



**FEDERAL UNIVERSITY OF CEARA
CENTER OF AGRARIAN SCIENCES
FISHING ENGINEERING DEPARTMENT
GRADUATION PROGRAM IN BIOTECHNOLOGY OF NATURAL RESOURCES**



**GHENT UNIVERSITY
FACULTY OF BIOSCIENCE ENGINEERING
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
DOCTORAL SCHOOL OF BIOSCIENCE ENGINEERING: BIOTECHNOLOGY**

CLAUDIA FIGUEIREDO LÓSSIO

**ANALYSIS OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE, SPECIFICITY AND
ANTICANCER ACTIVITY OF THE *Canavalia villosa* (BENTH) LECTIN**

FORTALEZA

2021

CLAUDIA FIGUEIREDO LOSSIO

ANALYSIS OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE, SPECIFICITY AND
ANTICANCER ACTIVITY OF THE *Canavalia villosa* (BENTH) LECTIN

Thesis presented to the Graduation Program in
Biotechnology of Natural Resources and
Doctoral School of Bioscience Engineering:
Biotechnology as partial requirement for
obtaining the following titles of Doctor in
Natural Resources Biotechnology by UFC and
Doctor in Bioscience Engineering:
Biotechnology by UGent.

Supervisors: Prof. Dr. Kyria Santiago do
Nascimento (UFC)
Prof. Dr. Els Van Damme (UGent)

Co-supervisor: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
(UFC)

FORTALEZA

2021

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)

L889a Lossio, Claudia Figueiredo.
Análise da estrutura tridimensional, especificidade e atividade anticâncer da lectina *Canavalia villosa* (BENTH) / Claudia Figueiredo Lossio. – 2021.
288 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.
Coorientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

1. Lectina. 2. Câncer . 3. Estudos estruturais. 4. *Canavalia villosa*. I. Título.

CDD 660.6

CLAUDIA FIGUEIREDO LOSSIO

ANALYSIS OF THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE, SPECIFICITY AND
ANTICANCER ACTIVITY OF THE *Canavalia villosa* (BENTH) LECTIN

Thesis presented to the Graduation Program in
Biotechnology of Natural Resources and
Doctoral School of Bioscience Engineering:
Biotechnology as partial requirement for
obtaining the following titles of Doctor in
Natural Resources Biotechnology by UFC and
Doctor in Bioscience Engineering:
Biotechnology by UGent. Concentration area:
Biotechnology

Approved in: ___ / ___ / ____.

EXAMINATION BOARD

Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento (Supervisor)
Federal University of Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Federal University of Ceará (UFC)

Prof. Dr. Andre Skirtach
Ghent University (UGent)

Prof. Dr. Cíntia Renata Costa Rocha
Federal University of Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Rodrigo Bairy Leal
Federal University of Santa Catarina (UFSC)

To my family, for the love, care, and for
believing in me.

AKNOWLEDGEMENTS

To Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento, for your guidance since my scientific initiation, for the conversations, and mentoring that go well beyond lab expertise, thank you very much. I've always appreciated your kindness and patience.

To Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada, for the attention that you've always had with all of your students, for the support that was given me throughout these years, and for always encouraging me to give my best thank you very much.

Prof. Dr. Els Van Damme, thank you for receiving me in your lab, for your guidance and for always being willing to listen. The experience I had while working in your lab under your supervision was a big dream that came true.

To prof. Dra. Cintia Rocha, prof. Dr. Rodrigo Bainy, and prof. Dr. Andre Skirtach, thank you for accepting the invitation to be part of examination board, and thank you for your comments and collaboration.

I also would like to thank all professors that work in collaboration with BioMol-Lab, all my colleagues in doctoral school classes, my fellow Department of Biochemistry employees and outsourced workers colleagues, as well as all the Faculty members of the Graduate Program.

To my dear colleagues in BioMol lab, I've always been so proud to watch everyone graduate, and now that it's my turn, I'm excited and nervous at the same time. I would like to thank everyone that was with me since the beginning of my scientific initiation, when Fernando guided me through proteomics experiments. Now that I look back and see how much I've grown as a person and scientist, I'm aware that it was all thanks to you guys. I can't name everyone, but please feel represented as I thank dear colleagues Ivanice, Vanir, Vinicius, Neto, Alfa, Messias, William, Edil, Claudio, Lara, Yara and Paula, who were having coffee with me most recently.

I especially need to thank my beautiful friends Clareane, Cleane, Gleiciane, Ivanice, Luciana, Mayara, Nagila and Simoni. I have no words to describe how amazing and inspiring you guys are. Your friendship was a gift that the lab life gave me and that I will take with me for a lifetime, I really miss having you guys in my routine.

To all the dear friends of Glyco, you guys are amazing! The time I spent in Gent was unforgettable thanks to you guys who welcomed me warmly and made me feel part of the team right away. I especially want to send a big virtual hug to Simin, Isabel, Flavia and Tibo, I

miss you!

To all my other friends, out of Academic life, who supported me and were with me during these years, thank you so much!

Thanks, Federal University of Ceará and University of Ghent. I appreciate the work from the employees and staff from both institutions.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), through the program CAPRES-PrInt and in part by the funding agencies FUNCAP and CNPq.

I would also like to express my gratitude to the team from CIC biomaGuNE laboratory, who carried out glycan array experiments in collaboration. Also the team from MX2 beamline from Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), where the crystals were diffracted, and the team from Mass Spectrometry lab, from Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), where MSMS sequencing experiments were carried out.

Finally, I am immensely grateful to my family, who mean everything to me. Thank you to my mother Rochelane, my aunt Julia and my sister Nicea for the support, love and encouragement they have always given me. I am the person I am today thanks to you. I dedicate this work to you.

“If you can’t fly, then run, if you can’t run, then walk, if you can’t walk, then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Células utilizam glicanos de superfície para codificar informações moduladoras de processos que variam desde o reconhecimento celular e desenvolvimento de tecidos a apoptose. A decodificação dessas mensagens armazenadas em um *glicocódigo* é desempenhada por moléculas ligantes de carboidratos, e dentre estas, as lectinas se destacam devido a elas serem proteínas já bem caracterizadas e que se ligam a sacarídeos de forma específica e reversível. Dessa forma, as lectinas podem ser capazes de reconhecer determinados tipos celulares de acordo com o perfil de glicosilação expresso nas membranas dessas células. Sabe-se que diversas patologias, incluindo câncer e diabetes, apresentam glicanos mutados nas superfícies de tecidos afetados. Este fato desperta o interesse na área de glicobiologia e lectinologia, no que concerne a busca para desvendar a relação entre a mensagem passada por carboidratos alterados e o desenvolvimento e progressão de enfermidades. À vista disso, a bioprospecção e caracterização de novas lectinas que apresentem potenciais biotecnológicos é interessante em vista das comprovadas aplicações que as lectinas já estudadas apresentam. Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade anticâncer da lectina de *Canavalia villosa* (Cvill), traçando um paralelo entre essa ação e o perfil de afinidade a carboidratos dessa lectina. A estrutura tridimensional de Cvill também foi resolvida, e a partir disso foram feitas análises de interações com glicanos de câncer in silico. Para isso, Cvill, que já apresenta protocolo de isolamento descrito, teve sua sequência de aminoácidos obtida por espectrometria de massas e sequenciamento gênico. A estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia de macromoléculas e difração de raios X. A especificidade a carboidrato fina de Cvill foi analisada por *Glycan Array* e *Docking* molecular, e sua atividade anticâncer foi testada em células de HeLa, nas quais foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a ativação de caspases. O nível de expressão de transcritos relacionados com apoptose e autofagia foi avaliado por qPCR. Os resultados mostraram que Cvill apresenta um efeito citotóxico em células de HeLa, com participação do CRD e geração de ROS intracelular na maior dose testada. Também foi observado que a morte celular foi desencadeada por mecanismos que envolvem tanto vias autofágicas quanto apoptóticas, com a expressão aumentada de LC3 e a ativação de caspase 8. Cvill apresenta uma estrutura tridimensional típica de lectinas de leguminosas, com um domínio β -sanduíche e sítios de ligação a carboidratos e metais conservados.

Palavras-chave: lectina; glicobiologia; câncer; *Canavalia villosa*.

ABSTRACT

Cells use surface glycans to encode information that modulates processes ranging from cell recognition and tissue development to apoptosis. The decoding of these messages stored in a *glycocode* is performed by carbohydrate-binding molecules, and among these, lectins stand out as they are well-characterized proteins that bind to glycans in a highly specific and reversible way. Thus, lectins may be able to recognize specific cell types according to the glycosylation profile expressed in the membranes of these cells. It is known that several pathologies, including cancer and diabetes, present mutated glycans on the surfaces of affected tissues. This fact raises interest in the area of glycobiology and lectinology as these fields try to unravel the relationship among the message conveyed by altered carbohydrates and the development and progression of diseases. In view of this, the bioprospection and characterization of new lectins that may have biotechnological potential is interesting in view of the proven applications that known lectins have presented so far. This work aimed to analyze the anticancer activity of the lectin from *Canavalia villosa* (Cvill), drawing a parallel among the lectin toxicity and its carbohydrate affinity profile. The three-dimensional structure of this lectin was also solved and used to analyze interactions with cancer glycans in silico. For this, Cvill, which was isolated and partially characterized previously, had its amino acid sequence determined by mass spectrometry and gene sequencing. The three-dimensional structure was solved by macromolecule crystallography and X-ray diffraction. The fine carbohydrate specificity of Cvill was studied by Glycan Array and Molecular Docking, and its anticancer activity was evaluated in HeLa cells, in which ROS production and caspase activation were assessed. The level of apoptosis and autophagy transcripts expression was analyzed by qPCR. The results showed that Cvill has a cytotoxic effect on HeLa cells, with participation of CRD and generation of intracellular ROS at the highest dose tested. It was also observed that cell death was triggered by mechanisms involving both autophagic and apoptotic pathways, with increased expression of LC3 and activation of caspases 8. Cvill presents a three-dimensional structure typical of legume lectins, with a β -sandwich domain and conserved carbohydrate and metal binding sites.

Keywords: lectin; glycobiology; cancer; *Canavalia villosa*.

ABSTRACT

Cellen gebruiken oppervlakteglycanen om informatie te coderen die processen moduleert, variërend van celherkenning en weefselontwikkeling tot apoptose. Het decoderen van deze berichten die zijn opgeslagen in een glycode wordt uitgevoerd door koolhydraatbindende moleculen. Lectines zijn goed gekarakteriseerde eiwitten die op een zeer specifieke en omkeerbare manier aan glycanen kunnen binden. Lectinen zijn aldus in staat om specifieke celtypen te herkennen volgens het glycosyleringsprofiel dat tot expressie wordt gebracht op de membranen van deze cellen. Het is bekend dat verschillende pathologieën, waaronder kanker en diabetes, gemuteerde glycanen presenteren aan het oppervlak van aangetaste weefsels. Dit feit wekt interesse op het gebied van glycobiologie en lectinologie, aangezien onderzoekers de relatie tussen de boodschap die wordt gecodeerd door de gewijzigde koolhydraten en de ontwikkeling en progressie van ziekten willen ontrafelen. Met het oog hierop is de bioprospectie en karakterisering van nieuwe lectines die mogelijk biotechnologisch potentieel bieden, interessant in het licht van de bewezen toepassingen die bekende lectines tot nu toe hebben gepresenteerd. Dit werk was gericht op het analyseren van de antikankeractiviteit van het lectine van *Canavalia villosa* (Cvill), waarbij een parallel werd getrokken tussen de lectinetoxiciteit en het koolhydraatspecificiteit. De driedimensionale structuur van dit lectine werd opgelost en gebruikt om interacties met kankerglycanen *in silico* te analyseren. Hiervoor werd de aminozuursequentie van Cvill, dat eerder geïsoleerd en gedeeltelijk gekarakteriseerd was, bepaald door massaspectrometrie en gensequencing. De driedimensionale structuur werd bestudeerd en opgelost door middel van macromolecuul kristallografie en röntgendiffractie. De fijne koolhydraatspecificiteit van Cvill werd bepaald met behulp van een glycaanarray en moleculaire docking, en de antikankeractiviteit van Cvill werd geëvalueerd in HeLa-cellen, waarin ROS-productie en caspase-activering werden onderzocht. Het niveau van apoptose en expressie van autofagietranscripten werd geanalyseerd met qPCR. De resultaten toonden aan dat Cvill een cytotoxisch effect heeft op HeLa-cellen bij de hoogst geteste dosis, waarbij de koolhydraatbindingsplaats en het genereren van intracellulaire ROS een belangrijke rol spelen. Er werd ook waargenomen dat celdood werd veroorzaakt door mechanismen waarbij zowel autofagische als apoptotische routes betrokken zijn, met verhoogde expressie van LC3 en activering van caspase 8. Cvill vertoont een driedimensionale structuur die kenmerkend is voor vlinderbloemige lectines met een β -sandwich-domein en met geconserveerde bindingsplaatsen voor metalen en koolhydraten.

Sleutelwoorden: lectine; glycobiologie; kanker; *Canavalia villosa*.

LIST OF FIGURES

Figure 1	– Circular permutation of ConA-like lectins. The mature lectin is obtained as a result of the post-translational processing of the pre-protein	38
Figure 2	– Glycan library used in array experiments	60
Figure 3	– Map of Cvill peptides obtained through lectin digestion with Trypsin, Chymotrypsin, Asp-N, Pepsin and Glu-C enzymes and sequenced by MSMS	67
Figure 4	– 1.5% agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from <i>C. villosa</i> seeds	68
Figure 5	– Colony PCR of Cvill cloned in TOP10 <i>E. coli</i>	69
Figure 6	– Sequence of <i>Canavalia villosa</i> lectin gene	70
Figure 7	– Alignment of Cvill with <i>Canavalia</i> lectins	72
Figure 8	– Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining method demonstrating the evolutionary distance of the <i>C. villosa</i> lectin and other Diocleinae lectins	74
Figure 9	– Crystals of Cvill complexed with α -methyl-mannoside formed in the optimization plate under the condition: 17.5% PEG1000, 0.1 M phosphate-potassium citrate pH 5.0 and 0.2 M lithium sulfate	76
Figure 10	– Three-dimensional structure of <i>C. villosa</i> lectin	79
Figure 11	– Cvill homotetramer	80
Figure 12	– Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of <i>C. villosa</i> lectin	82
Figure 13	– Three-dimensional representation of Cvill's MBS	84
Figure 14	– Octahedral coordination of calcium and manganese ions in Cvill MBS	84
Figure 15	– Superposition of Cvill's three-dimensional structure with other <i>Canavalia</i> lectins	86
Figure 16	– Glycan microarray of <i>C. villosa</i> lectin	89
Figure 17	– N-glycans selected for Molecular Docking experiments	92

Figure 18 – Interactions of fucosylated and non-fucosylated complex N-glycans in Cvill's CRD	94
Figure 19 – Docking results of two asymmetric N-glycans and Cvill	95
Figure 20 – Molecular docking results of Cvill with complex N-glycan and hybrid N-glycan	96
Figure 21 – Dose-response curve of Cvill cytotoxicity in HeLa cells after incubation for the periods of 24, 48 and 72h	98
Figure 22 – Cytotoxicity of Cvill in HeLa cells after incubation of 48 h and reversion of lectin activity by incubation with specific sugar	99
Figure 23 – Morphology of HeLa cells after incubation with different doses of Cvill for 48 h and with α -methyl-mannoside (α mm)	101
Figure 24 – Evaluation of reactive oxygen species (ROS) produced after 48 h of incubation of HeLa cells with Cvill	102
Figure 25 – Activity levels of caspase 3/7, 8 and 9	104
Figure 26 – 3% agarose gel electrophoresis showing successful amplification of a fragment of GAPDH gene from newly synthesized cDNA	107
Figure 27 – Relative expression level of genes related to cell death in HeLa cells treated with Cvill at 125.0 μ g/mL, 32.25 μ g/mL, and 7.81 μ g/mL concentrations	108
Figure 28 – Confocal microscopy image of Cvill internalization by HeLa cells after 48 h incubation	112
Figure 29 – Fluorescence microscopy of HeLa cells incubated with Cvill at concentrations of 31.25 μ g/mL and 125.0 μ g/mL for a period of 48 h	113

LIST OF TABLES

Table 1	– Diocleinae lectins with solved structures	41
Table 2	– Pre-crystallization test results and recommended actions	56
Table 3	– Primers designed for qPCR reactions	62
Table 4	– Cvill tertiary structure resolution parameters	76
Table 5	– Interactions between Cvill CRD residues and α -methyl-mannoside (MMA) ...	83
Table 6	– Root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) of <i>Canavalia</i> lectins in relation to Cvill	87
Table 7	– Full nomenclature and scores (PLP.Fitness) of the glycans tested in the molecular docking experiments	92

LIST OF ABBREVIATIONS

Arg	Arginine
Asn	Asparagine
Asp	Aspartic acid
ATG	Autophagy Related Genes
Bak	Bcl-2 homologous antagonist protein
Bax	Protein X associated with Bcl-2
Bcl-2	Apoptosis Regulating Protein 2 of the B-cell Lymphoma Family
BCL-XL	Apoptosis Regulating Protein XL of the B-cell Lymphoma Family
CaBo	<i>Canavalia bonariensis</i> lectin
CBol	<i>Canavalia boliviana</i> lectin
CD95	Receptor of the TNFR family
CFL	<i>Cratylia floribunda</i> lectin
CGL	<i>Canavalia gladiata</i> lectin
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i> lectin
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i> lectin
ConC	<i>Canavalia cathartica</i> lectin
ConGF	<i>Canavalia grandiflora</i> lectin
ConL	<i>Canavalia lineata</i> lectin
ConM	<i>Canavalia maritima</i> lectin
ConV	<i>Canavalia virosa</i> lectin
CPL	<i>Camptosema pedicellum</i> lectin
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
Cvill	<i>Canavalia villosa</i> lectin
CY5	Cyanine5
CDG	Congenital Disorders of Glycosylation
DGL	<i>Dioclea grandiflora</i> lectin
Dgui	<i>Dioclea guianensis</i> lectin
DISC	Death Induction Signaling Complex
DLL	<i>Dioclea lasiocarpa</i> lectin
Dlyl	<i>Dioclea lasiophylla</i> lectin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DrfL	<i>Dioclea reflexa</i> lectin
DRL	<i>Dioclea rostrata</i> lectin
DSL	<i>Dioclea sclerocarpa</i> lectin
Dvir	<i>Dioclea virgata</i> lectin
DVL	<i>Dioclea violacea</i> lectin
FADD	Fas Associated protein
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetyl-Galactosamine
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamine
Gln	Glutamine
Glu	Glutamic acid
Gly	Glycine
H2DCFDA	2,7-Dichlorofluorescein diacetate
HeLA	Cervical Cancer Cell Line
His	Histidine
HPA	<i>Helix pomatia</i> lectin
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HS	Hydrophobic Site
IC50	Half maximal Inhibitory Concentration
LB	Luria Bertani culture medium
LC3	Microtubule-Associated Protein Light Chain
LCA	<i>Lens culinaris</i> lectin
Leu	Leucine
Lys	Lysine
Man	Mannose
MBS	Metal Binding Site
Met	Methionine

MMA	α -methyl-mannoside
PBS	Sodium Phosphate Buffer
PEG	Polyethylene glycol
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i> lectin
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> lectin
PSA	<i>Pisum sativum</i> lectin
PUMA	P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
qPCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
RIP	Ribosome Inactivating Protein
ROS	Reactive Oxygen Species
SBA	<i>Glycine max</i> lectin
Ser	Serine
Thr	Threonine
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptors
TRITC	Tetra-methyl-rhodamine isothiocyanate
TxLCI	Tulip bulb lectin
Tyr	Tyrosine
VCA	<i>Viscum album</i> lectin
α mm	α -methyl-mannoside

TABLE OF CONTENTS

1	INTRODUCTION	21
2	THEORETICAL FRAMEWORK	23
2.1	Glycobiology	23
2.2	Lectins	29
2.2.1	<i>Brief history</i>	29
2.2.2	<i>Lectin classification</i>	32
2.2.2.1	<i>Classification according to carbohydrate affinities</i>	32
2.2.2.2	<i>Classification according to structural organization</i>	33
2.2.3	<i>Plant lectins</i>	34
2.2.4	<i>Legume lectins</i>	36
2.2.5	<i>Diocleinae lectins</i>	37
2.2.5.1	<i>Tertiary structure of Diocleinae lectins</i>	40
2.2.5.2	<i>Biological activities and commercial applications of Diocleinae lectins</i>	42
2.2.5.3	<i>Diocleinae lectins and cancer</i>	44
2.2.5.4	<i>HeLa cell research</i>	48
2.2.6	<i>Canavalia villosa lectin</i>	49
3	OBJECTIVES	51
3.1	Main objective	51
3.2	Specific objectives	51
4	METHODOLOGY	52
4.1	Lectin Isolation	52
4.2	Determination of Cvill primary structure	52
4.2.1	<i>Mass spectrometry sequencing</i>	52
4.2.2	<i>DNA purification from C. villosa seeds</i>	53
4.2.3	<i>Amplification, cloning and sequencing of the lectin gene</i>	53
4.2.4	<i>Sanger Sequencing</i>	54
4.3	Phylogenetic analysis	55
4.4	Resolution of Cvill three-dimensional structure	56
4.4.1	<i>Crystallization of Cvill</i>	56
4.4.2	<i>Crystal diffraction</i>	57
4.4.3	<i>Resolution of three-dimensional structure</i>	58
4.5	Carbohydrate Interaction Analysis	58

4.5.1	<i>Glycan array</i>	59
4.5.2	<i>Molecular Docking</i>	59
4.6	Evaluation of Cvill activity in HeLa cells.....	60
4.6.1	<i>Cytotoxicity of Cvill in HeLa cells</i>	60
4.6.2	<i>ROS production evaluation</i>	61
4.6.3	<i>Analysis of Caspases activity</i>	62
4.6.4	<i>qPCR analysis</i>	62
4.7	Study of Cvill subcellular addressing by confocal microscopy	64
4.8	Statistical analysis	65
5	RESULTS AND DISCUSSIONS	66
5.1	<i>Canavalia villosa</i> lectin sequence	66
5.2	Elucidation of Cvill's three-dimensional structure	74
5.3	Carbohydrate Interaction Assays	87
4.3.1	<i>Glycan array</i>	87
4.3.5	<i>Molecular Docking</i>	91
5.4	Biological activities.....	97
5.4.1	<i>Cytotoxicity in HeLa cells</i>	97
5.4.2	<i>Production of reactive oxygen species</i>	101
5.4.3	<i>Caspase activity</i>	103
5.4.4	<i>Analysis of gene expression in Cvill-treated HeLa cells</i>	106
5.5	Analysis of Cvill internalization by confocal microscopy.....	111
6	CONCLUSION	115
	REFERENCES	116
	APPENDIX A - CURRICULUM VITAE	141

1 INTRODUCTION

The glycosylation pattern of membrane proteins conveys a lot of information about the physiological state in which a particular cell may find itself. Cells use carbohydrates to encode messages related to informational functions such as signaling, communication between cells, tissue development, cell cohesion, mitosis, apoptosis, among others. Thus, the functions that saccharides can present go far beyond the energetic and structural attributions that are usually cited (WIEDERSCHAIN, 2013). The ability of glycans to encode information is derived from the extensive structural variety that these molecules can present. Unlike nucleic acids and proteins, which are linear polymers, monosaccharides can build different glycosidic bonds with each other to form complex, branched carbohydrates. In addition, carbohydrates can also vary in their three-dimensional structures due to the presence of isomers. In this context, the study of carbohydrates and their functions through glycobiology is of great importance to elucidate how these molecules act in the transmission of different messages in tissues, since it is already widespread in the literature that modified glycosylation patterns in glycoproteins can indicate pathologies such as cancer (DENNIS; GRANOVSKY; WARREN, 1999).

Molecules that are capable of deciphering the glycode, such as lectins, are, therefore, of great value in glycobiology studies (AMBROSI et al., 2005). Lectins are proteins that recognize and bind carbohydrates in a specific and reversible manner (SHARON; LIS, 2007; TSANEVA; VAN DAMME, 2020) Lectins are also ubiquitous, and have been found in every model of life studied so far. They play different intrinsic roles in their organisms of origin.

In animals, lectins act mainly by interacting with endogenous glycoconjugates such as in cell adhesion and signaling processes; white cell diapedesis through the endothelium to inflamed sites; uptake, recycling and degradation of glycoproteins by the liver; presentation of antigens to the immune system; modulation of T cell activation, and apoptosis (SHARON; LIS, 2004; WIEDERSCHAIN, 2013).

In plants, the interaction with carbohydrates is generally directed towards exogenous sugars, causing lectins to act usually as defense molecules or insecticides, in the control of homeostasis, in plant symbiosis with nitrifying bacteria, and in abiotic stress (AL ATALAH et al., 2011; MACEDO et al., 2007; OHIZUMI et al., 2009; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Due to lectin's refined ability to interact with specific carbohydrates, these proteins, which are isolated from highly diverse sources, are indispensable tools widely used in glycoproteomic studies (HIRABAYASHI, 2004), as inputs in tumor recognition (SOUSA et al.,

2016), and as molecules with anti-HIV activity (MOLCHANOVA et al., 2007; WONG; NG, 2005). Lectins are also already marketed as columns that reduce the viral load of Hepatitis C patients (TULLIS et al., 2009) and as a vaginal ointment that prevents infections against the HIV virus (BEAMAN et al., 1996). Additionally, the use of lectins in biochemistry and glycobiology research has increased significantly as these molecules can be used in the construction of microarrays (HU; WONG, 2009), affinity chromatography columns and blotting methodologies (DAN; LIU; NG, 2016).

Thus, considering the valuable applications that lectins can have in several biological models, this thesis was developed based on a project that included the isolation, characterization and studies of biological activities of a plant lectin, from the legume family, named *Canavalia villosa*. The work was the result of a collaboration among BioMol-Lab (Federal University of Ceará, Brazil) coordinated by prof. Dr Benildo Sousa Cavada and prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento, and the Laboratory of Biochemistry and Glycobiology (University of Gent, Belgium) coordinated by prof. Dr. Els Van Damme.

2 THEORETICAL FRAMEWORK

2.1 Glycobiology

Carbohydrates, also known as sugars, glycans or hydrates of carbon, are biomolecules consisting mainly of carbon, oxygen and hydrogen, which have the empirical formula $(\text{CH}_2\text{O})_n$, and which contain aldehyde or ketone functional groups in their structure, also presenting two or more hydroxyls per molecule. Sugars are known for their sweet taste and are responsible for a large part of the caloric intake of human diet around the world. Starch, for example, is a reduced carbohydrate, rich in calories, which is often used in nourishment, and is found in breads, pastas and cakes. Cellulose and chitin are structural carbohydrate polymers and are the most abundant biological compounds on the planet. Carbohydrates play diverse and essential roles in cell metabolism, and glycobiology is the science that studies and characterizes the different aspects of these biomolecules (GABIUS, 2018; NELSON; COX, 2018).

The simplest types of carbohydrates, monosaccharides, are the building blocks of polymers such as starch, cellulose, and glycogen. The simplest monosaccharides are trioses, such as glyceraldehyde, which is a compound made of just three carbons. Monosaccharides of five carbons (pentoses) or more (hexoses onwards) tend to cyclize when in aqueous solution, forming pyranoses (when the ring formed is composed of six atoms) or furanoses (when it is composed of five) (NELSON; COX, 2018).

With the exception of dihydroxyacetone, all monosaccharides have chiral centers in their structures, making them optically active molecules. The different stereoisomeric configurations that carbohydrates can present are one of the reasons why we can find a great variety of carbohydrate structures in nature. Monosaccharides can be classified according to their stereoisomerism based on the D and L nomenclature used to differentiate the two stereoisomers of glyceraldehyde. Two distinct stereoisomers present different three-dimensional structures, thereby, interactions that involve the molecular topology, for instance the binding of a ligand to its receptor, or the interaction between an enzyme and its substrate may result in different outcomes depending on which stereoisomer is involved in the process. (NELSON; COX, 2018; YANG et al., 2019; YURIEV; RAMSLAND, 2012).

Monosaccharides are also divided into two families, aldoses, which have an aldehyde group in their structure, such as glucose, and ketoses, which have a ketone in their structures, such as fructose. The formation of rings in monosaccharides in aqueous solutions involves a reaction between a hydroxyl group of the monosaccharide and its carbonyl group.

This reaction results in the formation of a hemiacetal, in the case of aldose-type monosaccharides, or a hemiketal, in the case of ketoses. Cyclic forms of monosaccharides can also generate two types of anomers, which are called α - or β -, depending on the configuration of the anomeric carbon at the moment the cycle is closed (ERNST; HART; SINAÏ, 2008; NELSON; COX, 2018).

Modifications in monosaccharides such as additions or substitutions of hydroxyls by other groups are also quite common in nature. N-acetylglucosamine is an example of a pyranose with a hydroxyl at C2 replaced by an amide derivative. This hexose is always found on the base of N-glycans, functioning as a bridge between the asparagine residue and the rest of the glycan. Other important hexoses such as L-fucose and N-acetylneuraminic acid (sialic acid) are also derived from other simpler pyranoses (NELSON; COX, 2018).

Two monosaccharides can be linked together by a covalent bond called glycosidic bond. This bonding involves the anomeric carbon of one monosaccharide with one of the hydroxyls of the other. The product of this reaction is called disaccharide and involves the formation of an acetal or ketal group (MIN; DUNN; JONES, 1992). Disaccharides such as sucrose, galactose and fructose are found in several widely consumed foods such as sugar cane, milk, and fruits. Disaccharides fall into a category called oligosaccharides, which encompasses glycans composed from 2 to 20 monosaccharides units. Polymers that are constructed with more than 20 monosaccharide units fall into the polysaccharide category (NELSON; COX, 2018).

Carbohydrate polymers can play a role in providing and storing energy for cells. The construction of reserve polymers takes place when the availability of sugars exceeds the amount used for cell respiration and precursor synthesis. Starch is an example of a branched glucose homopolymer widely used as an energy reserve by plants. In animal cells, the preferred storage carbohydrate is glycogen, which is also a glucose homopolymer with the same types of bonds between the monomers, but that differs from starch as it is more branched. Storing fuel in the form of polymers rather than monomers is advantageous as polymer molecules do not contribute to increasing the osmotic pressure within the cell in the way that the same mass in monosaccharides would contribute (WIEDERSCHAIN, 2013).

Carbohydrates also present structural functions, such as chitin involved in the formation of the arthropod exoskeleton. Chitin is an impermeable unbranched polysaccharide formed by N-acetyl-glucosamine monomers joined by $\beta(1-4)$ bonds. Another structural polysaccharide widely found in nature is cellulose. As fundamental component of the plant cell wall, cellulose consists of glucose monomers interconnected by $\beta(1-4)$ bonds. Due to the character of these bonds, cellulose cannot be digested by enzymes that cleave starch and

glycogen, and therefore cannot be digested to monosaccharides by humans or vertebrates (ERNST; HART; SINAÏ, 2008; NELSON; COX, 2018).

In addition to the structural and energetic functions previously discussed, carbohydrates also present informational functions. Glycans can be responsible for transmitting information in cellular processes that range from determining blood type groups to encoding complex events such as apoptosis. To understand how cells use these molecules to encode such varied type of information, it is important to remember that carbohydrates can present great structural complexity due to the combination of several factors in the construction of their polymers and oligomers, such as sequence and content of monosaccharides, modifications and substitutions of groups on the rings, and ring size. Furthermore, unlike nucleic acids and proteins, which are linear polymers, monosaccharides can form glycosidic bonds at more than one point on the saccharide ring, forming branched chains, and significantly increasing the number of possible structures to be built for the same set of monomers. This complexity is further increased due to the existence of different isomers that can exist for a monosaccharide. Due to this wide variety of structures that can be formed, carbohydrates become key molecules that can be used to encode different messages (GABIUS; ROTH, 2017). Thus, the encoding of biological messages in the compact and three-dimensional structure of carbohydrates is called glycode, and allows great sharing of information in the limited space of the cell membrane surface (GABIUS, 2018).

The glycode is widely used by cells to encode highly specific and efficient messages in several cellular processes, such as interaction and adhesion between cells, biological signaling, blood coagulation, immune response, leukocyte recruitment in inflammation, tissue development, hormone reception, fertilization, embryogenesis, adhesion of infectious agents to host cells, and metastasis (WIEDERSCHAIN, 2013).

These informational functions are often performed by glycans that are covalently associated with proteins or lipids, forming glycoconjugates. Protein glycosylation is a post-translational modification that occurs when, through the activity of enzymes such as glycosyltransferases and glycosidases, monosaccharide residues are added at specific protein sites, being called N-glycans when the addition occurs on the nitrogen atom of the side chain of an asparagine residue included in the sequon Asn-X-Ser/Thr (where X can be any amino acid except proline) and O-glycans when conjugation with sugar is done at the oxygen atom of serine or threonine (GABIUS et al., 2011). The saccharide moiety of glycoproteins can label proteins for degradation as well as proteolysis protection. It can also function as addressing tags besides helping with solubilization and stabilization of the mature protein (KATTLA et al., 2011a).

Similar to glycoproteins, glycosylated lipids are also structurally diverse and are often involved with signaling, recognition and cell adhesion functions, so that changes in the glycosylation patterns of these glycolipids are often associated with neurological and autoimmune diseases (KOPITZ, 2017). Cells from different tissues have different glycosylation patterns in their glycoproteins and glycolipids, and cells from the same tissue can also have glycans modified under different physiological conditions of that same tissue (WIEDERSCHAIN, 2013). This variant glycosylation pattern would therefore be responsible for encoding different messages, which would be inherent to the physiological condition and current metabolism of the cell.

Due to the amphipathic character of glycoproteins and sphingolipids, it is possible to find these molecules working as components of cell membranes, including the plasma membrane, organelle membranes and even the nucleus membrane. These glycoconjugates are responsible for reproducing signals and triggering cellular processes. The carbohydrate moiety of these complex molecules can be located either on the outer face of the plasma membrane or inside organelles. When located on the outer face of the cell membrane, they are the main constituents of the glycocalyx (WIEDERSCHAIN, 2013).

The glycocalyx is a layer densely populated by proteins and glycans, which is located on the outer surface of cells and is responsible for the adhesion and communication between cells, diffusion of membrane receptors, and mechanical protection against pathogens (KUO et al., 2018). This coating structure is characterized by its rich saccharide content, and is found in several cell types, from bacteria (which are part of the cell wall) to eukaryotic cells, as an extension of the plasma membrane. In animal cells, the glycocalyx is rich, complex and has the extensive presence of glycosaminoglycans, which provide an overall negative net charge to the membrane (GABIUS et al., 2011). Carbohydrates and glycoconjugates can also be secreted and exert their informational functions in biological fluids such as extracellular matrix, saliva and blood. Luteinizing hormones and thyrotropin, for example, are glycoproteins that are recognized through their carbohydrate portions by lectin-type receptors in hepatocytes and removed from the bloodstream. This process regulates the concentration and stimulatory effect of these hormones in the system (CAHOREAU; KLETT; COMBARNOUS, 2015).

The recognition and informational functions of glycocalyx is widely used by pathogens during infectious processes, such as those that occur by influenza virus types A and B, contamination by the bacteria *Vibrio cholera*, *Clostridium botulinum* and *Helicobacter pylori*, and infection by the protozoan *Plasmodium falciparum*. In all of these cases, cell recognition and subsequent infection occur after binding of these pathogens to sialylated carbohydrates. In addition, more than half of known cell receptors are glycoconjugates that

specifically and selectively bind to their corresponding ligands. The insulin receptor on liver cells and adipocytes is an example of these glycoprotein receptors (UEMATSU et al., 2012; WIEDERSCHAIN, 2013). Overall, glycosylations provide proteins with more message-coding possibilities than the widely known post-translational modifications of phosphorylation, acetylation, and sulfation (GABIUS et al., 2011).

Glycobiology is the science that studies the great variety of glycans that are present in cells, including their functions, structures and metabolism, besides the highly specific biochemical and physicochemical processes that involve these biomolecules (MUNRO, 2000; WIEDERSCHAIN, 2013). Diseases related to defects in carbohydrate metabolism and the consequences that they bring to the body are also targets of glycobiology studies, which leads some researchers to believe that the term glycomedicine is more appropriate to address this type of subject in the current context of research and development (WIEDERSCHAIN, 2013).

Several genetic disorders are known to cause defects in carbohydrate metabolism. The so-called Congenital Glycosylation Disorders (DCG) are deficiencies in the glycosylation of lipids and proteins caused by mutations in genes of enzymes involved with biosynthetic pathways of glycoconjugates, triggering the emergence of several syndromes. The development of powerful gene sequencing techniques has accelerated the identification of these mutations and allowed the assumption of causality between these defective genes and the clinical phenotypes of DCG. In 2015, the number of 100 genetic defects cataloged and described as of causing DCG was reached (HENNET; CABALZAR, 2015). The discovery and in-depth study of these pathologies helped to bring knowledge about the function of glycans as informational molecules that have important roles in the metabolism of cells and tissues (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). Disorders in carbohydrate metabolism are also present in diseases such as diabetes, Alzheimer's, deficiencies in the coagulation cascade and muscular dystrophies (WIEDERSCHAIN, 2013; ZHANG et al., 2020).

In malignant tumors, significant modifications are also observed in the spectrum of tissue glycoconjugates and in the activity of enzymes responsible for the biosynthesis or degradation of these macromolecules (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Tumor cells tend to have a thicker glycocalyx due to increased production of glycans such as mucins, hyaluronic acid and polysialic acids. This thickening hinders receptor-ligand interactions between the cancer cells and other tissue cells or other extracellular matrix molecules, which can result in loss of adhesion and metastasis. Even the net charge density of the glycocalyx of cancer cells is different from that of healthy cells, being positively

charged, due to the more acidic pH that cancer cells tend to present in their surroundings (KUO et al., 2018).

Some changes in glycosylation patterns are detectable early in cancer development, progressing according to tumor growth (PEIXOTO et al., 2019). These altered glycosylation patterns can be used as molecular biomarkers for early cancer diagnosis. Biomarkers are molecules whose appearance characterizes a certain physiological state of a cell or tissue, which makes them important tools for disease diagnosis (TANIGUCHI; KIZUKA, 2015). In order to be used as a biomarker, a molecule must have high specificity and sensitivity in diagnostic tests, for the purpose of avoiding false positive and false negative results, which makes the identification of new biomarkers an extremely diligent process. The research and identification of biomarkers for cancer is of great importance because, in addition to helping to monitor the progression of patients' treatment, it would allow a premature initial diagnosis of high-risk cancers and the early initiation of therapies, which would result in higher rates of patient survival and recovery (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017).

Some biomarkers approved by the Food and Drug Administration (FDA) for use in cancer monitoring and diagnosing are the CA 125 antigen of ovarian cancer and the CA 15-3 present in breast cancer. These biomarkers are glycoproteins already well studied and documented. The discovery of glyco-biomarkers, however, is more laborious than the finding of protein or gene biomarkers, since carbohydrates have a greater structural variety and since the current techniques for characterization of glycans still have big limitations when compared to sequencing techniques of proteins and genes (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017).

In this context, finding molecules that are able to decipher the glycode and to select specific glycans by binding them is of extreme importance to biochemical and cancer research and to the field of glycobiology. Among the carbohydrate-binding molecules, lectins stand out as they are proteins that specifically bind carbohydrates and thus manage to efficiently decipher/translate the glycode. Lectins, from the Latin *legere*, which means to select, are defined as (glyco)proteins capable of binding to mono- or oligosaccharides in a highly specific and reversible way, without presenting catalytic action in their carbohydrate-binding domain (GABIUS et al., 2011; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). These proteins are widely distributed in nature and are present in various living beings, with reports of their presence ranging from simple microorganisms such as fungi, bacteria and viruses to complex organisms such as plants and animals (SHARON; LIS, 2004).

Since the early 80's, the interaction of lectins with cancer glycans has been observed as shows the report of the binding of *Helix pomatia* lectin (HPA) to breast cancer metastatic

cells (LEATHEM; DOKAL; ATKINS, 1983). It has also been noticed that several other lectins have similar activities to HPA, as they display fine selectivity towards tumor cells. Some of these lectins even bind cancer cells without triggering cytotoxicity in healthy cells, as observed with *Viscum album* lectin (VCA) (LYU; PARK, 2007), ConA from *Canavalia ensiformis* (LEI; CHANG, 2007), and ConBr from *Canavalia brasiliensis* (SILVA et al., 2014b), among others (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Thus, the use of lectins can facilitate the discovery of new biomarkers from saccharide origin because some of these proteins are able to select and bind exclusively to cancer-specific antigens, making the isolation and study of molecular markers more practical and fast (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017; OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Considering all the activities that these proteins can have, a more in-depth bibliographic review about lectins will be presented below.

2.2 Lectins

Lectins were initially called hemagglutinins by Elfstrand in 1898 due to the capacity of these molecules to agglutinate erythrocytes (ELFSTRAND, 1898). This property of lectins comes from the fact that these proteins usually present two or more carbohydrate-binding domains, being, therefore, di- or polyvalent. Hemagglutination occurs as a result of the interaction of lectins with glycoproteins from erythrocyte membranes, forming a kind of network between lectins and cells, resulting in the agglutination that can be observed at macroscopic level (LIS; SHARON, 1998). In 1954 Boyd and Shapleigh coined the term lectin based on the latin meaning of the word to refer to those proteins that selectively bind to antigens of blood groups from the ABO system (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). This term is still used today to refer to these molecules. Next, a brief analysis of the history of lectin will be given, as well as a description of interesting facts about notable lectins.

