *Curriculum vitae*

Curriculum Vitae: Vinicius Jose da Silva Osterne (born: 19/03/1992)
Email: vinnyosterne@gmail.com

- **Last updated 06/04/2020**

Area of Specialization: Biotechnology (Plant Proteins; Structural Biology);

Education:

Grad.	Biotechnology	Federal University of Ceara	(Fortaleza – CE, Brazil) 2013
M.Sc.	Natural Resources Biotechnology	Federal University of Ceara	(Fortaleza - CE, Brazil) 2015.

Current: Ph.D. student in Biotechnology of Natural Resources - Federal University of Ceara.

Fortaleza- Ceará, Brazil since 2016. Supervisors: Kyria Santiago Nascimento and Benildo Sousa Cavada.

Joint Ph.D. in Applied Biological Sciences: Cell and Gene Biotechnology - Ghent University in Gent - Belgium. Supervisor: Els Van Damme

Summary of Publications and Presentations

Full papers published in international journals	32
Scientific events	17
Abstracts presented in events	09
Technical productions	14
Patents	3

Full papers published:

1. Cavada BS, **Osterne VJS**, Oliveira MV, Pinto-Junior VR, Silva MTL, Bari AU, et al. Reviewing *Mimosoideae* lectins: A group of under explored legume lectins. *Int J Biol Macromol.* 2020; 154: 159–165.
2. Dubiel M, De Coninck T, **Osterne VJS**, Verbeke I, Van Damme D, Smaghe G, et al. The ArathEULS3 Lectin Ends up in Stress Granules and Can Follow an Unconventional Route for Secretion. *Int J Mol Sci.* 2020; 21. doi:10.3390/ijms21051659
3. Cavada BS, **Osterne VJS**, Pinto-Junior VR, Souza LAG, Lossio CF, Silva MTL, et al. Molecular dynamics and binding energy analysis of *Vatairea guianensis* lectin: a new tool for cancer studies. *J Mol Model.* 2020; 26: 22.
4. Nascimento KS, Silva MTL, Oliveira MV, Lossio CF, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, et al. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive *Papilionoideae* (leguminous) tribe. *Int J Biol Macromol.* 2020; 144: 509–526.
5. Cavada BS, Bari AU, Pinto-Junior VR, Lossio CF, Silva MTL, Souza LAG, Oliveira MV, Souza-Filho CHD, Correia SEG, Vital APMS, Lima LD, **Osterne VJS**, Nascimento KS. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H.C. Hopkins seeds (*Leguminosae* family; *Mimosoideae* subfamily) and evaluation of its biological effects. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2020. pp. 845–855. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.102

6. Cavada BS, **Osterne VJS**, Lossio CF, Pinto-Junior VR, Oliveira MV, Silva MTL, et al. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. pp. 901–911. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100
7. Nascimento APM, Wolin IAV, Welter PG, Heinrich IA, Zanotto-Filho A, **Osterne VJS**, et al. Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells. *Int J Biol Macromol*. 2019; 134: 660–672.
8. Cavada BS, **Osterne VJS**, Pinto-Junior VR, Nascimento KS. ConBr, the Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Seeds: Forty Years of Research. *Curr Protein Pept Sci*. 2019; 20: 600–613.
9. Cavada BS, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Nascimento KS. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. *Int J Mol Sci*. 2018; 20. doi:10.3390/ijms20010030
10. Clemente-Napimoga JT, Silva MASM, Peres SNC, Lopes AHP, Lossio CF, Oliveira MV, **Osterne VJS**, et al. *Dioclea violacea* lectin ameliorates inflammation in the temporomandibular joint of rats by suppressing intercellular adhesion molecule-1 expression. *Biochimie*. 2019; 158: 34–42.
11. Nascimento KS, Araripe DA, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Martins FWV, Neco AHB, et al. Homology modeling, molecular docking, and dynamics of two α -methyl-D-mannoside-specific lectins from *Arachis* genus. *J Mol Model*. 2018; 24: 251.
12. Nascimento APM, Knaut JL, Rieger DK, Wolin IAV, Heinrich IA, Mann J, Juarez AV, Sosa LDV, Paul ALP, Moreira CG, Silva IB, Nobre CS, **Osterne VJS**, et al. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*. *Int J Biol Macromol*. 2018; 120: 566–577.
13. Neco AHB, Pinto-Junior VR, Araripe DA, Santiago MQ, **Osterne VJS**, Lossio CF, et al. Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from *Centrolobium microchaete* seeds. *Int J Biol Macromol*. 2018; 117: 124–133.
14. Leal RB, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Wolin IAV, Nascimento APM, Neco AHB, et al. Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. *Int J Biol Macromol*. 2018; 114: 64–76.
15. Nascimento KS, Santiago MQ, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Martins FWV, Nascimento APM, et al. Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017; 92: 79–89.
16. Cavada BS, Araripe DA, Silva IB, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Neco AHB, et al. Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa). *Int J Biol Macromol*. 2018;107: 236–246.
17. Cavada BS, Silva MTL, **Osterne VJS**, Pinto-Junior VR, Nascimento APM, Wolin IAV, et al. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. *Int J Biol Macromol*. 2018; 106: 369–378.
18. Pinto-Junior VR, Santiago MQ, Nobre CB, **Osterne VJS**, Leal RB, Cajazeiras JB, et al. Crystal structure of *Pisum arvense* seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics. *Arch Biochem Biophys*. 2017; 630: 27–37.
19. Marques GFO, **Osterne VJS**, Almeida LM, Oliveira MV, Brizeno LAC, Pinto-Junior VR, et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of *Vatairea guianensis* lectin to induce edematogenic activity. *Biochimie*. 2017; 140: 58–65.
20. Araripe DA, Pinto-Junior VR, Neco AHB, Santiago MQ, **Osterne VJS**, Pires AF, et al. Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans*

- seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. *Int J Biol Macromol.* 2017; 102: 323–330.
21. Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Santiago MQ, Lossio CF, Nagano CS, Rocha CRC, et al. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. *Biochimie.* 2017; 135: 126–136.
 22. **Osterne VJS**, Silva-Filho JC, Santiago MQ, Pinto-Junior VR, Almeida AC, Barreto AAGC, et al. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. *Int J Biol Macromol.* 2017; 94: 271–282.
 23. Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Santiago MQ, Correia JLA, Pereira-Junior FN, Leal RB, et al. Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. *Int J Biol Macromol.* 2017; 98: 12–23.
 24. Bari AU, Santiago MQ, **Osterne VJS**, Pinto-Junior VR, Pereira LP, Silva-Filho JC, et al. Lectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects. *Int J Biol Macromol.* 2016; 92: 194–201.
 25. Almeida AC, **Osterne VJS**, Santiago MQ, Pinto-Junior VR, Silva-Filho JC, Lossio CF, et al. Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity. *Arch Biochem Biophys.* 2016; 596: 73–83.
 26. Alves AC, Vasconcelos MA, Santiago MQ, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Lossio CF, et al. A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: partial characterization and immobilization in chitosan beads. *Arch Biochem Biophys.* 2015; 588: 33–40.
 27. Pinto-Junior VR, Correia JLA, Pereira RI, Pereira-Junior FN, Santiago MQ, **Osterne VJS**, et al. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. *J Mol Recognit.* 2016; 29: 134–141.
 28. Teixeira CS, Assreuy AMS, **Osterne VJS**, Amorim RMF, Brizeno LAC, Debray H, et al. Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice. *Process Biochemistry.* 2014. pp. 529–534. doi:10.1016/j.procbio.2013.12.020
 29. Santiago MQ, Leitão CCF, Pereira-Junior FN, Pinto-Junior VR, **Osterne VJS**, Lossio CF, et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. *Journal of Molecular Recognition.* 2014. pp. 117–123. doi:10.1002/jmr.2340
 30. **Osterne VJS**, Santiago MQ, Pinto-Junior VR, Cajazeiras JB, Correia JLA, Leitão CCF, et al. Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014; 172: 3342–3353.
 31. Barroso-Neto IL, Simões RC, Rocha BAM, Bezerra MJB, Pereira-Junior FN, **Osterne VJS**, et al. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 543: 31–39.
 32. Pinto-Júnior VR, de Santiago MQ, **Osterne VJS**, Correia JLA, Pereira-Júnior FN, Cajazeiras JB, et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* mart. *Molecules.* 2013; 18: 10857–10869.

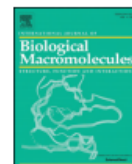
ANEXO A – PAPER 1

International Journal of Biological Macromolecules 154 (2020) 159–165



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Review

Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins



Benildo Sousa Cavada ^{a,*}, Vinicius Jose Silva Osterne ^a, Messias Vital Oliveira ^a, Vanir Reis Pinto-Junior ^b, Mayara Torquato Lima Silva ^c, Alfa Umaro Bari ^a, Lara Dias Lima ^a, Claudia Figueiredo Lossio ^a, Kyria Santiago Nascimento ^{a,*}

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

^b Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2020

Received in revised form 2 March 2020

Accepted 13 March 2020

Available online 14 March 2020

Keywords:

Lectins

Mimosoideae

Leguminosae

ABSTRACT

Lectins are proteins capable of specific and reversible binding to mono- and/or oligosaccharides, and within this group, Legume lectins are the most studied. However, most of these studies focus on the Papilionoideae subfamily, with Caesalpinioideae and Mimosoideae lectins being significantly less explored in the literature. The Mimosoideae subfamily consists of at least 79 genera and 3275 species, but, to date, only about 14 lectins have been purified, a fact which shows the lack of studies for this group. Based on their purification protocols, as well as physicochemical and structural properties, Mimosoideae lectins are very heterogeneous. Despite the few studies, a wide variety of biological activities have been tested, including, for example, inflammatory, anti-cancer, antibacterial, and antifungal. In this context, the present review aims to summarize the available data regarding the purification, physicochemical and structural properties, as well as biological activities, of lectins extracted from plants of the Mimosoideae subfamily in order to bring more insight to researchers interested in further exploring the potential of these molecules.

ANEXO B – PAPER 2




International Journal of
Molecular Sciences



Article

The ArathEULS3 Lectin Ends up in Stress Granules and Can Follow an Unconventional Route for Secretion

Malgorzata Dubiel ^{1,2} , Tibo De Coninck ¹ , Vinicius Jose Silva Osterne ^{1,3}, Isabel Verbeke ¹, Daniël Van Damme ^{4,5} , Guy Smagghe ²  and Els J. M. Van Damme ^{1,6,*} 

- ¹ Laboratory of Biochemistry and Glycobiology, Department of Molecular Biotechnology, Ghent University, Coupure Links 653, 9000 Ghent, Belgium; Malgorzata.Dubiel@UGent.be (M.D.); Tibo.DeConinck@UGent.be (T.D.C.); VinnyOsterne@Alu.Ufc.br (V.J.S.O.); Isabel.Verbeke@UGent.be (I.V.)
 - ² Laboratory of Agrozoology, Department of Plants and Crops, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium; Guy.Smagghe@UGent.be
 - ³ Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, Universidade Federal do Ceará, José Aurelio Camara, S/N, 61440-970, Fortaleza 60440-970, Brazil
 - ⁴ Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, Technologiepark 71, 9052 Ghent, Belgium; Daniel.VanDamme@psb.vib-ugent.be
 - ⁵ VIB Center for Plant Systems Biology, Technologiepark 71, 9052 Ghent, Belgium
 - ⁶ Center for Advanced Light Microscopy, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium
- * Correspondence: ElsJM.VanDamme@UGent.be; Tel.: +32-9 264-60-86

Received: 29 January 2020; Accepted: 26 February 2020; Published: 28 February 2020



Abstract: Stress granules are cytoplasmic compartments, which serve as mRNA storage units during stress, therefore regulating translation. The *Arabidopsis thaliana* lectin *ArathEULS3* has been widely described as a stress inducible gene. This study aimed to examine in detail the localization of *ArathEULS3* lectin in normal and stressed cells. Colocalization experiments revealed that the


ANEXO C – PAPER 3

Journal of Molecular Modeling (2020) 26: 22
<https://doi.org/10.1007/s00894-019-4281-3>

ORIGINAL PAPER



Molecular dynamics and binding energy analysis of *Vatairea guianensis* lectin: a new tool for cancer studies

Benildo Sousa Cavada¹  · Vinicius Jose Silva Osterne¹ · Vanir Reis Pinto-Junior² · Luiz Augusto Gomez Souza³ · Claudia Figueiredo Lossio¹ · Mayara Torquato Lima Silva⁴ · Corneville Correia-Neto¹ · Messias Vital Oliveira¹ · Jorge Luis Almeida Correia¹ · Antonio Hadson Bastos Neco¹ · Jorge Luiz Coelho Domingos² · Wandemberg Paiva Ferreira² · Gil Aquino Farias² · Kyria Santiago Nascimento¹

Received: 30 May 2019 / Accepted: 19 December 2019 / Published online: 7 January 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The Tn antigen is an epitope containing *N*-acetyl-D-galactosamine present in the extracellular matrix of some carcinoma cells in humans, and it is often used as a biomarker. Lectins are proteins capable of binding to carbohydrates and can be used as a molecular tool to recognize antigens and to differentiate cancer cells from normal cells. In this context, the present work aimed to characterize the interaction of *Vatairea guianensis* seed lectin with *N*-acetyl-D-galactosamine and the Tn antigen by molecular dynamics and molecular mechanics/Poisson–Boltzmann solvent-accessible surface area analysis. This study revealed new interacting residues not previously identified in static analysis of the three-dimensional structures of *Vatairea* lectins, as well as the configuration taken by the carbohydrate recognition domain, as it interacts with each ligand. During the molecular dynamics simulations, *Vatairea guianensis* lectin was able to bind stably to Tn antigen, which, as seen previously for other lectins, enables its use in cancer research, diagnosis, and therapy. This work further demonstrates the efficiency of bioinformatics in lectinology.