2.2.1 Brief history

The first works of detection and isolation of lectins date back to more than 130 years ago (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), with the pioneering work of Stillmark, who in 1888, during his doctoral thesis research, identified that the toxin of *Ricinus communis* (ricin), was of protein origin, caused agglutination in erythrocytes and precipitated blood serum proteins (STILLMARK, 1888). Ricin is an extremely toxic ribosome-inactivating protein (RIP)

that has been used in bioterrorism activities, such as a few that occurred during the two world wars (OLSNES, 2004) and in intercepts of letters addressed to the president of the United States in 2013 (PAYNE; SMITH; CRATTY, 2013). Abrin is another RIP from *Abrus precatorius* seeds whose identification and characterization date back to 1891, shortly after those of ricin (HELLIN, 1891). Due to the high toxicity of these lectins, both were also extremely important in the development of immunology as a science, as shown by the work of Ehrlich, who reported that rats injected with these toxins at low doses and subcutaneously developed immunity to their toxic action (EHRLICH, 1891). Years later, Ehrlich would receive the Nobel Prize for Medicine in 1908 for the various works developed in the field of immunology (POLITO et al., 2019). RIPS from *R. communis* (Euphorbiaceae family) and *A. precatorius* (Fabaceae family) are chimerolectins, and therefore have two domains with distinct functions, one with the ribosomal inactivation action, which triggers toxicity, and another with carbohydrate binding properties (HUNG et al., 1993; OLSNES; KOZLOV, 2001).

More works on the isolation of new lectins were only effectively developed around 30 years later, when Sumner purified the lectin from *Canavalia ensiformis* (ConA) through crystallization of globulin fractions by ammonium sulfate semi-saturation (SUMNER, 1919). Sumner won the Nobel Prize years later, in 1947, for his work developed in 1926, that involved the crystallization of urease enzyme (SUMNER, 1926). ConA is a lectin that does not have ribosome inactivating activity, as previously isolated ricin and abrin, but has an affinity for mannose and glucose. ConA is one of the most famous and best studied plant lectin. Lectins from the same subtribe as *C. ensiformis*, the Diocleinae subtribe, are called ConA-like. This protein was a pioneer in studies of physicochemical and structural characterization of lectins, and its biological activities has already been tested in the most diverse models. ConA has interesting antineoplastic (LI et al., 2011), antitumor (SHI et al., 2014), edematogenic (BENTO et al., 1993), and vasodilator (ASSREUY et al., 2009) properties, among others (CAVADA et al., 2019b). Because ConA was isolated over 100 years ago, and has been extensively characterized and tested over the years, it is widely used as a standard for comparison when evaluating the properties of newly isolated lectins from the same tribe and family or even from different clades.

During the 1950s, most of the work developed with lectins involved hemagglutination tests with different extracts of legume seeds. In those, the activity was evaluated in erythrocytes from different animal species or with erythrocytes from humans of different blood types. It was observed that many of these seed extracts had specificity towards only some certain blood types (SHARON; LIS, 2004). Thus, studies of inhibition of lectin

activities by simple sugars, together with the selective results of erythrocyte agglutination, provided clues as to what would be the likely constitution of red blood cell membrane glycans in the human ABO blood system (MORGAN; WATKINS, 2000).

The amount of work involving the isolation of new lectins other than ConA grew considerably only after the 60s with the improvement of affinity chromatography techniques (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965). In addition to that, more attention was also been paid to studies of lectin interactions due to the mitogenic actions presented by the lectin from *Phaseolus vulgaris* (PHA) and ConA. The focus on lectin research became, thus, the cellular mechanisms triggered from the interactions of lectins with cell membrane glycans and the selectivity that some lectins presented to cancer cells (SHARON; LIS, 2004).

In the 70s and 80s, other clades within legume family also started being explored in search of new lectins. In the subfamily of Caesalpinioideae, lectins from the species of *Griffonia simplicifolia* (MURPHY; GOLDSTEIN, 1977) and *Bauhinia purpurea* (YOUNG; WATSON; WILLIAMS, 1985) were prospected and isolated. Extracts from several seeds of the *Acacia* genus from the Mimosoideae subfamily also gave positive results for lectin activity (HAPNER; JERMYN, 1981). Within the Viciae tribe, the lectins from *Lathyrus ochrus* isolated in 1984 (ROUGE; SOUSA-CAVADA, 1984), *Lens culinaris*, isolated in 1969 (HOWARD; SAGE, 1969), *Vicia cracca*, in 1980 (KARHI; GAHMBERG, 1980) and *Vicia sativa* isolated in 1979 (FALASCA et al., 1979) stand out. The first works involving identification and purification of lectins from animals and fungi also took place during this period (BORREBAECK; MATTIASON; NORDBRING-HERTZ, 1984; KILPATRICK, 2002).

It was also during the 1970s, with the improvement of Edman's degradation techniques, that the complete amino acid sequence of a lectin was determined for the first time. The ConA sequence was determined by protein digestion with cyanogen bromide and Edman sequencing (WANG et al., 1975). Since then, with the advent of mass spectrometry and genome sequencing techniques, more primary structures have been solved over the years. With information on the amino acid sequence of lectins, alignment and structure prediction studies can be performed, bringing important information about the phylogeny of these proteins.

The three-dimensional structure of ConA was solved concomitantly with the primary structure, making this lectin also the first to have its tertiary structure solved by macromolecule crystallography (BECKER et al., 1975). Since then, dozens of new structures have been resolved by X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance and cryo-microscopy techniques every year. Currently there are more than 2300 structures of 564 different lectins deposited in the PDB (UNILECTIN, 2021).

Lectins are important inputs in glycobiology studies, and have several biotechnological applications in the areas of health and agriculture (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Lectins are also quite diverse, with different carbohydrate affinities, different structural profiles, and different origins. In the following topic, lectin classification according to some of their properties will be discussed.

2.2.2 Lectin classification

Lectins can be classified according to their biochemical and structural properties, function, also according to the organisms of origin and by the type of carbohydrate affinity they present (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). These proteins are known to be ubiquitous, having already been found in the most diverse types of organisms, including fungi, bacteria, viruses, plants, invertebrate animals, vertebrate animals and protists. In these organisms, they play different intrinsic roles, and may also present great differences in their structural, biochemical and carbohydrate-binding properties (SHARON; LIS, 2007). Assuming this, sometimes it becomes difficult to group lectins so different within the same classification, and for this work, we will focus on plant lectins, without, however, completely disregarding lectins from other kingdoms. Next, we will discuss a little more about the categories of these proteins according to their affinities to carbohydrates and the organization of their structures.

2.2.2.1 Classification according to carbohydrate affinities

Considering the affinity that lectins can present to monosaccharides, these proteins can be divided into five groups, namely those that bind to mannose, galactose/N-acetyl-galactosamine, N-acetyl-glucosamine, fucose, and N-acetylneuraminic acid. Interestingly, these are the sugars that are most commonly found in mammalian membrane glycoconjugates (SHARON; LIS, 2007). Within the Plantae kingdom alone, there have been isolated enough lectins to fit all of these binding categories (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). In the legume family, lectins with affinity to mannose, glucose and their derivatives stand out due to the large number of ConA-like lectins isolated. Different lectins with the same affinity profile will not necessarily trigger the same responses in biological activities or show the same fine specificity to sugars in glycan array and docking experiments, despite the high similarity that can be found among legume lectin sequences (CAVADA et al., 2019b). In general, lectins interact more

weakly with monosaccharides, showing stronger interactions with oligosaccharides and polysaccharides (SHARON; LIS, 2007).

2.2.2.2 Classification according to structural organization

In addition to the classification described above, another possibility of lectin categorization is related to the capacity that these proteins may have to agglutinate cells and/or precipitate glycoconjugates. This classification is based on the structure of the mature lectin, and groups these molecules into the four classes described below: merolectins, hololectins, chimerolectins and superlectins (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Merolectins have a single carbohydrate binding site in their structure. Protomers of this type of lectin do not oligomerize, and because of that, they are considered monovalent, and cannot agglutinate cells or precipitate glycoconjugates (CAVADA et al., 2001). Because merolectins are not able to cause hemagglutination in erythrocytes, the first definition of lectins, which portrayed them exclusively as “agglutination-causing proteins” (ELFSTRAND, 1898) becomes in fact false, since merolectins are still considered lectins regardless of not causing agglutination. The most famous example of a merolectin is that of hevein, a small monomeric chitin-binding protein isolated from the latex of *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991).

Hololectins, unlike merolectins, have at least two carbohydrate recognition domains in their structure, which are necessarily identical to each other or very similar in structure, what results in this type of lectin having affinity towards a single group of carbohydrate, despite of multiple binding sites. As they are di- or multivalent proteins, they are capable of causing cell agglutination. Most lectins from isolated plants, such as ConA and PHA, belong to this group of hemagglutinins (CAVADA et al., 2001).

Chimerolectins present in their structures at least one carbohydrate recognition domain and another site with a different activity occurring concomitantly. The non-lectin site may have an enzymatic or another biological function, and must necessarily be able to perform its activity regardless of the CRD. Depending on the number of sugar-binding units, chimerolectins may exhibit a behavior similar to that of merolectins or hololectins (VAN DAMME et al., 1998). Type 2 RIPs are examples of chimerolectins, which have a carbohydrate recognition domain and another site with nuclease activity (FERRIZ-MARTINEZ et al., 2010). *Parkia platycephala* lectin is also a chimerolectin with chitinase activity and affinity to glucose/mannose saccharides (MANN et al., 2001).

Superlectins have at least two carbohydrate-binding domains, which must recognize structurally distinct sugars. Superlectins differ from hololectins because the latter are capable of recognizing only one type of sugar (CAVADA et al., 2001). Some authors, however, may consider superlectins as a sub-group of chimerolectins (ITAKURA et al., 2017). As an example of superlectin, we can mention TxLCI, extracted from tulip bulbs and which has an affinity for mannose and N-acetyl-galactosamine (VAN DAMME et al., 1996).

2.2.3 Plant lectins

Studies involving the identification and isolation of lectins have been reported since the late 1900's and thus far lectins have been identified in all forms of life ranging from simple bacteria to complex organisms, such as animals and plants (SHARON; LIS, 2007). Lectins from plants and animals are a group of proteins extensively studied, with a large amount of structural information deposited in protein databases. Animal lectins present great sequence variety and can be grouped, according to Kilpatrick, in twelve families that present similarities in the architecture of their structures (KILPATRICK, 2002; LOH et al., 2017). Plants lectins are also divided into twelve families (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), which will be discussed in more details later. Lectins from plants and animals with non-homologous origins and unrelated sequences may present similar tertiary structures such as the beta-sandwich fold that can be found in both vertebrate galectins and in legume lectins (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; LORIS, 2002). Usually, the existence of common motifs in lectins from groups that are highly unrelated is the result of convergent evolution (LOH et al., 2017; LORIS, 2002).

Although there is less information on lectin sequences from microorganisms and fungi deposited in databases, the evidence for homology between those proteins and plants lectins can be traced back a long time, since studies have reported evolutionarily related ricin subdomains in both fungal and plant lectins (CANDY et al., 2001, 2003). Conserved homologous domains are also present in bacteria, algae and higher plant lectins (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Lectins from algae present interesting biological activities and usually are low-molecular weight monomeric proteins which present thermostable carbohydrate binding properties due to the presence of disulfide linkages (SINGH; THAKUR; BANSAL, 2015). Plant and animal lectins also present relevant biotechnological applications and are known for being structurally diverse. Those lectins are grouped in several lectin families which can fulfill

a variety of innate functions in the organism of origin, usually with plant lectins being involved in growth and defense mechanisms while animal lectins are responsible for recognition and cell communication processes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; WIEDERSCHAIN, 2013).

Due to the pioneering work which was first developed with plant lectins, this group of proteins were, hence, the main focus of lectinology research of several groups for a long time. The interesting biological applications that these molecules present, and the relative ease with which these lectins could be purified in reasonable quantities also contributed to the high interest of research groups in those proteins. As a result, the amino acid sequences of these lectins were solved much faster than the sequence of any other group of plant proteins (SHARON, 2007; VAN DAMME et al., 1998) There are currently 2332 deposits of lectin tertiary structures in PDB database, accounting for 308 species. Most of these species with solved lectins, totaling 98, are from plants. (BONNARDEL et al., 2019; UNILECTIN, 2021).

Despite the remarkable differences that plant lectins can exhibit in their three-dimensional structures, carbohydrate affinities, and biological activities, which may lead to the erroneous conclusion that they are an extensively complex and heterogeneous group of proteins; when these proteins are analyzed at molecular cloning and gene sequencing levels, it is clear that plant lectins have domains in common and that they can be subdivided into twelve evolutionarily related families, namely: the families of *Agaricus bisporus* lectins, Amaranthins, Chitin-binding lectins, Cyanovirins, EUL related lectins, GNA related lectins, Heveins, Jacalin, Legume lectins, LysM lectins, Nictaba related lectins and finally of Ricin-B lectins (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). The study of homology within the group of plant lectins provides valuable insights into the relationships that can be defined at evolutionary and phylogenetic levels.

Among plant lectin families, the legume group deserves particular attention due to the number of species that have had agglutinins worked on already. Most studies developed with legume lectins are made with proteins extracted mainly from seeds. The total amount of lectin that can be purified per seed varies on an average of 10% of total protein dry weight content (LORIS, 2002), which provides a good yield in high-efficiency isolation protocols, such as affinity chromatography. The amount of lectins in seeds, however, can vary greatly based on the species that are being worked with or based on the physiological conditions that the target organism is found (RUDIGER; GABIUS, 2002).

2.2.4 Legume lectins

Legume lectins are of historic relevance since part of the pioneering studies involving lectins were carried out with them. It can be said, therefore, that they helped to establish the first definitions of what lectins are (SHARON, 2008; VAN DAMME et al., 1998). Studies with ConA, a legume lectin from Diocleinae subtribe, provided the first evidence of lectin inhibition by sugars (SUMMER, J. B.; HOWELL, 1936), and ConA was also the first plant lectin to have its primary and tertiary structure solved, as previously cited (BECKER et al., 1975). Thus, it can be concluded that ConA was fundamental for both the development of lectinology as a science and for the progress of biochemistry and biophysics fields as well (VAN DAMME et al., 1998).

Legume lectins have interesting biological activities documented in the areas of biomedical research, such as the antitumor actions of PHA and ConA lectins (BLOMME et al., 2009), antimicrobial activities of *Arachis hypogaea*, ConA and *P. sativum* (PSA) lectins (ISLAM; KHAN, 2012), and ConA and PSA antiviral actions (HANSEN et al., 1989). In addition to those, legume lectins also present potential insecticidal and antifungal activities, which is of great attraction for agricultural biotechnology fields as well (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

Legume lectins are metalloproteins that present Metal Binding Sites (MBS) composed of conserved residues. Calcium and manganese ions are usually found coordinating MBS residues. Legume lectins may or may not present glycosylation in their mature structures and they generally present a single chain composed of around 250 amino acids, with an apparent molecular weight of 30 kDa on average. These lectins can undergo post-translational processing, in which glycosylation addition or protease cleavage of the protein chain into fragments can occur (RUDIGER; GABIUS, 2002; VAN DAMME et al., 1998).

About 20% of the amino acid residues that compose legume lectin sequences are invariant. In addition to that, another 20% of residues are often quite similar within lectins from this family. Amino acids residues involved with the CRD or MBS are usually conserved. The secondary structures of these lectins are mostly composed of beta strands and loops, with the absence or low participation of alpha helices in general (AMBROSI et al., 2005).

Legume lectin protomers generally oligomerize into dimers or tetramers. The dimerization within this family does not occur following a single pattern, and different dimer arrangements can be observed such as the canonical dimer, GS-IV-like, EcoL-like and DB58-like dimers (RUDIGER; GABIUS, 2002). The presence of lectin isoforms in seed tissues is also

very common, and their oligomerization, forming heterotetramers, has already been observed in PHA and *Robinia pseudoacacia* lectins (VAN DAMME et al., 1998).

The carbohydrate affinity profile of legume lectins is quite diverse, with this lectin family being the one with the widest range of sugar selections. There have been reports of enough isolated legume lectins to fit all groups of the following carbohydrate affinity profiles: Glc, GlcNAc, Man, Gal, GalNAc, Fuc and complex glycans (RUDIGER; GABIUS, 2002).

Considering the Diocleinae sub-tribe, it is a group of lectins from legume family, composed by hemagglutinins that have extensive sequence similarity, but varied biological activities, which makes these lectins interesting tools to study the structure-function relationship of proteins. The extensively studied ConA and ConBr belong to this group, and *Canavalia villosa*, the species targeted by this work is also a Diocleinae species.

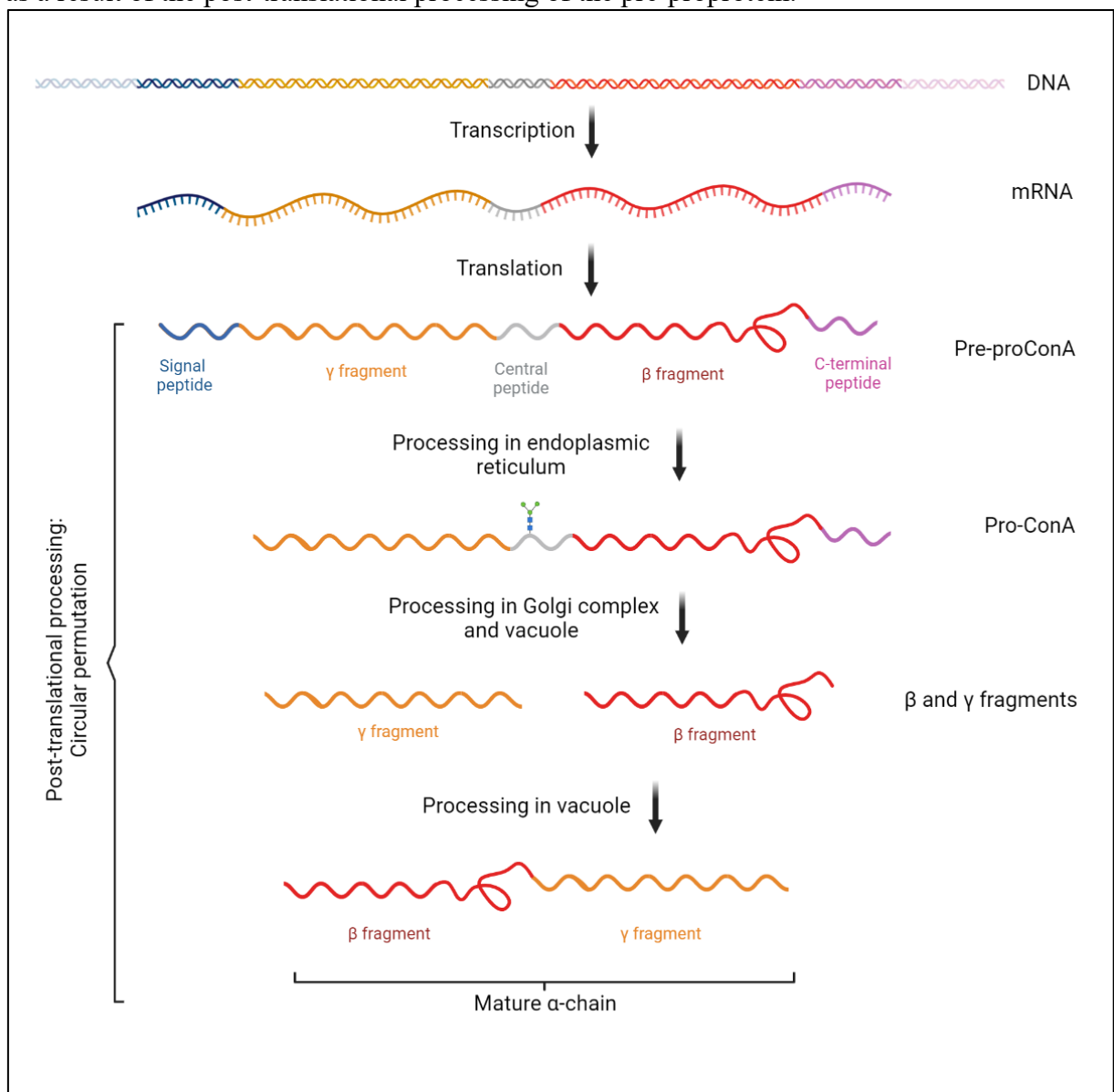
2.2.5 Diocleinae lectins

The Diocleinae subtribe is composed of 13 genera: *Camptosema*, *Canavalia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cratylia*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*, *Lackeya*, *Luzonia*, *Macropsychanthus*, *Neorudolphia* and *Rhodopis*. Among these, three (*Canavalia*, *Cratylia* and *Dioclea*) are more widely known regarding the study of lectins (CAVADA et al., 2019b). As seen above, the *Canavalia ensiformis* lectin, ConA, was the first Diocleinae agglutinin to be isolated and structurally characterized. A few years after the isolation of ConA, other Diocleinae lectins such as *Dioclea grandiflora* (DGL) isolated in 1983, (MOREIRA et al., 1983), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), in 1984 (CAVADA; MOREIRA, 1984) and *Canavalia bonariensis* (CaBo), in 1996 (CAVADA et al., 1996) began to have work developed with them. Currently, there are about 20 Diocleinae lectins isolated and with their sequences deposited in databases, all of which are metalloproteins that present physicochemical and structural similarities, with oligomerization usually dependent on pH (CAVADA et al., 2019b).

The biosynthesis and post-translational processing of lectins belonging to species of the Diocleinae subtribe is quite peculiar and was first described for ConA (BOWLES et al., 1986). ConA is synthesized as a pre-proprotein, containing a signal peptide of approximately 30 residues, whose function is to direct the pre-proprotein to the endoplasmic reticulum. Once in this organelle, this pre-proprotein is converted through a cotranslation (removal of its signal peptide), and the central peptide is glycosylated (proConA). The oligosaccharide anchored to the central portion of proConA function, in turn, is to direct the proConA to the Golgi complex, where the glycan will undergo structural modifications. Then, the pro-lectin is directed to the

vacuole where, through the action of endopeptidases and carboxypeptidases, the C-terminal and the central peptides are lost. The cleavage products are the β and γ chains, which are then re-ligated in reverse order, and processing is completed, forming the mature α chain (CAVADA et al., 2019b). This post-translational processing was called circular permutation and is exclusive to this subtribe, not occurring in other legume lectins (NONIS et al., 2021; RUDIGER; GABIUS, 2002).

Figure 1. Circular permutation of ConA-like lectins. The mature α -chain of the lectin is obtained as a result of the post-translational processing of the pre-proprotein.



Source: Created using Biorender.com.

Diocleinae lectins, also called ConA-like lectins, show affinity towards mannose, glucose and derivatives of these monosaccharides, generally without interacting with lactose,

galactose and fucose (CAVADA et al., 2019b). The interactions that these lectins perform with complex oligosaccharides and glycans are generally stronger than those with monosaccharides, this is due to the so-called "extended binding site" that involves residues in the vicinity of the CRD, which interact with other residues from the glycan, stabilizing the interaction (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). In complex N-glycans, ConA-like lectins interact with the tri-mannosidic core, as demonstrated by microcalorimetry for seven Diocleinae lectins (DAM et al., 1998; DAM; OSCARSON; BREWER, 1998) by glycan array scanning experiments (MANIMALA et al., 2006) and by molecular docking experiments (CAVADA et al., 2018; LEAL et al., 2018).

The different distribution of hydroxyl groups in the three-dimensional space in epimer carbohydrates such as glucose and galactose generate different possible interactions with the topology of the lectin CRD. At the same time, the possibility of rotation that these hydroxyls present enables the formation of directional hydrogen bonds with polar amino acid residues, such as Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, His and Lys, which are commonly found in lectin sites. Aliphatic (C–H) and nonpolar (such as methylations) portions of sugar molecules also pair up in hydrophobic and Van der Waals interactions with residues near the site. Thus, the set of these factors coordinates the possible interactions that these lectins can make, thus determining their affinity (GABIUS, 2011; GABIUS et al., 2011).

Among the most used techniques in studies of lectins and carbohydrate interactions, we can mention inhibition of hemagglutinating activity, assays involving physicochemical methods such as surface plasmon resonance (RAMOS et al., 2002) and isothermal titration microcalorimetry (DAM et al., 2000); also *in silico* methods, such as docking and molecular dynamics experiments (NASCIMENTO et al., 2017); and scanning methods such as glycan array (VAN DAMME et al., 2011). By these methods, the association constant and other kinetic, thermodynamic or relative parameters of the binding can be evaluated, thus providing highly relevant information about the nature of the binding sites and the fine affinity profile of these proteins.

Isolation protocols for these lectins generally exploit their affinity to specific ligands, most of times through protein extraction at neutral pHs and affinity chromatography to efficiently obtain pure lectins. Usually, immobilized mannose matrices or dextran polymer matrices such as Sephadex G-50 are used in ConA-like lectin purification (CAVADA et al., 2019a, 2019b).

In addition to the mannose-specific lectins found in Diocleinae seeds, it has also been reported that this subtribe may contain a second lectin, this time lactose-specific, in its

seeds. The lactose-specific lectins of Diocleinae are found in lower concentrations when compared to the ConA-like ones, and have been isolated from the species *Dioclea lehmanni* (PÉREZ, 1998), *Dioclea grandiflora* and *Canavalia ensiformis* (MELGAREJO; VEGA; PÉREZ, 2005). The discovery of these lectins, which have considerable differences in affinity and alignment with ConA-like, shows that despite the many studies already carried out, this subtribe can still be explored in terms of lectin bioprospection.

2.2.5.1 Tertiary structure of Diocleinae lectins

The study of lectin-carbohydrate interactions is important to elucidate how these proteins perform their functions. This information is mainly obtained through the resolution of the three-dimensional structure of these proteins coupled with biological activity assays. Furthermore, the use of *in silico* techniques such as molecular docking becomes a valuable strategy as well in the study of the molecular bases of oligosaccharide and glycoprotein recognition by lectins (SOUSA et al., 2016).

For the resolution of three-dimensional structures of proteins, the used most techniques are X-ray crystallography (usually using synchrotron light diffraction), nuclear magnetic resonance and cryo-electron microscopy. These techniques play a fundamental role in modern biochemistry and molecular biology (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; JONIC; VÉNIEN-BRYAN, 2009). Most of the lectin structures deposited in the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) were obtained through X-ray crystallography. This technique is used to solve the three-dimensional structure of molecules with details at the atomic level. For this, it is necessary to obtain crystals of the pure protein, which will then be used for X-ray diffraction. The collected data are then analyzed and the structure of the crystallized protein is assembled (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

A protein tertiary structure can only be solved by X-ray crystallography if its sequence information has already been elucidated. Thereby, different techniques can be used to obtain the primary structure of the target protein. The most used technique at the protein level is mass spectrometry. Besides sequence information, this technique can also be used to analyze protein glycosylation and post-translational processing. Using a bottom-up approach, it is possible to obtain the complete sequence of pure proteins through the analysis of its peptides in a tandem mass spectrometer instrument. In this equipment, the target protein peptides are ionized, vaporized and fragmented through collisions with inert gases (usually argon). The mass/charge ratio of each generated fragment is measured in a detector and spectra containing

the complementary series of all newly generated ions are built. With the spectral information in hand, each peptide sequence can be elucidated and the full protein sequence can be assembled afterwards (HO et al., 2003).

The three-dimensional structure of ConA-like monomers acquires a conformation known as β -sandwich or jellyroll (CAVADA et al., 2019a). In addition to carbohydrate and metal binding sites, this monomer also has a conserved hydrophobic site (EDELMAN; WANG, 1978). Diocleinae lectin monomers tend to exhibit pH-dependent oligomerization, with the formation of dimers preferably at acidic pHs and tetramers at neutral and basic pHs, according to the protonation state of key residues responsible for the interaction between monomers. The dimers formed are of the canonical type, and the tetramers are formed by dimerization of them (CAVADA et al., 2019b).

The first 3D structure of ConA was reported in 1972, and, since then, *C. ensiformis* lectin has been re-crystallized and solved under several other different conditions. As a result, more than 60 structures of ConA have been deposited in databases. About 20 other species of Diocleinae also had their lectin structures solved and deposited in PDB databank, with the most recent deposit being in 2020, from the *C. brasiliensis* lectin complexed with indole-3-acetic acid (PDB ID 6VB8). With the exception of ConA and its 63 deposits, table 1 shows the 20 species of Diocleinae lectins that have their three-dimensional structures solved.

Similar to legume lectins in general, ConA-like are metalloproteins with an apparent molecular mass of around 30 kDa. Calcium and manganese metals interact strongly with MBS residues through an octahedral molecular geometry, with each ion coordinating 4 amino acid residues and two water molecules. Metals in CRD are stabilizing a cis-peptide bond that positions CRD residues in an “open” and functional conformation for interaction with glycans. Both the residues that make up MBS and CRD are highly conserved. The mature lectin chain is composed of 237 amino acids. (CAVADA et al., 2019a, 2019b).

Table 1 – Diocleinae lectins with solved structures

Species	PDB ID
<i>Camptosema pedicellum</i>	3U4X
<i>Canavalia boliviana</i>	4K1Y, 4K1Z, 4K20, 4K21
<i>Canavalia bonariensis</i>	5U3E
<i>Canavalia brasiliensis</i>	1AZD, 3JU9, 4H55, 4P14, 4PCR, 6VB8
<i>Canavalia cathartica</i>	5F5Q, 6GW9

Continued on next page

Species	PDB ID
<i>Canavalia gladiata</i>	1WUV, 2D7F, 2EF6, 2OVU, 2P2K
<i>Canavalia grandiflora</i>	4L8Q
<i>Canavalia lineata</i>	4TZD, 4I30, 4TYS, 3SNM
<i>Canavalia maritima</i> (C. <i>rosea</i>)	2CWM, 2CY6, 2CYF, 2OW4, 2P34, 2P37, 2CYF
<i>Cratylia floribunda</i>	2D3P, 2D3R
<i>Cratylia mollis</i>	1MVQ
<i>Cymbosema roseum</i>	3A0K
<i>Dioclea grandiflora</i>	1DGL, 2JE9, 2JEC, 4Z8B
<i>Dioclea guianensis</i>	1H9P, 1H9W, 2JDZ, 2JE7
<i>Dioclea lasiophylla</i>	6CJ9
<i>Dioclea reflexa</i>	5TG3
<i>Dioclea rostrata</i>	2ZBJ
<i>Dioclea sclerocarpa</i>	4NOT
<i>Dioclea violacea</i>	3AX4, 2GDF
<i>Dioclea virgata</i>	3RRD, 3RS6, 5UUY
<i>Dioclea wilsonii</i>	3SH3

Source: Elaborated by the author.

2.2.5.2 Biological activities and commercial applications of Diocleinae lectins

As previously seen, lectins can be used as tools for the detection, isolation and characterization of oligosaccharides, such as in blood typing and in selective binding to cancer cells (FAHEINA-MARTINS et al., 2012; KILPATRICK, 2002). In other words, lectins can be used in the identification of certain cellular conditions that modulate specific glycosylation patterns on the cellular membrane. Considering this, the scientific community currently sees lectins as molecules of great biotechnological interest, since they are proteins with promising biological activities and are relatively easy to purify at a good yield (DAN; LIU; NG, 2016; VAN DAMME et al., 1998).

Biotechnology companies currently market some lectins as inputs mainly for the field of glycobiology research. These lectins are generally immobilized on columns such as the ConA-Sepharose® 4B and the HiTrap® ConA 4B both from Sigma-Merck and the DGL

immobilized on agarose from EY Laboratories. Diocleinae lectins are also widely available for sale in free form as ConA by ThermoFisher Scientific, and soybean lectin SBA (*Glycine max*) and lentil lectin LCA (*Lens culinaris*) by Vector Laboratories. Lectins conjugated with fluorescent dyes such as ConA-FITC (Sigma-Merck), DGL-TRITC (EY Laboratories) and PNA-CY®5 (Vector Laboratories) are also used extensively in glycohistochemistry and immunofluorescence assays and marketed by several companies. Still as examples of commercial applications, lectin microarrays are currently available by companies such as Abcam and Plexera® for characterization of cell and tissue glycan profiling (HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018).

Considering the biomedical area, there are lectin-based filters, such as The Hemopurifier® from Aethlon Medical Inc. which has an expanded FDA access permit for the treatment of Ebola patients. This filter works by reducing the viral load of hemodialysis patients affected by viral infections and has also been shown to be highly efficient for binding of Hepatitis C and HIV viruses (NASH, 2016; TULLIS et al., 2009). Preclinical tests have shown that The Hemopurifier® is also able to interact with a wide spectrum of glycosylated viruses, including chikungunya, dengue and smallpox viruses, and also has the potential to bind viruses of the coronavirus family.

Still considering the biomedical area applications, Diocleinae lectins are known to present several promising biological activities. In inflammation assays, ConA-like lectins can present pro-inflammatory effects, such as what lectins from DGL, ConBr, ConA, ConGF and ConV present when administered intraperitoneally, subcutaneously or in intraplantar way (BENTO et al., 1993; OSTERNE et al., 2017; SIMÕES et al., 2012). ConA-like lectins, however, can also have anti-inflammatory effects when administered systemically, such as DVL (from *Dioclea violacea*), CFL and Dgui (ASSREUY et al., 1997). Furthermore, within the scope of inflammatory studies, it was observed that Diocleinae lectins are able to cause stimulation or inhibition of nociception with effects also dependent on the route of administration (DELATORRE et al., 2011; PINTO-JUNIOR et al., 2017b) and induction of vasodilation in aortic ring models (DO NASCIMENTO et al., 2012; FERNANDES et al., 2010).

Diocleinae lectins also have an immunostimulant effect, as observed with ConBr lectin, which stimulated the production of cytokines and nitric oxide, in addition to triggering a mitotic effect on murine splenocytes (DE OLIVEIRA SILVA et al., 2011). Similar immunostimulant results with increased cytokine production were also observed in ConA, DVL and Dvir (MURAILLE et al., 1999; SOUZA et al., 2013). ConBr, Dvir (from *Dioclea virgata*), DRL (from *Dioclea rostrata*), DGL, DVL, ConA and CFL also stimulated lymphocyte

proliferation (BARRAL-NETTO et al., 1992). Increased histamine release by mast cells treated by ConA and ConBr has also been reported (LOPES et al., 2005).

Regarding antiviral activity, some lectins specific to D-glucose or N-acetyl-D-glucosamine have shown an inhibitory effect on the cytopathic stress induced by HIV and on the viral replication in host cells (MOLCHANOVA et al., 2007). Other lectins acted preventing infection among contaminated and healthy leukocytes (BALZARINI et al., 1992), in addition to inhibiting the reverse transcriptase activity (LIU et al., 2009). In the case of legume and Diocleinae lectins, ConA binds to glycoproteins such as gp120 in the viral envelope of HIV, neutralizing the virus and causing it to lose its ability to interact with the host cell receptor (AKKOUH et al., 2015). The lectins ConBr, ConM (from *Canavalia maritima*), DLL (from *Dioclea lasiocarpa*) and DSL (from *Dioclea sclerocarpa*) show promising results similar to ConA in this regard (GONDIM et al., 2019). Mannose-binding plant lectins also showed strong antiviral activity against the coronavirus family, which cause severe acute respiratory syndrome (SARS), when compared with lectins of other specificities. These proteins act by inhibiting the virus's replication cycle. Due to the current pandemic caused by SARS-CoV-2, this property of mannose-binding plant lectins becomes extremely valuable, as it opens up possibilities for using these biotechnological tools for studies of viral isolation and/or inactivation (KEYAERTS et al., 2007; SAUVION et al., 2004).

In addition to the use of ConA-like lectins in health care, these proteins also show potential applications in the areas of plant and food biotechnology, such as ConBr, DVL and DRL lectins that showed activity against grape pathogenic fungi (GOMES et al., 2012) and DVL and ConA lectins that exhibit insecticidal action against lepidopteran and aphid species (OLIVEIRA et al., 2015; SAUVION et al., 2004).

Lectins, therefore, are currently seen as important elements for research in several areas, and their use has been increasing mainly in the areas of immunology, pharmacology, biochemistry, and cell biology.

2.2.5.3 *Diocleinae lectins and cancer*

The mitogenic and antiproliferative activities of legume lectins in cancer cells will be discussed separately given the great potential that mannose-binding lectins and plant lectins in general present as antitumor molecules in different cancer models (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005). These antitumor activities of lectins occur due to their carbohydrate recognition properties. In tumors, mutations in glycoconjugates and hyperglycosylations in cell membranes

are commonly observed, what usually corroborates for the ability that cancer cells have to escape immunological surveillance (CHAVEZ; GARCIA; YNALVEZ, 2018). Finding lectins that uniquely recognize these mutated glycans and do not bind or cause toxicity to healthy tissues makes these molecules powerful tools in cancer glycobiology research.

In glioma cells, promising results of dose- and time-dependent cell death induction were seen by the lectins of CaBo, DVL, DLL, ConV and ConA, ConBr and DlyL, usually triggering inhibition of cancer cells migration and proliferation. The treatment of tumor cells with these lectins also resulted in a change in morphology as well, with cells usually becoming round and losing adhesion to the extracellular matrix (CAVADA et al., 2018; LEAL et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018, 2017; OSTERNE et al., 2017; PRATT; ROY; ANNABI, 2012; SINA et al., 2010; WOLIN et al., 2021).

In melanoma and carcinoma models, induction of apoptosis by ConA, ConBr and by *Pisum sativum* lectin (PSA) has been documented (KABIR et al., 2013; LIU et al., 2009; SHI et al., 2014; SILVA et al., 2014b). In hepatoma, however, ConA induced cell death not by apoptosis, but by the autophagy mechanism, triggering the internalization of the lectin and participation of mitochondria in the autophagic process (CHANG et al., 2007; LEI; CHANG, 2009). In leukemia cell lines, ConA and ConBr triggered apoptosis at low IC₅₀ values, with the increased production of reactive oxygen species (ROS) intracellularly (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). DLL lectin, which was tested in several tumor cell models, also showed antiproliferative activity in ovarian, lung, breast and prostate cancer, triggering apoptosis through the activation of caspase 9 and accumulating intracellularly in the perinuclear region (GONDIM et al., 2017).

In HeLa cells, it has been observed that the *C. ensiformis* lectin causes cell death by autophagy triggered by the interaction of ConA with receptors on the plasma membrane of these cells. Afterwards, there is activation of apoptotic metabolic pathways, indicating that there is a crosstalk between these two cell death mechanisms (ROY et al., 2014).

Thus, it is interesting to note how Diocleinae lectins have cytotoxic and selective actions in different tumor models. These lectins are often able to differentiate cancer lines from healthy tissues as well, as observed in cases of treatment of leukemia cells with ConA and ConBr lectins (FAHEINA-MARTINS et al., 2012) and *Cratylia mollis* in breast cancer (BELTRÃO et al., 1998). Generally, the cell death mechanism caused by these Diocleinae lectins in these cancer models involves autophagy and/or apoptosis with caspases activation.

Apoptosis is an evolutionarily conserved programmed cell death mechanism that is important in tissue development and to eliminate defective cells (OUYANG et al., 2012).

Apoptotic cells have characteristic morphology, which includes nuclear condensation and formation of bubbles in the plasma membrane (HENGARTNER, 2000). In general, apoptosis is triggered mainly by two mechanisms, the intrinsic pathway, or mitochondrial, and the extrinsic pathway, using cell death receptors (BHUSHAN et al., 2007).

The intrinsic pathway is related to the Bcl-2 superfamily proteins, especially BCL-XL and Bcl-2, which have anti-apoptotic functions as they kidnap the pro-apoptosis proteins Bak and Bax and prevent them from causing mitochondrial membrane permeabilization. This process of pore formation in the mitochondria followed by the release of its content into the cytoplasm causes an intracellular oxidative species imbalance, which itself can trigger apoptosis (OUYANG et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2004). In this way, anti-apoptotic proteins block the release of mitochondrial content, including of cytochrome c, which is involved with the activation of caspase 9 which causes the subsequent cleavage of caspases 3 and 7 to their mature forms, that are responsible for actually triggering apoptosis. (ADAMS; CORY, 1998; BHUSHAN et al., 2007).

Caspases are cysteine-proteases that are the main executors of all apoptotic processes. They are synthesized as inactive proteins, and their cleavage into two fragments is part of their activation process. A large number of proteins seem to be part of the caspase family of substrates, some of them responsible for important roles in the cell cycle (MARTIN, 2014; STROH; SCHULZE-OSTHOFF, 1998). Caspases 8 and 9 are called inducers, because they are related to the activation of other caspases, while caspases 3 and 7 are called effectors, because they actually cleave cell components. Caspase 9 is one of the main representatives of the initiation of intrinsic apoptosis, while caspase 8 indicates extrinsic apoptosis, triggered by the formation of the Death Induction Signaling Complex (DISC) (MARTIN, 2014; OUYANG et al., 2012).

The extrinsic pathway is related to the modulation of apoptosis through the interaction of specific ligands with membrane receptors of the TNFR family (Tumor Necrosis Factor Receptors). These receptors, such as TRAIL-R1 and Fas (also called CD95), when interacting with their ligands, trigger the formation of DISC, which includes internalization of the cellular receptor and binding of it with FADD protein. The formation of this complex activates caspase 8, which is an initiator caspase, that cleaves caspases 3 and 7, activating them (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013). In cancer cells, TNFR family receptors may present altered or defective glycosylations, increasing their sensitivity to interactions with carbohydrate-binding molecules and stimulating apoptosis through the extrinsic pathway. Cases

like this show the potential that glycans and lectins can have as therapeutic targets (MICHEAU, 2018; WAGNER et al., 2007).

The induction of cell death by apoptosis is one of the main mechanisms used in anticancer therapies. Molecules capable of triggering this pathway are strong candidates to become cancer treatment drugs. ConA is an example of a lectin that triggers cell death in cancer through apoptosis via the mitochondrial pathway with release of cytochrome c and activation of caspases (LIU et al., 2009; SUEN et al., 2000). Lectins from *S. flavescens* (LIU et al., 2008) and frutalin (OLIVEIRA et al., 2011) also present antitumor properties by induction of apoptotic pathways.

Autophagy is a conserved cellular mechanism as well, which can play two antagonistic roles in cellular metabolism: cell protection or cell death. Considering cell protection function at first, autophagy can be an instrument of homeostasis preservation as it acts on the degradation of damaged macromolecules and organelles, as well on energy maintenance under cell starvation conditions, recycling components that will be reused by the cell, and finally it can have the function of selectively degrading harmful or toxic molecules (RADOGNA; DICATO; DIEDERICH, 2015).

Autophagy is finely regulated in healthy and tumor cells for the purpose of tissue maintenance. Thus, there is a discussion within the scope of cancer research regarding which methodology should be triggered in treatments, if either the induction or inhibition of autophagy, since this pathway may end up protecting tumor cells from chemotherapy treatments (MIZUSHIMA et al., 2008).

On the other hand, there is also the possibility that the activation of autophagy generates a high level of cellular stress, which ends up triggering cell death instead of cellular protection, as observed in the treatments of glioma and hepatoma with ConA-like lectins (CHANG et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2019; WOLIN et al., 2021) In this case, autophagy triggers a cellular “autodigestion”, with the formation of autophagosomes and autolysosomes, but leaving the nucleus intact (LEVINE; KLIONSKY, 2004). What happens in each case seems to depend on the cell type and treatment in question, but in fact, it is known that failures in the autophagy process can trigger various pathological conditions such as cancer and neurodegenerative diseases (MIZUSHIMA et al., 2008). More studies need to be done in this area to understand the cellular mechanisms that are activated in tissues undergoing different treatments.

Some genes related to autophagy, called ATG (autophagy-related genes) have already been identified, but much remains to be described regarding their mechanism of action.

Some regulatory proteins such as PIK3 class I, Bcl-2 and TOR exert autophagy inhibition functions, while others such as Beclin 1 and LC3-II and PUMA are present or act intrinsically in triggering the autophagic process (KANG et al., 2011; ROY et al., 2014). Monitoring the level of expression of these genes or action of these proteins, as well as monitoring the formation of autophagic acidic vacuoles can help to identify the activation or suppression of autophagy.

It is currently known that there is a crosstalk between autophagy and apoptosis, and the two pathways can play synergistic roles in the cell death process. Apoptosis and autophagy have some proteins in common in their pathways, such as the Bcl-2 family, which sequesters both the pro-apoptosis Bax and Bak and the pro-autophagic Beclin-1 proteins, preventing their actions (BHAT et al., 2018; MAIURI et al., 2007). Some examples of proteins that activated both apoptosis and autophagy in their toxicity assays include abrin, in HeLa cells (BEHERA et al., 2014), the soybean lectin in HeLa (PANDA et al., 2014) and ConA in several cellular models (LI et al., 2011).

2.2.5.4 *HeLa cell research*

HeLa cells were the first cancer cell line strain successfully immortalized and replicated in laboratory. They were isolated from a cervical cancer tumor of patient Henrietta Lacks at John Hopkins Hospital about 70 years ago. Since then, HeLa cells have been extensively used in several research fields, such as characterization of metabolic pathways and development of vaccines (TWEEDALE, 2002).

The establishment of HeLa cells as the first immortal human cell lineage, however, draws attention to considerable ethical questions of scientific community. Henrietta was a 30-year-old black woman when part of her tumor was removed and her cells were cultured in the laboratory without consent. A short time later she would die due to the worsening of her illness. The aggressiveness of her cancer was one of the factors that made possible the *in vitro* culture success and survival of these cells in the lab. But for more than 20 years after her death, neither Henrietta's widower nor her 5 children were aware that her cells were used in scientific research and grown in laboratories all around the world. The Lacks family did not have any right to the profits generated from the commercialization of the cell line, nor did they have their genetic information and right to privacy preserved (BESKOW, 2016). Thus, the history of HeLa cells brings to light an important debate about the necessity of informed consent. It is imperative to

emphasize for the future scientific generations how ethics in science has progressed and how research was developed 70 years ago compared to how it's done today.

Nevertheless, because HeLa cells were the first successful case of human tissue culture more than 70 years ago, they are the most well studied and tested cancer cell line to date (TWEEDALE, 2002). HeLa cells represent a model used both in general cancer studies and in specific research on cervical tumors. Cervical cancer is the fourth most common type of cancer found in women, according to the World Health Organization (WHO, 2020).

HeLa cells have also been extensively used in cancer biomarker detection and characterization studies of mutated glycans (MALEROD et al., 2013). It is known that cell membrane glycoproteins from cancer cells are intrinsically involved with metastasis, as well as the process of recognition, communication and tumor development (PINHO; REIS, 2015). One of the main changes found in metastatic cells involves the early termination of N-glycan processing, generating large concentrations of high mannose structures in neoplasms (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Thus, aiming to characterize the peculiarities of tumor glycoma, biomarker discovery is stimulated in order to facilitate the early diagnosis of the disease and immediate initiation of treatment (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017).

As observed in other tumor cells, the HeLa glycocalyx is composed mostly of high-mannose type N-glycans which may be the reason why specific mannose lectins have been shown to be able to interact well with these cells and effectively cause toxicity on them (LIU et al., 2008; NAIK et al., 2017; SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021). Among the Diocleinae, however, only ConA was tested in HeLa cells, as seen above, triggering cell death by autophagy and apoptosis (ROY et al., 2014). Thus, the assessment of toxicity of other Diocleinae lectins in HeLa cells becomes an interesting tool to unravel the mechanisms of action of these lectins in inducing cell death in cancer.

2.2.6 *Canavalia villosa* lectin

Canavalia villosa is a legume species belonging to the Fabaceae family, Phaseoleae tribe and *Canavalia* genus. The *C. villosa* lectin (Cvill) was isolated using Sephadex G-50 affinity matrix and presented affinity to monosaccharides glucose, mannose, α -methyl-D-mannoside, and to glycoproteins fetuin and ovalbumin. In SDS-PAGE assays, the lectin presented a 3-band profile composed of the α chain and the β and γ fragments characteristic of

ConA-like lectins. In the first published work, Cvill had 40% of its primary structure sequenced by mass spectrometry (LOSSIO et al., 2017).

Regarding its biological activities, this lectin presented toxic effect on *Artemia nauplii*, and in the rat model, it had edematogenic and hypernociceptive effects, with reversion by α -methyl-D-mannoside. Cvill also caused viability reduction and morphological changes in C6 lineage glioma cells at concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ (LOSSIO et al., 2017; WELTER, 2018).

3 OBJECTIVES

3.1 Main objective

In a quest to understand by which metabolic pathways the lectin from *Canavalia villosa* provokes cell death on cervical cancer cells (HeLa), this work investigated the cytotoxic activity of Cvill through experiments that evaluated caspase activities, transcript expression and ROS production. The primary and tertiary structures of *Canavalia villosa* lectin were also elucidated, and the fine sugar specificity of the lectin was studied, aiming as well to further investigate the relation between the structure of this lectin and its activity in HeLa cells.

3.2 Specific objectives

- To sequence *Canavalia villosa* lectin by mass spectrometry;
- To purify DNA from *Canavalia villosa* seeds and isolate the lectin gene;
- To clone, amplify and sequence the gene using the Sanger method;
- To obtain protein crystals by the hanging drop vapor diffusion method;
- To solve the three-dimensional structure of the lectin through X-ray diffraction;
- To study the interaction of Cvill with N-glycans from cancer cells glycocalyx through Molecular Docking tools;
- To evaluate the fine specificity of Cvill through Glycan Array;
- To estimate lectin cytotoxicity in HeLa cells;
- To evaluate Cvill activity regarding the production of ROS and activation of caspases in HeLa;
- To study the expression levels of genes related to cell death by qPCR;
- To study the subcellular localization of the lectin in HeLa using confocal fluorescence microscopy.

4 METHODOLOGY

4.1 Lectin Isolation

Cvill was isolated from the seeds of *Canavalia villosa* by affinity chromatography using Sephadex G-50 column, according to the protocol previously described in (LOSSIO et al., 2017). Lectin purity was monitored by SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) and its activity was tested by hemagglutination of 3% native and enzymatically treated rabbit erythrocytes. Hemagglutinating activity was performed according to a protocol adapted from Ainouz et al (AINOUZ et al., 1992).

4.2 Determination of Cvill primary structure

In order to determine the complete primary structure of the *C. villosa* lectin, mass spectrometry and gene sequencing techniques were employed in a bottom-up approach.

4.2.1 Mass spectrometry sequencing

In Lossio et al (LOSSIO et al., 2017) approximately 40% of the α -chain sequence was obtained by mass spectrometry using the Bruker Daltonics MALDI-TOF/TOF spectrometer and through *de novo* manual sequencing. Considering this data, and aiming to increase the coverage of the protein sequence, the sample was prepared again for analysis in a mass spectrometer, this time using Q-TOF equipment with a nanoelectrospray ionization source. For this, the protein was separated into bands through SDS-PAGE and only the band corresponding to the α chain was cut from the gel and digested following the protocol established by Shevchenko (SHEVCHENKO et al., 2007) with adaptations for electrospray ionization. The enzymes trypsin, chymotrypsin, pepsin, Asp-N and Glu-C were used for digestion of Cvill α -chain according to the enzyme:substrate ratio proposed by the manufacturer. Peptides were extracted in a 5% formic acid solution in acetonitrile (1:1) and collected in a new microcentrifuge tube. Samples were injected into a Q-TOF Premier mass spectrometer (Waters Corporation, USA) using a C-18 column (100 μ m x 100 mm) coupled to a NanoAcquity UPLC chromatograph at a flow of 600 nL/min through a 0 - 90% gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid. The equipment operated at a voltage of 3.5 kV at the ionization source and within an ion data acquisition range of 100 to 2000 m/z. Runs were processed and

data were analyzed using the MassLynx 4.1 software package (Waters Corporation, USA). MaxEnt3 tool was used for the deconvolution of multicharged MS/MS spectra using the maximum entropy method (FERRIGE et al., 1992). Peptides were manually sequenced using the PepSeq tool, both included in the MassLynx 4.1 software package. The partial sequence of the Cvill lectin was assembled based on information provided by the different digests.

4.2.2 DNA purification from C. villosa seeds

Genomic DNA was isolated from *Canavalia villosa* seeds following an adapted CTAB protocol (HEALEY et al., 2014). Seeds were peeled and macerated in liquid nitrogen until a fine flour was obtained, to which was added CTAB buffer previously heated at 65 °C in a proportion of 1:10 (w/v). The suspension was incubated at 65 °C for 30 min with occasional shaking at 10 min intervals. After incubation, the samples were centrifuged and 1 volume of chloroform:isoamyl alcohol 24:1 (v/v) solution was added to the supernatant. After centrifugation, the aqueous supernatant was transferred to a new tube, and 95% ethanol solution was added, followed by incubation at -20 °C for 1 h. The precipitated genetic material was then washed with 70% ethanol and dried in a laminar flow chamber at room temperature. The DNA was then solubilized in autoclaved ultrapure water, its purity and quantification were assessed by absorbance reading in a UV-Vis NanoDrop spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) and its integrity verified by 1% agarose gel electrophoresis.

4.2.3 Amplification, cloning and sequencing of the lectin gene

Considering the data obtained previously as a result of the mass spectrometry experiments, a pair of primers were designed from amino acid sequence information aiming to specifically amplify the gene of the lectin (Fw: TGATCCTTCAAGGTGACGCC; Rv: GAGAGAATGGTATTGGTTTCTTTGT). Primer3-web tool V4.1.0 (KÖRESSAAR et al., 2018) was used for primer design and the post-translational processing that ConA-like lectins undergo was considered during this process. A PCR reaction with the previously isolated *C. villosa* genomic DNA was performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzyme (ThermoFisher Scientific) following the protocol established by the supplier for a final reaction volume of 25 µL. The following program was adopted:

Step 1: Initial denaturation: 95 °C – 2 min

Step 2: Denaturation: 95 °C – 30 s

Step 3: Annealing: 60 °C – 30 s

Step 4: Amplification: 72 °C – 30 s

Step 5: Final amplification: 72 °C – 5 min

35 cycles of steps 2 to 4

The PCR product was analyzed by agarose gel electrophoresis and nanodrop quantification (UV-Vis NanoDrop spectrophotometer - ThermoFisher Scientific). The amplicon was inserted in pJET blunt end cloning vector (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol and using the T4 DNA ligase enzyme provided with the vector's kit. The ligation reaction was performed following the protocol established by the vector supplier. The reaction was prepared with the amplicon at a ratio of 3:1 to the plasmid. Competent *E. coli* Top10 cells were transformed by heat shock and incubated for 1h at 37 °C at a constant agitation of 185 RPM in LB medium containing carbenicillin. Afterwards, the bacteria were seeded on a selective medium containing carbenicillin and the plate was incubated overnight. Colony PCR was performed the following day under the same conditions of the first gene amplification by PCR to confirm the selection of transformed clones, which were subsequently incubated overnight in LB liquid medium containing carbenicillin. Bacterial growth was monitored with readings at 600 nm in a spectrophotometer, and, once the O.D. of 0.6 was reached, cells were centrifuged at 5000 x g for 15 min. Plasmid purification was performed using Qiagen's Miniprep kit.

4.2.4 Sanger Sequencing

Sequencing of the plasmid containing the lectin gene was performed at a facility (LGC Genomics Technology) using the Sanger methodology and 3730XL DNA Analyzer System sequencer (ThermoFisher Scientific), with PHRED20 quality. The vector's own primers, pJET1.2 Forward and pJET1.2 Reverse Sequencing Primers, were used in the sequencing reaction. The generated files were read by the Phred/Phrap/Consed software package that assigns scores to the bases, and performs the assembly of the contig (EWING; GREEN, 1998). The contig, therefore, corresponds to the partial sequence of the lectin gene. Data was treated with the VecScreen tool (NCBI), which would exclude nucleotide sequence fragments from the pJET vector. The translation of nucleotide information into protein was performed using the gadget Translate Tool from the ExPASy platform (ARTIMO et al., 2012),

in which the reading frames were analyzed and the one corresponding to the lectin gene was chosen. The translated protein sequence, together with the peptide information obtained by mass spectrometry, contributed to obtaining the complete lectin sequence. The post-translational processing that ConA-like lectins undergo was taken into account in the assembly of the sequence. Possible glycosylation sites were predicted using online tool NGlycPred Server (CHUANG et al., 2012).

4.3 Phylogenetic analysis

Cvill was compared at the sequence level with other proteins deposited in non-redundant databases using Blastp alignment tool (NCBI). Considering the results obtained, sixteen other lectins were chosen to carry out the phylogenetic analysis of the *Canavalia villosa* lectin within the Diocleinae subtribe. The lectins selected are those from the following organisms mentioned below: *Canavalia grandiflora* (ConGr, ncbi ID: A0A067XG71.1), *Canavalia cathartica* (ConC, ncbi ID: P81461.1), *Canavalia gladiata* (CGL ncbi ID: 1WUV_A), *Canavalia virosa* (ConV, ncbi ID: C0HJY1.1), *Canavalia lineata* (ConL, ncbi ID: P81460.1), *Canavalia maritima* (ConM, ncbi ID: 2OW4_A), *Canavalia brasiliensis* (ConBr, ncbi ID: P55915.1), *Canavalia boliviana* (CBol, ncbi ID: A0A023GPI8.1), *Canavalia bonariensis* (Cabo, ncbi ID: 5U3E_A), *Dioclea virgata* (DvirL, ncbi ID: P58907.2), *Dioclea lasiocarpa* (DLL, ncbi ID: 5UUY_A), *Dioclea rostrata* (DRL, ncbi ID: P58908.2), *Dioclea guianensis* (Dgui, ncbi ID: 1H9W_A), *Dioclea lasyophylla* (DlyL, ncbi ID: 6CJ9_A), *Dioclea reflexa* (DrfL, ncbi ID: C0HK81.1), *Camptosema pedicellum* (CPL, ncbi ID: J9PBR3), and finally *Bowringia mildbraedii* (ID: P42088), which was chosen as an outgroup in the analysis. The alignment of protein sequences was performed using MUSCLE tool and the phylogenetic tree was constructed according to the statistical method of Neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987), using the Bootstrap phylogeny test, with 500 replications and poisson's correction model (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965) (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965), all tools used are from MEGA X software package (KUMAR et al., 2018).

The prediction of the secondary structure was performed by ESPrnt 3 online software (GOUET et al., 1999) using the three-dimensional model of lectin ConGr (PDB ID: 4L8Q). The lectins ConGr, ConC, CGL, ConV, ConL, ConM, ConBr, CBol were used to build the alignment figure with Cvill.

4.4 Resolution of Cvill three-dimensional structure

Macromolecule crystallization is the most sought-after technique for the solving of three-dimensional structures of biologically important compounds. In view of this, and aiming to deepen the knowledge regarding Cvill's protein-carbohydrate interactions, this lectin was crystallized in its native condition and conjugated to its specific ligands. The obtained crystals were diffracted in X-rays and the structure was solved using bioinformatics software.

4.4.1 Crystallization of Cvill

In order to determine the optimal concentration at which the lectin should be prepared, a pre-crystallization test (Hampton Research) was performed, with the solubilization of the lectin in 4 different buffers (0.1 M Tris-HCl pH 8.5 with 2.0 M ammonium sulfate; 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 with 1.0 M ammonium sulfate, 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 containing 0.2 M Magnesium Chloride and 30% w/v PEG 4000; and 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 containing 0.2 M Magnesium Chloride and 15% w/v PEG 4000).

Table 2 – Pre-crystallization test expected results and recommended actions

Buffers 1 and 3 results	Buffers 2 and 4 results	Recommended action
Large amorphous precipitate	Large amorphous precipitate	Dilute sample 1:1 and repeat pre-crystallization test
Clear solution	Clear solution	Concentrate the sample to half the original volume and repeat the pre-crystallization test
Light and granular precipitate	Clear solution	Start screening
Clear solution	Light and granular precipitate	Start screening
Large amorphous precipitate	Light and granular precipitate	Start screening
Large amorphous precipitate	Clear solution	Perform pre-crystallization test with buffers 3 and 4
Clear solution	Large amorphous precipitate	Perform pre-crystallization test with buffers 3 and 4

Source: User Manual. Pre-crystallization test, Hampton Research (2018).

Typical concentration of *Canavalia* samples for crystallization should be between 5 and 100 mg/mL. Cvill was solubilized at 12.5 mg/ml in 0.025 M Tris-HCl buffer pH 7.6. The assay was mounted in a 24-well VDX crystallization plate (Hampton Research), with 1 mL of each of the aforementioned buffers being allocated to different wells of the plate. On siliconized coverslips, 1 μ L of the lectin solution and 1 μ L of one of the test buffers were pipetted, totaling 2 μ L per cover slip. Each coverslip was then placed inverted over the corresponding buffer well, so that the drops were hanging. The results were interpreted according to the table of results (Table 2) of the pre-crystallization kit from Hampton Research (PCT Pre Crystallization Test). Once the best lectin concentration was defined, screening tests were started. At this stage, different buffers, precipitating agents and salts, in the most varied concentrations, are combined in kits to build several crystallization-inducing solutions.

Cvill was crystallized in the absence of ligands, and in the presence of oligomannosidic (XMAN) and simple (α -methyl-mannoside) sugars. The Cristal screen I and II kits (Hampton Research) and the JBScreen JCSG++ kit (Jena Bioscience) were used for Cvill crystallization experiments. Screening was performed through vapor diffusion method using 48-well MCR Swissci sitting-drop plates from Hampton Research. The screening was automatically assembled using mosquito[®] crystal crystallization robot (ttplabtech). The lectin was crystallized in native condition and conjugated with its specific ligands at concentrations of 0.1 M. In each well, 100 μ l of crystallization condition was used. The seated drops were mounted using 100 nL of the lectin solution and 100 nL of the well solution, totaling 200 nL at a 1:1 ratio. The plate was sealed with ViewDrop[™] II film (TTP Labtech). The presence of crystals was checked weekly, each condition that presented crystals proceeded to the optimization step.

Optimization was performed in a 24-well VDX hanging drop plate. New conditions were prepared from the solutions that showed good results in the screening test. For this, small changes in pH values and concentration of precipitating agents were combined to build these new conditions. The online tool Make Tray (Hampton Research) was used to format the optimization plate. The drops were mounted on siliconized coverslips using 2 μ L of lectin solution and 2 μ L of the new condition solution in a 1:1 ratio totaling 4 μ L in the drop.

4.4.2 Crystal diffraction

Optimization plates in which crystal growth was observed were taken to the National Laboratory of Sincrontron Light (LNLS, Campinas, SP). Crystals were harvested with

the aid of appropriate cryoloops (Hampton Research) and those containing PEG at a concentration of at least 30% in the crystallization solution did not need to be cryoprotected. Those that did not contain PEG, however, were dipped in a 20% glycerol solution to prevent ice from forming inside and around the crystal. Crystals were then taken to the LNLS MX2 beamline, where they were diffracted by hard X-rays (5 to 15 keV) at 100 K. The images were collected using PILATUS2M detector (DECTRIS) and the data was stored for analysis and resolution of the three-dimensional structure. Each set of data of the protein conjugated with ligand or in native condition contained 360 images in total, obtained and recorded by the rotation of 0.5° of the crystal around a fixed axis.

4.4.3 Resolution of three-dimensional structure

The obtained sets of data were analyzed by the CCP4 software package (WINN et al., 2011). These programs are responsible for processing the image sets, scaling the data, and converting the output file format to other formats that run in external programs. The spots were integrated and indexed by the iMOSFILM software and the best spatial group was defined by POINTLESS. With the POINTLESS output mtz file, the number of molecules per asymmetric unit was defined using Mathews coefficient and parameters of multiplicity, completeness and Rmerge were evaluated by SCALA. Further processing was proceeded by molecular replacement, using MOLREP software (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010) and using the coordinates of the ConGr lectin (PDB ID: 4L8Q) as a reference model for the coordinates. The refinement was carried out in PHENIX (ADAMS et al., 2010) and WinCoot (EMSLEY et al., 2010) programs, and the model was validated by PDB Validation Tool (READ et al., 2011). The model of the three-dimensional structure of the Cvill lectin conjugated with α -methyl-mannoside ligand was deposited in PDB under the identification number: 5BKR. The number of polar and hydrophobic interactions of Cvill with the α -methyl-mannoside ligand was evaluated by CONTACT (CCP4) software. Figures were built using PyMOL (SCHRÖDINGER, 2015) and LIGPLOT (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) software.

4.5 Carbohydrate Interaction Analysis

Glycan array and molecular docking experiments were carried out to study the interaction of Cvill with target glycans of biotechnological interest.

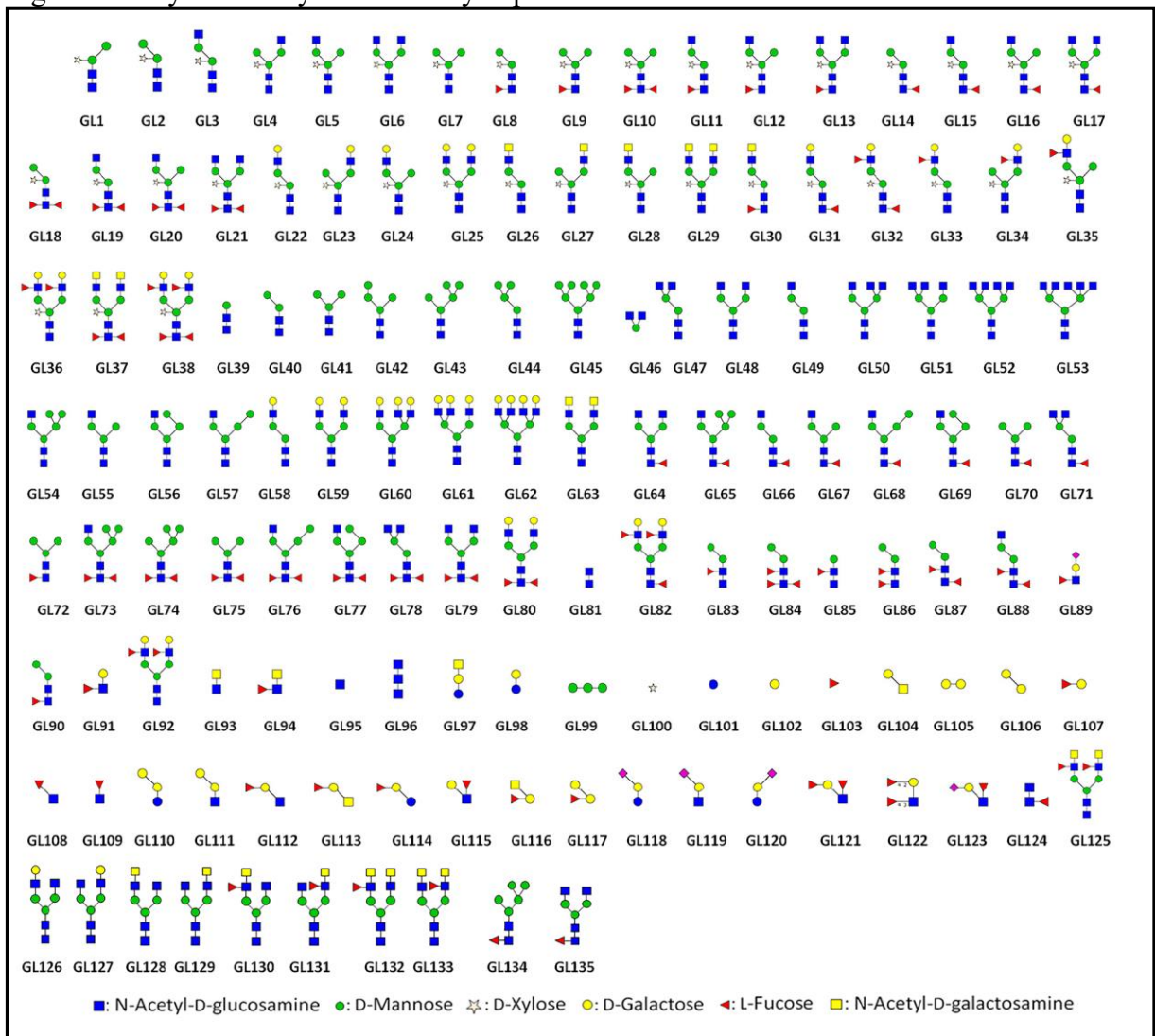
4.5.1 Glycan array

Glycan array experiments were performed using a synthetic library containing 136 N- and O-linked glycans previously used and detailed in (ACHILLI et al., 2020) and described in Figure 2. *Canavalia villosa* lectin was labeled with the fluorescent dye Cy3 and the experiment was performed similarly as described in (ECHEVERRIA et al., 2018). The lectin was prepared in 25 mM Tris-HCl pH 7.5 solution containing 150 mM NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.5% Bovine Serum Albumin (BSA) and 0.005% Tween-20 (v/v). Incubation of the lectin with the array slide occurred for a period of 18 h at a temperature of 4 °C. After washing the microarray slide, the fluorescence of the labeled lectin was measured using Agilent G2565BA scanner equipment (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) at a reading of 568 nm. The ProScanArray Express software (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) processed the fluorescence quantification and the results were made available in arbitrary relative fluorescence measurements (Relative Fluorescence Units, RFU) in the form of histograms.

4.5.2 Molecular Docking

Once the resolved and validated three-dimensional C_vill structure was obtained, and also considering the results of the Glycan array, docking experiments were performed with complex, hybrid and high mannose N-glycans built using Carbohydrate builder tool from the GLYCAM-Web portal (ALOCCI et al., 2018) or downloaded from the N-glycan library from the same portal. Glycans that are components of the glycocalyx of HeLa cells, or glycans that showed interesting results in the glycan array, were selected for this assay. The software GOLD - Cambridge Crystallographic Data Centre (JONES et al., 1997) was used to carry out docking experiments. Docking was used to study the behavior and geometry of ligands in C_vill's CRD. The binding site was defined by an 11 Å radius from the coordinates of α -methyl-mannoside in PDB structure. The protein was considered rigid and the ligands were made flexible. Interaction scores were calculated by the ChemPLP function. Figures were created with the aid of PyMOL and LIGPLOT software.

Figure 2 – Glycan library used in array experiments



Source: Achilli S. et al. Tetralect, artificial tetrameric lectins: A tool to screen ligand and pathogen interactions, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1 – 20. doi:10.3390/ijms21155290. (Figure 1 in Supplementary Materials).

4.6 Evaluation of Cvill activity in HeLa cells

Considering anti-tumor and mitogenic activities that *Canavalia* lectins have presented before in cancer cells tests, the activity of Cvill in HeLa cells was evaluated through experiments of cytotoxicity, ROS generation, caspase activity and qPCR.

4.6.1 Cytotoxicity of Cvill in HeLa cells

HeLa cells were cultivated in DMEM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (p/s) in an incubator at 37 °C and 5% CO₂.

Cvill was solubilized at 10 μM (1 mg/mL) in sterile PBS buffer pH 7.4. The lectin was serially diluted in growth medium to final concentrations of 250,0 $\mu\text{g/mL}$, 125,0 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, 15,6 $\mu\text{g/mL}$ and 7,81 $\mu\text{g/mL}$.

Passages 6 to 10 of HeLa cells were used in the experiments. Cells were counted using hemocytometer. The cell viability curve was constructed within a cell count ranging from 325 to 20,000 cells per well. Cell viability was determined through PrestoBlue™ method, in which 10 μL of the reagent was added to each well of the experiment and the fluorescence was measured at 560/600 nm after incubation for 30 min at 37 °C and 5% of CO₂ in the dark.

Control contained cells in growth medium without addition of lectin (dose 0). Three replicates were prepared for each lectin concentration. Three separate experiments were executed. Lectin CRD participation in cytotoxicity was evaluated by incubation of Cvill with its specific sugar (100 mM α -methyl-mannoside) before each assay. Cells were seeded to a final amount of 10,000 cells per well in 96 well plates. Plates were incubated at 37 °C for 24, 48 and 72 h. After each incubation period, Presto Blue™ was added to each well followed by a 30 min incubation at 37 °C with an atmosphere of 5% of CO₂ in the dark. The fluorescence was measured at 560/600 nm using Tecan plate reader (Tecan Group Ltd, Switzerland). The cell viability was expressed in function of the protein concentration and incubation time.

4.6.2 ROS production evaluation

Reactive Oxygen Species (ROS) generation was measured using 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) (Sigma-Aldrich). HeLa cells were seeded at 10.000 cells per well in a 96-well plate. Afterwards, cells were incubated with three concentrations (125,0 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$ and 7,81 $\mu\text{g/mL}$) of Cvill prepared in DMEM growth medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. After 48 h incubation at 37 °C with a 5 % CO₂ atmosphere, all medium was carefully removed and 100 μL of H2DCFDA working solution prepared at 5 μM in sterile PBS was added to wells, and plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 30 min in dark. Negative control were cells without treatment, incubated only with PBS and positive control were cells treated with 100 μM of hydrogen peroxide for 15 min prior to ROS measurement. Fluorescence measures were performed in a Tecan microplate reader using wavelengths of 485 nm for excitation and 538 nm for emission (OPARKA et al., 2016).

4.6.3 Analysis of Caspases activity

The analysis of activation of caspase 3/7, 8 and 9 at protein level was evaluated using Cell Meter™ Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Assay Kit from AAT Bioquest. Cells were cultivated in DMEM containing 10% FBS and 1% p/s with the lectin at final concentrations of 125,0 µg/mL, 31,25 µg/mL and 7,81 µg/mL. After 48 h incubation at 37 °C with 5% CO₂ atmosphere, 100 µL of caspase working solution was added to each well followed by 30 min incubation in same conditions. Fluorescence measures were read at excitation/emission wavelengths of 535/620 nm for Caspase-3/7, 490/525 nm for Caspase 8 and 360/470 nm for caspase 9, according to the manufacturer's recommendations. Fluorescence measures were normalized by cell viability using PrestoBlue™ Cell Viability Reagent.

4.6.4 qPCR analysis

To analyze the expression level of genes related to cell death, primers were selected for genes involved with pro-apoptotic mechanisms (PUMA, Bax and Bak), anti-apoptotic mechanisms (Bcl-2 and BCL-XL), genes that regulate autophagy (LC3), genes involved with apoptosis via the intrinsic pathway (Caspase 3 and Cytochrome C) and genes involved with the extrinsic pathway of apoptosis (Caspase-8 and FADD). GAPDH, HPRT1 and β-actin were chosen as reference genes (KRAINOVA et al., 2013).

Table 3 – Primers designed for qPCR reactions

Gene	Primers
<i>Pro-apoptosis</i>	
<i>PUMA</i>	Fw: 5' ATGCCTGCCTCACCTTCATC 3' Rv: 5' TCAGCCAAAATCTCCCACCC 3'
<i>BAX</i>	Fw: 5' AGTAACATGGAGCTGCAGAGG 3' Rv: 5' ATGGTTCTGATCAGTTCCGG 3'
<i>BAK</i>	Fw: 5' ACTCTACCCCTGCTCCCATT 3' Rv: 5' CTTGGAGGCTTCTGACACGT 3'
<i>Mitochondrial apoptosis</i>	
<i>Caspase 3</i>	Fw: 5' ATACCAGTGGAGGCCGACTTC 3' Rv: 5' CAAAGCGACTGGATGAACCA 3'
<i>Cytochrome C</i>	Fw: 5' CCTCTGGGGCATTATCCATC 3' Rv: 5' ATATTTGCACAGTGAAACATAGGA 3'

Continued on next page

Gene	Primers
<i>Autophagy</i>	
<i>LC3</i>	Fw: 5' AGAAGGCGCTTACAGCTCAA 3' Rv: 5' AGATTGGTGTGGAGACGCTG 3'
<i>Extrinsic apoptosis</i>	
<i>Caspase 8</i>	Fw: 5' GGATGGCCACTGTGAATAACTG 3' Rv: 5' TCGAGGACATCGCTCTCTCA 3'
<i>FADD</i>	Fw: 5' GTGCGGGAGTCACTGAGAAT 3' Rv: 5' CTCCTGTTCTGGAGGTCACG 3'
<i>Anti-apoptose</i>	
<i>BCL-2</i>	Fw: 5' GGAGCGTCAACAGGGAGATG 3' Rv: 5' GATGCCGGTTCAGGTACTCAG 3'
<i>BCL-XL</i>	Fw: 5' AGACCCAGACCTTCCTCTTTCT 3' Rv: 5' CCCGGTTGCTCTGAGACATTT 3'
<i>Reference genes</i>	
<i>GAPDH</i>	Fw: 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' Rv: 5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'
<i>HPRT1</i>	Fw: 5' TGAGGATTTGGAAAGGGTGT 3' Rv: 5' CAGAGGGCTACAATGTGATGG 3'
<i>B-actin</i>	Fw: 5' TCTGGCACACACCTTCTACAATG 3' Rv: 5' GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA 3'

Source: prepared by the author

HeLa cells were cultivated in 24 well plates at a cell counting of 50,000 cells per well in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% p/s in an incubator at 37 °C and 5% CO₂. Cells were incubated with doses of 125,0 µg/mL, 31,25 µg/mL and 7,81 µg/mL of Cvill for 48 h. Control were cells incubated without the presence of lectin (dose 0). The experiment was executed in three biological replicates.

RNA and DNA were isolated using TRI-Reagent (Sigma-Aldrich) protocol for cells cultured in monolayers. RNA was treated with lithium chloride overnight for enhancement of 260/230 and 260/280 ratios and to get rid of contaminants. Afterwards DNase treatment was performed. Quantification was monitored using UV-Vis NanoDrop (ThermoFisher Scientific) spectrophotometer. cDNA from each sample was synthesized starting from 1000 ng of RNA using M-MLV Reverse transcriptase enzyme (ThermoFisher Scientific).

cDNA was pooled and a six-points dilution standard curve was constructed in triplicate to test primer efficiency. Each primer specificity was also checked through PCR and 3% agarose gel electrophoresis. Primers that resulted in the amplification and presence of a

single band of the expected size on the agarose gel were used in the experiment.

RT-qPCR was performed with three technical replicates for each biological replicate. Reactions were prepared with 0.5 μM of each primer, 10 μL of SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad) and 1 μL of cDNA in a total volume of 20 μL per well. The program used included one initial step of 95 °C for 10 min and 42 cycles of steps of 95 °C for 15 s, 60 °C for 25 s and 72 °C for 20 s. Experiments were executed in Bio-Rad CFX96 qPCR thermocycler instrument using Bio-Rad CFX Manager 3.1 software. Reference gene stability was analyzed using qBase+ (Biogazelle) and gene expression levels were analyzed using Relative Expression Software Tool (REST 2009) version 2.0.13 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLE, 2002). Reference genes were used to normalize the results, which were plotted on whisker-box graphs. The Bootstrap method was used to analyze the significance of the gene expression using 95% confidence intervals and 2000 randomizations.

4.7 Study of Cvill subcellular addressing by confocal microscopy

Cvill labeling with Tetramethylrhodamine (TRITC, Sigma-Aldrich) was prepared according to Barauna with adaptations (BARAUNA et al., 2006). Cvill was solubilized in 100 mM sodium bicarbonate buffer pH 9.0 at 4mg/mL. The lectin carbohydrate binding site was protected with addition of α -methyl-mannoside to a final concentration of 100 mM. TRITC was prepared in DMSO at 1mg/mL, and added to the lectin at a proportion of 50 μL of TRITC per 1 mL of lectin solution. The mixture was incubated under constant agitation for 2 h at RT. Afterwards, unbound TRITC was separated from TRITC labelled Cvill by dialysis against 150 mM sodium chloride solution. Final protein content and dye:protein ratio were determined by spectrophotometry.

Hela cells were cultivated in glass bottom cell culture dishes at 35,000 cell/dish and were incubated overnight at 37 °C with 5% CO₂. Afterwards, cell culture medium was discarded, cells were washed with PBS and Cvill-TRITC was added to dishes at 125,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations and incubated for 48h at 37 °C, 5% CO₂ in the same culture medium. Cells were stained with Calcein (Thermofisher) for 45 min at 37 °C with 5% of CO₂ and washed twice with PBS before confocal microscopy experiments.

For each dose of the lectin, 3 confocal microscopy dishes were prepared, and from these dishes, 4 confocal images were constructed per dose. About 140 cells were analyzed individually. Experiments were performed on a Nikon Instrument A1 Confocal Laser Microscope. NIS-Elements C (Laboratory Imaging) software was used for data collection and

image analysis. The emission/excitation wavelengths were 525/488 for Calcein and 595/560 for TRITC. Plan Apo Extra Long Working Distance (ELWD) 60x DIC H water immersion objective lenses were used to generate images. The software NIS-Elements Viewer 5.21 and ImageJ (NIH) were used in the construction of the images.

4.8 Statistical analysis

Statistical analysis of cytotoxicity, ROS and caspase assays was performed using the GraphPad Prism 6.01 program. Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) and Turkey's multiple comparison test. IC50 was calculated by non-linear regression. The indication of significance was given by p-value, with ($p < 0.01$) unless another p-value value in the text is explicitly indicated. The statistical results of the qPCR experiments were analyzed by the REST 2009 software. Significance was given by the Bootstrap method using 95% confidence intervals.

5 RESULTS AND DISCUSSIONS

5.1 *Canavalia villosa* lectin sequence

The *C. villosa* lectin (Cvill) sequence is composed of 237 amino acid residues, and undergoes post-translational processing common in Diocleinae lectins called circular permutation. Cvill has at least five isoforms, as can be noted by punctual amino acid changes at specific positions of the protein sequence, and by two-dimensional electrophoresis in previously published results (CAVADA et al., 2019a; LOSSIO et al., 2017).

In previous works, 40% of Cvill sequence coverage was obtained using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics) (LOSSIO et al., 2017). In new mass spectrometry experiments, this time using an ESI-qTOF spectrometer, new ions were obtained and it was possible to increase the coverage of Cvill primary structure to 80%. In these new experiments, the protein was digested with the enzymes trypsin, chymotrypsin, Asp-N, Pepsin and Glu-C. The peptides were organized using *Canavalia grandiflora*'s lectin sequence as a template, as ConGr was the lectin that showed the highest level of sequence identity with the peptides of Cvill in alignments made by Blastp tool. The partial sequence of Cvill originated from protein peptides data was deposited in the UNIPROT database. The alignment of peptides against the template can be seen in Figure 3. Information about the order that the peptides occupy can be obtained by observing regions of sequence intersections between adjacent peptides and between peptides from digestions with different enzymes, as occurs in T4, T10 and A2 (Figure 3).

Degenerate primers were designed from protein sequence information obtained by mass spectrometry. The design of the primers was carried out considering the post-translational processing that Diocleinae lectins undergo. In order to obtain primers that amplify close to the complete lectin gene, but which would be as specific as possible, several regions of the sequence were tested in the primer design process. Thus, it was observed that the regions that would deliver the best primers, highlighted in bold in Figure 3, would not amplify the central region of the native protein, which corresponds to the beginning and end regions of the gene sequence, before processing. This deficiency in gene sequencing information, however, would not be a major problem in obtaining the complete Cvill sequence, since mass spectrometry data coverage of this central region would compensate for the lack of gene information (Figure 3).

Figure 3 – Map of Cvill peptides obtained through lectin digestion with Trypsin, Chymotrypsin, Asp-N, Pepsin and Glu-C enzymes and sequenced by MSMS. Regions marked in yellow indicate sections not covered by mass spectrometry data. Consequently, in this figure, those regions maintained the sequence information of the ConGr lectin, which was used as a template for the assembly of Cvill's peptides in the correct order. In bold are the region of the sequence used for primer designing. Sections covered by MS/MS data had ConGr sequence information replaced by that of Cvill.

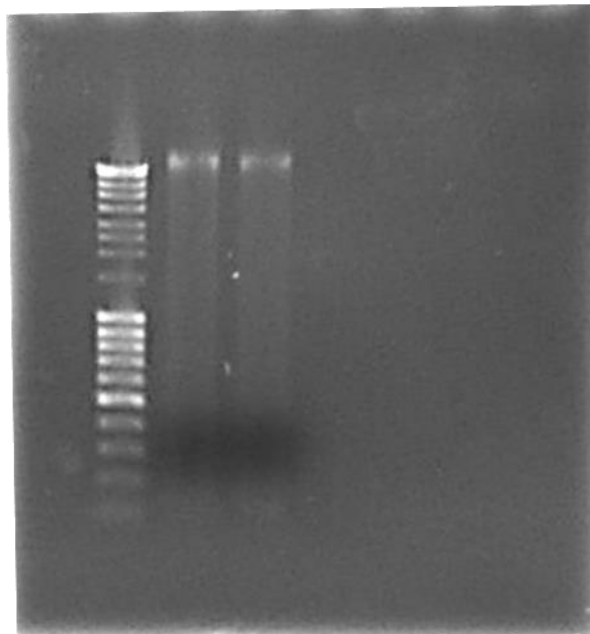


Source: own authorship.