Keywords Tn antigen · Cancer · *Vatairea guianensis* · Lectin · Molecular dynamics

ANEXO D – PAPER 4



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Review

Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe



Kyria Santiago Nascimento^{a,*}, Mayara Torquato Lima Silva^b, Messias Vital Oliveira^a,
Claudia Figueiredo Lossio^a, Vanir Reis Pinto-Junior^c, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

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

^c Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2019

Received in revised form 6 November 2019

Accepted 14 December 2019

Available online 17 December 2019

Keywords:

Lectins

Leguminosae

Dalbergieae tribe

ABSTRACT

Lectins are (glyco)proteins capable of reversibly binding to specific carbohydrates, thus having various functions and applications. Plant lectins are the best studied, and the *Leguminosae* family is highlighted in a number of published works, especially species of the Papilionoideae subfamily. Dalbergieae is one of the tribes in this subfamily comprising 49 genera and over 1300 species. From this tribe, about 26 lectins were studied, among which we can highlight the *Arachis hypogaea* lectin, widely used in cancer studies. Dalbergieae lectins demonstrate various carbohydrate specificities and biological activities including anti-inflammatory, vasorelaxant, nociceptive, antibacterial, antiviral among others. Structurally, these lectins are quite similar in their three-dimensional folding but present significant differences in oligomerization patterns and in the conservation of carbohydrate-recognition domain. Despite the existence of structural data from some lectins, only sparse literature has reported on this tribe's diversity, not to mention the range of biological effects, determined through specific assays. Therefore, this work will review the most important studies on Dalbergieae lectins and their potential biomedical applications.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

ANEXO E – PAPER 5

International Journal of Biological Macromolecules 145 (2020) 845–855



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H.C. Hopkins seeds (*Leguminosae* family; *Mimosoideae* subfamily) and evaluation of its biological effects



Benildo Sousa Cavada^{a,*}, Alfa Umara Bari^a, Vanir Reis Pinto-Junior^a, Claudia Figueiredo Lossio^a, Mayara Torquato Lima Silva^b, Luiz Augusto Gomes Souza^c, Messias Vital Oliveira^a, Claudio Henrique Dahne Souza-Filho^a, Sarah Elizabeth Gomes Correia^a, Ana Paula Moreira Sousa Vital^a, Lara Dias Lima^a, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Kyria Santiago Nascimento^{a,*}

^aLaboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol-Lab), Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil

^bLaboratório de Neuroquímica 3 – Transdução de Sinal no SNC, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2019

Received in revised form 8 October 2019

Accepted 10 October 2019

Available online 15 November 2019

ABSTRACT

Lectins are proteins that have as one of their main characteristics recognizing and reversibly binding to carbohydrates. In this work, it was possible to purify and characterize a lectin from *Parkia panurensis* (*Leguminosae* family; *Mimosoideae* subfamily) seeds by a combination of the techniques: protein precipitation, along with affinity and then ion exchange chromatography using the Sepharose-mannose and diethylaminoethyl matrices, respectively. The pure lectin, called PpaL, has affinity by D-mannose, D-

ANEXO F – PAPER 6

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Review

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



Benildo Sousa Cavada^{a,*}, Vinicius Jose Silva Osterne^a, Claudia Figueiredo Lossio^a, Vanir Reis Pinto-Junior^a,
Messias Vital Oliveira^a, Mayara Torquato Lima Silva^a, Rodrigo Bainy Leal^b, Kyria Santiago Nascimento^{a,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2019

Received in revised form 16 May 2019

Accepted 16 May 2019

Available online 18 May 2019

Keywords:

Lectin

Canavalia

Structure

ABSTRACT

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

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO G – PAPER 7

International Journal of Biological Macromolecules 134 (2019) 660–672



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells

Ana Paula M. Nascimento ^a, Ingrid A.V. Wolin ^a, Priscilla G. Welter ^a, Isabella A. Heinrich ^b, Alfeu Zanotto-Filho ^c, Vinicius J.S. Osterne ^d, Claudia F. Lossio ^d, Mayara T.L. Silva ^d, Kyria S. Nascimento ^d, Benildo S. Cavada ^d, Rodrigo B. Leal ^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica e Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^c Departamento de Farmacologia, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, BioMolLab, Universidade Federal do Ceará, 60020-181 Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 January 2019

Received in revised form 5 April 2019

Accepted 30 April 2019

Available online 1 May 2019

Keywords:

Autophagy

Dioclea violacea

mTOR

ABSTRACT

The antitumor activity of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea* seeds, on the U87 human glioma cell line was evaluated and compared with *Canavalia ensiformis* lectin (ConA). Treatment with DVL (10–100 µg/mL; 24–96 h) induced alterations in cell morphology, decreased cell numbers and clonogenic survival in a time- and concentration-dependent manner. DVL caused significant decreases in cell viability and impaired cell migration. Mechanistically, DVL treatment (12 h) disrupted mitochondrial electrochemical gradient, without ROS accumulation or caspase activation. In the absence of apoptosis, DVL (30–100 µg/mL), instead, induced autophagy, as detected by acridine orange staining and cleavage of LC3B. Inhibition of autophagy with 3-Methyladenine (3-MA) and Chloroquine partially abrogated DVL, but not ConA, cytotoxicity. The modulation of signaling pathways that orchestrate autophagic and cell survival processes were analyzed. DVL (30–100 µg/mL) decreased Akt,

ANEXO H – PAPER 8

600

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net*Current Protein and Peptide Science*, 2019, 20, 600-613

REVIEW ARTICLE



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



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

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

ARTICLE HISTORY

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

DOI:
 10.2174/1389203720666190104123210



CrossMark

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

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

ANEXO I – PAPER 9




International Journal of
Molecular Sciences



Review

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

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

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

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

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



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

ANEXO J – PAPER 10

Biochimie 158 (2019) 34–42



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

Dioclea violacea lectin ameliorates inflammation in the temporomandibular joint of rats by suppressing intercellular adhesion molecule-1 expression[☆]



Juliana T. Clemente-Napimoga^a, Maria A.S.M. Silva^a, Sylvia N.C. Peres^b,
 Alexandre H.P. Lopes^c, Claudia F. Lossio^d, Messias V. Oliveira^d, Vinicius J.S. Osterne^d,
 Kyria S. Nascimento^d, Henrique B. Abdalla^e, Juliana M. Teixeira^a, Benildo S. Cavada^{d, **},
 Marcelo H. Napimoga^{f, *}

^a Faculdade São Leopoldo Mandic, Instituto de Pesquisas São Leopoldo Mandic, Área de Fisiologia, Campinas, Brazil

^b Laboratory of Biopathology and Molecular Biology, University of Uberaba, Uberaba, Brazil

^c Department of Pharmacology, Medical School of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^d Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Brazil

^e Laboratory of Orofacial Pain, Department of Physiology, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

^f Faculdade São Leopoldo Mandic, Instituto de Pesquisas São Leopoldo Mandic, Área de Imunologia, Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2018

Accepted 13 December 2018

Available online 14 December 2018

ABSTRACT

Inflammation of temporomandibular joint (TMJ) tissues are the most common cause of pain conditions associated with temporomandibular disorders (TMDs). After a tissue and/or neural damage, the inflammatory response is characterized by plasma extravasation and leukocytes infiltration in the TMJ tissues, which in turn, release inflammatory cytokines cascades responsible for inflammatory pain.


ANEXO K – PAPER 11

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

ORIGINAL PAPER



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

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

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

Abstract

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

Keywords *Arachis* lectins · Molecular dynamics · Homology modeling

ANEXO L – PAPER 12

International Journal of Biological Macromolecules 120 (2018) 566–577



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*

Ana Paula M. Nascimento ^{a,1}, Jhônatas L. Knaut ^{b,1}, Débora K. Rieger ^c, Ingrid A.V. Wolin ^a, Isabella A. Heinrich ^b, Josiane Mann ^b, Andrea V. Juarez ^{d,e}, Liliana del V. Sosa ^{d,e}, Ana Lucia De Paul ^{d,e}, Cleane G. Moreira ^f, Ivanice B. Silva ^f, Clareane S. Nobre ^f, Vinicius J.S. Osterne ^f, Kyria S. Nascimento ^f, Benildo S. Cavada ^f, Rodrigo B. Leal ^{a,b,*}

^a Departamento de Bioquímica e Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Neurociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^c Departamento de Nutrição e Programa de Pós-graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 88040-900 Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^d Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Médicas, Centro de Microscopia Electrónica, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina

^e Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA), Córdoba, Argentina

^f Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, BioMol-Lab, CEP 60440-970 Fortaleza, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2018

Received in revised form 17 July 2018

Accepted 21 August 2018

Available online 23 August 2018

Keywords:

ABSTRACT

Plant lectins have been studied owing to their structural properties and biological effects that include agglutinating activity, antidepressant-like effect and antitumor property. The results from this work showed the effects of the lectin extracted from the *Dioclea violacea* plant (DVL) on the C6 rat glioma cell line. DVL treatment was able to induce caspase-3 activation, apoptotic cell death and cellular membrane damage. Furthermore, DVL decreased mitochondrial membrane potential and increased the number of acidic vesicles and cleavage of LC3, indicating activation of autophagic processes. DVL also significantly inhibited cell migration. Compared to ConA, a well-studied lectin extracted from *Canavalia ensiformis* seeds, some effects of DVL were more potent, including de-

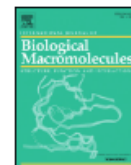
ANEXO M – PAPER 13

International Journal of Biological Macromolecules 117 (2018) 124–133



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from *Centrolobium microchaete* seeds

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

^a Universidade Federal do Ceara (UFC), Fortaleza, Ceara, Brazil^b Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA), Sobral, Ceara, Brazil^c Universidade Estadual do Ceara (UECE), Fortaleza, Ceara, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2018

Received in revised form 11 May 2018

Accepted 23 May 2018

Available online 24 May 2018

Keywords:

Dalbergiaceae

ABSTRACT

Lectins represent a class of proteins or glycoproteins capable of reversibly binding to carbohydrates. Seed lectins from the Dalbergiaceae tribe (Leguminosae) have structural variability, carbohydrate specificity, and biological effects, such as inflammation, vasorelaxation and cancer antigen binding. To comprehensively address these factors, the present work aimed to establish and characterize the three-dimensional structure of *Centrolobium microchaete* lectin (CML) by homology modeling, investigate protein-carbohydrate interactions and evaluate its inflammatory effect on mice. Molecular docking was performed to analyze interactions of the lectin with monosaccharides, disaccharides and N-glycans. Two dimannosides, methyl mannose-1,3- α -D-mannose (MM13) and methyl mannose-1,3- α -D-mannose-6-phosphate (MM13P) showed the strongest interactions with CML.

ANEXO N – PAPER 14

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

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



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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2017

Received in revised form 28 February 2018

Accepted 16 March 2018

Available online 17 March 2018

Keywords:

... ..

ABSTRACT

Lectins are a class of carbohydrate-binding proteins or glycoproteins with diverse specificities and functions. The determination and characterization of the three-dimensional structures of these proteins are keys to understanding their biological effects. Recent studies have explored the anticancer potential of *Diocleinae* lectins (from *Leguminosae* family), evaluating their antiproliferative effect and their ability to induce glioma cell death via apoptosis and autophagy. In this work, the three-dimensional structure of *Dioclea lasiophylla* seed lectin (DlyL) complexed with Xman (5-bromo-6-chloro-3-indolyl- α -D-mannopyranoside) was determined by X-ray crystallography. Moreover, interactions with relevant *N*-glycans were evaluated by molecular docking. DlyL presented

ANEXO O – PAPER 15

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



Contents lists available at ScienceDirect

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

Research paper

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

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Dioclea lasiocarpa lectin

DLL

Crystal structure

Molecular docking

Glioma

ABSTRACT

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

ANEXO P – PAPER 16

International Journal of Biological Macromolecules 107 (2018) 236–246



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

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



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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2017

Received in revised form 29 August 2017

Accepted 30 August 2017

Available online 1 September 2017

Keywords:

nPELa

Crystal structure

Nociception

ABSTRACT

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

ANEXO Q – PAPER 17

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2017

Received in revised form 19 July 2017

Accepted 3 August 2017

Available online 10 August 2017

ABSTRACT

CaBo is a mannose/glucose-specific lectin purified from seeds of *Canavalia bonariensis*. In the present work, we report the CaBo crystal structure determined to atomic resolution in the presence of X-man, a specific ligand. Similar to the structural characteristics of other legume lectins, CaBo presented the jellyroll motif, a metal binding site occupied by calcium and manganese ions close to the carbohydrate-recognition domain (CRD). *In vitro* test of CaBo cytotoxicity against glioma cells demonstrated its ability to decrease

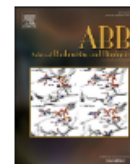
ANEXO R – PAPER 18

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



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

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

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



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2017

Received in revised form

19 July 2017

Accepted 23 July 2017

ABSTRACT

The *Pisum arvense* lectin (PAL), a legume protein belonging to the Viciae tribe, is capable of specific recognition of mannose, glucose and its derivatives without altering its structure. In this work, the three-dimensional structure of PAL was determined by X-ray crystallography and studied in detail by a combination of molecular docking and molecular dynamics (MD). Crystals belonging to monoclinic space