Genomic DNA (Figure 4) was isolated from *Canavalia villosa* seeds according to the CTAB method (HEALEY et al., 2014). PCR was performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzyme to ensure accurate sequence information. Amplicons presented the expected size of 661 bp. The PCR product was inserted directly into the pJET cloning vector

without a gel purification step. Cvill-pJET vector was used to transform TOP10 strains of *E. coli* by heat shock. Cells were grown afterwards in selective semi-solid medium containing carbenicillin. The presence of the recombinant DNA in selected colonies was confirmed by colony PCR on the following day (Figure 5).

Figure 4 – 1.5% agarose gel electrophoresis portraying the genomic DNA extracted from *C. villosa* seeds (lanes 2 and 3). MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific) marker in lane 1.



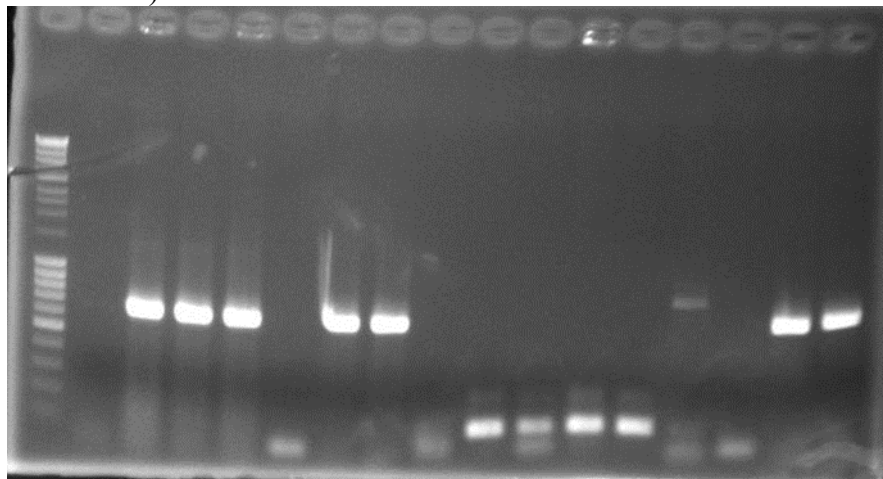
Source: prepared by the author.

Among fifteen clones selected for colony PCR, only seven confirmed the presence of the insert, successfully amplifying the expected band of 661 bp (Figure 5). Two of these colonies (called A and B) were then selected and inoculated overnight in 5mL of liquid LB medium containing carbenicillin at 37 °C. Afterwards, plasmids were purified (plasmids A and B) with the Qiagen Miniprep kit and sent to a facility for sequencing. The sequencer used was the 3730XL DNA Analyzer System (ThermoFisher Scientific). Plasmids A and B were subjected to forward and reverse sequencing to increase the confidence of the information. Because of this, each plasmid originated two contigs, now called contigs forwardA and reverseA, and forwardB and reverseB.

Sequence fragments that would come from the pJET vector were excluded from the obtained data through the use of VecScreen tool (NCBI). Alignment of each contig forward with the reverse complement of its reverse (Contigs ForwardA and the reverse complement of

ReverseA, as an example) confirmed the correct base call obtained from each sequencing experiment. When aligned with each other, contigs A and B showed punctual differences in some nucleotides, which can be explained by the fact that seeds of *Canavalia villosa* present lectin isoforms, as previously observed in the 2017 work (LOSSIO et al., 2017). Thus, contig A corresponds to one Cvill isoform and contig B to another. The presence of isoforms in specific ConA-like mannose binding lectins is quite common and has been previously reported in the lectins of *C. bonariensis* (TORQUATO et al., 2016), *C. maritima* and *D. lehmanni* (PEREZ et al., 1991). Contigs A and B of *C. villosa* lectin gene were deposited in the GenBank database, under the identifier codes MW677574 and MW677575.

Figure 5 – Colony PCR of Cvill cloned in TOP10 *E. coli*. The image shows 1.5% agarose gel electrophoresis showing seven bands of apparent molecular weight of 661 bp referring to colonies positively transformed with PCR fragment. Eight lanes are shown without any amplification. MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific) marker in lane 1.



Source: Prepared by the author.

Translation of MW677574 and MW677575 sequences into protein was done using Translate Tool (ExPASy). The frame chosen was the one in which data was coinciding with that of MSMS data, considering that the ORF would be incomplete and the initiator methionine would not be included in the gene information, due to the fact that the designed primers did not cover the complete lectin gene. The gene, when translated, covered 86% of the amino acid sequence, not including data corresponding to 32 amino acids from the central region of the protein. The central region, however, was already covered by mass spectrometry data. The final Cvill sequence was therefore obtained by combining MSMS and gene sequencing data. The alignment between the final sequence and translated MW677574 and MW677575 can be seen

in Figure 6. It is possible to find some spots in Figure 6 that show that MW677574 and MW677575 do not align perfectly. These punctual regions of discrepancy correspond to areas of differentiation between isoforms. During manual mass spectrometry *de novo* sequencing, these punctual regions of variation between isoforms were also found. Some examples of these isoform regions include, for example, position 4 that can be occupied by an Ile or by Val, and position 223 that can be occupied by an Arg or Met.

Figure 6 – Sequence of *Canavalia villosa* lectin gene. The complete primary structure of the lectin (Cvill_fullsequence) was obtained by combining both mass spectrometry and gene sequencing data. MW677575 and MW677574 correspond to the sequences of two translated Cvill gene isoforms. The alignment was done respecting the post-translational processing that the lectin undergoes.

Cvill_fullsequence	SDTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKKTARWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR	60
MW677575	SDTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKKTARWNMQNGKVGTAHITYNSVCKR	60
MW677574	SDTVVAVELDTYPNPDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKKTARWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR	60
	:** ***** ***** ***** **	
Cvill_fullsequence	LSAIVSYPNGDSATVSYDVLDNVLPWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST	120
MW677575	LSAIVSYPNGDSATVSYDVLDNVLPWVRVGLSASTGLNKETNTIL-----	107
MW677574	LSAIVSYPNGDSSVSYDVLDNVLPWVRVGLSASTGLNKETNTIL-----	107
	*****:***** ***** *****	
Cvill_fullsequence	AETNALHFTLNQFTKQKDLILQGDATTDSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSVGRALFYAPVH	180
MW677575	-----LILQGDATTDSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSMGRALFYAPVH	148
MW677574	-----LFLQGDATADSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSVGRALFYAPVH	148
	*:*****:***** *****:*****	
Cvill_fullsequence	IWESSAVVASFDATFFLIKSPDSDPADGITFFISNMDSTLPRGSTGMLLGLFPDAN	237
MW677575	IWESSAVVASFDATFFLIKSPDRDPADGITFFISNMDSTLPMGSTGMLLGLFPDAN	205
MW677574	IWESSAVVASFDATFFLIKSPDRDPADGITFFISNMDSTLPMGSTGMLLGLFPDAN	205
	***** ***** ***** *****	

Source: Prepared by the author.

Two small fragments totaling five residues had no information coverage neither by mass spectrometry nor by gene sequencing, they were fragments Leu115-Lys116 and Asp137-Lys139. These two sections would be small peptides generated as a product of Cvill digestion by the trypsin enzyme that probably did not fly well in the mass spectrometer analyzer. Both peptides in the vicinity of these two fragments were found in mass spectrometry experiments data, which indicates that the C-terminal residue of both unknown fragments must be a lysine or an arginine, necessarily. Furthermore, both of these fragments are highly conserved in other primary structures of *Canavalia* and *Dioclea*. Final confirmation of the sequence of these fragments was given by experiments of three-dimensional structure solving, in which the residues suggested by sequence similarity with other *Canavalia* lectins presented a good fit in the electron density map of Cvill structure. Using the electron density map data to aid the

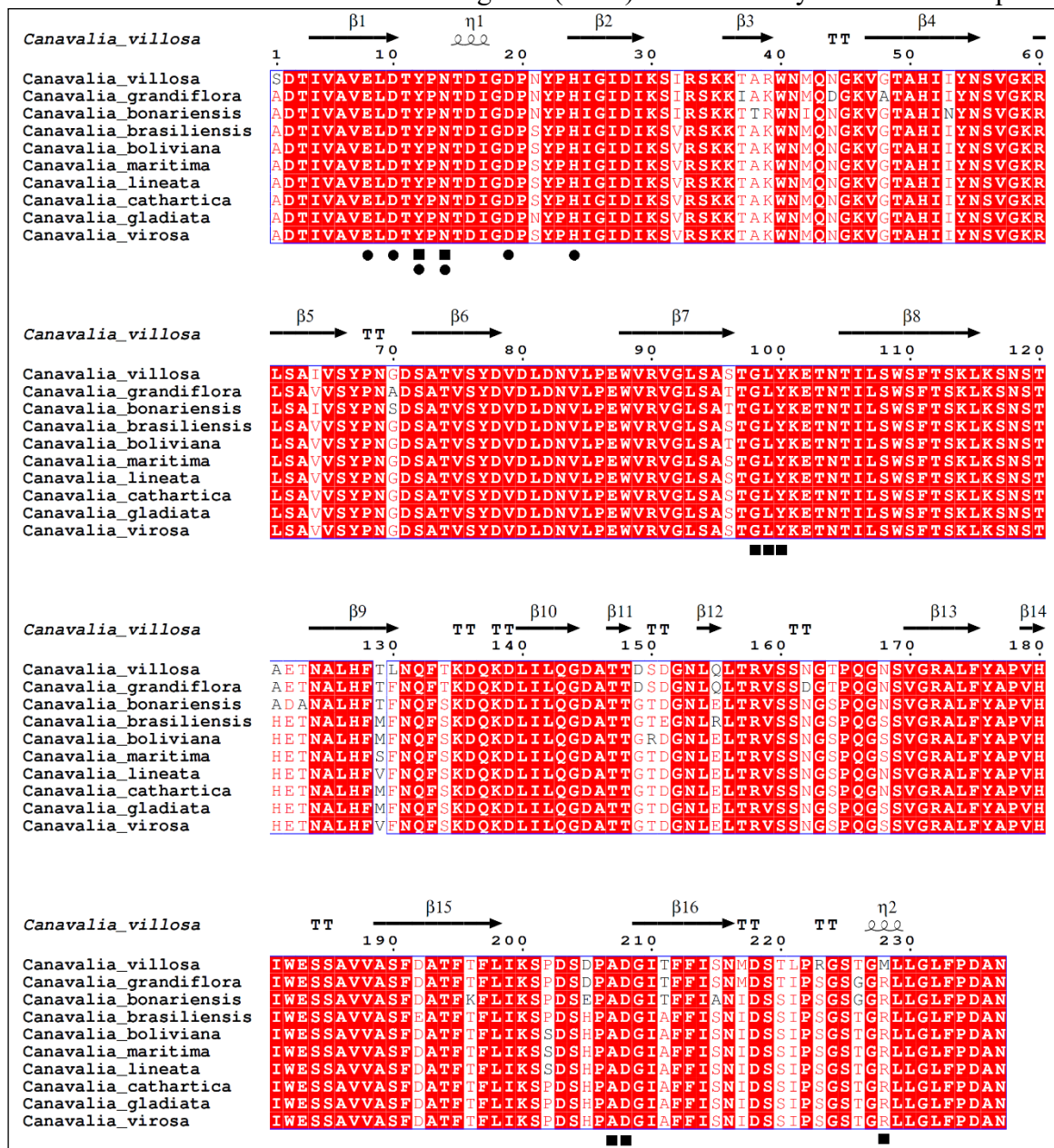
solution of the sequence was previously done by Souza et al (DE SOUZA et al., 2003) for the elucidation of the sequence of that same region from *Cratylia mollis* lectin. In regions of isoform variance, the electronic cloud was also used to discern between two residues and was fundamental in defining the final lectin sequence. Thus, the lectin sequence was completed based on the data set from the mass spectrometry, gene sequencing and three-dimensional structure experiments.

Considering post-translational modifications, it was concluded that Cvill definitely undergoes circular permutation processing since it was observed that the N-terminal region of the γ -fragment is covalently linked to the C-terminal residue of the β -fragment. This link was proven by mass spectrometry experiments, in which it was observed that the T3 peptide (Figure 3) is constituted by the final residues of the β fragment and the initial residues of the γ fragment (Ser117-Asn118 and Ser119 onwards, respectively), indicating the reconnection point of Diocleinae lectin processing. These two covalently linked fragments form the alpha chain of mannose-specific lectins of the Diocleinae subtribe (CAVADA et al., 2019b; SANTIAGO et al., 2014; TORQUATO et al., 2016).

The prediction of possible N-glycosylation sites was performed using NGlycPred Server algorithm (CHUANG et al., 2012), which uses the three-dimensional structure and glycosylation patterns of databases to predict glycosylation of unknown proteins. As a result, it was indicated that Cvill would be glycosylated at its Asn162 residue, which does not coincide with previous experimental results, which demonstrated by Schiff's reagent colorimetric test that the lectin does not present glycosylation in any of its isoforms (LOSSIO et al., 2017). Mass spectrometry data also confirm that this region is non-glycosylated. Mannose-specific ConA-like lectins tend not to present glycosylation in their mature forms (GRANGEIRO et al., 1997; PINTO-JUNIOR et al., 2015; PINTO et al., 2013a).

Blastp alignment results indicated that Cvill is 94.09% identical to *Canavalia grandiflora* lectin (ConGr), 91.56% identical to *Canavalia cathartica* (ConC) lectin, 91.56% identical to *Canavalia gladiata* (CGL) lectin and 91.14% identical to *Canavalia virosa* lectin (ConV). The alignment of Cvill with these lectins, as well as with the lectins from *C. bonariensis* (CaBo), *C. brasiliensis* (ConBr), *C. boliviana* (CboL), *C. maritima* (CML), and *C. lineata* (ConL) can be found in Figure 7. The alignment shows clearly the high degree of similarity and homology that these lectins present with each other.

Figure 7 – Alignment of Cville with *Canavalia* lectins. Residues involved with the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) are represented by a square subscripted, while residues involved with the Metal Binding Site (MBS) are marked by a circle subscripted.



Source: prepared by the author. Alignment performed using the online tool ClustalW. Graphic construction of sequence similarities and secondary structure prediction obtained using ESPrict 3.0.

A striking difference between Cville and other *Canavalia* lectins in residues involved with the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) is the change of the residue Arg228 for Met228. This mutation is interesting since these two residues present distinct chemical properties. It is also the first time that a methionine is found occupying position 228 in ConA-like lectins. The way methionine will act in the CRD is an interesting point to be analyzed with the resolution of the three-dimensional structure. Still considering modifications in key residues of the carbohydrate binding site, it is relevant to mention that in the gene sequencing an

asparagine was found occupying the position of Tyr100. However, the presence of both Tyr100 or Asn100 could be found in mass spectrometry data, with most of the peptides sequenced by MSMS including a tyrosine occupying position 100 in fragments that encompassed this region. In addition, the Tyr100 also fits better into Cvill's electronic cloud. The finding of both Tyr100 or Asn100 in MSMS data indicate Asn100 wasn't introduced by PCR primers in gene sequence. The other residues that make up the CRD were conserved when compared to other *Canavalia* lectins. Cvill's Metal Binding Site (MBS) residues were very conserved as well, with amino acids Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 and His24 (Figure 7) composing the MBS. In previous work, it was observed that Cvill did not show any changes in hemagglutinating activity when dialyzed against EDTA solution (LOSSIO et al., 2017), which would indicate that this lectin would not be metal-dependent. The most plausible explanation, however, is that metals are tightly bound to the lectin structure, and dialysis against this chelating agent was not enough to remove them from the Cvill structure, as was previously observed with the lectin from *C virosa*, which is metallo-dependent as proven by structure resolution experiments (OSTERNE et al., 2017).

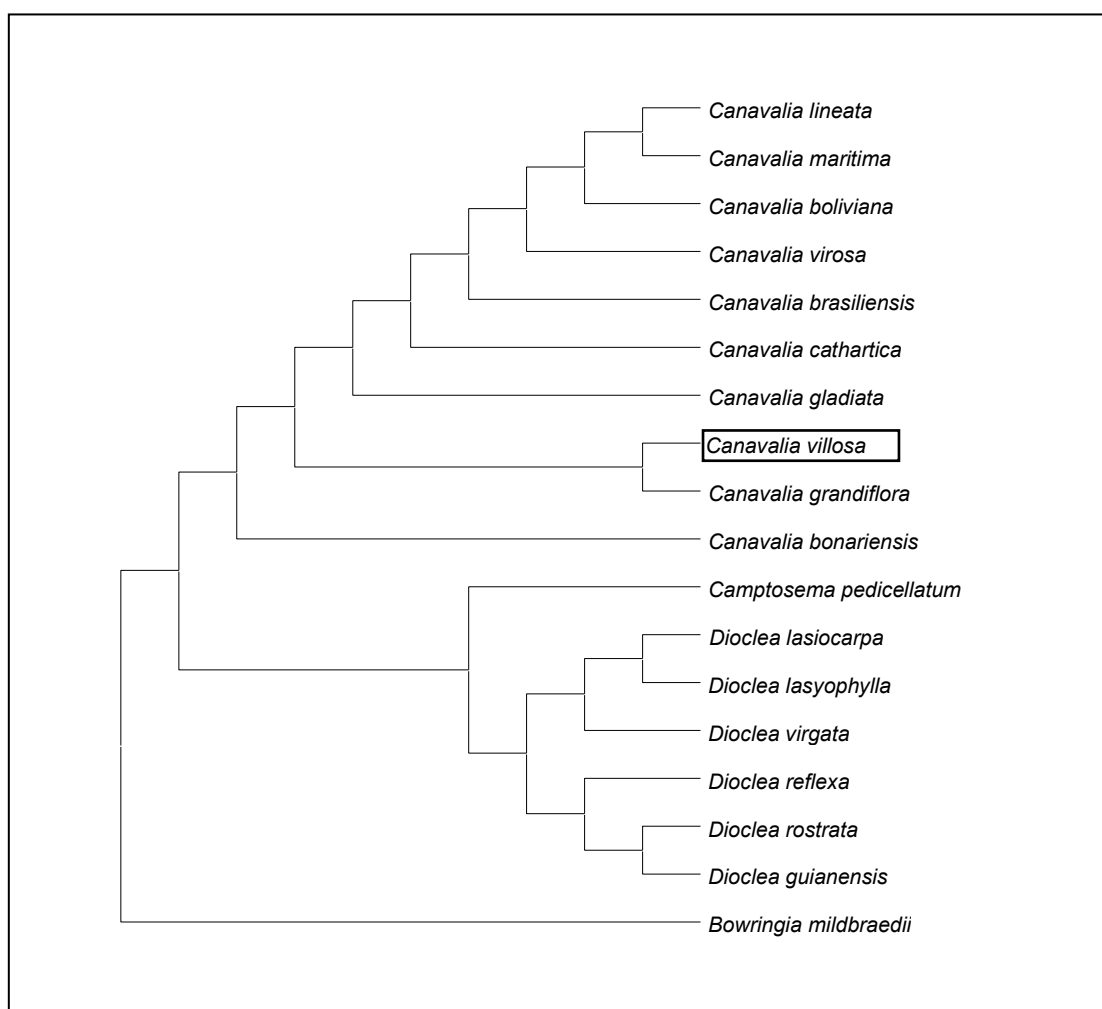
Some other peculiarities of the Cvill sequence include the first residue of the sequence, a serine, occupying the position of Ala1. This is the first time that this modification has been observed in ConA-like sequences, with this alteration being observed both in MSMS data and in Cvill's gene sequence. Another interesting modification of the N-terminal region of the lectin is the possibility of the presence of both an isoleucine or a valine occupying position 4 of the sequence, therefore modifying the famous initial sequence ADTIVAVELD of lectins of this type, and indicating that position 4 of the sequence is an isoform region. In view of this, the N-terminal SDTVVAVELD becomes a possibility in ConA-like lectins.

Secondary structure prediction using ESPript 3.0 software (GOUET et al., 1999) indicated that Cvill follows the pattern observed in Diocleinae lectins, with a great predominance of beta strands in its secondary structure.

The phylogenetic tree constructed using the amino acid sequences of Diocleinae lectins (Figure 8) shows the expected evolutionary proximity between the lectins of *C. grandiflora* and *C. villosa*, as the high sequence similarity between these two lectins made it clear. It is also possible to note that Cvill is one of the most primitive lectins of the genus *Canavalia*, together with the lectins of *C. grandiflora* and *C. bonariensis*. Cvill, ConGr and CaBo are evolutionarily positioned close to the branch corresponding to the *Dioclea* genus in the tree. Lectins are interesting molecules to be used in studies of phylogeny and evolutionary relationships because these proteins are ubiquitous, and have homologues outside the Plantae

kingdom. Considering this, and as an addition to the studies of isolation and characterization of these molecules, one should also seek to understand the evolutionary origin of these proteins, helping to understand what role they may have played in the adaptation of plants to the terrestrial environment and how they have differentiated from each other since then (SUVARNA; SHARMA, 2020; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Figure 8 – Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining method demonstrating the evolutionary distance of the *C. villosa* lectin and other Diocleinae lectins. *B. mildbraedii* lectin was chosen as an outgroup.



Source: prepared by the author. The tree was built using the MEGA X software and the evolutionary distances were calculated using Poisson method.

5.2 Elucidation of Cvill's three-dimensional structure

The tertiary structure of Cvill conjugated with α -methyl-mannoside was solved by macromolecule crystallography and X-ray diffraction. The crystallization experiments started

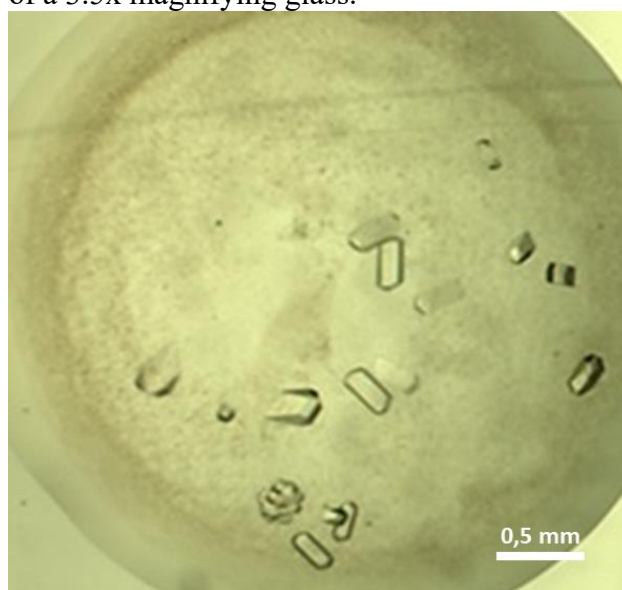
with the pre-crystallization assays, which confirmed the concentration of 12.5 mg/mL Cvill as optimal for starting the screening. Samples of the lectin in native condition as well as conjugated with ligands 5 mM X-MAN or 5 mM α -methyl-mannoside were prepared at 12.5 mg/mL. Crystal screen I and II kits (Hampton Research) and JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience) kit were used in screening step. After a relatively brief period of 2 weeks of incubation at RT, wells containing Cvill complexed with α -methyl-mannoside at conditions A6 (20% PEG1000, 0.1 M potassium phosphate citrate pH 4.2 and 2 M lithium sulfate), C1 (20% PEG8000, 0.1 M potassium phosphate citrate pH 4.2 and 0.2 M sodium chloride) and C11 (0.1 M sodium acetate pH 4.6 and 2 M ammonium sulfate) from the JBScreen JCSG++ kit exhibited crystals and were therefore selected for the optimization step.

For the construction of the optimization plates, small variations in the pH values of the 0.1 M potassium phosphate citrate buffer (pHs 4.0; 4.2; 4.4; 4.6; 4.8 and 5.0) were combined with variations in concentrations of the precipitating agents PEG1000 (17.5%, 20%, 22.5% and 25%) and PEG 8000 (18%, 20%, 22% and 24%) for conditions A6 and C1 respectively. The concentration of additives lithium sulfate and sodium chloride remained the same (0.2 M) in all new combinations created. The optimization for condition C11 was done in a similar way, with pH variations of the 0.1 M sodium acetate buffer (pHs 4.2; 4.4; 4.6; 4.8; 5.0 and 5.2) being combined with variations in the molarity of the ammonium sulfate additive (1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00 and 3,25 M). Condition C11 did not contain precipitating agents included in its composition. The lectin incubated with α -methyl-mannoside was mounted on the plates by the hanging-drop method. Crystals with sizes good enough for synchrotron light diffraction grew under the following four conditions: 17.5% PEG1000, 0.1 M potassium phosphate citrate pH 4.2, and 0.2 M lithium sulfate; 17.5% PEG1000, 0.1 M potassium phosphate citrate pH 5.0 and 0.2 M lithium sulfate; 25% PEG1000, 0.1 M potassium phosphate citrate pH 4.2 and 0.2 M lithium sulfate and finally 24% PEG8000, 0.2 M potassium phosphate citrate, pH 4.4 and 0.2 M sodium chloride. The plates were then taken to Campinas (SP) to the National Laboratory of Synchrotron Light (LNLS), where the crystals were laced and diffracted in the MX2 beamline at a temperature of 100 K. The crystal exposure time to radiation and resolution were adjusted manually. A total of 360 images for each crystal were obtained. Each image was obtained by oscillating the crystal at an angle of 0.5 degrees, thus covering 180° of crystal rotation.

Image files generated by diffraction experiments were analyzed using the CCP4 software package. The iMOSFILM program was used for image indexing, cell refinement and spot integration. Cvill presented an orthorhombic space group of I222 type, and an asymmetric unit per unit cell. The parameters for evaluating reflection quality were analyzed by SCALA.

More details about data collection, molecular replacement and refinement parameters can be seen in Table 4.

Figure 9 – Crystals of Cviol complexed with α -methyl-mannoside formed in the optimization plate under the condition: 17.5% PEG1000, 0.1 M phosphate-potassium citrate pH 5.0 and 0.2 M lithium sulfate. Crystals visualized with the aid of a 3.5x magnifying glass.



Source: provided by the author.

Table 4 – Cviol tertiary structure resolution parameters

Parameters	Values
Data collection	
Space group	I 2 2 2
Unit cell parameters	(61.49 Å; 84.44 Å; 89.07 Å) (90.00°; 90.00°; 90.00°)
Number of reflections	40,674
Number of unique reflections	8,301
Molecules per asymmetric unit	1
Resolution limits	27.48 – 2.50

Continued on next page

Parameters	Values
Completeness (%)	99.63
R _{merge} ^a (%)	11.2
Multiplicity	4.9
Average I/σ(I)	8.9
Molecular replacement	
wRfactor	0.431
Score	0.6826
Refinement	
Resolution range	27.48 – 2.50
Total number of atoms	1839
R _{factor} ^b (%)	23.34
R _{free} ^c (%)	26.54
Number of reflections	8295
Reflections used in R-free	408
Number of residues in asymmetric unit	236
Number of water molecules	37
Variations of RMS Optimal Values	
Bond length (Å)	0.021
Bond angles (degree)	1.59
Temperature factors	
Average B value for whole protein chain	46.8
Ligand & solvent	54.9 & 47.8
Rotamers and Ramachandran Plot	
Rotamer outliers (%)	0.50

Continued on next page

Parameter	Values
Residues in most favored regions (%)	93.89
Residues in additional allowed regions (%)	6.11
Residues in generously allowed regions (%)	0

Source: Prepared by the author.

$$^a R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_{hkl,j} - \langle 1 - hkl \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}$$

$$^b R_{factor} = \frac{\sum |F_{calc} - F_{obs}|}{\sum |F_{obs}|}$$

^c Free was calculated using a random subset of 5% of reflections excluded from refinement

MOLREP program was used to fit the polypeptide chain into the electron density map through molecular replacement. ConGr lectin coordinates (PDB ID: 4L8Q) were used as a reference since Blastp alignment results suggested that this lectin presents the highest sequence similarity to Cvill. Ligand fitting and refinement were performed using Phenix and WinCoot. The model was validated by the PDB validation tool (READ et al., 2011) and deposited in PDB databank under the identification code: 5BKR.

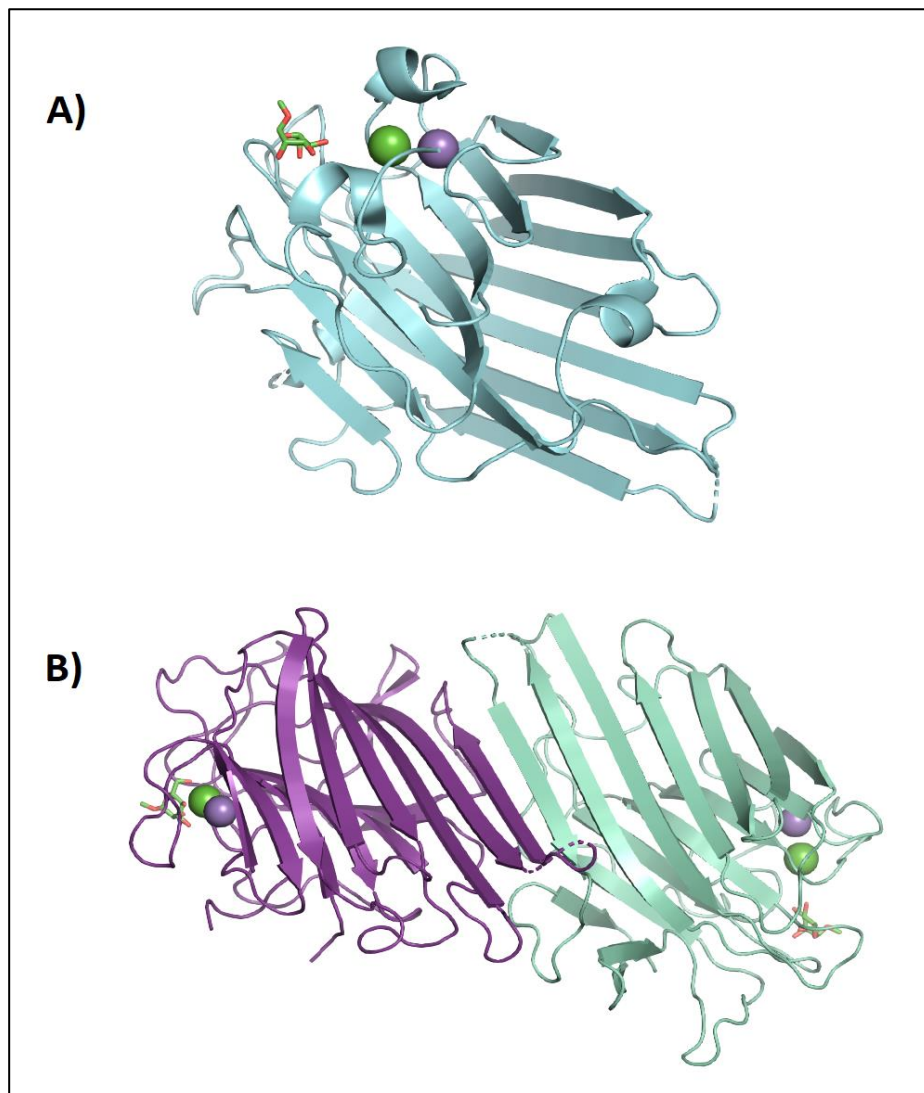
Cvill presents the typical ConA-like tertiary structure of a jellyroll motif, also called a β -sandwich motif, which is characterized by the presence of two superimposed beta sheets, as in a sandwich. The beta sheets consist of antiparallel strands, with six long, flat beta strands forming one beta sheet and other seven curved strands making up the other sheet. Each of these structures is connected by loops, which are generally the regions where most of the amino acid sequence variations between lectins are observed.

The β -sandwich fold is largely conserved in Fabaceae lectin (CAVADA et al., 2019a, 2019b; LORIS et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2020). Figure 10A shows Cvill's jellyroll-like protomer. The oligomerization of monomers composing dimers is thermodynamically favorable and stable in legume lectins. These oligomerizations always involve non-covalent interactions between the β -sheets of two different monomers (MANOJ; SUGUNA, 2001).

In Cvill's case, the formation of the canonical dimer, or type II dimer (Figure 10B), is observed. The dimerization of Cvill was predicted using the oligomerization prediction tool PISA (EMBL-EBI), which calculates the thermodynamically favorable quaternary assembly of structures uploaded as PDB or mmCIF files. This assembly pattern is characterized by the positioning of two monomers side-by-side, with the six β -strands of one jellyroll aligning with

the six beta-strands of the other jellyroll, in order to obtain a structure that resembles 12 continuous β -strands. Other dimerization patterns in legume lectins can be observed, such as the oligomerization in which the monomers are arranged in “X”, as is the case for the lectin from *Arachis hypogaea* (PNA) (CAGNONI et al., 2020). The vast majority of dimerization observed in Diocleinae lectins, however, are of the canonical type (BARROSO-NETO et al., 2016b; CAVADA et al., 2018; MANOJ; SUGUNA, 2001).

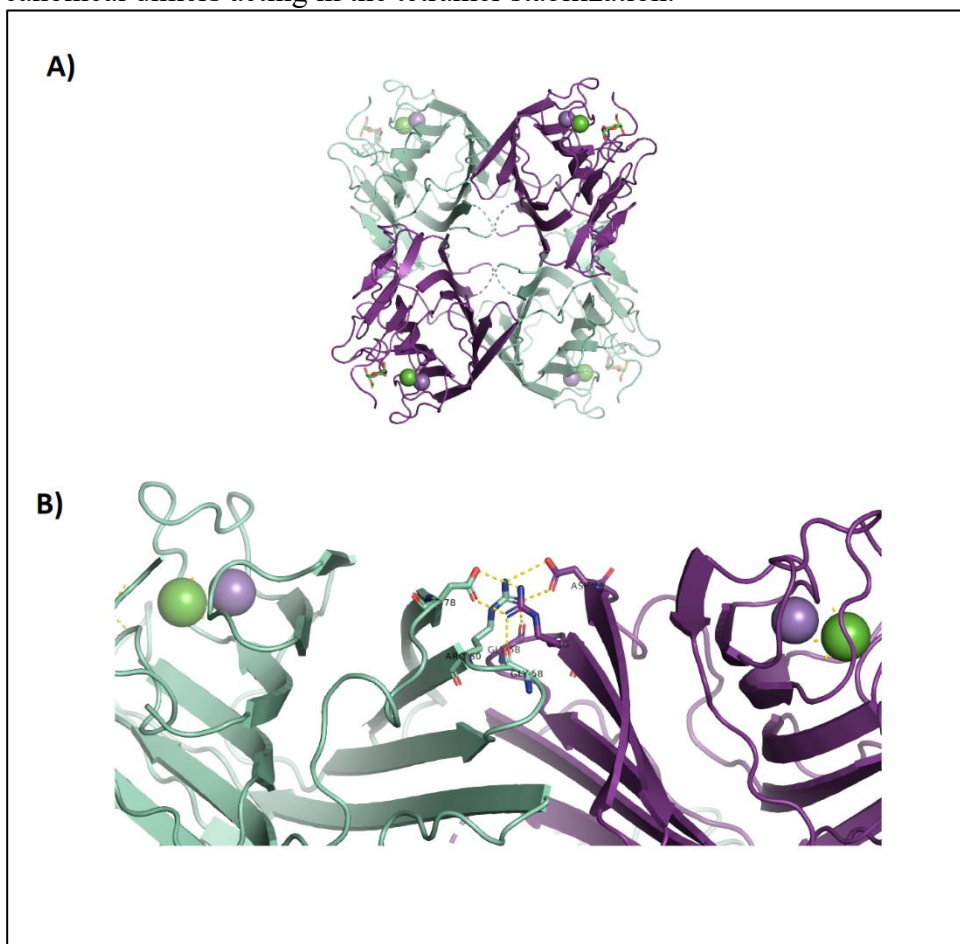
Figure 10 – Three-dimensional structure of *C. villosa* lectin. (A) Cvill monomer. Calcium and manganese ions are represented as green and purple spheres respectively, and the α -methyl-mannoside ligand is positioned at the carbohydrate binding site. (B) Cvill’s canonical dimer representation, the 12 aligned β -strands that characterize the canonical dimer are shown in the front of the structure.



Source: Prepared by the author. Three-dimensional structure solved using CCP4 software package. Refinement performed in WinCoot and Phenix software. The graphical representation of Cvill monomer and dimer in ribbon diagram was constructed using PyMOL 2.0 software.

The formation of tetramers in these lectins is often described as the arrangement of “dimer of dimers”. Hence, one tetramer is composed of two canonical dimers. The quaternary structure is stabilized usually by interactions between residues that compose the six-stranded β -sheet of each dimer (CAVADA et al., 2019a). The oligomerization state of Diocleinae lectins is generally pH dependent, with the presence of dimers being more frequent at lower pH, while the formation of tetramers is favored at neutral and basic pH (DEL SOL; CAVADA; CALVETE, 2007; NAGANO et al., 2008). There are some exceptions to this rule, however, such as the lectin from *D. grandiflora*, which has pH-independent oligomerization (ROZWARSKI et al., 1998). Oligomerization variations due to pH changes are related to the protonation state of residues involved in the interactions between dimers (CAVADA et al., 2019a, 2019c).

Figure 11 – Cvill homotetramer. (A) Quaternary structure of Cvill with calcium and manganese ions occupying the MBS (B) Polar interactions among residues Gly58, Arg60 and Asp78 from the peripheral region of two canonical dimers acting in the tetramer stabilization.



Source: Prepared by the author. Cvill's quaternary structure predicted by PISA tool (EMBL-EBI). The graphical representation of Cvill tetramer in cartoon diagram was constructed using PyMOL 2.0 software.

The crystal of *C. villosa* lectin that was best diffracted was obtained under acidic conditions of pH, around 5.0, and because of that, the presence of the dimeric form in the proteins that constituted the crystal would be expected rather than the tetrameric form. Considering this, it is important to note that the quaternary structure interactions that would be expected in a lectin resolved at pH 7.0 might not be observed in the predicted Cvill tetramer, which was computed *in silico* with the coordinates of a monomer resolved at lower pH conditions.

Cvill's tetramer (Figure 11A) was predicted using the web-based service PISA (EMBL-EBI) (KRISINEL; HENRICK, 2007). It is possible to observe the participation of residues Gly58, Arg60 and Asp78 from the peripheral region of the structure acting in the stabilization of the quaternary structure of Cvill (Figure 11B). The involvement of Arg60 and Asp78 in the stabilization of the tetramer has been observed previously in CFL lectin (DEL SOL; CAVADA; CALVETE, 2007; NAGANO et al., 2008).

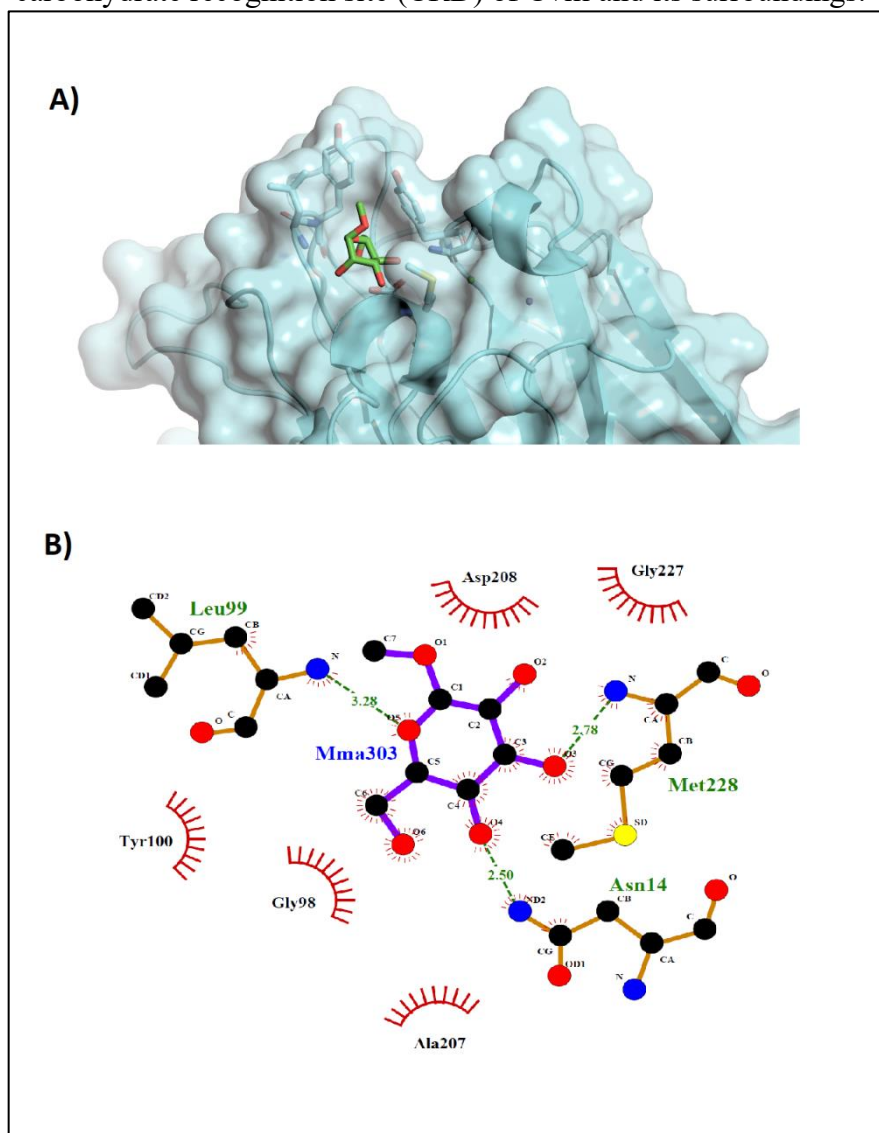
Residues from loop 117-123 and His51 have also been cited as participants in interactions that stabilize the tetramer of this type of lectin (CAVADA et al., 2019b). In Cvill, however, the three-dimensional structure of those specific loop residues was not possible to be solved, since the electron density map presented considerable information deficiency in this area. This deficiency is probably due to the positional instability of the loop, which is flexible and can present different conformations during diffraction. In this loop region, it is also located the reconnection point of β and γ fragments. It is common to find, however, β and γ fragments that were not covalently linked composing an unbound α -chain. This fact contributes even more to the instability that is portrayed in the diffraction of the loop (BEZERRA et al., 2011; CAVADA et al., 2019c).