ANEXO S – PAPER 19

Biochimie 140 (2017) 58–65



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

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



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2017

Accepted 9 June 2017

Available online 16 June 2017

Keywords:

Vatairea guianensis

ABSTRACT

Vatairea guianensis lectin (VGL), Dalbergiae tribe, is a N-acetyl-galactosamine (GalNAc)/Galactose (Gal) lectin previously purified and characterized. In this work, we report its structural features, obtained from bioinformatics tools, and its inflammatory effect, obtained from a rat paw edema model. The VGL model was obtained by homology with the lectin of *Vatairea macrocarpa* (VML) as template, and we used it to demonstrate the common characteristics of legume lectins, such as the jellyroll motif and presence of a metal-binding site in the vicinity of the carbohydrate-recognition domain (CRD). Protein-ligand docking

ANEXO T – PAPER 20

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

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



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

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

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

^c Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2016

Received in revised form 30 March 2017

Accepted 31 March 2017

Available online 2 April 2017

ABSTRACT

The lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) was purified by affinity chromatography in a mannose-agarose column. The lectin agglutinated rabbit erythrocytes and the agglutinating effect was inhibited by previous incubation with the glycoprotein fetuin, along with *N*-acetyl-D-glucosamine, D-mannose and its derivatives. The lectin maintained complete activity in temperatures ranging from 40 to 60 °C and pH values ranging from 6 to 10. As a glycoprotein, PELa has a carbohydrate content of 2.3% and its activity

ANEXO U – PAPER 21

Biochimie 135 (2017) 126–136



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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

Research paper

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



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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2017

Accepted 9 February 2017

Available online 11 February 2017

ABSTRACT

Lectins are proteins, or glycoproteins, capable of reversibly binding to specific mono- or oligosaccharides via a noncatalytic domain. The Diocleinae subtribe presents lectins with high structural similarity, but different effects based on biological activity assays. This variability results from small structural differences. Therefore, in this context, the present study aimed to perform a structural analysis of the lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. ex Benth seeds (DlvL) and evaluate its inflammatory effect. To accomplish

ANEXO V – PAPER 22

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities



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

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

^b Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2016

Received in revised form 8 October 2016

Accepted 9 October 2016

ABSTRACT

A lectin from *Canavalia virosa*, Diocleinae subtribe, was purified by affinity chromatography with Sephadex G-50 matrix and named ConV. The primary structure of ConV was obtained by mass spectrometry and crystals were obtained by the vapor diffusion method at 293 K and belonged to orthorhombic space group P2₁2₁2₁ with two molecules in its asymmetric unit. The structure obtained presented R

ANEXO W – PAPER 23

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

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



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

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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2016

Received in revised form 16 January 2017

Accepted 20 January 2017

ABSTRACT

The three-dimensional structure of *Dioclea reflexa* seed lectin (DrFL) was studied in detail by a combination of X-ray crystallography, molecular docking and molecular dynamics. DrFL was purified by affinity chromatography using Sephadex G-50 matrix. Its primary structure was obtained by mass spectrometry, and crystals belonging to orthorhombic space group P2₁2₁2₁ were grown by the vapor diffusion method

ANEXO X – PAPER 24

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



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Lectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects



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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2016

Received in revised form 7 July 2016

Accepted 11 July 2016

ABSTRACT

The relation structure–activity of the Mimosoideae lectins of *Parkia platycephala* (PPL) and *Parkia biglobosa* (PBL) was analyzed in this study. PBL was solved by X-ray crystallography at a resolution of 2.1 Å, and the crystal structure belonged to the C222₁ space group. Structural organization and binding sites were also

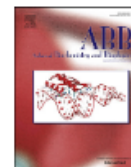
ANEXO Y – PAPER 25

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



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

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

Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity



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

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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 January 2016

Received in revised form

ABSTRACT

A glycosylated lectin (CTL) with specificity for mannose and glucose has been detected and purified from seeds of *Centrolobium tomentosum*, a legume plant from *Dalbergiaceae* tribe. It was isolated by mannose-

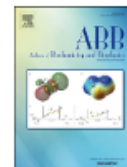
ANEXO Z – PAPER 26

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



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

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

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



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

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

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

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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

ABSTRACT

A novel lectin from seeds of *Clathrotropis nitida* (CNA) was purified and characterized. CNA is a glyco-