Cvill's CRD is molded by 4 loops: Thr11-Pro23, Ser96-Asn104, Leu198-Asp208 and Ser225-Leu232. The side chain of residue Asn14, and the nitrogen of the main chain of residues Leu99 and Met228 interact directly with the oxygens O4, O5 and O3 of the α -methyl-mannoside ligand through hydrogen bonds (Figure 12). As previously observed in other ConA-like lectins, C2 hydroxyl did not seem to influence binding with carbohydrates (CAVADA et al., 2019b). Residues Gly98, Tyr100, Ala207, Asp208, and Gly227 also interact with the ligand through hydrophobic interactions, as shown in Figure 12B.

The interaction of Met228 with the ligand occurs through the formation of a hydrogen bond between the oxygen O6 of the α -methyl-mannoside and the backbone nitrogen of Met228 and not through the side chain of this residue (Figure 12B). This may be one of the

reasons why the mutation of the typical CRD Arg228 for this Met228 in Cvill did not cause a great difference in the expected mannose affinity of ConA-like lectins.

Figure 12 – Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of *C. villosa* lectin. (A) Three-dimensional representation of the positioning of the α -methyl-mannoside ligand (in green) at the lectin site. (B) Ligplot picture representing the interactions that occur between the α -methyl-mannoside (Mma) ligand and residues positioned at the carbohydrate recognition site (CRD) of Cvill and its surroundings.



Source: prepared by the author. The image of Cvill's CRD in surface representation (A) was constructed using PyMOL 2.0 software. LigPlot software was used to depict the ligand's interaction with CRD residues (B).

The interactions computed by CONTACT software, as well as the interatomic distances measured in Angstroms (\AA), are shown in table 5. These results show that α -methyl-mannoside ligand established 7 polar interactions and 8 Van de Waals-type interactions with

residues of the CRD. All of these interactions contribute to the fine specificity of Cvill to α -methyl-mannoside.

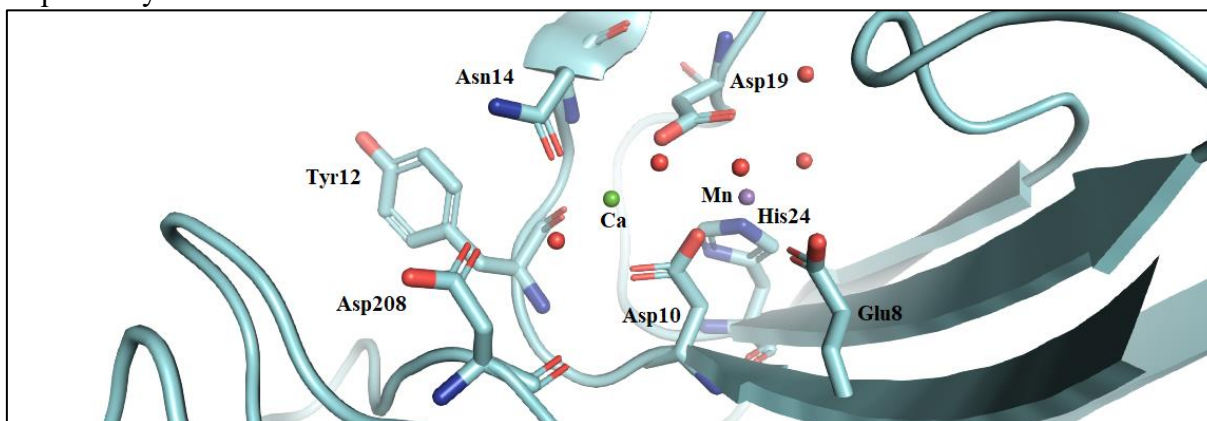
Table 5 – Interactions between Cvill CRD residues and α -methyl-mannoside (MMA)

Cvill residues and atoms	Ligand atom	Distance (Å)
<i>Polar interactions</i>		
Asn14/ND2	MMA/O4	2,50
Gly98/N	MMA/O6	3,39
Leu99/N	MMA/O5	3,28
Asp208/OD1	MMA/O6	3,39
Asp208/OD1	MMA/O4	2,85
Asp208/OD2	MMA/O6	2,39
Met228/N	MMA/O3	2,78
<i>Van der Waals interactions</i>		
Gly98/CA	MMA/O6	3,25
Ala207/CB	MMA/O6	3,21
Asp208/CG	MMA/O6	3,20
Asp208/OD2	MMA/C4	3,40
Gly207/CA	MMA/O3	3,33
Met208/CG	MMA/O3	3,37
Met208/CE	MMA/C3	3,10
Met208/CE	MMA/O3	2,75

Source: prepared by the author. Interactions were calculated by CONTACT software (CCP4).

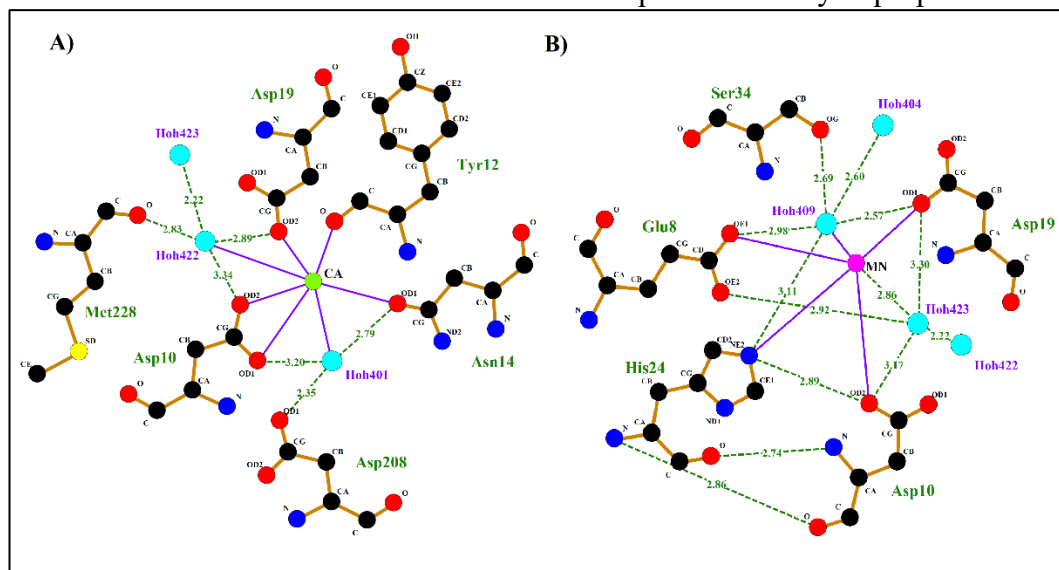
The presence of calcium and manganese ions was confirmed in the tertiary structure of Cvill, confirming that this lectin is a metalloprotein. The MBS residues are symmetrically arranged through an octahedral molecular geometry by these metals. Residues participating in the metal binding site (MBS) are quite conserved, with the calcium ion coordinating residues Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 and two water molecules and the manganese ion coordinating residues Glu8, Asp10, Asp19, and His24 and two water molecules as well (Figures 13 and 14). The MBS is located in the vicinity of the CRD, being essential for the establishment of its proper and active conformation (OSTERNE et al., 2017).

Figure 13 – Three-dimensional representation of Cvill's MBS. The residues involved in the site are represented as sticks, the rest of the tertiary structure of the lectin is represented in cartoons. The green, purple and red spheres represent calcium and manganese ions and water molecules, respectively.



Source: prepared by the author. The image of Cvill's MBS in surface and stick representation was constructed using PyMOL 2.0 software

Figure 14 – Octahedral coordination of calcium and manganese ions in Cvill MBS. The green (Ca), purple (Mn) and light blue (Hoh401, Hoh404, Hoh409, Hoh422 and Hoh423) spheres represent calcium, manganese and water molecules respectively. Hydrogen bonds are represented by green dashed lines, and coordination with metal atoms are represented by purple lines.



Source: prepared by the author using LigPlot software.

The coordination of Asp208 residue (Figure 14) by the calcium ion through a bridge with a water molecule is what makes possible the establishment of the "cis-peptide" conformation between residues Ala207 and Asp208. The cis-peptide is typically found in legume lectins, and it plays a big part in assisting the correct arrangement of CRD residues

(Figure 13) (CAVADA et al., 2019c; LORIS et al., 1998).

Similarly to Asp208, Met228 is also coordinated by calcium through a water bridge. This interaction may be one of the causes of the strong binding of calcium to the MBS, making Cvill demetallization through chelating agents an extremely difficult process, as observed by bench experiments with Cvill (LOSSIO et al., 2017). Met228 also participates in the carbohydrate binding, as previously mentioned. Cvill was the first Diocleinae lectin to present a methionine at position 228, studying the interaction of this lectin with other ligands by bioinformatics or benchtop experiments will help to elucidate the differences that this mutation may or may not cause to Cvill's carbohydrate affinity profile.

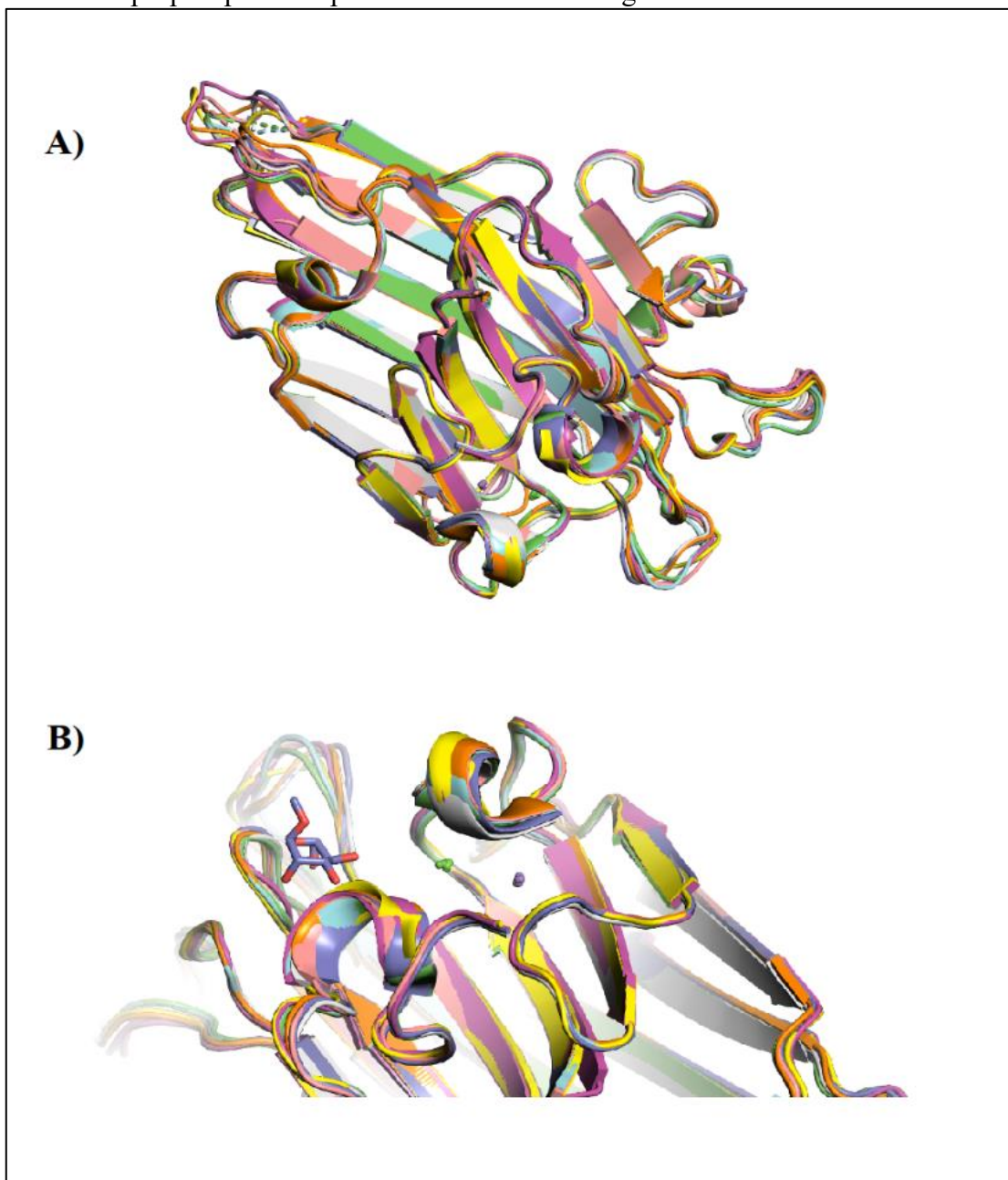
Figure 15A shows the alignment among the three-dimensional structures of Cvill with lectins from *C. boliviana* (PDB ID 4K1Y), *C. bonariensis* (PDB ID 5U3E), *C. brasiliensis* (1AZD), *C. gladiata*, (PDB ID 2P2K), *C. gradiflora* (PDB ID 4L8Q), *C. maritima* (PDB ID 2P34), and *C. virosa* (PDB ID 5F5Q), with figure 15B highlighting the CRD and MBS regions. Through this alignment it is possible to visualize that the β -sandwich three-dimensional structure is visibly well conserved among these lectins and that the structural changes that can be noted are mainly concentrated in the regions of the loops. Interestingly enough, three-dimensional structure similarities do not necessarily mean that these lectins show the same results in biological activities, as it is known that ConA-like lectins can present considerably different results in inflammation and nociception activities depending on the route of lectin administration, for example (CAVADA et al., 2019b).

The alignment of protomers was done using PyMOL alignment plugin (SCHRÖDINGER, 2015). Cvill deposited structure was used as reference (PDB ID 5BKR). According to the root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD, Table 6), CaBo was the lectin that best overlapped the three-dimensional structure of Cvill, while ConGF showed the greatest differences in the RMSD values, which are unexpected results, since once it's considered only the primary structure information, ConGr is the lectin that best aligns with Cvill. The RMSD results, however, in general are very similar, not indicating noteworthy differences between the tertiary structures within this group.

In addition to what's been observed regarding the carbohydrate recognition domain and metal binding sites, it is interesting to note that there are other conserved regions of the amino acid sequence that may be involved with the assembly of other sites, such as the hydrophobic site (HS), that has been observed beforehand in CGL lectin (PDB ID 2D7F) (DELATORRE et al., 2007), and ConBr (PDB ID 3JU9) (BEZERRA et al., 2011). These lectins have already had their structures solved with hydrophobic ligands occupying the HS, which is

mainly formed by the conserved residues Leu115, Leu126 and Val179, and is located between the beta sheets of the β -sandwich. Cvill presents conserved residues with CGL and ConBr within this hydrophobic region, which indicates that it may also be able to interact with hydrophobic ligands through this site.

Figure 15 – Superposition of Cvill's three-dimensional structure (in purple) with other *Canavalia* lectins. (A) The lectin from *C. villosa* was used as a reference in the alignment with the lectins from CBol, Cabo, ConBr, CGL, ConGF, ConM, and ConV, whose colors are shown in table 6. (B) CRD and MBS regions zoomed in to exhibit the α -methyl-mannoside ligand (in purple) positioned on the conserved binding sites. Green and purple spheres represent calcium and manganese ions.



Source: elaborated by the author. The image of *Canavalia* lectin structures superimposition was built using PyMOL 2.0 software.

Table 6 – Root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) of *Canavalia* lectins in relation to Cvill

Species	Lectin	PDB ID	RMSD	Color - Figure 15
<i>C. boliviana</i>	CBol	4K1Y	0.429	Pink
<i>C. bonariensis</i>	CaBo	5U3E	0.317	Salmon
<i>C. brasiliensis</i>	ConBr	1AZD	0.412	Yellow
<i>C. gladiata</i>	CGL	2P2K	0.454	Green
<i>C. grandiflora</i>	ConGF	4L8Q	0.466	Gray
<i>C. maritima</i>	ConM	2P34	0.390	Ciano
<i>C. virosa</i>	ConV	5F5Q	0.380	Orange

Source: prepared by the author. RMSD calculation was performed by PyMOL software.

5.3 Carbohydrate Interaction Assays

5.3.1 Glycan array

Glycan array results exposed interesting information about Cvill's fine specificity towards carbohydrate and N-glycans. For example, this experiment confirmed that Cvill presents the expected affinity towards the tri-mannosidic nucleus of complex N-glycans that ConA-like lectins usually have, as previously observed in DGL, ConBr and DVL (DAM et al., 1998; DAM; OSCARSON; BREWER, 1998; MANIMALA et al., 2006; MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012).

The presence of terminal GlcNAc or GalNAc did not appear to exert much influence on the affinity of Cvill for the tri-mannosidic nucleus of biantennary N-glycans (DAM et al., 1998). Interactions involving high-mannose and hybrid glycans also showed good results, as expected, as Cvill is a mannose-specific lectin (Figure 16) (CAVADA et al., 2019b).

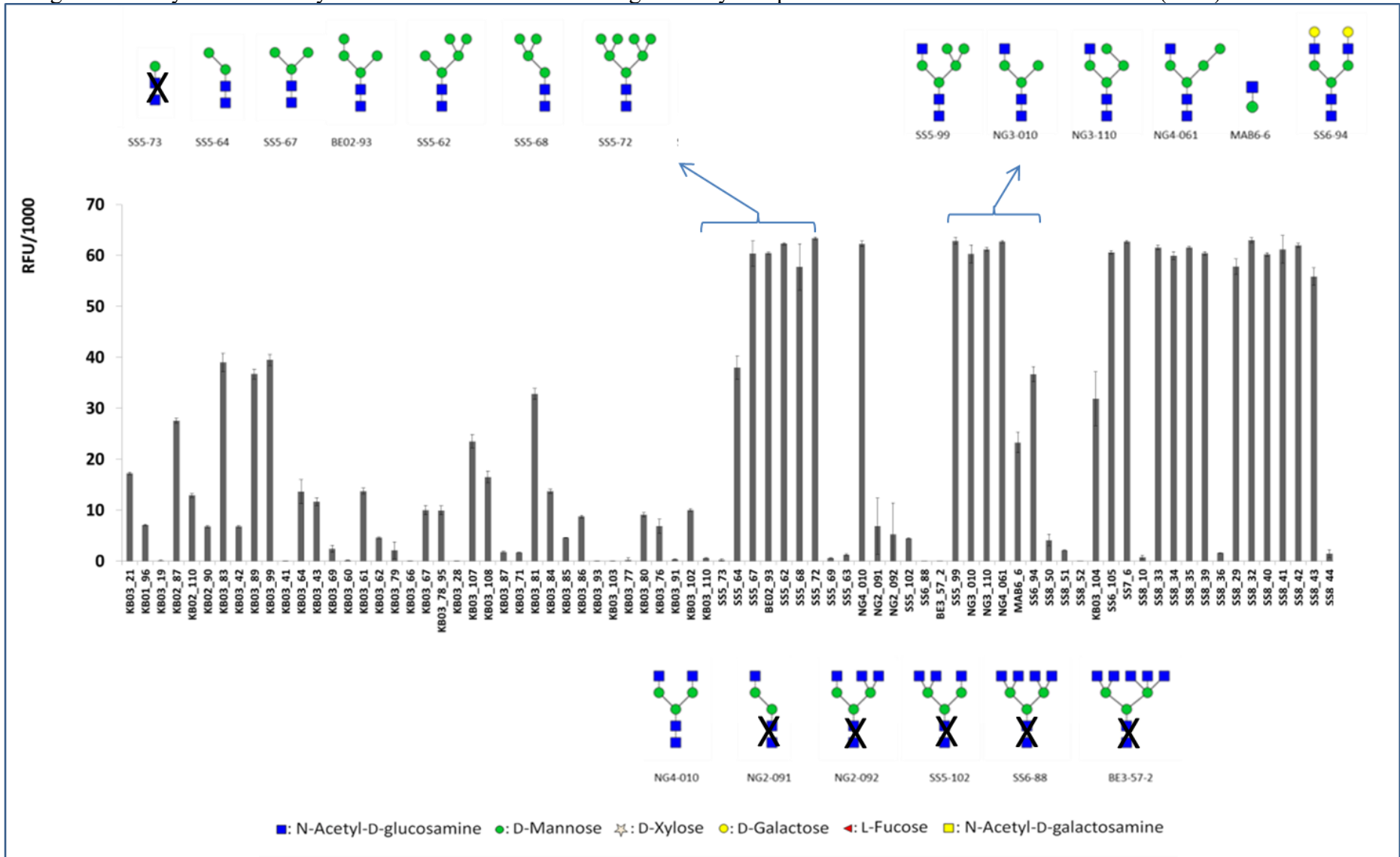
N-glycans with core fucosylation interacted with Cvill's CRD with similar intensities as the non fucosylated N-glycans. The fucose did not cause much differences in these interactions, in Cvill's case. There are reports, however, of lectins, such as the one from *Lens culinaris* (LCA), that presented an increased interaction with core-fucosylated N-glycans, when compared to the non-fucosylated ones. This difference was explained based on the geometry that the N-glycan presents when interacting with the CRD. When LCA binds to a core fucosylated N-glycan, the fucose occupies a hydrophobic pocket located in the CRD vicinities,

favorably positioning the mannosidic nucleus of the N-glycan inside the CRD, and ultimately contributing to the interaction with the lectin (MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012).

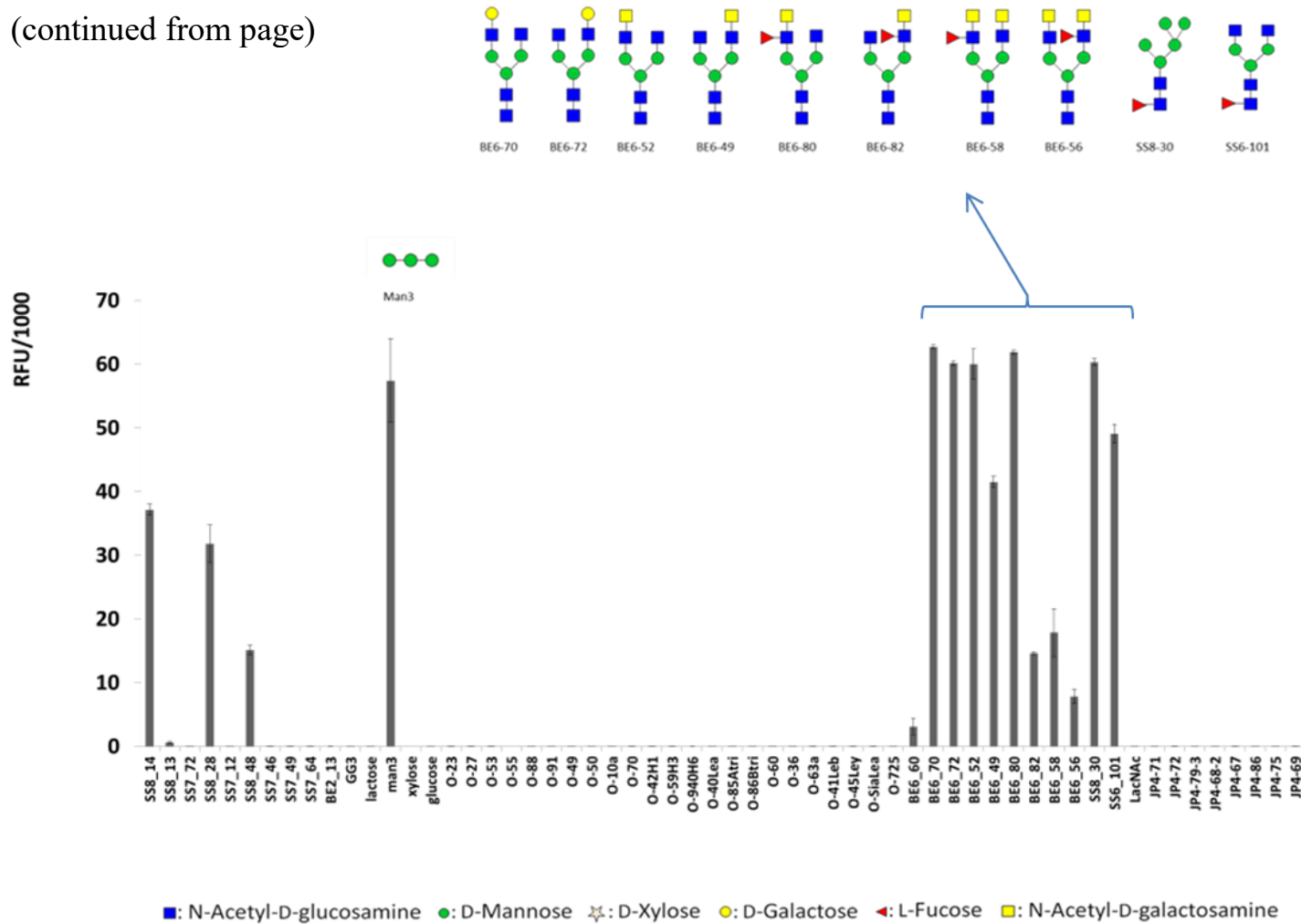
Multi-antenna complex N-glycans that have 3 or more branches had their interactions with Cvill significantly impaired or completely nullified, probably due to steric impairments caused by multi-branches. Similar results were observed with N-glycans containing D-xylose added to the core mannoses. This type of D-xylose modified N-glycan is widely found in plants (STRASSER et al., 2004). Since Cvill is a plant lectin, and these proteins have many of their intrinsic functions associated with defense (DELATORRE et al., 2007; PEUMANS; VAN DAMME, 1995), one of the reasons why Cvill interacts poorly with D-xylose modified N-glycans may be due to a plant mechanism that directs the lectin interaction mainly towards exogenous glycans from pathogens.

Cvill was also able to differentiate between glycans with asymmetrical branches. The interaction of Cvill with biantennated complex glycans with a fucose and GalNAc added to a single antenna was drastically different depending on whether the additions were linked in arm 3 or 6 (Figure 16, glycans BE6-80 and BE6-82). The influence of both fucose and GalNAc seems to be fundamental in this binding, since no large differences are observed in the interaction between the same N-glycans in the absence of fucose (Figure 16, BE6-52 and BE6-49 glycans) or in N-glycans that contained terminal GalNAc in both arms, with only the fucose position being different between them (Figure 16, BE6-58 AND BE6-56). Similarly, it was previously reported that the lectin from *Platytodium elegans*, (PELa) a legume of the subtribe Dalbergiae, was also able to differentiate between asymmetric N-glycans (BENEVIDES et al., 2012b). Thus, it is interesting to observe how carbohydrate isomerism can be fundamental in determining the interaction with lectins (ECHEVERRIA et al., 2018; WANG et al., 2013), reinforcing the idea that stereoisomeric glycans acting as informational molecules can transmit different information depending on which isomer is used by the cell.

Figure 16 – Glycan microarray of *C. villosa* lectin. The binding intensity is represented in relative fluorescence units (RFU).



(continued from page)



Source: carried out in collaboration with the CIC biomaGuNE research center.

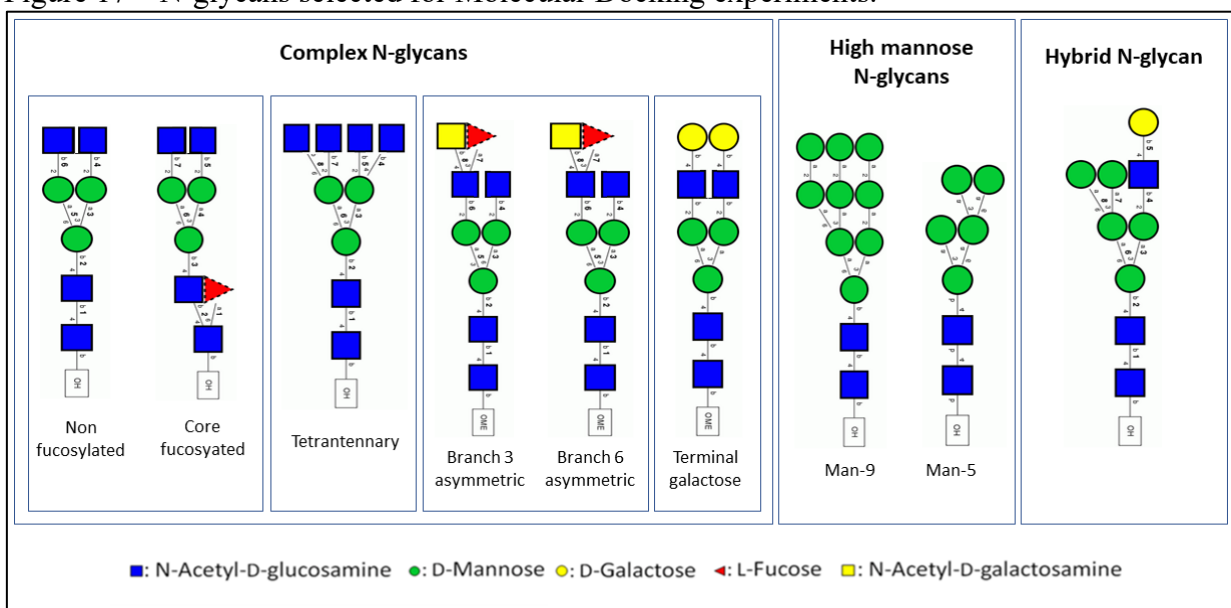
The pandemic of the new coronavirus, that extended throughout the whole year of 2020 and is still active in 2021, has made many victims so far and due to this, many scientific resources are being currently devoted to research on this topic in order to mitigate the virus restrictive and lethal effects. Studies that are developed in the area of glycobiology on the SARS-CoV-2 virus are constantly updated, and part of the glycan composition of SARS-CoV-2 spike protein has been characterized already. Interestingly, some of the glycans tested in Cvilla's glycan array are commonly found in the spike protein of the new coronavirus. Results have shown that Cvilla binds relatively well to them. These glycans are the N-glycans Man-9 (id SSS-67 in the glycan array) and the complex N-glycan biantennary with terminal galactose (id SS6-94, on the glycan array). In the virus, these carbohydrates are exposed prone to interactions with lectins as they cover more than 40% of the exposed area of spike protein (GRANT et al., 2020), what makes these glycans interesting targets for inactivation studies using mannose specific lectins.

Glycans tested in the glycan array assay were previously used in (ACHILLI et al., 2020) and in (ECHEVERRIA et al., 2018).

5.3.2 Molecular Docking

Seeking to better understand the type and number of interactions that saccharides establish with Cvilla's CRD, and also aiming to study the possible geometry that these flexibilized ligands acquire during this bonding, some of the N-glycans with interesting results in the glycan array experiment were chosen for molecular docking analysis. Not by chance, some of these selected glycans are membrane carbohydrates that are known to be part of the glycocalyx of cancer cells, such as HeLa. It is known that metastatic cells and cervical cancer cells present a glycocalyx rich in high mannose N-glycans (HORVAT et al., 2012; OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017; TURIÁK et al., 2019), and since Cvilla has specificity towards this type of glycan, as shown in the sugar activity inhibition experiments and by Glycan Array, the docking experiments were focused on predicting how Cvilla would interact with these typical tumor molecules. Complex biantennary N-glycans with terminal galactose and high mannose N-glycans Man-5 or Man-9 fit this profile of target molecules and were therefore selected for docking analysis (ABDEL RAHMAN et al., 2015; GAO et al., 2017; HORVAT et al., 2012; LOSSIO et al., 2017; TURIÁK et al., 2019).

Figure 17 – N-glycans selected for Molecular Docking experiments.



Source: prepared by the author using images of glycans downloaded from the GLYCAM-Web portal.

As previously mentioned, core fucosylated N-glycans, biantennary N-glycans with terminal galactose and high-mannose N-glycans are commonly found in the spike protein of SARS-Covid-2 (GRANT et al., 2020), reinforcing the choice of these carbohydrates for this experiment. The selected glycans are described in Figure 17 and their nomenclatures as well as the score values obtained in docking results are shown in Table 7.

Table 7 – Full nomenclature and scores (PLP.Fitness) of the glycans tested in the molecular docking experiments

Glycan	GLYCAM condensed nomenclature	Score
Complex non fucosylated	DGlcNAc β 1-2DMan α 1-6[DGlcNAc β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNAc β 1-4DGlcNAc β 1-OH	-61,89
Core fucosylated	DGlcNAc β 1-2DMan α 1-6[DGlcNAc β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNAc β 1-4[LFuc α 1-6]DGlcNAc β 1-OH	-66.61
Tetra-antennary complex glycans	DGlcNAc β 1-6[DGlcNAc β 1-2]DMan α 1-6[DGlcNAc β 1-2[DGlcNAc β 1-4]DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNAc β 1-4DGlcNAc β 1-OH	-36.89
Branch 3 asymmetric	DGalpNAc β 1-4[LFuc α 1-3]DGlcNAc β 1-2DMan α 1-6[DGlcNAc β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNAc β 1-4DGlcNAc β 1-OME	-64.27
Branch 6 asymmetric	DGalpNAc β 1-4[LFuc α 1-3]DGlcNAc β 1-2DMan α 1-3[DGlcNAc β 1-2DMan α 1-6]DMan β 1-4DGlcNAc β 1-4DGlcNAc β 1-OME	-48.83

Continued on next page

Glycan	GLYCAM condensed nomenclature	Score
Terminal galactose	DGalp β 1-4DGlcNac β 1-2DMan α 1-6[DGalp β 1-4DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DManp β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OME	-65.07
High mannose Man-5	DMan α 1-6[DMan α 1-3]DMan α 1-6[DMan α 1-3]DManp β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-58.32
High mannose Man-9	DMan α 1-2DMan α 1-6[DMan α 1-2DMan α 1-3]DMan α 1-6[DMan α 1-2DMan α 1-2DMan α 1-3]DManp β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-69.33
Hybrid	DMan α 1-6[DMan α 1-3]DMan α 1-6[DGalp β 1-4DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DManp β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-67.30
MMA	α -methyl-mannoside	-30.39

Source: prepared by the author. Docking experiments and scores were calculated using GOLD software.

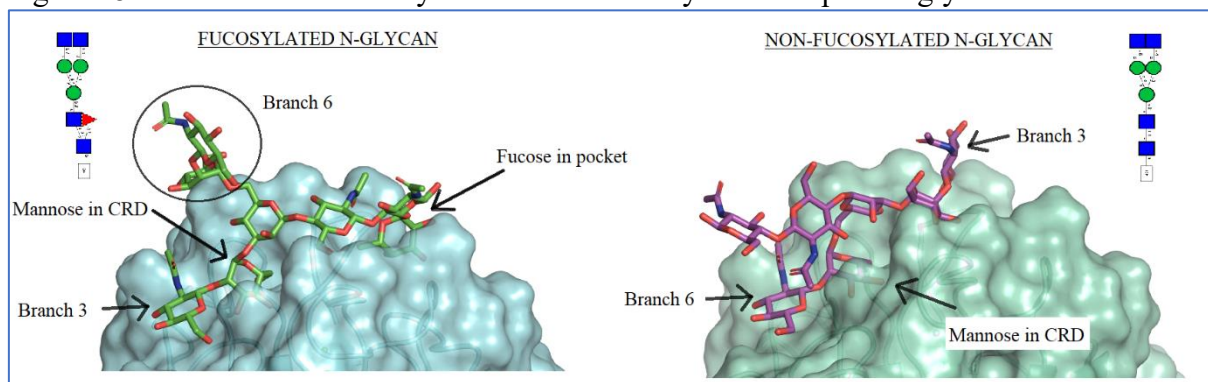
The altered glycocalyx of cancer cells may be deeply involved with tumor progression and metastasis (PINHO; REIS, 2015), and due to this, understanding how these mutated glycoconjugates interact with carbohydrate binding proteins such as lectins might be a good method to study the modulation of cellular responses that involve the glycode. The N-glycans of HeLa cells that were included in docking experiments had their three-dimensional structure described by mass spectrometry previously in works that described HeLa cells glycan profiling (GAO et al., 2017; HORVAT et al., 2013; TURIÁK et al., 2019).

Molecular docking results show that Cville interacted well with all chosen ligands, with the exception of the tetra-antennary complex N-glycan. The best scores, which indicate the best interactions, were assigned to the high mannose man-9 N-glycan and to the hybrid N-glycan, as shown in Table 7. The binding affinity was accessed through the PLP.PLP scoring function from GOLD software. The more negative the value of the empirical score assigned to the complex, the stronger is the interaction between Cville and the tested glycan. The validation was performed with the deletion and redocking of α -methyl-mannoside in Cville's CRD, which presented an RMSD of 0.52.

In general, Cville presents affinity towards the mannose residues of the Man3GlcNAc2 nucleus of the N-glycan, sometimes interacting with the branch 3 mannose, other times interacting with branch 6 mannose. Other Diocleinae lectins also have this affinity profile for the core mannose of N-glycans as previously observed in microcalorimetry and molecular docking experiments (CAVADA et al., 2018; DAM; OSCARSON; BREWER, 1998; LEAL et al., 2018). Cville's results usually presented interactions with the ligand occupying very

specific coordinates, such as core mannoses occupying geometries that overlap almost perfectly with the coordinates of the crystallized structure α -methyl-mannoside.

Figure 18 – Interactions of fucosylated and non-fucosylated complex N-glycans in Cvilla's CRD.



Source: prepared by the author. Images built using PyMOL.

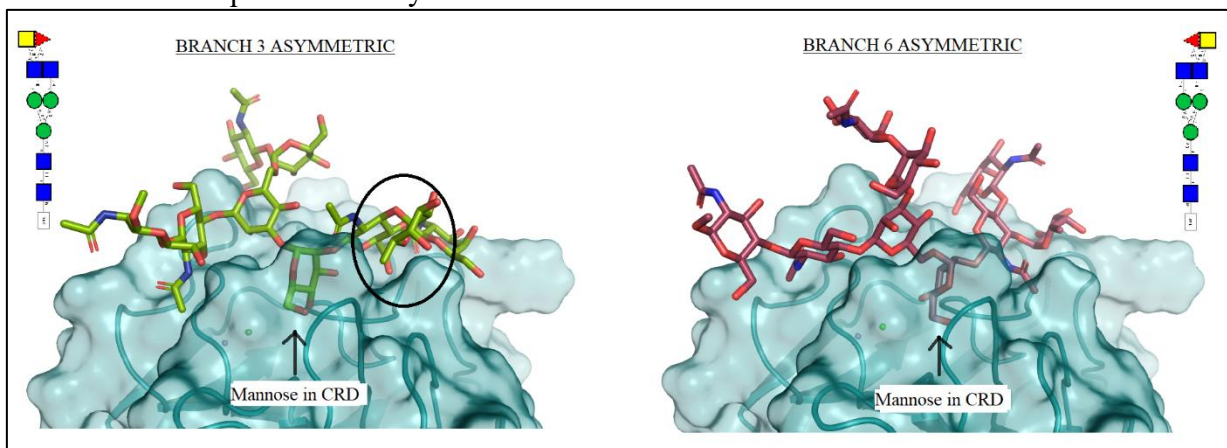
Fucosylated and non-fucosylated complex-type N-glycans bound with some of the highest scores to Cvilla's CRD. Although the score for the core fucosylated structure is higher than that of the non-fucosylated structure, the difference was not so important, and thus, these results confirm that fucosylation in the GlcNAc nucleus does not cause a great difference in the intensity of the binding. Considering the geometry of the interaction, fucose fits into a hydrophobic pocket close to the CRD, stabilizing the ligand in place, similarly to what happens with the LCA lectin (MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012). This interaction of fucose, however, is not enough to make the score difference between these two glycans large, and one of the reasons for this may be because the non-fucosylated N-glycan also fits well to the binding site, but differently from the first, positioning both antennae into pockets on the lectin surface (Figure 18).

As seen in table 7, the tetra-antennary N-glycan interacted weakly with Cvilla, as the four antennae probably provided considerable steric hindrance to the mannose nucleus, blocking it from interaction with the lectin CRD. Part of the structures generated by docking proposed interactions between the CRD and a GlcNAc residue of the ligand, but bench experiments showed that this monosaccharide is not able to inhibit, and therefore, bind Cvilla. (LOSSIO et al., 2017). The generated lectin-ligand complexes that suggested GlcNAc in the CRD were discarded and were only considered structures that suggested the core mannose interaction with the CRD. Considering that molecular docking only uses mathematical models to calculate its results on top of a rigid protein structure, it is important to evaluate the results well and to know the target molecule in depth to consider the various chemical, conformational

and biological variables that can also have a great influence on the results of interactions with ligands. This methodology for studying interactions between molecules becomes, however, extremely valid once its limitations are known, since it provides valuable information about the molecular geometry of interactions and is an important starting point for more in-depth and accurate studies of molecular dynamics.

Considering the binding results of asymmetric N-glycans to Cvill, it was observed that the CRD interaction was always directed towards the core mannose belonging to the N-glycan branch that contained the fucose and galactose residues. This switch between antennas that interact with CRD causes a large difference in binding strength in glycan array assays, which showed that the asymmetric N-glycan with Fuc/GalNAc added to branch 3 interacts more intensely with Cvill than does branch 6 (Figure 16). Molecular Docking confirmed what was previously seen on glycan array, with branch 3 asymmetric glycan presenting a stronger interaction. It is interesting to note how the difference in symmetry between these ligands can cause such contrasting interactions, and how the lectin is sensitive enough to identify this. In Figure 19, it can be seen that fucose, when connected to branch 3, fits into a hydrophobic pocket (highlighted in the figure by a black circle), which does not happen with the fucose of branch 6 N-glycan. This fucose-pocket interaction may contribute to the difference seen in intensity.

Figure 19. Docking results of two asymmetric N-glycans and Cvill. The two interactions showed contrasting results, with the glycan that had the asymmetry in arm 3 presenting a stronger interaction with Cvill. The reason for this may be a stabilization that arises from the fucose fitting into a hydrophobic pocket close to the CRD (marked with a circle in the figure). Cvill surface is represented in cyan.

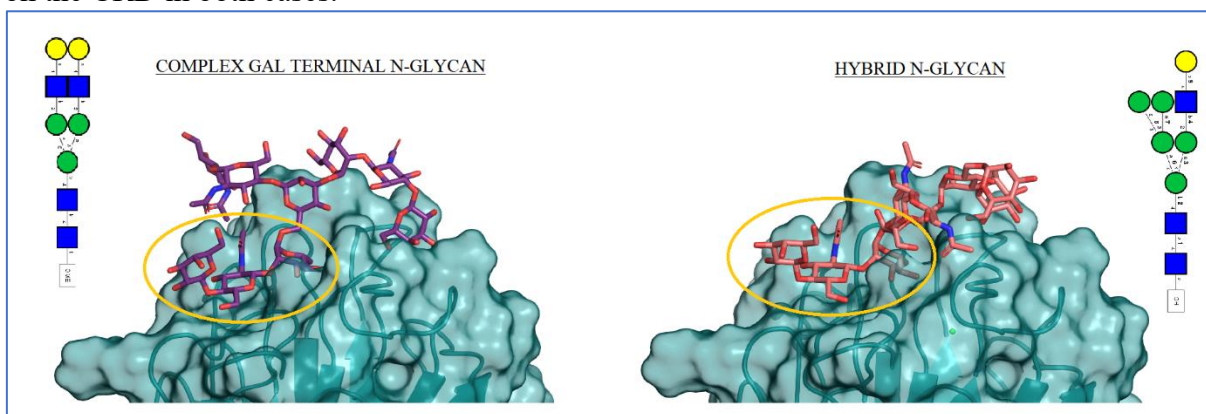


Source: elaborated by the author. Images built using PyMOL software.

For the case of high mannose N-glycans, Cvill interacted well with the core mannose from both Man-5 and Man-9. Man9 presented the best score among the glycans that were tested in Molecular Docking experiments.

The complex N-glycan with Gal terminal and the hybrid N-glycan both presented similar geometry in the binding site (Figure 20), with the Gal-GlcNAc-Man arm positioned in the CRD for both cases. Both complexes also presented high score values. Stabilization may be due to the favorable fit of these glycans to the extended binding site of the lectin, as can be seen in the figure, where other saccharide residues fit well into the protein surface.

Figure 20 – Molecular docking results of Cvill with complex N-glycan and hybrid N-glycan. The region highlighted with the yellow circle represents the Gal-GlcNAc-Man arm positioned on the CRD in both cases.



Source: prepared by the author. Images built using PyMOL software.

Docking results reinforce what was previously observed in glycan array analysis. In general, the experiments showed that Cvill is able to bind complex, high mannose and hybrid N-glycans, interacting mainly with the core mannose nucleus of N-glycosylation, in a similar way as observed with other mannose-specific Diocleinae lectins (CAVADA et al., 2019b, 2018; LEAL et al., 2018). Cvill interacted well with N-glycans present in the glycocalyx of HeLa cells, as well as with N-glycans of the spike protein of the SARS-CoV-2 virus (GRANT et al., 2020). It is known that some plant lectins, mainly those specific to mannose, are strong inhibitors of coronaviruses, as demonstrated in inhibition experiments of SARS-CoV 2002 viral replication (KEYAERTS et al., 2007). The ability of Cvill to interact well with glycans from the spike protein may indicate that, in the case of the 2019 strains, the inhibition would also be successful if tested with this lectin. These promising results show the great potential that Cvill has to be used as a biotechnological tool in the study of interaction with these biological models.

5.4 Biological activities

Considering the results of three-dimensional structure and interaction to ligands, as well as the cytotoxic profile that lectins homologous to Cvill present when tested in different cancer models, Cvill was evaluated for its biological activity in a HeLa cell model.

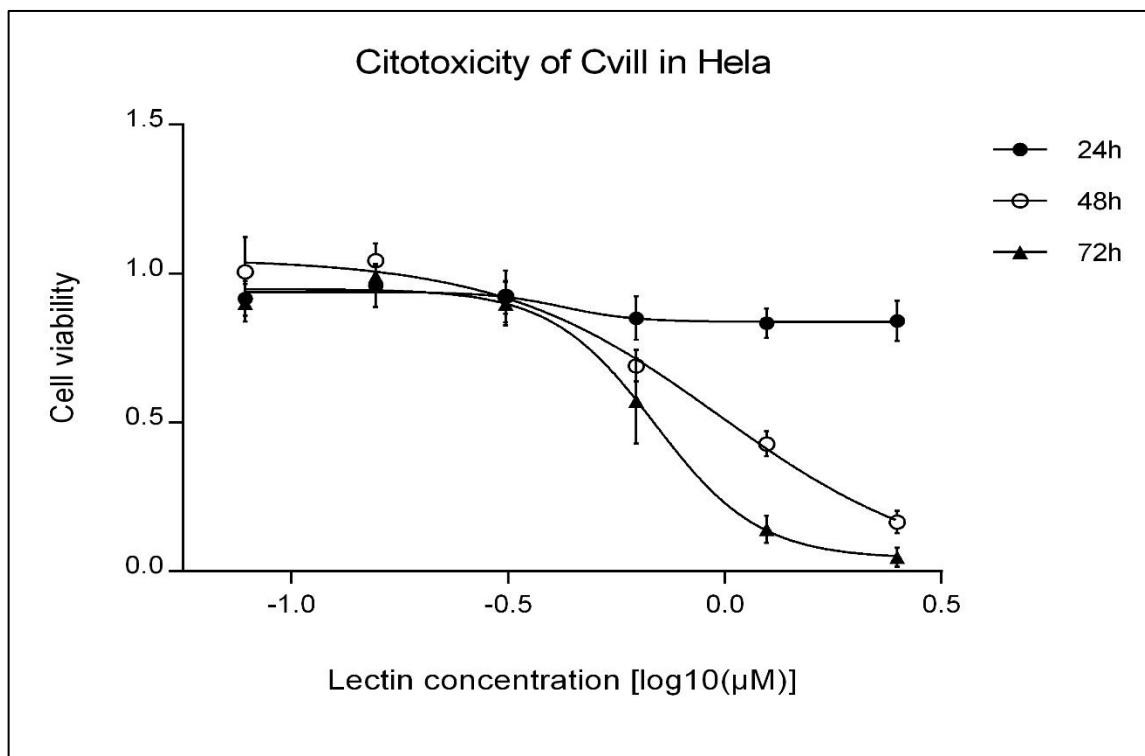
5.4.1 Cytotoxicity in HeLa cells

Canavalia villosa lectin presented dose-dependent cytotoxicity in HeLa cells with CRD participation. The six doses tested (250.0 µg/mL, 125.0 µg/mL, 62.5 µg/mL, 31.25 µg/mL, 15.6 µg/mL and 7.81 µg/mL) were prepared in sterile PBS by serial dilutions. Incubation of the lectin with its specific sugar α -methyl-mannoside prior to the assay prevented the toxic activity of the lectin. The α -methyl-mannoside sugar also did not show cytotoxic action against cells when incubated alone at 100 mM. Cvill results were obtained from three independent experiments, each performed in triplicate. The three different incubation times tested, 24 h, 48 h and 72 h, presented significantly different results from each other at the highest doses of the lectin application (Figure 21). The cytotoxic activity of Cvill had previously been reported in an unpublished monograph work that showed that *C. villosa* lectin induced cell death and inhibition of cell proliferation in C6 glioma lineage in a CRD-dependent manner (WELTER, 2018).

Cvill presented IC₅₀ values for HeLa cells of 97.09 µg/mL for the 48h incubation period ($R^2 = 0.9534$) and 68.97 µg/mL for cells incubated for 72 h ($R^2 = 0.9606$). IC₅₀ values were calculated using non-linear regression using GraphPad Prism 6 software. For the 24 h incubation period it was not possible to calculate the IC₅₀ value due to outline of the dose-response curve itself which did not provide reliable R^2 values.

The cytotoxic action of legume lectins on neoplastic cells has been documented from mid-1970s to the present day. Sandvig's work (SANDVIG; OLSNES; PIHL, 1976; SANDVIG, 1978) involving the RIP type lectin abrin from *Abrus precatorius* were some of the pioneer works developed on cytotoxicity research in HeLa cells. The ability of lectins to specifically agglutinate tumor cells, observed in these early studies, supported the theory that cancer cells have different glycosylation patterns when compared to healthy cells (SHARON, 2008).

Figure 21 – Dose-response curve of Cvill cytotoxicity in HeLa cells after incubation for the periods of 24, 48 and 72h. Cell viability is expressed as the ratio between cytotoxic responses and control. The points on curves represent the means between the triplicate values and the bars represent the standard deviations. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times.



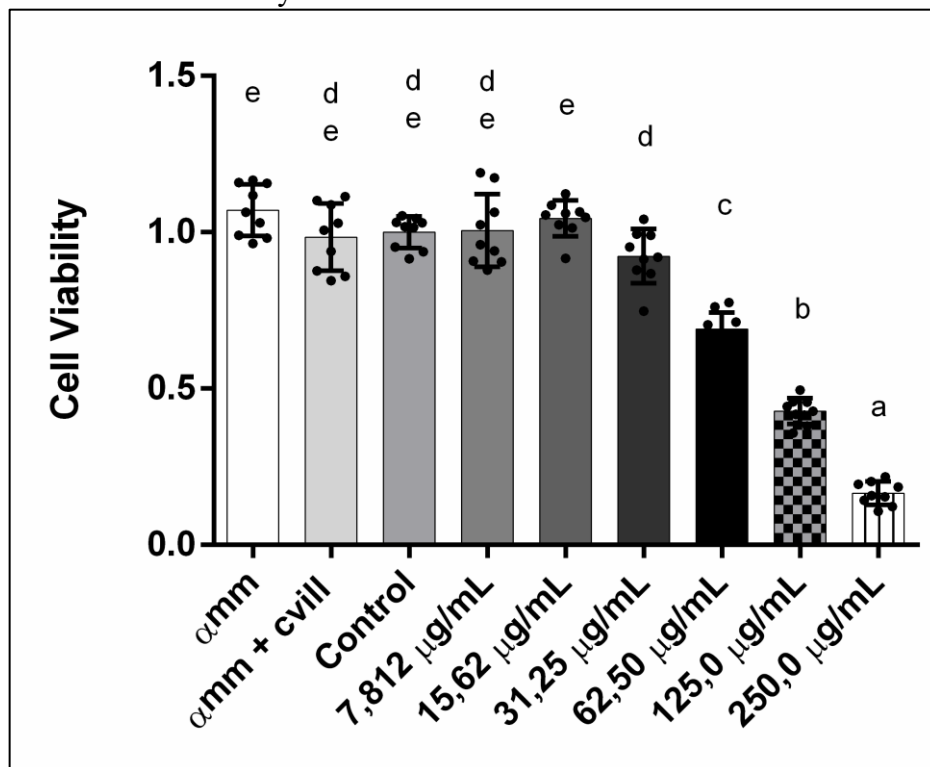
Source: Prepared by the author. Graph constructed GraphPad Prism software.

Since then, several legume lectins such as ConA (ROY et al., 2014), ConBr (SILVA et al., 2014b), ConV (OSTERNE et al., 2017), CaBo (CAVADA et al., 2018), DVL (NASCIMENTO et al., 2019), PSA (KABIR et al., 2013), SFL (*Sophora flavescens* lectin, tribe Sophoreae) (LIU et al., 2008), and AMML (*Astragalus mongholicus* lectin) (YAN et al., 2009), also had their cytotoxic and antiproliferative actions evaluated in models of cervical cancer or in other cancer models, such as glioblastoma, carcinoma or melanoma types, to name a few. Outside of the Legume family, one can also observe an anticancer potential already documented for the plant lectins of *Musa acuminata* (Musaceae family) (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021), *Pinellia ternata* (Araceae family) (ZUO et al., 2012), *Viscum album* (Viscaceae family) (BANTEL et al., 1999), *Triticum aestivum* (Poaceae family) (GABOR; KLAUSEGGER; WIRTH, 2001), and *Artocarpus incisa* (Moraceae family) (BENOIST et al., 2009), among others, indicating that such competence is not limited only to the lectins from the Fabaceae family.

A. incisa lectin, also called frutalin, is a galactose specific jacalin-like that presented LC50 values in HeLa of 100 μg/mL (OLIVEIRA et al., 2011), quite similar to that of Cvill for

the period of 48 h incubation. Other lectins, in general, present lower IC₅₀ values and are therefore more toxic than Cvill for HeLa cells, such as the mannose-specific lectin *Musa acuminata* (MAL) lectin, with an IC₅₀ value of 13.25 µg/mL for incubations of 24 h (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021), and *Pinellia ternata* lectin (PTL), with an IC₅₀ of less than 10 µg/mL for an incubation period of 48 h (ZUO et al., 2012). The exception for this rule is the lectin from *Indian hyacinth*, which had an IC₅₀ of 158 µg/mL, a dose considerably higher than the dose of Cvill needed to decrease cell viability in 50% in the HeLa cell populations (NAIK et al., 2017).

Figure 22 – Cytotoxicity of Cvill in HeLa cells after incubation for 48 h and reversion of lectin activity by incubation with specific sugar. Cell viability was assessed using the PrestoBlue assay and is expressed as the ratio between cytotoxic and control responses. To block lectin activity the lectin was prepared at 250 µg/mL and incubated previously with 100 mM α -methyl-mannoside prior to the cytotoxicity assay. Significance was assessed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test with a 95% confidence interval. Bars represent the mean \pm SD of three experiments in triplicate. Bars that share no lowercase letters are considered statistically different.



Source: prepared by the author. Graph constructed by GraphPad Prism software.

Considering the LC₅₀ values of *Canavalia* lectins, it is interesting to note that they vary according to both the lectin and cell model tested. ConA proved to be quite toxic in

different cell cultures, with IC50 values of 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in human breast carcinoma cells (SHI et al., 2014), of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in hepatoma tissue culture (CHANG et al., 2007), of 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in leukemia cells (FAHEINA-MARTINS et al., 2012) and of around 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in HeLa cells (ROY et al., 2014), while ConV, which presents 91.14% identity with Cvill, had a IC50 of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in glioma cells (OSTERNE et al., 2017), a result very similar to that of Cvill in HeLa culture.

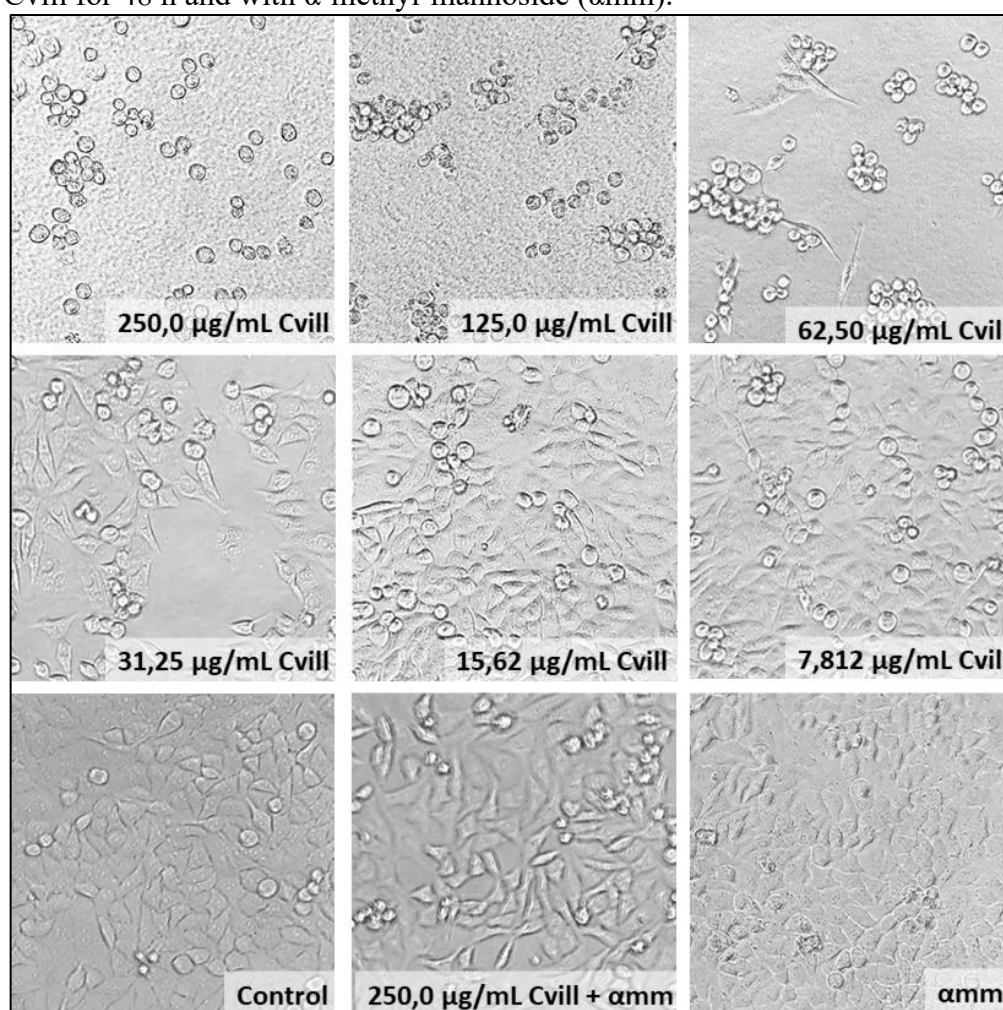
Regarding the results of the incubation of HeLa cells with Cvill over the interval of 48 h (Figure 22), it is possible to observe that the doses 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 62.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 31.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 15.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were statistically different when compared to each other. Incubation of cells with α -methyl-mannoside at 100 mM (in the figure called αmm) did not result in a statistically different result from the control, which shows that sugar alone has no effect on the cells tested. The sugar reversion experiments showed that the lectin prepared at 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ completely lost its cytotoxic activity when previously incubated with its specific sugar at 100 mM. Thus, the lectin bound to sugar did not show statistical difference with the control, but Cvill with the free CRD showed a clear distinction when tested at a dose of 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and compared with the control. These data definitely indicate that the lectin exerts its cytotoxic activity with the involvement of CRD.

To investigate changes in cell morphology, an optical microscope with 20x magnification was used. Changes in cell number and morphology were observed in the three incubation periods tested, especially at the highest doses of the lectin. Figure 23 shows that, over the 48 h period, Cvill clearly caused agglutination of HeLa cells at the doses 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 62.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, especially at the two higher doses. The agglutinated cells became round and lost the ability to adhere to the bottom of the wells and instead adhered to each other. At lower doses, the cells maintained the elongated morphology of HeLa cells, as well as in the control, reaching confluence. Incubation of the lectin with its specific sugar α -methyl-mannoside (αmm) for 30 minutes prior to the assay reversed the toxic and agglutinating effects of the lectin. Incubation of cells with α -methyl-mannoside alone did not result in changes in morphology or agglutination.

Similar changes in the cellular morphology of HeLa cells were also observed in assays with the native and recombinant forms of frutalin lectin (OLIVEIRA et al., 2011) and the mannose-specific lectin MAL (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021). In these, the cells agglutinated, also lost adherence to the bottom of the well and became round. ConA and SFL also showed promising and similar cytotoxic results in MCF-7 human breast carcinoma cells, without showing such morphological changes in the non-cancerous cell line MCF-10A (SHI et al., 2014). In glioma models, ConBr, ConV, Cabo and DVL lectins showed

morphological changes that also involved the change from the cell's flattened to rounded shape besides loss of adhesion to the plate (CAVADA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019; OSTERNE et al., 2017; WOLIN et al., 2021). The morphological profile that cells acquire after treatment with lectins, including Cvill, has been shown to be dose and time-dependent. These changes also reflect a considerable decrease in cell viability, especially for doses that strongly affect cell shapes.

Figure 23 – Morphology of HeLa cells after incubation with different doses of Cvill for 48 h and with α -methyl-mannoside (α mm).



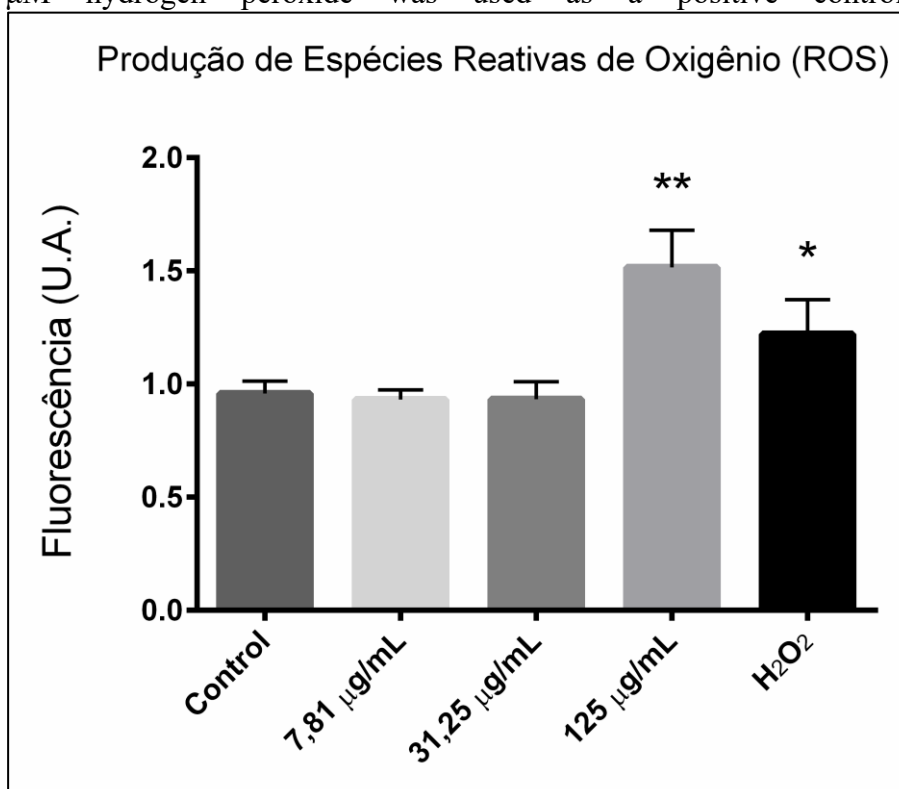
Source: prepared by the author. Photos were taken from an optical microscope at 20x magnification.

5.4.2 Production of reactive oxygen species

Considering the results of the cytotoxicity experiments, it is interesting to understand how and through which metabolic pathways the lectin is acting and causing the loss

of cell viability in cancer cells. Thus, the evaluation of the production of reactive oxygen species (ROS) is an interesting experiment to be considered initially, which gives quick answers about the cell's oxidative stress level and about the mitochondrial involvement in cell damage.

Figure 24 – Evaluation of reactive oxygen species (ROS) produced after 48 h of incubation of HeLa cells with Cvill. The dose of 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ caused an increase in the production of ROS when compared to the control and the other doses tested. Significance was assessed using the ANOVA test (** $p < 0.001$ and * $p < 0.01$ in relation to the control). 100 μM hydrogen peroxide was used as a positive control.



Source: prepared by the author using GraphPad Prism software.

To carry out ROS evaluation experiments, three doses of the lectin that involved low (7,812 $\mu\text{g}/\text{mL}$), intermediate (31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and high (125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cytotoxicity results were chosen. The positive control consisted of cells treated with 100 μM hydrogen peroxide, and the negative control contained cells incubated in the absence of the lectin (dose 0). It is possible to observe in the results (Figure 24) that in the two lowest concentrations of Cvill tested there was no indication of exacerbated production of ROS, while at the dose of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ there was an accumulation of ROS intracellularly and confirmation of a state of cellular oxidative stress. The accumulation of ROS can trigger the process of apoptosis in cells, in addition to being an indication of damage of the mitochondrial membrane (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; DA MOTA et al., 2012). With these data, it can be assumed that Cvill may

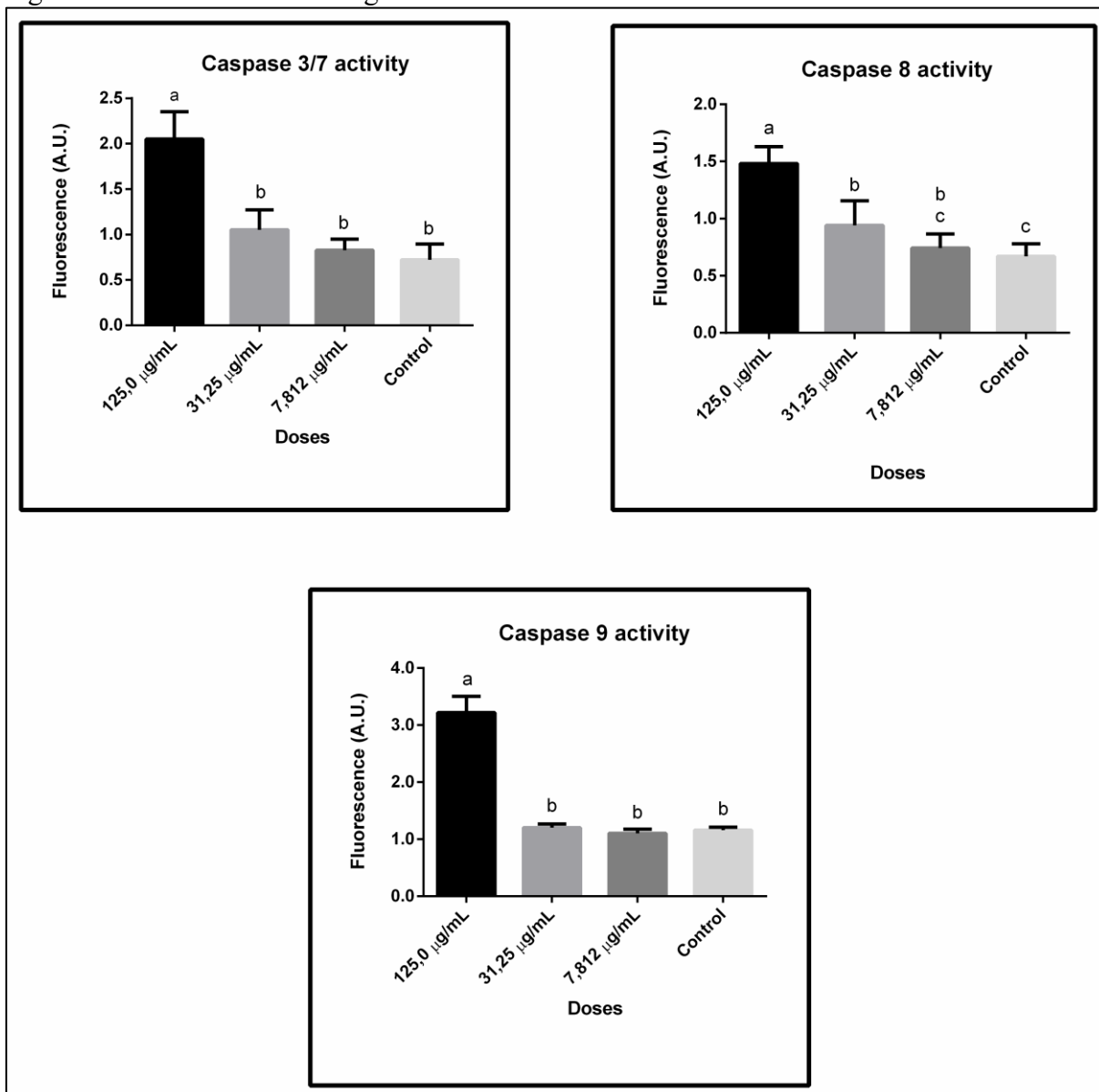
cause cell death by different mechanisms at the highest dose when compared to the intermediate and lower doses.

The increased production of ROS in HeLa cell models treated with agglutinins was previously observed for Eutirucallin lectin (galactose-specific lectin, extracted from the latex of *Euphorbia tirucalli*, from the Euphorbiaceae family) (PALHARINI et al., 2017), also with the RIP Abrin (BEHERA et al., 2014) and with SBA, lectin from soy bean (PANDA et al., 2014). In glioma cells, treatments with DVL, ConA and ConBr did not change the level of intracellular ROS (NASCIMENTO et al., 2019; WOLIN et al., 2021), however, in leukemia cells, ConA and ConBr stimulated the production of ROS considerably, but only at the highest concentration of lectins, with no significant response at low doses (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). These positive results only at high concentrations of lectins indicate that probably there is more than one active pathway of cell death, other than apoptosis, considering that the loss of viability and changes in cell morphology are also observed at the other doses that did not show increased ROS production. Furthermore, the differences between the responses in different cells also show that the cytotoxicity and the increased production of ROS intrinsically depend on the cancer strain under analysis and on the type of lectin tested.

5.4.3 Caspase activity

Considering the results of ROS production, and the possibility that apoptosis is one of the pathways by which Cvill causes cell death in HeLa cells, the possible role that Caspases 3/7, 8 and 9 may play in cytotoxic activity was studied using the Cell Meter™ Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Assay kit. High levels of caspase activity indicate the involvement of apoptotic processes. Caspases 8 and 9 are initiator proteases, while 3 and 7 are effector caspases. Both caspases 8 and 9 can activate caspases 3 and 7, and caspase 3 can also be activated via the mitochondrial pathway, independently of caspase 8 (BRETNALL et al., 2013; CORY; ADAMS, 2002). The activation of only caspase 8 indicates the start of the apoptotic process via the extrinsic pathway, while active caspases 3 and 9 indicate that the initiating pathway is the intrinsic or mitochondrial pathway. However, the pathways are not mutually exclusive, which means that both can be activated at the same time (HENGARTNER, 2000). The absence of any caspase activity, as what is seen at the lowest dose of 7,812 µg/mL Cvill shows that apoptosis probably was not initiated in this condition and for this period of time.

Figure 25 – Activity levels of caspase 3/7, 8 and 9. Three doses of Cvill were incubated with HeLa cells for 48 h. The graphs indicate the activity of caspase-3/7 (A), caspase-8 (B) and caspase-9 (C). Each bar represents the mean \pm SD of three different experiments in triplicate. Bars labeled with different lowercase letters indicate statistically different data (p -values < 0.01). Significance was assessed using ANOVA.



Source: prepared by the author. Graphs and statistics were composed using GraphPad Prism software.

The caspase assays showed that the activity level for all four cysteine proteases was increased at the highest dose tested, 125.0 $\mu\text{g/mL}$ Cvill (Figure 25). This result corroborates the ROS results, since high concentrations of oxidative species indicate the participation of mitochondria in the ongoing metabolic process, and considering the high level of activity of caspases 3/7 and 9, it can be inferred that apoptosis was initiated, at least in part, by the intrinsic or mitochondrial route. The high level of caspase 8 activity indicates that part of the active caspases 3 and 7 may have come from the action of Cas8, but due to the high rate of intracellular

ROS and caspase 9 it can be assumed that the mitochondrial pathway was also involved in the process.

Caspase 9 is also involved in intrinsic apoptosis. This caspase plays a role in the activation of effector caspases, release of cytochrome C from the mitochondria and increased production of ROS (BRETNALL et al., 2013), thus, the high presence of intracellular ROS observed in cells treated with the highest concentration of Cvill goes well with the high Cas9 activity observed at this concentration as well. Similarly to Cvill, *V. album* lectin also triggered apoptosis in HeLa cells (BANTEL et al., 1999), and ConA in melanoma cells (LIU et al., 2009) through a mechanism that involved the activation of Caspases 3, 8 and 9 besides involving the release of Cytochrome C. In the case of *Canavalia* lectins, what is observed is that the antineoplastic activity is usually triggered by the activation of autophagic pathways (BHUTIA et al., 2019; CAVADA et al., 2018; WOLIN et al., 2021), but Liu (LIU et al., 2009) and Shi (SHI et al., 2014) demonstrated that apoptosis via the mitochondrial pathway is also possible to be triggered in the case of lectins of this genus.

At the intermediate dose of 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ only caspase 8 was active (Figure 25), which indicates that, for this concentration, the mechanism of apoptosis through the intrinsic pathway, involving the mitochondria, is not occurring, since caspase 9 is inoperative. The caspase 8 activity indicates that apoptosis was initiated by the non-mitochondrial pathway, generally through interaction with TNFR cell death receptors (HENGARTNER, 2000). These results are once again validated by data from the ROS experiments, which indicated that there was no oxidative stress at the 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dose, indicating the non-involvement of the mitochondria at that dose. Cell death of tumor cells triggered by caspase 8 activation has also been observed in SFL (LIU et al., 2008), MAL (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021) and ConBr (WOLIN et al., 2021). In 2008, Benoist et al (BENOIST et al., 2009) demonstrated that Morniga M lectin, a mannose specific jacalin-like lectin, also caused caspase 8 activation in leukemia cells. In this work, Benoist argues that apoptosis was triggered by the interaction of the lectin with the Fas receptor, of the TNFR family, since apoptosis was significantly suppressed in FADD-deficient cells. It was previously observed that Cvill has a high affinity for complex bi-antennary and high mannose-type N-glycans, and considering that HeLa cells are rich in this type glycan, it can be inferred that one of the mechanisms by which Cvill causes apoptosis may be by binding to a glycosylated receptor of the TNFR superfamily. Li et al demonstrated that ConA is able to bind strongly to Fas receptor glycans (LI et al., 2007). It has also been previously observed that the interaction of galectin 3 with the N-glycan of the Fas receptor triggers apoptosis by the extrinsic pathway, activating caspase 8 and subsequently

Cas3 (FUKUMORI et al., 2004), thus, there is the possibility that Cvill can trigger a similar response by recognizing and binding to N-glycans of this type of receptors.

Since lectins are important tools in the recognition of tumor cells and effective molecules with antineoplastic actions, and considering the data obtained from previous experiments, it is important to unravel the mechanism by which Cvill acts because this is a fundamental step that molecules with a wide therapeutic potential must take to become new drugs in anticancer therapies. In this context, the expression level of several genes related to cell death mechanisms were evaluated by qPCR.

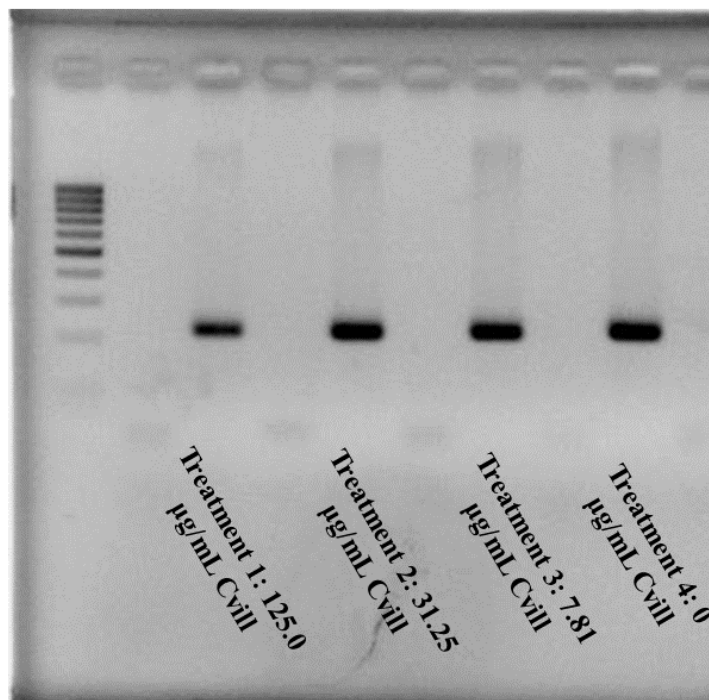
5.4.4 Analysis of gene expression in Cvill-treated HeLa cells

The qRT-PCR experiments allowed to evaluate the expression level of the genes involved in the following processes: intrinsic and extrinsic apoptosis pathways (Bax and Bak, Cytochrome C, Caspase 3, Caspase 8, FADD, PUMA), anti-apoptotic mechanisms (Bcl-2 and BCL-XL), and autophagic route (LC3), using the reference genes GAPDH, HPRT1 and β -actin.

An experiment was set up in which HeLa cells were treated with three doses of Cvill (125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h. RNA extraction was successful and after treatment with lithium chloride, RNAs of all doses showed a 260/230 ratio higher than 1.8. Thus, the samples were good enough to proceed to the cDNA synthesis step, after treatment with DNase. cDNAs were synthesized from 1000 ng of RNA from each sample using the enzyme M-MLV Reverse transcriptase. Before starting the real-time reactions, an amplification of the reference gene GAPDH was performed by means of a simple PCR to verify if the cDNAs from all treatments were good enough for real time experiments (Figure 26).

For the primer specificity test, a cDNA pool was made, and a PCR was performed with the primers of the selected genes. All PCR results showed a single band on 3% agarose gel electrophoresis. The amplicons were of the expected sizes indicating that the reactions were specific. The cDNA pool was also used to construct a 6-point dilution curve to calculate the efficiency of the primers. Of these, only the primers for the BCL-2 and BCL-XL genes did not obtain good efficiency results, as they presented very late Cq's or did not show amplification at all. The two pairs of primers from these genes were therefore discarded from the next steps of the experiment and from the qPCR reactions. All other primers had efficiency values very close to or equal to 2.

Figure 26 – 3% agarose gel electrophoresis showing amplification of a fragment of GAPDH gene from newly synthesized cDNA. HeLa cells were treated with four doses of Cvill (125.0 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 7.81 $\mu\text{g/mL}$ and 0 $\mu\text{g/mL}$ of Cvill respectively). Total mRNA was extracted from cells submitted to each treatment and MMLV reverse transcriptase was used for cDNA synthesis. PCR results had the expected sizes of 226 bp. Low range DNA ladder is positioned in lane 1.

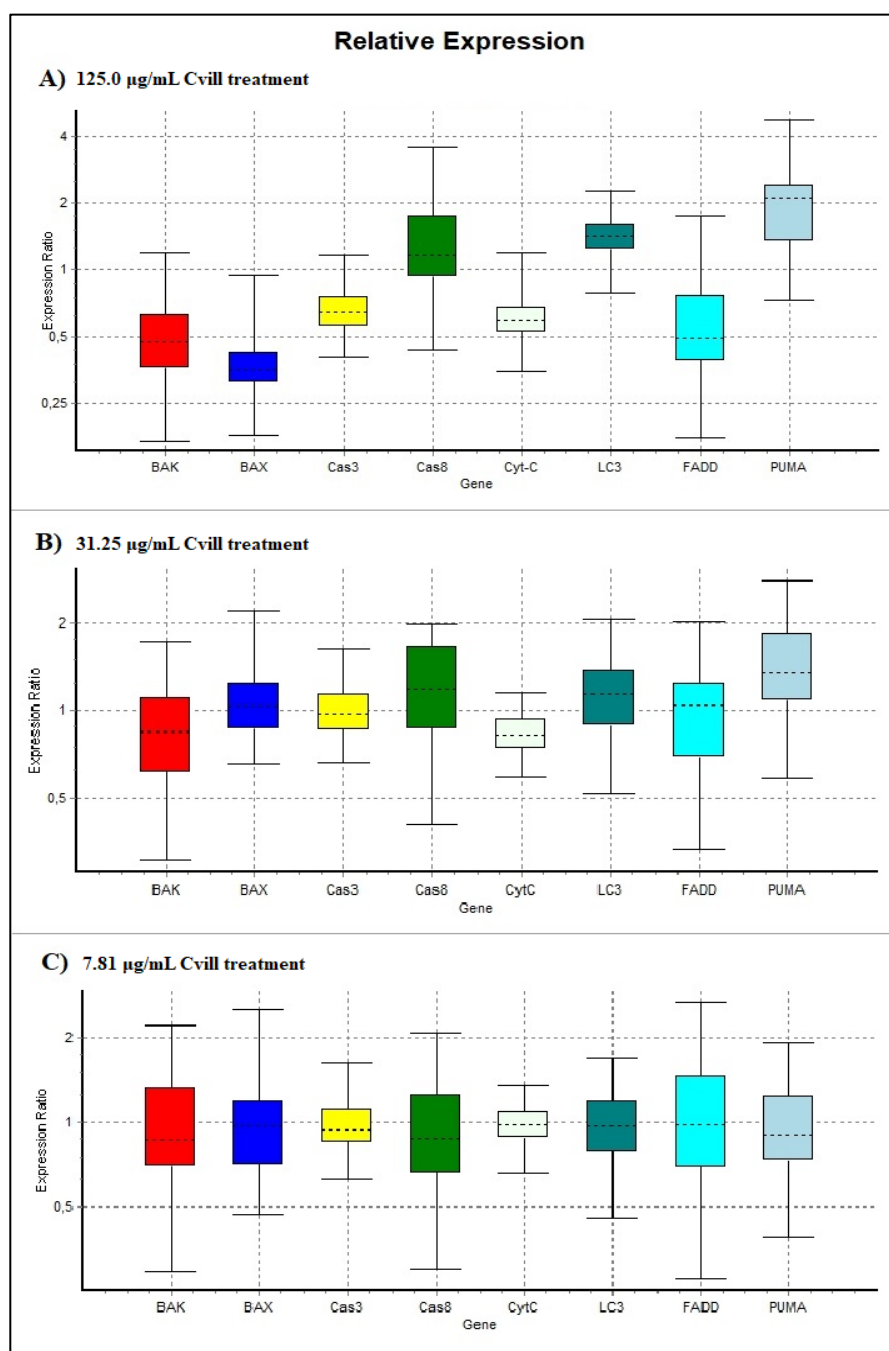


Source: Prepared by the author.

Reference genes GAPDH and HPRT1 showed acceptable stability values for the parameters of GeNorm M (0.708 for GAPDH and 0.782 for HPRT1) and CV (0.267 for GAPDH and 0.369 for HPRT1) when analyzed in qBase+ software. β -actin, however, did not show satisfactory results (GeNorm M of 1,202 and CV of 0.434) and it was not used as a reference gene.

Figure 27 shows the qPCR results which depict the expression level of genes involved in cell death of HeLa cells treated with different doses of Cvill. The lowest dose of Cvill, 7,812 $\mu\text{g/mL}$, did not show any statistical difference in the expression level of any gene in relation to the control (Figure 27 C). As observed in several experiments mentioned previously, this dose was very diluted, not presenting significant results of cytotoxicity, caspase activity, changes in cell morphology, nor in the level of gene expression.