Research article

Journal of
Molecular
Recognition

Received: 1 July 2015,

Revised: 1 September 2015,

Accepted: 5 September 2015,

Published online in Wiley Online Library: 14 October 2015

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

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

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

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

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

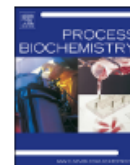
ANEXO AB – PAPER 28

Process Biochemistry 49 (2014) 529–534



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

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

Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice



Claudener Souza Teixeira^{a,b}, Ana Maria Sampaio Assreuy^c,
Vinícius José da Silva Osterne^a, Renata Morais Ferreira Amorim^c,
Luiz André Cavalcante Brizeno^c, Henri Debray^d, Celso Shiniti Nagano^e, Plinio Delatorre^f,
Alexandre Holanda Sampaio^{a,e}, Bruno Anderson Matias Rocha^a,
Benildo Sousa Cavada^{a,*}

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

^b Unidade Descentralizada de Campos Sales, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brazil

^c Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Laboratoire de Chimie Biologique et Unité Mixte de Recherche N° 8576 du CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Lille, France

^e Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará 60440-970, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 October 2013

ABSTRACT

Lectins are proteins that specifically bind to carbohydrates and form complexes with molecules and biological structures containing saccharides. The FRIL (FIT3 receptor interacting lectin) is a dimeric two-chain

ANEXO AC – PAPER 29

Research Article

Molecular
Recognition

Received: 18 September 2013,

Revised: 05 November 2013,

Accepted: 08 November 2013,

Published online in Wiley Online Library

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

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

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

Recent studies have shown that lectins are promising tools for use in various biotechnological processes, as well as studies of various pathological mechanisms, isolation, and characterization of glycoconjugates and understanding the mechanisms underlying pathological mechanisms conditions, including the inflammatory response. This study aimed to purify, characterize physicochemically, and predict the biological activity of *Canavalia oxyphylla* lectin (CoxyL) *in vitro* and *in vivo*. CoxyL was purified by a single-step affinity chromatography in Sephadex[®] G-50 column. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis showed that the pure lectin consists of a major band of 30 kDa (α -chain) and two minor components (β -chain and γ -chain) of 16 and 13 kDa, respectively. These data were further confirmed by electrospray ionization mass spectrometry, suggesting that CoxyL is a typical ConA-like lectin.

ANEXO AD – PAPER 30

Appl Biochem Biotechnol (2014) 172:3342–3353
DOI 10.1007/s12010-014-0751-3

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

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

Received: 23 October 2013 / Accepted: 20 January 2014 /
Published online: 13 February 2014
© Springer Science+Business Media New York 2014

ANEXO AE – PAPER 31

Archives of Biochemistry and Biophysics 543 (2014) 31–39



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

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

Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis



Ito Liberato Barroso-Neto^a, Rafael Conceição Simões^a, Bruno Anderson Matias Rocha^a, Maria Julia Barbosa Bezerra^a, Francisco Nascimento Pereira-Junior^a, Vinicius José Silva Osterne^a, Kyria Santiago Nascimento^a, Celso Shiniti Nagano^{a,b}, Plinio Delatorre^c, Maria Gonçalves Pereira^d, Alana Freitas Pires^d, Alexandre Holanda Sampaio^{a,b}, Ana Maria Sampaio Assreuy^d, Benildo Sousa Cavada^{a,*}

^a Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

^b Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

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

^d Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2013

and in revised form 2 December 2013

Available online 17 December 2013

ABSTRACT

Lectins are comprised of a large family of proteins capable of the specific and reversible recognition of carbohydrates. Legume lectins, the most studied plant lectins, show high structural similarity, but with modifications that imply a variation in the intensity of some biological activities. In this work, the primary and tertiary structures of *Canavalia grandiflora* (ConGF) were determined. ConGF, a lectin isolated from *C. grandiflora* seeds, is able to induce relaxant activity in rat aortic rings. The complete

ANEXO AF – PAPER 32

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

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

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

Vanir Reis Pinto Júnior ¹, Mayara Queiroz de Santiago ¹, Vinícius José da Silva Osterne ¹,
Jorge Luis Almeida Correia ¹, Francisco Nascimento Pereira Júnior ¹,
João Batista Cajazeiras ¹, Mayron Alves de Vasconcelos ¹, Edson Holanda Teixeira ²,
Antônia Sâmia Fernandes do Nascimento ¹, Thaiz Batista Azevedo Rangel Miguel ¹,
Emilio de Castro Miguel ¹, Alexandre Holanda Sampaio ³, Kyria Santiago do Nascimento ¹,
Celso Shiniti Nagano ³ and Benildo Sousa Cavada ^{1,*}

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