Figure 27 – Relative expression level of genes related to cell death in HeLa cells treated with Cvill at 125.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (A), 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B), and 7.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C) concentrations. The box diagram provides the visualization of data asymmetry and dispersion, in which 50% are distributed within the boxes and 50% are within the range delimited by the lines. The dashed line within the boxes represents the median of the expression ratio values. Boxes that move away from the ratio value equal to 1 upwards indicate increased expression of that gene in relation to the control, while those downwards indicate decreased expression. The two reference genes HPRT1 and GADPH were used to normalize the expression data. The statistics were calculated based on a 95% confidence interval considering 2000 randomizations. The graphics were generated using the REST 2009 program.



Source: prepared by the author using REST 2009 software.

The intermediate dose, 31.25 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 27 B), presented a statistical difference in the expression levels of genes Puma, which was upregulated and Cytochrome C, which was downregulated in relation to dose 0 (control). At the highest dose of 125.0 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 27 A) it was observed that, in addition to Puma, the expression level of LC3 was also significantly increased. The expression of Caspase 8 transcripts was also increased at the two highest doses, but not enough to reach statistical significance in the qPCR experiments. However, it can be confirmed that the Caspase 8 activation was in fact increased both at the 125.0 $\mu\text{g/mL}$ dose and at the 31.25 $\mu\text{g/mL}$ dose, since their activity was also evaluated at the protein level, by Cell Meter™ Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9, kit which showed that this caspase was active with a statistical difference from the control of $p < 0.01$.

The increase in Puma expression that was observed at the two highest doses is generally related to intrinsic apoptotic activity, since this protein is a member of the Bcl-2 superfamily and interacts by binding to the anti-apoptotic proteins BCL-XL and Bcl-2, leaving Bak and Bax free to act in the formation of pores in the mitochondria, which permeabilize it and cause the release of Cytochrome C into the cytosol (CORY; ADAMS, 2002). During this process, in apoptotic cells, an increase in the expression level of Bak, Bax and Puma is expected, at the expense of the decrease of the expression of BCL-XL and Bcl-2 as previously observed with ConA (AMIN et al., 2007), with the lectin from *Solanum tuberosum* (KABIR et al., 2016) and with pea lectin (KABIR et al., 2013) in carcinoma cells, and with ConA and SFL in breast cancer cells (SHI et al., 2014). Cvill's results, however, exposed the increased expression of PUMA countered by the decreased expression of Bak, Bax and Cytochrome C at the higher and intermediate doses of the lectin treatment. This result is an interesting point to be analyzed, since it is not the pattern that occurs in apoptotic cells. Although Cvill showed high caspase activity and intracellular ROS production at 125.0 $\mu\text{g/mL}$ dose, it cannot be concluded hastily that HeLa cells are exclusively in apoptosis.

In addition to Bax and Bak, FADD also had its expression significantly decreased as doses of Cvill were increased. For FADD's case, the increase in gene expression would be related to the activation of the extrinsic apoptotic pathway, which does not involve the mitochondria or Bax or Bak. FADD participates in the formation of the Death Inducing Signaling Complex (DISC), which is modulated by the interaction of a receptor from the Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFR) superfamily, such as Fas (CD95) or TRAIL to its ligands, FasL and cytokines. After this interaction, there is the formation of DISC and activation of caspase 8, which triggers apoptosis by the extrinsic pathway (GRIFFITH et al., 2009). The interaction of these receptors, which are glycoproteins, with their ligands and the triggering of

apoptosis by the extrinsic pathway can be modulated by the carbohydrate portion of these membrane molecules. Therefore, lectins that interact with the glycan portion of these receptors can trigger apoptosis initiation through signal transduction, as galectin 1 does when it binds to Fas in leukemia cells (MICHEAU, 2018).

In Cvill's case, the low expression of FADD may indicate that the lectin probably did not interact with Fas receptor to trigger Cas8 activation specifically, and that caspase activation must have been promoted by another mechanism, probably in a similar way as the lectin from *V. album* also triggered the activation of Caspase 8 independently of cell receptors (BANTEL et al., 1999).

Therefore, considering that apoptosis may not be the only mechanism to be activated in Cvill's death induction routes, it is important to consider that increased PUMA expression may also be indicative of cellular stress, which triggers autophagy as a response, as discussed previously by Wolin (WOLIN et al., 2021), in which it was observed that glioma cells treated with ConBr initiated the autophagy process involving a crosstalk with the activation of Caspase-8. In cases of autophagy, PUMA acts by preventing the anti-apoptosis proteins BCL-XL and Bcl-2 from binding to Beclin1, which is an autophagocytosis inducer, that can be inhibited by Bcl-2 superfamily proteins (KANG et al., 2011). In Wolin's work, it was also observed that there was no change in the expression level of the pro-apoptotic proteins Bak or Bad, but there was an increase in PUMA expression and induction of LC3 cleavage, as well as activation of Caspase 8 activity. Cvill also showed increased activity of Caspase 8 in addition to positively regulating the expression of LC3, which is a protein associated with the microtubule involved in the maturation of the autophagosome and the subsequent triggering of autophagy (BHAT et al., 2018). The induction of autophagy by ConA-like lectins in cancer cells has also been documented in ConA in the case of hepatoma cells (LEI; CHANG, 2007), glioma (PRATT; ROY; ANNABI, 2012), and HeLa (ROY et al., 2014), and in the case of DVL (NASCIMENTO et al., 2019), CaBo (CAVADA et al., 2018) and ConV (OSTERNE et al., 2017) in glioma. In a previous unpublished monograph work, it was also shown that Cvill triggers cell death by mechanisms that may involve both apoptosis and autophagy, since an increase in phosphatidylserine labeling by annexin V was observed, in addition to an increase in the presence of acidic vesicular organelles and of intracellular levels of LC3II when C6 glioma lineage cells are treated with Cvill for incubation periods as short as 6 h (WELTER, 2018).

Considering the possible parallels to be drawn between the cited results of Cvill and ConA in HeLa cells (ROY et al., 2014), and Cvill and ConBr in glioma (WELTER, 2018; WOLIN et al., 2021), it can be said that, at least partially, one of the probable cell death

mechanisms that Cvill triggers in HeLa cells, besides apoptosis, is autophagy. Cvill, ConBr and ConA are mannose-specific *Canavalia* lectins that have a high level of sequence identity with each other. The superposition of the three-dimensional structure of these lectins also showed results with low RMSD values (Figure 15 and Table 6), indicating high structural similarity between these proteins. Correlated results between these lectins may be a consequence of such similarities.

Thus, given the evidence of autophagy activation at the same time of caspase activation, it is possible to state that Cvill probably causes cell death by the combination of both apoptotic and autophagic pathways. Due to the fact that only Caspase 8 is active at a dose of 31.25 $\mu\text{g/mL}$, it can be assumed that the apoptosis process starts extrinsically through Caspase 8 and by autophagy due to the increased expression of PUMA and LC3. At the highest dose, 125.0 $\mu\text{g/mL}$, all caspases are active, and ROS production is also high. These processes may have been triggered from Cas8 and Cas9, which activated effector caspases, and then apoptosis and autophagy processes. Cell death mechanisms are not self-exclusive, and there may be a combination of processes taking place in the cell, depending on the concentration, or the period of incubation with the toxicity-inducing agent. Faheina-Martins et al. in their work showed that metabolic pathways can be activated in the process of cell death in a dose-dependent manner, since the lectins ConA and ConBr triggered necrosis at high concentrations in leukemia cells, and apoptosis in lower concentrations (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). Similarly, it has also been shown that ConV lectin, which triggers autophagy in glioma cells, can cause necrosis at higher lectin concentrations (OSTERNE et al., 2017).

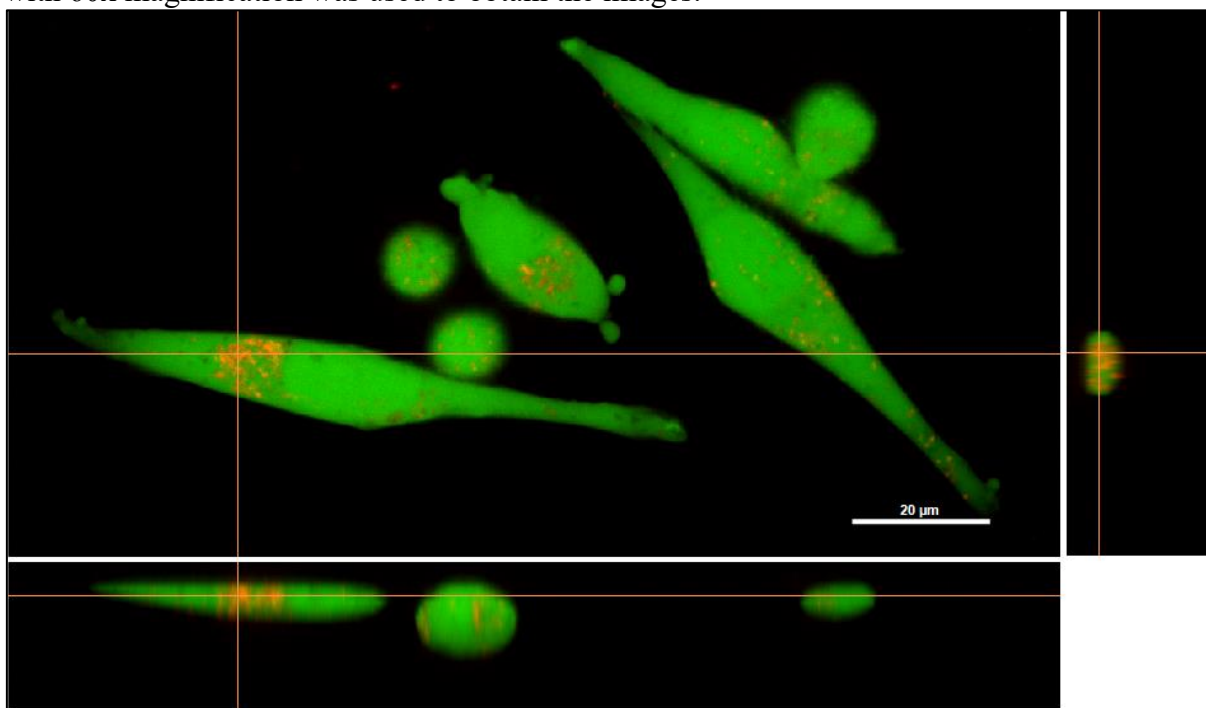
5.5 Analysis of Cvill internalization by confocal microscopy

Confocal microscopy images of Cvill in HeLa showed that the lectin is internalized in both doses tested (Figure 28) after incubation for 48 h. Cellular agglutination and loss of adhesion to the bottom of the plaque is also seen at both doses, more markedly at the most concentrated dose, of 125 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 29). Because of this, the cells acquire a rounded pattern, as seen previously in cell morphology images at 20x magnification. The expected morphological changes related to apoptosis which include cell shrinkage and membrane blebbing were present in some of the confocal images that were analyzed. However, some features of a specific kind of apoptosis, termed anoikis, were also undoubtedly observed in Cvill's results. A cell that is going through anoikis presents a morphology that is described by loss of cell adhesion, and it is also characterized by classical apoptosis markers which include

triggering of both intrinsic and extrinsic apoptosis mechanisms, participation of proteins from Bcl-2 superfamily and caspase activation. The increase of ROS levels and induction of autophagy can also occur in cells going through anoikis (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). Induction of anoikis by the galactose-specific lectin from *Morus alba* has been reported before on breast cancer cells (SARANYA et al., 2017).

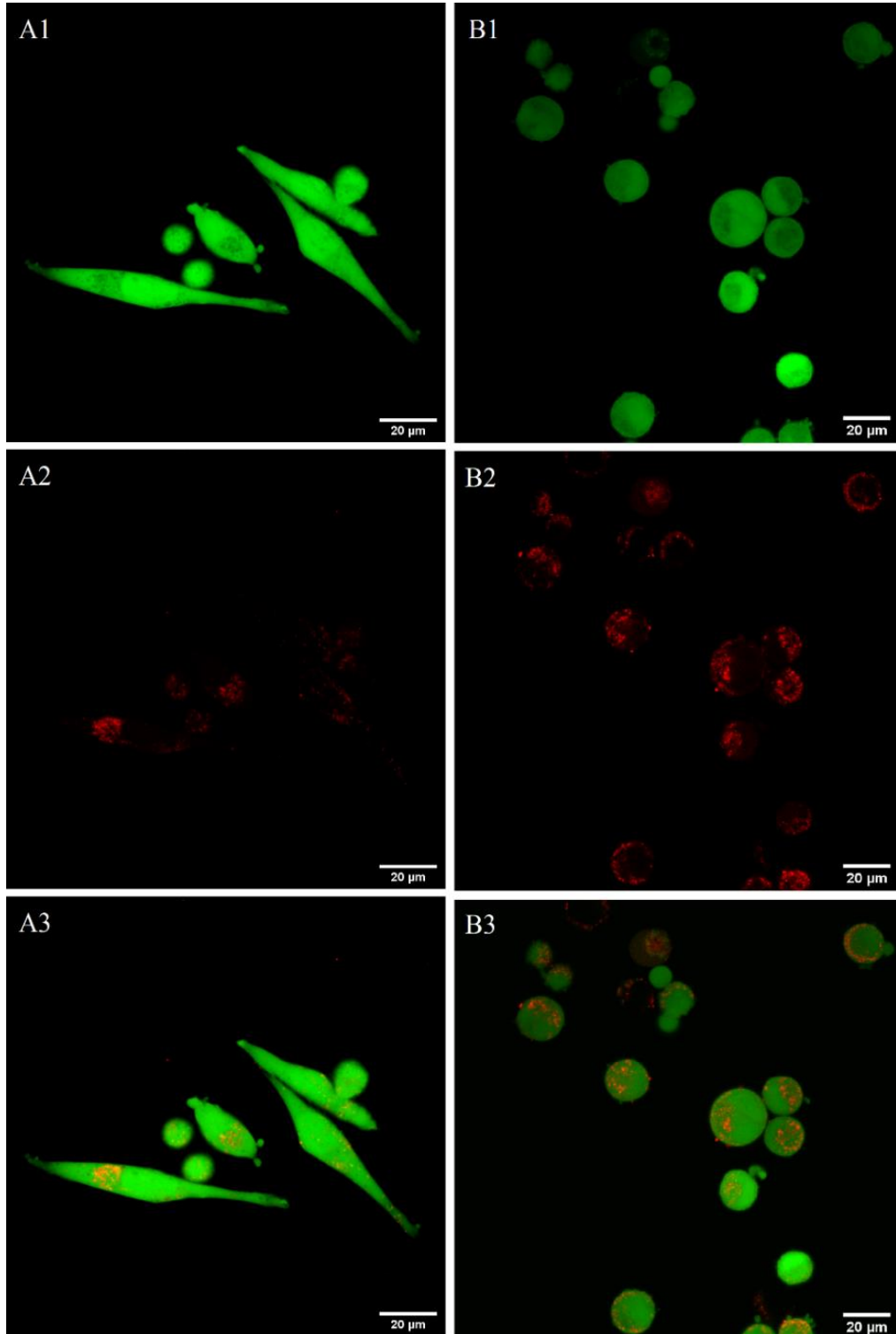
Through a detailed examination of the cell nucleus region, which is characterized by a more condensed labeling with calcein dye, it can be concluded that Cvill, after internalization, is concentrated in the vicinity of the nucleus, without entering it, and that the nucleus is intact.

Figure 28 – Confocal microscopy image of Cvill internalization by HeLa cells after 48 h incubation. The images in the lower frame (XZ axes) and side frame (YZ axes) represent cross and longitudinal sections of the XY axis (central frame), in which it is possible to see that the lectin prepared at 31.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was incorporated by the cell, being located in perinuclear regions. The image shown here represents the results observed by repeating the experiment in triplicate and manually observing several cells alone. Cvill was labeled with TRITC (red band emission – 560 nm) and HeLa cells were stained with calcein (green – 488 nm). Objective lens with 60x magnification was used to obtain the images.



Source: prepared by the author. Image constructed using NIS Elements Viewer software. Internalization of Cvill-TRITC demonstrated using slice view tool from the same software.

Figure 29 – Fluorescence microscopy of HeLa cells incubated with Cvill at concentrations of 31.25 $\mu\text{g/mL}$ (A) and 125.0 $\mu\text{g/mL}$ (B) for a period of 48 h. The channels calcein 488 nm (A1 and B1) and rhodamine 560 nm (A2 and B2) are individually arranged in the figure. Figures A3 and B3 correspond to the green and red channels merged. Magnification of 60x.



Source: prepared by the author. Images built using ImageJ software.

Considering that HeLa cells present a glycocalyx rich in mannose, one of the possible mechanisms of internalization of Cvill by the cell that can occur involves the interaction of the lectin with receptor glycans. Apoptosis and autophagy mechanisms can be initiated both from binding of extracellular receptors or after lectin incorporation by the cell. Like Cvill, the mannose-specific lectin SFL (LIU et al., 2008) was also incorporated by HeLa cells during the process of triggering cell death. In hepatoma cells, ConA was also internalized and accumulated in mitochondria, where it triggered autophagy (LEI; CHANG, 2009), ConA also showed similar results in macrophage cells of the PU5-1.8 lineage, where, however, it triggered apoptosis (SUEN et al., 2000). It is not clear whether Cvill is accumulating inside a specific organelle, similar to ConA that was internalized by mitochondria in macrophages and hepatoma cells. What can be inferred from confocal images is that the lectin is present in specific locations inside the cell, more precisely in the vicinity of the nucleus. The lectin accumulation can be seen as the rather large red objects in figure 28. Other mannose-specific lectins such as artocarpin and Morniga M were rapidly endocytosed by lymphocyte cells as well (BENOIST et al., 2009).

Galactose-specific lectin frutalin was also internalized by HeLa cells, but it was directed to the nucleus, accumulating in the perinuclear region and specially inside the nucleus (OLIVEIRA et al., 2011). Future experiments may determine whether Cvill follows the ConA pattern of accumulation in mitochondria or not.

6 CONCLUSION

In this thesis work it was described, through cell viability experiments, qPCR, caspase activity assays and intracellular ROS production, that the *Canavalia villosa* lectin presents cytotoxic action on HeLa cells and it incites cell death mechanisms that involve both autophagic and apoptotic pathways.

The primary structure of Cvill was also obtained by gene sequencing and mass spectrometry. In possession of the sequence information, the three-dimensional structure of the lectin was solved by macromolecule crystallography. Cvill's tertiary structure presents the typical ConA-like lectin jellyroll motif, and it oligomerizes to form a stable tetramer. Studies of carbohydrate affinity were done through Glycan Array and Molecular Docking experiments, seeking to establish a parallel between the interaction of Cvill with target sugar components of HeLa membrane and the cytotoxicity observed. Cvill interacts well with high mannose N-glycans which are commonly found and overexpressed in HeLa glycoalyx. This interaction of Cvill with these glycans, which may be part of membrane receptors, may cause the internalization of the lectin by the cell, which in turn causes the cytotoxicity observed. Confocal microscopy experiments showed that the lectin is incorporated by the cell, and accumulates in the perinuclear region.

As perspectives for this work, we can mention molecular dynamics experiments, to evaluate by computer simulation the binding of Cvill with target N-glycans considering the time variable and the flexibility of the complex as a whole. Applications in virus models can also be included, as Cvill recognized glycans of the Sars-Covid-2 spike protein. And finally, in HeLa models, an evaluation of cell death pathways can be performed by protein blotting, aiming to monitor the activation of the pathways involved in cell death at the protein level, and not only by transcript. Analysis of internalization and sublocation can further bring valuable information about mitochondrial involvement.

REFERENCES

- ABDEL RAHMAN, Anas M.; RYCZKO, Michael; NAKANO, Miyako; PAWLING, Judy; RODRIGUES, Tania; JOHSWICH, Anita; TANIGUCHI, Naoyuki; DENNIS, James W. Golgi N-glycan branching N-acetylglucosaminyltransferases I, v and VI promote nutrient uptake and metabolism. **Glycobiology**, [*S. l.*], v. 25, n. 2, p. 225–240, 2015. DOI: 10.1093/glycob/cwu105.
- ACHILLI, Silvia et al. Tetralec, artificial tetrameric lectins: A tool to screen ligand and pathogen interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 21, n. 15, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3390/ijms21155290.
- ADAMS, Jerry M.; CORY, Suzanne. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. **Science**, [*S. l.*], v. 281, n. 5381, p. 1322–1326, 1998. DOI: 10.1126/science.281.5381.1322.
- ADAMS, Paul D. et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [*S. l.*], v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010. DOI: 10.1107/S0907444909052925.
- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, [*S. l.*], v. 96, n. 3, p. 23–25, 1965. DOI: 10.1042/bj0960023C.
- AINOUZ, IL; SAMPAIO, AH; BENEVIDES, NMB; FREITAS, ALP; COSTA, FHF; CARVALHO, MR; PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extract. **Botânica Marina**, [*S. l.*], v. 35, n. 6, p. 475–479, 1992.
- AKKOUH, Ouafae; NG, Tzi Bun; SINGH, Senjam Sunil; YIN, Cuiming; DAN, Xiuli; CHAN, Yau Sang; PAN, Wenliang; CHEUNG, Randy Chi Fai. Lectins with anti-HIV activity: A review. **Molecules**, [*S. l.*], v. 20, n. 1, p. 648–668, 2015. DOI: 10.3390/molecules20010648.
- AL ATALAH, Bassam et al. Expression analysis of the nucleocytoplasmic lectin “Oryzata” from rice in *Pichia pastoris*. **FEBS Journal**, [*S. l.*], v. 278, n. 12, p. 2064–2079, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08122.x.
- ALOCCHI, Davide; GHRAICHY, Marie; BARLETTA, Elena; GASTALDELLO, Alessandra; MARIETHOZ, Julien; LISACEK, Frederique. Understanding the glycome : an interactive view of glycosylation from glycompositions to glycoepitopes. **Glycobiology**, [*S. l.*], v. 28, n. 6, p. 349–362, 2018. DOI: 10.1093/glycob/cwy019.
- AMBROSI, Moira; CAMERON, R.; DAVIS, Benjamin G.; CAMERON, Neil R.; DAVIS, Benjamin G. Lectins : tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [*S. l.*], p. 1593–1608, 2005.
- AMIN, A. R. M. Ruhu.; PAUL, Rajib K.; THAKUR, Vijay S.; AGARWAL, Munna L. A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, concanavalin A. **Cancer Research**, [*S. l.*], v. 67, n. 12, p. 5617–5621, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0655.

ARTIMO, Panu et al. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 40, n. W1, p. 597–603, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks400.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; DE SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 6, p. 201–210, 1997.

ASSREUY, Ana Maria Sampaio; FONTENELE, Sabrina Rodrigues; DE FREITAS PIRES, Alana; FERNANDES, Débora Costa; RODRIGUES, Natália Velloso Fontenelle C.; BEZERRA, Eduardo Henrique Salviano; MOURA, Tales Rocha; DO NASCIMENTO, Kyria Santiago; CAVADA, Benildo Sousa. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S. l.], v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009. DOI: 10.1007/s00210-009-0465-1.

BALZARINI, Jan; NEYTS, Johan; SCHOLS, Dominique; HOSOYA, Mitsuaki; VAN DAMME, Els; PEUMANS, Willy; DE CLERCQ, Erik. The mannose-specific plant lectins from *C. hybrid* and *E. helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *U. dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replicati. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 191–207, 1992. DOI: 10.1016/0166-3542(92)90038-7.

BANTEL, Heike; ENGELS, Ingo H.; VOELTER, Wolfgang; SCHULZE-OSTHOFF, Klaus; WESSELBORG, Sebastian. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 2083–2090, 1999.

BARAUNA, Sara C.; KASTER, Manuella P.; HECKERT, Bettina T.; DO NASCIMENTO, Kyria S.; ROSSI, Francesco M.; TEIXEIRA, Edson H.; CAVADA, Benildo S.; RODRIGUES, Ana Lúcia S.; LEAL, Rodrigo B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 160–169, 2006. DOI: 10.1016/j.pbb.2006.07.030.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 297–303, 1992. DOI: 10.3109/08820139209069369.

BARROSO-NETO, Ito L. et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 82, p. 464–470, 2016. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052>.

BARROSO-NETO, Ito L. et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **International journal of biological macromolecules**, Netherlands, v. 82, p. 464–470, 2016. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052.

BEAMAN, Inventors Brain S.; PARK, Hyde; FUAD, E.; Y, N.; JAMES, L. United States Patent. [S. l.], 1996. DOI: 10.1074/JBC.274.42.30033.(51).

BECKER, Joseph W.; REEKE, G. N.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Biological Chemistry**, [S. l.], v. 260, n. 4, p. 1513–1524, 1975.

BEHERA, Birendra; MISHRA, Debasish; ROY, Bibhas; DEVI, K. Sanjana P.; NARAYAN, Rajan; DAS, Joyjyoti; GHOSH, Sudip K.; MAITI, Tapas K. Abrus precatorius agglutinin-derived peptides induce ROS-dependent mitochondrial apoptosis through JNK and Akt/P38/P53 pathways in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 222, p. 97–105, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.08.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.08.017>.

BELTRÃO, Eduardo I. C.; CORREIA, Maria T. S.; FIGUEREDO-SILVA, José; COELHO, Luana C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 125–134, 1998. DOI: 10.1007/BF02825961.

BENEVIDES, Raquel Guimaraes et al. A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 287, n. 31, p. 26352–26364, 2012. a. DOI: 10.1074/jbc.M112.375816.

BENEVIDES, Raquel Guimarães et al. A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 31, p. 26352–26364, 2012. b. DOI: 10.1074/jbc.M112.375816.

BENOIST, Hervé; CULERRIER, Raphaël; POIROUX, Guillaume; SÉGUI, Bruno; JAUNEAU, Alain; VAN DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; BARRE, Annick; ROUGÉ, Pierre. Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 103–114, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0708434.

BENTO, C. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T.; MOREIRA, R. a; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and actions**, [S. l.], v. 38, p. 48–54, 1993. DOI: 10.1007/BF02027213.

BERG, JM; TYMOCZKO, JL; STRYER, L. Three-Dimensional Protein Structure Can Be Determined by NMR Spectroscopy and X-Ray Crystallography. In: FREEMAN, WH (org.). **Biochemistry**. New York. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22393/>.

BESKOW, Laura M. Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [S. l.], v. 17, p. 395–417, 2016. DOI: 10.1146/annurev-genom-083115-022536.

BEZERRA, E. H. et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, [S. l.], v. 408, p. 566–570, 2011. DOI: 10.2210/PDB3JU9/PDB. Disponível em: <http://www.rcsb.org/structure/3JU9>. Acesso em: 1 fev. 2019.

BHAT, Punya; KRIEL, Jurgen; SHUBHA PRIYA, Babu; BASAPPA; SHIVANANJU,

Nanjunda Swamy; LOOS, Ben. Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. **Biochemical Pharmacology**, [*S. l.*], v. 147, p. 170–182, 2018. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.11.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.021>.

BHUSHAN, Shashi; KUMAR, Ajay; MALIK, Fayaz; ANDOTRA, Samar Singh; SETHI, Vijay Kumar; KAUR, Indu Pal; TANEJA, Subhash Chandra; QAZI, Ghulam Nabi; SINGH, Jaswant. A triterpenediol from *Boswellia serrata* induces apoptosis through both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human leukemia HL-60 cells. **Apoptosis**, [*S. l.*], v. 12, n. 10, p. 1911–1926, 2007. DOI: 10.1007/s10495-007-0105-5.

BHUTIA, Sujit K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, [*S. l.*], v. 144, n. January, p. 8–18, 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.04.001.

BLOMME, Bram; VAN STEENKISTE, Christophe; CALLEWAERT, Nico; VAN VLIERBERGHE, Hans. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **Journal of Hepatology**, [*S. l.*], v. 50, n. 3, p. 592–603, 2009.

BONNARDEL, François; MARIETHOZ, Julien; SALENTIN, Sebastian; ROBIN, Xavier; SCHROEDER, Michael; PEREZ, Serge; LISACEK, Frcrossed D. Signdcrosse.; IMBERTY, Anne. Unilectin3d, a database of carbohydrate binding proteins with curated information on 3D structures and interacting ligands. **Nucleic Acids Research**, [*S. l.*], v. 47, n. D1, p. D1236–D1244, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky832.

BORREBAECK, C. A. K.; MATTIASON, B.; NORDBRING-HERTZ, B. Isolation and partial characterization of a carbohydrate-binding protein from a nematode-trapping fungus. **Journal of Bacteriology**, [*S. l.*], v. 159, n. 1, p. 53–56, 1984. DOI: 10.1128/jb.159.1.53-56.1984.

BOWLES, Dianna J.; MARCUS, Susan E.; PAPPIN, Darryl J. C.; FINDLAY, John B. C.; ELIOPOULOS, Elias; MAYCOX, Peter R.; BRUGESS, Jeremy. Posttranslational Processing of Concanavalin A precursors in Jackbean Cotyledons. **Journal of Cell Biology**, [*S. l.*], v. 102, n. April, p. 1284–1297, 1986.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, [*S. l.*], v. 119, n. 3091, p. 1954, 1954.

BRENTNALL, Matthew; RODRIGUEZ-MENOCAL, Luis; DE GUEVARA, Rebeka Ladron; CEPERO, Enrique; BOISE, Lawrence H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**, [*S. l.*], v. 14, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1471-2121-14-32. Disponível em: BMC Cell Biology.

CAGNONI, Alejandro J. et al. Crystal structures of peanut lectin in the presence of synthetic β -N- And β -S-galactosides disclose evidence for the recognition of different glycomimetic ligands. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, [*S. l.*], v. 76, p. 1080–1091, 2020. DOI: 10.1107/S2059798320012371.

CAHOREAU, Claire; KLETT, Danièle; COMBARNOUS, Yves. **Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors** *Frontiers in*

Endocrinology, 2015. DOI: 10.3389/fendo.2015.00026.

CANDY, Laure; PEUMANS, Willy J.; MENU-BOUAOUICHE, Laurence; ASTOUL, Corinne Houllès; VAN DAMME, Jo; VAN DAMME, Els J. M.; ERARD, Monique; ROUGÉ, Pierre. The Gal/GalNAc-specific lectin from the plant pathogenic basidiomycete *Rhizoctonia solani* is a member of the ricin-B family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 282, n. 3, p. 655–661, 2001. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4626.

CANDY, Laure; VAN DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; MENU-BOUAOUICHE, Laurence; ERARD, Monique; ROUGÉ, Pierre. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 308, n. 2, p. 396–402, 2003. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01406-2.

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. DOI: 10.2174/1389203013381152.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, Characterization and Behavior during Germination. **Biologia Plantarum**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 113–120, 1984.

CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; LOSSIO, C. F.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, M. T. L.; LEAL, R. B.; NASCIMENTO, K. S. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 134, 2019. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100.

CAVADA, Benildo S.; PINTO-JUNIOR, Vanir R.; OSTERNE, Vinicius J. S.; NASCIMENTO, Kyria 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, 2019. b. DOI: 10.3390/ijms20010030.

CAVADA, Benildo Sousa et al. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 11, p. 74–80, 1996.

CAVADA, Benildo Sousa 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023>.

CAVADA, Benildo Sousa; OSTERNE, Vinicius Jose Silva; PINTO-JUNIOR, Vanir Reis; NASCIMENTO, Kyria Santiago. 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, 2019. c. DOI: 10.2174/1389203720666190104123210.

CHANDRA, Joya; SAMALI, Afshin; ORRENIUS, Sten. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 29, n. 3–4, p. 323–333, 2000. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00302-6.

CHANG, Chih Peng; YANG, Ming Cheng; LIU, Hsiao Sheng; LIN, Yee Shin; LEI, Huan Yao. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 286–296, 2007. DOI: 10.1002/hep.21509.

CHAVEZ, Veronica; GARCIA, Alexis; YNALVEZ, Ruby. Plant lectin-induced apoptosis in cancer cells: a mini-review. **BIOS**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 79–89, 2018.

CHUANG, Gwo Yu; BOYINGTON, Jeffrey C.; GORDON JOYCE, M.; ZHU, Jiang; NABEL, Gary J.; KWONG, Peter D.; GEORGIEV, Ivelin. Computational prediction of N-linked glycosylation incorporating structural properties and patterns. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 28, n. 17, p. 2249–2255, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts426.

CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 647–656, 2002. DOI: 10.1038/nrc883.

DA MOTA, Mariana Flavia; BENFICA, Polyana Lopes; BATISTA, Aline Carvalho; MARTINS, Frederico Severino; DE PAULA, José Realino; VALADARES, Marize Campos. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 319–329, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.055>.

DAM, Tarun K.; CAVADA, Benildo S.; GRANGEIRO, Thalles B.; SANTOS, Claudia F.; CECCATTO, Vania M.; DE SOUSA, Flavia A. M.; OSCARSON, Stefan; BREWER, C. Fred. Thermodynamic binding studies of lectins from the diocleinae subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 21, p. 16119–16126, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M000670200.

DAM, Tarun K.; CAVADA, Benildo S.; GRANGEIRO, Thalles B.; SANTOS, Claudia F.; DE SOUSA, Flavia A. M.; OSCARSON, Stefan; BREWER, C. Fred. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 20, p. 12082–12088, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.20.12082.

DAM, Tarun K.; OSCARSON, Stefan; BREWER, C. Fred. Thermodynamics of binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea grandiflora* lectin. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 49, p. 32812–32817, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32812. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.49.32812>.

DAN, Xiuli; LIU, Wenlong; NG, Tzi Bun. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 221–247, 2016. DOI: 10.1002/med.21363. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.21363>.

DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin 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. DOI: 10.1080/10408390591034445.

DE OLIVEIRA SILVA, Flávio et al. Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 346, n. 2, p. 237–244, 2011. DOI: 10.1007/s00441-011-1239-x.

DE SOUZA, Gustavo A. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 961–972, 2003. DOI: 10.1093/glycob/cwg115.

DEL SOL, Francisca Gallego; CAVADA, Benildo S.; CALVETE, Juan 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. DOI: 10.1016/j.jsb.2006.08.014.

DELATORRE, Plinio et al. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC structural biology**, England, v. 7, p. 52, 2007. DOI: 10.1186/1472-6807-7-52.

DELATORRE, Plinio et al. Mass spectrometry and X-ray diffraction analysis of two crystal types of *Dioclea virgata* lectin: An antinociceptive protein candidate to structure/function analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 164, n. 6, p. 741–754, 2011. DOI: 10.1007/s12010-011-9170-x.

DENNIS, James W.; GRANOVSKY, Maria; WARREN, Charles E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1473, n. 1, p. 21–34, 1999. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00167-1.

DO NASCIMENTO, Antônia Sâmia F. et al. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 657–664, 2012. DOI: 10.1002/jmr.2222.

ECHEVERRIA, Begona; SERNA, Sonia; ACHILLI, Silvia; VIVÈS, Corinne; PHAM, Julie; THÉPAUT, Michel; HOKKE, Cornelis H.; FIESCHI, Franck; REICHARDT, Niels Christian. Chemoenzymatic Synthesis of N-glycan Positional Isomers and Evidence for Branch Selective Binding by Monoclonal Antibodies and Human C-type Lectin Receptors. **ACS Chemical Biology**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 2269–2279, 2018. DOI: 10.1021/acscchembio.8b00431.

EDELMAN, GERALD M.; WANG, JOHN L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 253, n. 9, p. 3016–3022, 1978.

EHRlich, Paul. Experimentelle untersuchungen über immunität. I. Ueber ricin. **DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift**, [S. l.], v. 17, n. 32, p. 976–979, 1891.

ELFSTRAND, M. Über blutkörperchenagglutinierende Eiweisse. **Görberdorfer Veröffentlichungen a. Band I**, [S. l.], p. 1–159, 1898.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 66, n. 4, p.

486–501, 2010. DOI: 10.1107/S0907444910007493.

ERNST, Beat; HART, Gerald Warren; SINAÏ, Pierre. **Carbohydrates in chemistry and biology**. [s.l.] : Wiley Blackwell, 2008.

EWING, Brent; GREEN, Phil. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998. DOI: 10.1101/gr.8.3.186. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.8.3.186>.

FAHEINA-MARTINS, Glaucia V.; DA SILVEIRA, Alethéia Lacerda; CAVALCANTI, Bruno C.; RAMOS, Márcio V.; MORAES, Manoel O.; PESSOA, Cláudia; ARAÚJO, Demetrius A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.06.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>.

FALASCA, A.; FRANCESCHI, C.; ROSSI, C. A.; STIRPE, F. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from *Vicia sativa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 577, p. 71–81, 1979. DOI: 10.1016/0005-2795(79)90009-6.

FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 69–78, 2010. DOI: 10.1007/s10863-010-9268-9.

FERRIGE, A. G.; SEDDON, M. J.; GREEN, B. N.; JARVIS, S. A.; SKILLING, J.; STAUNTON, J. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 707–711, 1992. DOI: 10.1002/rcm.1290061115. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1290061115>.

FERRIZ-MARTINEZ, Roberto A.; TORRES-ARTEGA, Iovanna C.; BLANCO-LABRA, Alejandro; GARCIA-GASCA, Teresa. The role of plant lectins in cancer treatment. **New Approaches in the Treatment of Cancer**. Nova Science, [S. l.], p. 71–89, 2010. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303603.

FUKUMORI, Tomoharu; TAKENAKA, Yukinori; OKA, Natsuo; YOSHII, Tadashi; HOGAN, Victor; INOHARA, Hidenori; KANAYAMA, Hiro Omi; KIM, Hyeong Reh Choi; RAZ, Avraham. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Research**, [S. l.], v. 64, n. 10, p. 3376–3379, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0336.

GABIUS, H. J. **The sugar code : fundamentals of glycosciences**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2011.

GABIUS, Hans Joachim. The sugar code: Why glycans are so important. **BioSystems**, [S. l.], v. 164, p. 102–111, 2018. DOI: 10.1016/j.biosystems.2017.07.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.07.003>.

GABIUS, Hans Joachim; ANDRÉ, Sabine; JIMÉNEZ-BARBERO, Jesús; ROMERO, Antonio; SOLÍS, Dolores. From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.01.005.

GABIUS, Hans Joachim; ROTH, Jürgen. An introduction to the sugar code. **Histochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 111–117, 2017. DOI: 10.1007/s00418-016-1521-9.

GABOR, Franz; KLAUSEGGER, Ursula; WIRTH, Michael. The Interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 221, n. 1–2, p. 35–47, 2001. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00650-0.

GADELHA, Carlos Alberto De Almeida et al. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 152, n. 3, p. 185–194, 2005. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.07.012.

GAO, Wenjie; JIANG, Yanhua; ZHANG, Zhihui; ZHANG, Yifang; LIU, Yanyan; ZHOU, Yanhong; LIU, Xin. A facile method for cellular N-glycomic profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **RSC Advances**, [S. l.], v. 7, n. 57, p. 35687–35693, 2017. DOI: 10.1039/c7ra06071h.

GHAZARIAN, Haïke; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [S. l.], v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011. DOI: 10.1016/j.acthis.2010.02.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>.

GOMES, B. S. et al. Antifungal activity of lectin against yeasts of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 770–778, 2012.

GONDIM, Ana C. S. et al. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 175, n. March, p. 179–189, 2017. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.07.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.011>.

GONDIM, Ana C. S. et al. Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. **Medicinal Chemistry Communications**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 390–398, 2019. DOI: 10.1039/c8md00508g.

GOUET, Patrice; COURCELLE, Emmanuel; STUART, David I.; MÉTOZ, Frédéric. ESPrict: Analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 305–308, 1999. DOI: 10.1093/bioinformatics/15.4.305.

GRANGEIRO, Thalles B.; SCHRIEFER, Albert; CALVETE, Juan J.; RAIDA, Manfred; URBANKE, Claus; BARRAL-NETTO, Manoel. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 48, p. 43–48, 1997.

GRANT, Oliver C.; MONTGOMERY, David; ITO, Keigo; WOODS, Robert J. 3D Models of glycosylated SARS-CoV-2 spike protein suggest challenges and opportunities for vaccine development. **bioRxiv**, [S. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.030445>.

GRIFFITH, Thomas; STOKES, Brittany; KUCABA, Tamara; EAREL JR., James; VANOOSTEN, Rebecca; BRINCKS, Erik; NORIAN, Lyse. TRAIL Gene Therapy: From Preclinical Development to Clinical Application. **Current Gene Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 1, p.

9–19, 2009. DOI: 10.2174/156652309787354612.

HANSEN, John-Erik; NIELSEN, Carsten M.; NIELSEN, Claus; HEEGAARD, P.; MATHIESEN, L. R.; NIELSEN, J. O. Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. **AIDS (London, England)**, [*S. l.*], v. 3, n. 10, p. 635–641, 1989.

HAPNER, K. D.; JERMYN, M. A. Lectin activity in Acacia seeds. **Annals of Botany**, [*S. l.*], v. 48, n. 1, p. 89–91, 1981.

HEALEY, Adam; FURTADO, Agnelo; COOPER, Tal; HENRY, Robert J. Protocol : a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1186/1746-4811-10-21.

HELLIN, Heinrich. **Der giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut**. 1891. Universität zu Dorpat, [*S. l.*], 1891.

HENDRICKSON, O. D.; ZHERDEV, A. V. Analytical Application of Lectins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [*S. l.*], v. 48, n. 4, p. 279–292, 2018. DOI: 10.1080/10408347.2017.1422965.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, [*S. l.*], v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000. DOI: 10.1038/35037710.

HENNET, Thierry; CABALZAR, Jürg. Congenital disorders of glycosylation: A concise chart of glycocalyx dysfunction. **Trends in Biochemical Sciences**, [*S. l.*], v. 40, n. 7, p. 377–384, 2015. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.03.002.

HIRABAYASHI, Jun. Lectin-based structural glycomics: Glycoproteomics and glycan profiling. **Glycoconjugate Journal**, [*S. l.*], v. 21, n. 1–2, p. 35–40, 2004. DOI: 10.1023/B:GLYC.0000043745.18988.a1.

HO, CS; LAM, CWK; CHAN, MHM; CHEUNG, RCK; LAW, LK; LIT, LCW; NG, KF; SUEN, MWM; TAI, HL. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, [*S. l.*], v. 24, n. 1, p. 3–12, 2003. DOI: 10.1002/9781118307816.ch34.

HORVAT, Tomislav; DEŽELJIN, Martina; REDŽIĆ, Irma; BARIŠIĆ, Darko; HERAK BOSNAR, Maja; LAUC, Gordan; ZOLDOŠ, Vlatka. Reversibility of Membrane N-Glycome of HeLa Cells upon Treatment with Epigenetic Inhibitors. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0054672.

HORVAT, Tomislav; MUŽINIĆ, Ana; BARIŠIĆ, Darko; BOSNAR, Maja Herak; ZOLDOŠ, Vlatka. Epigenetic modulation of the HeLa cell membrane N-glycome. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [*S. l.*], v. 1820, n. 9, p. 1412–1419, 2012. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.12.007.

HOWARD, Irmgard K.; SAGE, Harvey J. Isolation and Characterization of a Phytohemagglutinin from the Lentil. **Biochemistry**, [*S. l.*], v. 8, n. 6, p. 2436–2441, 1969. DOI: 10.1021/bi00834a028.

HU, Shen; WONG, David T. Lectin microarray. **Proteomics - Clinical Applications**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 148–154, 2009. DOI: 10.1002/prca.200800153. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/prca.200800153>.

HUNG, Chih-Hung; LEE, Ming-Chih; LEE, Te-Chang; LIN, Jung-Yaw. Primary Structure of Three Distinct Isoabrinins Determined by cDNA Sequencing. Conservation and Significance. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 229, p. 263–267, 1993.

ISLAM, Barira; KHAN, Asad U. Lectins: to combat infections. **Protein Purification**, [S. l.], v. 1, p. 167–188, 2012.

ITAKURA, Yoko; NAKAMURA-TSURUTA, Sachiko; KOMINAMI, Junko; TATENO, Hiroaki; HIRABAYASHI, Jun. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 6, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061160.

JONES, G.; WILLETT, Peter; GLEN, Robert; LEACH, Andrew R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 267, n. 3, p. 727–48, 1997. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126849>.

JONIC, Slavica; VÉNIEN-BRYAN, Catherine. Protein structure determination by electron cryo-microscopy. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 636–642, 2009. DOI: 10.1016/j.coph.2009.04.006.

KABIR, Syed Rashel; NABI, Md Mahamodun; HAQUE, Ariful; ZAMAN, Rokon Uz; MAHMUD, Zahid Hayat; REZA, Md Abu. Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest in vivo in mice. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 20, n. 14, p. 1288–1296, 2013. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.06.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.010>.

KABIR, Syed Rashel; RAHMAN, Md Musfikur; AMIN, Ruhul; KARIM, Md Rezaul; MAHMUD, Zahid Hayat; HOSSAIN, M. Tofazzal. Solanum tuberosum lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cells growth by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 8437–8444, 2016. DOI: 10.1007/s13277-015-4735-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4735-x>.

KAILEMIA, Muchena J.; PARK, Dayoung; LEBRILLA, Carlito B. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 409, n. 2, p. 395–410, 2017. DOI: 10.1007/s00216-016-9880-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9880-6>.

KANG, R.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T.; TANG, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 571–580, 2011. DOI: 10.1038/cdd.2010.191. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.191>.

KARHI, Kimmo K.; GAHMBERG, Carl G. Isolation and characterization of the blood group A-specific lectin from *Vicia cracca*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 622, p. 337–343, 1980.

KATTLA, J. J.; STRUWE, W. B.; DOHERTY, M.; ADAMCZYK, B.; SALDOVA, R.; RUDD, P. M.; CAMPBELL, M. P. **Protein Glycosylation**. Second Edition. [s.l.] : Elsevier B.V., 2011. a. v. 3 DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0>.

KATTLA, J. J.; STRUWE, W. B.; DOHERTY, M.; ADAMCZYK, B.; SALDOVA, R.; RUDD, P. M.; CAMPBELL, M. P. Protein Glycosylation. *In: Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Second Edition. [s.l.] : Elsevier B.V., 2011. b. v. 3p. 467–486. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0>.

KEYAERTS, Els; VIJGEN, Leen; PANNECOUQUE, Christophe; VAN DAMME, Els; PEUMANS, Willy; EGBERINK, Herman; BALZARINI, Jan; VAN RANST, Marc. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 179–187, 2007. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.03.003.

KILPATRICK, David C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00308-2.

KOPITZ, Jürgen. Lipid glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 175–198, 2017. DOI: 10.1007/s00418-016-1518-4.

KÕRESSAAR, Triinu; LEPAMETS, Maarja; KAPLINSKI, Lauris; RAIME, Kairi; ANDRESON, Reidar; REMM, Mairo. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. **Bioinformatics (Oxford, England)**, England, v. 34, n. 11, p. 1937–1938, 2018. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty036.

KRAINOVA, N. A. et al. Evaluation of Potential Reference Genes for qRT-PCR Data Normalization in Evaluation of Potential Reference Genes for qRT – PCR Data Normalization in HeLa Cells. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S. l.], v. 49, n. 9, p. 743–749, 2013. DOI: 10.1134/S0003683813090032.

KRISSINEL, Evgeny; HENRICK, Kim. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 372, p. 774–797, 2007. Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

KUO, Joe Chin Hun; GANDHI, Jay G.; ZIA, Roseanna N.; PASZEK, Matthew J. Physical biology of the cancer cell glycocalyx. **Nature Physics**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 658–669, 2018. DOI: 10.1038/s41567-018-0186-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41567-018-0186-9>.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, p. 680–685, 1970.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061242.

LEAL, Rodrigo Bairy et al. Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 114, p. 64–76, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080>.

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

LEI, Huan Yao; CHANG, Chih Peng. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. **Autophagy**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 402–404, 2007. DOI: 10.4161/auto.4280.

LEI, Huan Yao; CHANG, Chih Peng. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–12, 2009. DOI: 10.1186/1423-0127-16-10.

LEVINE, Beth; KLIONSKY, Daniel J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 463–477, 2004. DOI: 10.1016/S1534-5807(04)00099-1.

LI, Wen wen; YU, Jia ying; XU, Huai long; BAO, Jin ku. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 414, n. 2, p. 282–286, 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.072. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.072>.

LI, Yi; YANG, Xiaojing; NGUYEN, Alana H. T.; BROCKHAUSEN, Inka. Requirement of N-glycosylation for the secretion of recombinant extracellular domain of human Fas in HeLa cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1625–1636, 2007. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.04.002.

LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: When glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 976–986, 2013. DOI: 10.1038/cdd.2013.50.

LIS, Halina; SHARON, Nathan. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews (Washington, DC, United States)**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998. DOI: 10.1021/cr940413g. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/cr940413g>.

LIU, Bo; LI, Chun yang; BIAN, He jiao; MIN, Ming wei; CHEN, Long fei; BAO, Jin ku. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 482, n. 1–2, p.

1–6, 2009. DOI: 10.1016/j.abb.2008.12.003. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.003>.

LIU, Zhen; LIU, Bo; ZHANG, Zi Ting; ZHOU, Ting Ting; BIAN, He Jiao; MIN, Ming Wei; LIU, Yan Hong; CHEN, Jing; BAO, Jin Ku. A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 867–875, 2008. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.02.025.

LOH, So Hee; PARK, Jin Yeon; CHO, Eun Hee; NAH, Seung Yeol; KANG, Young Sun. Animal lectins: Potential receptors for ginseng polysaccharides. **Journal of Ginseng Research**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1016/j.jgr.2015.12.006. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2015.12.006>.

LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; GOMES, J. C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 935–941, 2005. DOI: 10.1590/S0100-879X2005000600016.

LORIS, Remy. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1572, n. 2–3, p. 198–208, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00309-4.

LORIS, Remy; HAMELRYCK, Thomas; BOUCKAERT, Julie; WYNS, Lode. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [S. l.], v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998. DOI: 10.1016/S0167-4838(97)00182-9.

LOSSIO, Claudia F. et al. Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 105, p. 272–280, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038>.

LYU, Su-Yun; PARK, Won-Bong. Effects of Korean Mistletoe Lectin *Viscum album coloratum* on Proliferation and Cytokine Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and T-Lymphocytes. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1252–1264, 2007. DOI: 10.1007/bf02980266. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02980266>.

MACEDO, Maria Lúcia Rodrigues; FREIRE, Maria das Graças Machado; DA SILVA, Maria Barbosa Reis; COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 146, n. 4, p. 486–498, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.01.020.

MAIURI, M. Chiara; ZALCKVAR, Einat; KIMCHI, Adi; KROEMER, Guido. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 741–752, 2007. DOI: 10.1038/nrm2239.

MALEROD, Helle; GRAHAM, Robert L. J.; SWEREDOSKI, Michael J.; HESS, Sonja. Comprehensive profiling of N-linked glycosylation sites in HeLa cells using hydrazide

enrichment. **Journal of Proteome Research**, [*S. l.*], v. 12, n. 1, p. 248–259, 2013. DOI: 10.1021/pr300859k.

MANIMALA, Joseph C.; ROACH, Timothy A.; LI, Zhitao; GILDERSLEEVE, Jeffrey C. High-throughput carbohydrate microarray analysis of 24 lectins. **Angewandte Chemie - International Edition**, [*S. l.*], v. 45, n. 22, p. 3607–3610, 2006. DOI: 10.1002/anie.200600591.

MANN, Karlheinz; FARIAS, Creuza M. S. A.; GALLEGO, Francisca; SOL, Del; SANTOS, Claudia F.; GRANGEIRO, Thalles B.; NAGANO, Celso S.; CAVADA, Benildo S.; CALVETE, Juan J. The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. [*S. l.*], v. 4422, p. 4414–4422, 2001.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Engineering, Design and Selection**, [*S. l.*], v. 14, n. 10, p. 735–745, 2001. DOI: 10.1093/protein/14.10.735. Disponível em: <https://academic.oup.com/peds/article-lookup/doi/10.1093/protein/14.10.735>.

MARTIN, S. J. Caspases: Executioners of Apoptosis. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**, [*S. l.*], v. 16, p. 145–152, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-386456-7.01411-8.

MAUPIN, Kevin A.; LIDEN, Daniel; HAAB, Brian B. The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier motif analysis of glycan array data. **Glycobiology**, [*S. l.*], v. 22, n. 1, p. 160–169, 2012. DOI: 10.1093/glycob/cwr128.

MELGAREJO, Luz Marina; VEGA, Nohora; PÉREZ, Gerardo. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 17, n. 3, p. 315–324, 2005. DOI: 10.1590/S1677-04202005000300006.

MICHEAU, Olivier. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand signaling by glycosylation. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 19, n. 3, 2018. DOI: 10.3390/ijms19030715.

MIN, W.; DUNN, A J.; JONES, D. H. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. **The EMBO Journal**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, p. 1303–7, 1992. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05174.x. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556578&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MIZUSHIMA, Noboru; LEVINE, Beth; CUERVO, Ana Maria; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, [*S. l.*], v. 451, n. 7182, p. 1069–1075, 2008. DOI: 10.1038/nature06639.

MOLCHANOVA, Valentina; CHIKALOVETS, Irina; CHERNIKOV, Oleg; BELOGORTSEVA, Natalia; LI, Wei; WANG, Jian Hua; YANG, Dong Yun Ou; ZHENG, Yong Tang; LUKYANOV, Pavel. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and**

Physiology - C Toxicology and Pharmacology, [*S. l.*], v. 145, n. 2, p. 184–193, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.11.012.

MOREIRA, R. A.; BARROS, Ana C. H.; STEWART, James C.; PUSZTAI, Arpad. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, [*S. l.*], v. 158, p. 63–69, 1983. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80431-8.

MOREMEN, Kelley W.; TIEMEYER, Michael; NAIRN, Alison V. Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [*S. l.*], v. 13, n. 7, p. 448–462, 2012. DOI: 10.1038/nrm3383.

MORGAN, Walter T. J.; WATKINS, Winifred M. Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. **Glycoconjugate Journal**, [*S. l.*], v. 17, n. 7–9, p. 501–530, 2000. DOI: 10.1023/A:1011014307683.

MUNRO, Sean. **Essentials of Glycobiology Trends in Cell Biology**, 2000. DOI: 10.1016/s0962-8924(00)01855-9.

MURAILLE, Eric; PAJAK, Bernard; URBAIN, Jacques; LEO, Oberdan. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: Interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cellular Immunology**, [*S. l.*], v. 191, n. 1, p. 1–9, 1999. DOI: 10.1006/cimm.1998.1401.

MURPHY, L. A.; GOLDSTEIN, I. J. Five α D galactopyranosyl binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 252, n. 13, p. 4739–4742, 1977. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)40221-3. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40221-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40221-3).

NAGANO, Celso S.; CALVETE, Juan J.; BARETTINO, Domingo; PEREZ, Alicia; CAVADA, Benildo S.; SANZ, Libia. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **The Biochemical Journal**, England, v. 409, n. 2, p. 417–428, 2008. DOI: 10.1042/BJ20070942.

NAIK, Sanjay; RAWAT, Ravindra Singh; KHANDAI, Santripati; KUMAR, Mukesh; JENA, Sidhartha S.; VIJAYALAKSHMI, Mookambeswaran A.; KUMAR, Sanjit. Biochemical characterisation of lectin from Indian hyacinth plant bulbs with potential inhibitory action against human cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 105, p. 1349–1356, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.170. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.170>.

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, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.203.

NASCIMENTO, Ana Paula 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106>.

NASCIMENTO, K. S.; SILVA, M. T. L.; OLIVEIRA, M. V.; LOSSIO, C. F.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; CAVADA, B. S. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 144, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.117.

NASCIMENTO, Kyria Santiago et al. Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 92, n. August, p. 79–89, 2017. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.09.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.014>.

NASH, Franklin David. Reduction in Pathogenic Load in Overwhelming Viremia. **International Journal of Complementary & Alternative Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 1–2, 2016. DOI: 10.15406/ijcam.2016.04.00098.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. [s.l.] : Artmed Editora, 2018.

NONIS, Samuel G.; HAYWOOD, Joel; SCHMIDBERGER, Jason W.; MACKIE, Emily R. R.; SOARES DA COSTA, Tatiana P.; BOND, Charles S.; MYLNE, Joshua S. Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. **The Plant Cell**, [S. l.], n. July, 2021. DOI: 10.1093/plcell/koab130.

OHIZUMI, Yuki et al. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 2896–2902, 2009. DOI: 10.1021/jf8040269.

OLIVEIRA-FERRER, Leticia; LEGLER, Karen; MILDE-LANGOSCH, Karin. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 44, p. 141–152, 2017. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.03.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.002>.

OLIVEIRA, Carla; NICOLAU, Ana; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, Lucília. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on Hela cervical cancer cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/568932.

OLIVEIRA, Carolina Turatti; KUNZ, Daniele; SILVA, Carlos Peres; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 81, p. 81–89, 2015. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2015.07.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.007>.

OLSNES, Sjur. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 361–370, 2004. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.05.003.

OLSNES, Sjur; KOZLOV, Jurij V. Ricin. **Toxicon**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 1723–1728, 2001. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00158-1.

OPARKA, Monika; WALCZAK, Jarosław; MALINSKA, Dominika; OPPEN, Lisanne M. P.

- E. Van; SZCZEPANOWSKA, Joanna; KOOPMAN, Werner J. H.; WIECKOWSKI, Mariusz R. Quantifying ROS levels using CM-H 2 DCFDA and HyPer. **Methods**, [S. l.], v. 109, p. 3–11, 2016. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.06.008.
- OSTERNE, Vinicius Jose Silva 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.020.
- OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- PALHARINI, Julio G. et al. Eutirucallin: A lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. APR, p. 1–13, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00136.
- PANDA, Prashanta Kumar et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 27–35, 2014. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.004>.
- PAOLI, Paolo; GIANNONI, Elisa; CHIARUGI, Paola. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1833, n. 12, p. 3481–3498, 2013. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>.
- PAYNE, Ed; SMITH, Matt; CRATTY, Carol. FBI confirms letters to Obama, others contained ricin. **CNN**, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://edition.cnn.com/2013/04/18/politics/tainted-letter-intercepted/index.html>.
- PEIXOTO, Andreia; RELVAS-SANTOS, Marta; AZEVEDO, Rita; LARA SANTOS, Lúcio; FERREIRA, José Alexandre. Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 9, p. 1–24, 2019. DOI: 10.3389/fonc.2019.00380.
- PÉREZ, Gerardo. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 843–853, 1998. DOI: 10.1016/S1357-2725(98)00045-4.
- PEREZ, Gerardo; PEREZ, Cecilia; SOUSA-CAVADA, Benildo; MOREIRA, Renato; RICHARDSON, Michael. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Cavanalia maritima*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 30, n. 8, p. 2619–2621, 1991.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995. DOI: 10.1104/pp.109.2.347.
- PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFFLE, Leo. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 30, n. 9, 2002. DOI:

10.1093/nar/30.9.e36.

PINHO, Salomé S.; REIS, Celso A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015. DOI: 10.1038/nrc3982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3982>.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. **Biochimie**, [S. l.], v. 135, 2017. a. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.02.002.

PINTO-JUNIOR, Vanir R. et al. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 134–141, 2015. DOI: 10.1002/jmr.2512.

PINTO-JUNIOR, Vanir Reis 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. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.092.

PINTO, Vanir Reis et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 10857–10869, 2013. a. DOI: 10.3390/molecules180910857.

PINTO, Vanir Reis et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 10857–10869, 2013. b. DOI: 10.3390/molecules180910857.

POLITO, Letizia; BORTOLOTTI, Massimo; BATTELLI, Maria Giulia; CALAFATO, Giulia; BOLOGNESI, Andrea. Ricin: An ancient story for a timeless plant toxin. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3390/toxins11060324.

PRATT, Jonathan; ROY, René; ANNABI, Borhane. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 1245–1255, 2012. DOI: 10.1093/glycob/cws093.

RADOGNA, Flavia; DICATO, Mario; DIEDERICH, Marc. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 1–11, 2015. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.12.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018>.

RAMOS, Marcio V.; CAVADA, Benildo S.; MAZARD, Anne Marie; ROUGÉ, Pierre. Interaction of diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 275–279, 2002. DOI: 10.1590/S0074-02762002000200025.

READ, Randy J. et al. A new generation of crystallographic validation tools for the Protein Data Bank. **Structure**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 1395–1412, 2011. DOI: 10.1016/j.str.2011.08.006.

ROUGE, Pierre; SOUSA-CAVADA, Benildo. Isolation and partial characterization of two isolectins from *Lathyrus ochrus* (L.) DC. seeds. **Plant Science Letters**, [S. l.], v. 37, p. 21–27, 1984. DOI: 10.1016/0304-4211(84)90197-4.

ROY, Bibhas; PATTANAIK, Arup K.; DAS, Joyjyoti; BHUTIA, Sujit K.; BEHERA, Birendra; SINGH, Prashant; MAITI, Tapas K. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 210, n. 1, p. 96–102, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.003>.

ROZWARSKI, Denise A.; SWAMI, Bale M.; BREWER, C. Fred; SACCHETTINI, James C. Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 49, p. 32818–32825, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32818. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.49.32818>.

RUDIGER, Harold; GABIUS, Hans-J. Plant lectins : Occurrence , biochemistry , functions and applications. [S. l.], p. 589–613, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

SANDVIG, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 251, n. 13, p. 3977–3984, 1976. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)33344-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33344-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33344-6).

SANDVIG, Kirsten. Cell density affects the binding of the toxic lectin Abrin to HeLa cells in monolayers cultures. [S. l.], v. 89, n. 2, p. 233–236, 1978.

SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 27, n. 3, 2014. DOI: 10.1002/jmr.2340.

SARANYA, Jayaram; SHILPA, Ganesan; RAGHU, Kozhiparambil G.; PRIYA, Sulochana. Morus alba leaf lectin (MLL) sensitizes MCF-7 cells to anoikis by inhibiting fibronectin mediated integrin-FAK signaling through Ras and activation of P38 MAPK. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, n. FEB, p. 1–12, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00034.

SAUVION, Nicolas; NARDON, Christiane; FEBVAY, Gérard; GATEHOUSE, Angharad M. R.; RAHBÉ, Yvan. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 1137–1150, 2004. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.10.006.

SCHRÖDINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0**, 2015.

SHARON, Nathan. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.

DOI: 10.1074/JBC.X600004200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/JBC.X600004200>.

SHARON, Nathan. Lectins: Past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1457–1460, 2008. DOI: 10.1042/BST0361457.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004. DOI: 10.1093/glycob/cwh122.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. **Lectins**. Second ed ed. [s.l.] : Springer, 2007.

SHEVCHENKO, Andrej; TOMAS, Henrik; HAVLI, Jan; OLSEN, Jesper V; MANN, Matthias. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2006.468. Disponível em: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2006.468>.

SHI, Zheng; CHEN, Jie; LI, Chun Yang; AN, Na; WANG, Zi Jie; YANG, Shu Lin; HUANG, Kai Feng; BAO, Jin Ku. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 248–256, 2014. DOI: 10.1038/aps.2013.151.

SILVA, Flávio de Oliveira et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014. a. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.01.005.

SILVA, Flávio de Oliveira et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014. b. DOI: 10.1016/J.RVSC.2014.01.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528814000290?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio. 2018.

SIMÕES, Rafael Conceição et al. Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 811–818, 2012. DOI: 10.1002/rcm.6171.

SINA, Asmaa; PROULX-BONNEAU, Sébastien; ROY, Alain; POLIQUIN, Laurent; CAO, Jian; ANNABI, Borhane. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 31–38, 2010. DOI: 10.1007/s12079-009-0084-0.

SINGH, Ram Sarup; THAKUR, Shivani Rani; BANSAL, Parveen. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 77–88, 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2013.798780.

SOUSA, Bruno L. et al. Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: A new tool for cancer research. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 72, p. 27–39, 2016. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.12.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.016>.

SOUZA, Maria A.; CARVALHO, Fernanda C.; RUAS, Luciana P.; RICCI-AZEVEDO, Rafael; ROQUE-BARREIRA, Maria Cristina. 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. DOI: 10.1007/s10719-012-9464-4.

SRINIVAS, Balaji Kyathgowdanadoddi; SHIVAMADHU, Madhu Chakkere; JAYARAMA, Shankar. Musa acuminata lectin exerts anti-cancer effects on HeLa and EAC cells via activation of caspase and inhibitions of Akt, Erk, and Jnk pathway expression and suppresses the neoangiogenesis in in-vivo models. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 166, p. 1173–1187, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.272. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.272>.

STILLMARK, Hermann. **Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiacacen**. 1888. University of Dorpat, [S. l.], 1888.

STRASSER, R.; ALTMANN, F.; MACH, L.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 561, n. 1–3, p. 132–136, 2004. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00150-4.

STROH, C.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Death by a thousand cuts: An ever increasing list of caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 997–1000, 1998. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400451.

SUEN, Y. K.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M.; LEE, C. Y.; CHAN, C. W.; KONG, S. K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 369–377, 2000. DOI: 10.1023/A:1009691727077.

SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. Hematin and the peroxidase of fig sap. **Enzymologia**, [S. l.], v. 1, p. 133, 1936.

SUMNER, James B. the Globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 137–142, 1919. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)86371-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86371-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86371-2).

SUMNER, James B. Note. The recrystallization of urease. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 97–98, 1926.

SUVARNA, Geetha; SHARMA, Bhagya B. An analogy of *Canavalia* lectins by molecular phylogenetic characterization. **Journal of Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 193–203, 2020. DOI: 10.1007/s42485-020-00041-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42485-020-00041-y>.

TAKAHASHI, Akiyuki; MASUDA, Atsushi; SUN, Mao; CENTONZE, Victoria E.; HERMAN, Brian. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 497–504, 2004. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2003.07.009.

- TANIGUCHI, Naoyuki; KIZUKA, Yasuhiko. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. **Advances in Cancer Research**, [S. l.], v. 126, p. 11–51, 2015. DOI: 10.1016/bs.acr.2014.11.001.
- TORQUATO, Mayara et al. Structural Characterization , Docking and Dynamics Simulations of *Canavalia bonariensis* Lectin. **Journal of Drug Design and Research**, [S. l.], v. 3, p. 1–8, 2016.
- TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 533–551, 2020. DOI: 10.1007/s10719-020-09942-y.
- TULLIS, Richard H.; DUFFIN, R. Paul; HANDLEY, Harold H.; SODHI, Puneet; MENON, Jeevan; JOYCE, James A.; KHER, Vijay. Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients. **Blood Purification**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 64–69, 2009. DOI: 10.1159/000167011.
- TURIÁK, Lilla; SUGÁR, Simon; ÁCS, András; TÓTH, Gábor; GÖMÖRY, Ágnes; TELEKES, András; VÉKEY, Károly; DRAHOS, László. Site-specific N-glycosylation of HeLa cell glycoproteins. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-51428-x.
- TWEEDALE, Geoffrey. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 311–315, 2002. DOI: 10.1038/nrc774.
- UEMATSU, Jun et al. Legume lectins inhibit human parainfluenza virus type 2 infection by interfering with the entry. **Viruses**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 1104–1115, 2012. DOI: 10.3390/v4071104.
- UNILECTIN. **UniLectin3D Curated Database**. 2021. Disponível em: <https://unilectin.eu/unilectin3D/>. Acesso em: 19 jun. 2021.
- VAGIN, Alexei; TEPLYAKOV, Alexei. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 22–25, 2010. DOI: 10.1107/S0907444909042589.
- VAN DAMME, E. J.; BRIKÉ, F.; WINTER, H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 236, n. 2, p. 419–27, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612611>.
- VAN DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; BARRE, Annick; ROUGÉ, Pierre. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 17, n. June, p. 576–692, 1998.
- VAN DAMME, Els J. M.; SMITH, David F.; CUMMINGS, Richard; PEUMANS, Willy J. Glycan arrays to decipher the specificity of plant lectins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 705, p. 757–767, 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419-7877-6_39.

VAN HOLLE, Sofie; VAN DAMME, Els J. M. Messages from the past: New insights in plant lectin evolution. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. January, p. 1–14, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00036.

VAN PARIJS, Jan; BROEKAERT, Willem F.; GOLDSTEIN, Irwin J.; PEUMANS, Willy J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, [S. l.], v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991. DOI: 10.1007/BF00197797.

WAGNER, Klaus W. et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1070–1077, 2007. DOI: 10.1038/nm1627.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, England, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995. DOI: 10.1093/protein/8.2.127.

WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The Covalent Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. I. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F1 and F2. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 250, n. 4, p. 1490–1502, 1975.

WANG, Zhen; CHINOY, Zoeisha S.; AMBRE, Shailesh G.; PENG, Wenjie; MCBRIDE, Ryan; DE VRIES, Robert P.; GLUSHKA, John; PAULSON, James C.; BOONS, Geert Jan. A general strategy for the chemoenzymatic synthesis of asymmetrically branched N-glycans. **Science**, [S. l.], v. 341, n. 6144, p. 379–383, 2013. DOI: 10.1126/science.1236231.

WELTER, Priscilla Gomes. **Análise dos efeitos biológicos da lectina extraída de *Canavalia villosa* (Cvill) em linhagem de glioma C6 (*Rattus norvegicus*)**. 2018. Universidade Federal de Santa Catarina., [S. l.], 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/192274>.

WHO. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer). Acesso em: 27 maio. 2021.

WIEDERSCHAIN, G. Ya. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. **Biochemistry**, [S. l.], v. 78, n. 7, p. 679–96, 2013. DOI: 10.1134/S0006297913070018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24010832>.

WINN, Martyn D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 235–242, 2011. DOI: 10.1107/S0907444910045749.

WOLIN, Ingrid A. V. et al. ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. **Biochimie**, [S. l.], v. 180, p. 186–204, 2021. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.11.003.

WONG, Jack Ho; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose / mannose / rhamnose-specific W c lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 439, p. 91–98, 2005. DOI: 10.1016/j.abb.2005.05.004.

YAN, Qiaojuan; LI, Yanxia; JIANG, Zhengqiang; SUN, Yan; ZHU, Lifeng; DING, Zufeng. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 16, n. 6–7, p. 586–593, 2009. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.024.

YANG, Qianwen; WANG, Ning; ZHANG, Jie; CHEN, Geng; XU, Hui; MENG, Qingguo; DU, Yuan; YANG, Xin; FAN, Huaying. In vitro and in silico evaluation of stereoselective effect of ginsenoside isomers on platelet P2Y12 receptor. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 64, n. March, p. 152899, 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152899. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152899>.

YOUNG, N. Martin; WATSON, David C.; WILLIAMS, Ross E. Lectins and legume chemotaxonomy. Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Bauhinia purpurea*. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 182, n. 2, p. 403–406, 1985. DOI: 10.1016/0014-5793(85)80342-2.

YURIEV, Elizabeth; RAMSLAND, Paul A. **Structural glycobiology**. [s.l.] : CRC Press, 2012.

ZHANG, Qi; MA, Cheng; CHIN, Lih Shen; LI, Lian. Integrative glycoproteomics reveals protein n-glycosylation aberrations and glycoproteomic network alterations in Alzheimer's disease. **Science Advances**, [S. l.], v. 6, n. 40, p. 1–19, 2020. DOI: 10.1126/sciadv.abc5802.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. In: **Evolving Genes and Proteins**. [s.l.] : Academic Press, 1965. p. 97–166. DOI: doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6.

ZUO, Zhenyu; FAN, Handong; WANG, Xue; ZHOU, Wei; LI, Lingling. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. **SpringerPlus**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1186/2193-1801-1-13.

APPENDIX A - CURRICULUM VITAE

(last updated: 17/06/2021)

Personal information

Name: Claudia Figueiredo Lossio

Birth date: April 11th 1989

Email: cflossio@gmail.com

Address: Rua Dr. Jose Lino, 262 apto 201. Fortaleza – CE. Brazil. CEP: 60175-426

Area of Specialization: Biotechnology, Biochemistry and Protein chemistry

Education

- | | |
|----------------|--|
| 2010 – 2013 | Federal University of Ceara & Iowa State University (joint School)
Biotechnology |
| 2014 – 2016 | Federal University of Ceara
Master’s Degree in Biotechnology of Natural Resources |
| 2016 - current | Federal University of Ceara & Gent University (joint PhD)
Graduation Program in Biotechnology of Natural Resources (UFC)
Promoters:
Kyria Santiago do Nascimento
Benildo Sousa Cavada
Doctoral School of Bioscience Engineering: Biotechnology (Ugent)
Promoter:
Els Van Damme |

Summary of Publications and Presentations

Full papers published in international journals	23
Scientific events	10
Abstracts presented in events	09
Patents	3

Full papers published

1. B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, M.V. Oliveira, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, K.S. Nascimento, A review of Viciae lectins studies: End of the book or a story in the

- writing?, *Int. J. Biol. Macromol.* 181 (2021) 1104-1123.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.062.
2. B.S. Cavada, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, L.A.G. Souza, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, C. Correia-Neto, M.V. Oliveira, J.L.A. Correia, A.H.B. Neco, J.L.C. Domingos, W.P. Ferreira, G.A. Farias, K.S. Nascimento, Molecular dynamics and binding energy analysis of *Vatairea guianensis* lectin: a new tool for cancer studies, *J. Mol. Model.* 26 (2020). doi:10.1007/s00894-019-4281-3.
 3. B.S. Cavada, V.J.S. Osterne, M.V. Oliveira, V.R. Pinto-Junior, M.T.L. Silva, A.U. Bari, L.D. Lima, C.F. Lossio, K.S. Nascimento, Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins, *Int. J. Biol. Macromol.* 154 (2020) 159-165.
doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.113.
 4. K.S. Nascimento, M.T.L. Silva, M.V. Oliveira, C.F. Lossio, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, B.S. Cavada, Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe, *Int. J. Biol. Macromol.* 144 (2020).
doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.117.
 5. B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, J.L.A. Correia, S.E.G. Correia, C.S. Nagano, M.V. Oliveira, L.D. Lima, A.P.M.S. Vital, R.B. Leal, K.S. Nascimento, A Diocleinae type II lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds specific to α -lactose/GalNAc, *Process Biochem.* 93 (2020) 104-114.
doi:10.1016/j.procbio.2020.03.026.
 6. B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, M.V. Oliveira, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, A.U. Bari, L.D. Lima, C.H.D. Souza-Filho, K.S. Nascimento, Comprehensive review on Caesalpinioideae lectins: From purification to biological activities, *Int. J. Biol. Macromol.* 162 (2020) 333-348. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.161.
 7. B.S. Cavada, M.T.L. Silva, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, C.F. Lossio, J.C. Madeira, M.G. Pereira, R.B. Leal, W.P. Ferreira, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreyu, Exploring the carbohydrate-binding ability of *Canavalia bonariensis* lectin in inflammation models, *J. Mol. Recognit.* 33 (2020). doi:10.1002/jmr.2870.
 8. B.S. Cavada, A.U. Bari, V.R. Pinto-Junior, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, L.A.G. Souza, M.V. Oliveira, C.H.D. Souza-Filho, S.E.G. Correia, A.P.M.S. Vital, L.D. Lima, V.J.S. Osterne, K.S. Nascimento, 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, *Int. J. Biol.*

- Macromol. 145 (2020). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.102.
9. A.P.M. Nascimento, I.A.V. Wolin, P.G. Welter, I.A. Heinrich, A. Zanotto-Filho, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, R.B. Leal, Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 134 (2019). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.203.
 10. B.S. Cavada, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, V.R. Pinto-Junior, M.V. Oliveira, M.T.L. Silva, R.B. Leal, K.S. Nascimento, One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review, *Int. J. Biol. Macromol.* 134 (2019). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100.
 11. B.S. Cavada, M.T.L. Silva, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, A.P.M. Nascimento, I.A.V. Wolin, I.A. Heinrich, C.A.S. Nobre, C.G. Moreira, C.F. Lossio, C.R.C. Rocha, J.L. Martins, K.S. Nascimento, R.B. Leal, *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018). doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023.
 12. B.S. Cavada, D.A. Araripe, I.B. Silva, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, A.H.B. Neco, E.P.P. Laranjeira, C.F. Lossio, J.L.A. Correia, A.F. Pires, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa), *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 236-246. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.174.
 13. A.H.B. Neco, V.R. Pinto-Junior, D.A. Araripe, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, C.A.S. Nobre, M.V. Oliveira, M.T.L. Silva, M.G.Q. Martins, J.B. Cajazeiras, G.F.O. Marques, D.R. Costa, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from *Centrolobium microchaete* seeds, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 124-133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.166.
 14. A.S. de Oliveira, C.F. Lóssio, A.J. Rangel, M.G.Q. Martins, F.E.P. do Nascimento, M.L.L. de Andrade, B.S. Cavada, S.R. Lacerda, K.S. do Nascimento, Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra* spp, *An. Acad. Bras. Cienc.* 89 (2017). doi:10.1590/0001-3765201720160150.
 15. D.A. Araripe, V.R. Pinto-Junior, A.H.B. Neco, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, A.F. Pires, C.F. Lossio, M.G.Q. Martins, J.L.A. Correia, R.G. Benevides, R.B. Leal, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, 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.* 102 (2017) 323-330. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.193.
16. V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, M.Q. Santiago, C.F. Lossio, C.S. Nagano, C.R.C. Rocha, J.C.F. Nascimento, F.L.F. Nascimento, I.B. Silva, A.S. Oliveira, J.L.A. Correia, R.B. Leal, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, K.S. Nascimento, Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein, *Biochimie.* 135 (2017). doi:10.1016/j.biochi.2017.02.002.
17. V.R. Pinto-Junior, M.Q. Santiago, C.B. Nobre, V.J.S. Osterne, R.B. Leal, J.B. Cajazeiras, C.F. Lossio, B.A.M. Rocha, M.G.Q. Martins, C.A.S. Nobre, M.T.L. Silva, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Crystal structure of *Pisum arvense* seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics, *Arch. Biochem. Biophys.* 630 (2017). doi:10.1016/j.abb.2017.07.013.
18. C.F. Lossio, C.G. Moreira, R.M.F. Amorim, C.S. Nobre, M.T.L. Silva, C.C. Neto, V.R. Pinto-Junior, I.B. Silva, J. Campos, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, K.S. Nascimento, Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017). doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038.
19. K.S. Nascimento, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, F.W.V. Martins, A.P.M. Nascimento, I.A.V. Wolin, I.A. Heinrich, M.G.Q. Martins, M.T.L. Silva, C.F. Lossio, C.R.C. Rocha, R.B. Leal, B.S. Cavada, Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 92 (2017). doi:10.1016/j.biocel.2017.09.014.
20. A.M.S. Assreuy, L. De Paula Pereira, G.F.O. Marques, C.C. Neto, C.F. Lossio, V.J. Da Silva Osterne, K.S. Do Nascimento, B.S. Cavada, Stimulation of leukocyte migration and nitric oxide release into rat peritoneal cavity by *Canavalia* lectins: Molecular and structural insights, *Curr. Top. Pharmacol.* 21 (2017).
21. A.C. Almeida, V.J. Da Silva Osterne, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, J.C. Silva-Filho, C.F. Lossio, F.L.F. Nascimento, R.P.H. Almeida, C.S. Teixeira, R.B. Leal, P. Delatorre, B.A.M. Rocha, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 596 (2016) 73-83. doi:10.1016/j.abb.2016.03.001.
22. A.C. Alves, M.A. Vasconcelos, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, V.J. Silva Osterne,

- C.F. Lossio, P.H. Souza Ferreira Bringel, R.R. Castro, C.S. Nagano, P. Delatorre, L.A.G. Souza, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: Partial characterization and immobilization in chitosan beads, *Arch. Biochem. Biophys.* 588 (2015). doi:10.1016/j.abb.2015.10.020.
23. M.Q. Santiago, C.C.F. Leitão, F.N. Pereira-Junior, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, J.B. Cajazeiras, H.C. Silva, F.V.S. Arruda, L.P. Pereira, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, B.S. Cavada, Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams, *J. Mol. Recognit.* 27 (2014) 117-123. doi:10.1002/jmr.2340.

Professional experience

2017 – Biotechnology Technologist
currently Federal University of Ceara



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



UNIVERSIDADE DE GANTE
FACULDADE DE ENGENHARIA DE BIOCIÊNCIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRAUDAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOCIÊNCIA:
BIOTECNOLOGIA

CLAUDIA FIGUEIREDO LÓSSIO

ANÁLISE DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL, ESPECIFICIDADE E ATIVIDADE
ANTICÂNCER DA LECTINA *Canavalia villosa* (BENTH)

FORTALEZA

2021

CLAUDIA FIGUEIREDO LOSSIO

ANÁLISE DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL, ESPECIFICIDADE E ATIVIDADE
ANTICÂNCER DA LECTINA *Canavalia villosa* (BENTH)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biociências como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais pela UFC e Doutora em Engenharia de Biociências pela UGent. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Orientador:

Prof. Dr. Kyria Santiago do Nascimento (UFC)

Prof. Dra Els Van Damme (Ugent)

Coorientador:

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

FORTALEZA

2021

CLAUDIA FIGUEIREDO LOSSIO

ANÁLISE DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL, ESPECIFICIDADE E ATIVIDADE
ANTICÂNCER DA LECTINA *Canavalia villosa* (BENTH)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biociências como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia de Recursos Naturais pela UFC e Doutora em Engenharia de Biociências: Biotecnologia pela UGent. Área de concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Els Van Damme (Orientadora)
Universidade de Gante (UGent)

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

Prof. Dr. Andre Skirtach
Universidade de Gante (UGent)

Prof. Dr. Cíntia Renata Costa Rocha
Universidade Federal de Pernambuco Pernambuco (UFPE)

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

À minha família, pelo amor, pelo cuidado, e
por acreditarem em mim mesmo nos
momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Prof^ª. Dr^ª. Kyria Santiago do Nascimento, pela orientação desde a iniciação científica, pelas conversas e ensinamentos que vão além do laboratório meu muito obrigado. Sempre admirei sua gentileza e paciência.

Ao Prof. Dr. Benildo de Sousa Cavada, pela atenção que tem com todos os alunos sob sua orientação, pelo apoio e pelo suporte que me foi dado durante toda minha trajetória, sempre me incentivando a dar o meu melhor e me dando oportunidades de crescer.

A prof^ª Dr^ª. Els Van Damme, por me receber em seu laboratório e me orientar no período sanduíche do doutorado. Muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por estar sempre disposta a ouvir. A experiência que tive em seu laboratório foi um grande sonho realizado.

Para o prof. Dra. Cintia Rocha, prof. Dr. Rodrigo Bainy e prof. Dr. Andre Skirtach, obrigado por aceitar o convite para fazer parte da banca examinadora, e obrigado por seus comentários e colaboração.

Meu muito obrigada também aos demais professores e colaboradores do Biomol-Lab, aos colegas turma de pós-graduação, aos colegas servidores e terceirizados do Departamento de Bioquímica e ao corpo docente da Pós-Graduação.

Aos meus queridos colegas de laboratório do BioMol, foi sempre um orgulho muito grande ver todos se formando e agora que chega a minha vez vejo um filme passando na minha mente com um apertinho no peito. Agradeço a todos, que estiveram presentes comigo desde o início da iniciação científica, tempo em que o Fernando orientava a mim sobre os experimentos de proteômica. Agora que olho pra trás e vejo o quanto cresci como pessoa e cientista, tenho a consciência que foi tudo graças a vocês. Eu não tenho como citar todos, mas fica aqui o meu obrigada representado nos queridos colegas e amigos Vanir, Vinicius, Neto, Alfa, Messias, Claudio, Lara, Yara e Paula, que estavam tomando café comigo e trabalhando no lab nos últimos tempos.

Em especial preciso agradecer às minhas amigas Clareane, Cleane, Gleiciane, Ivanice, Luciana, Mayara, Nagila e Simoni. Eu não tenho palavras pra descrever como vocês são incríveis e inspiradoras. A amizade de vocês foi um presente que vou levar para a vida toda, tenho muitas saudades do dia-a-dia com vocês.

A todos os queridos amigos do Glyco team, vocês são incríveis! O tempo que passei em Gent foi inesquecível graças a vocês, que me receberam calorosamente e me fizeram sentir parte do time logo de cara. Em especial quero mandar um abraço bem apertado pra Simin, Isabel, Flavia e Tibo, saudades de vocês!

A todos os meus demais amigos, que me deram suporte e estiveram comigo durante esses anos.

A Universidade Federal do Ceará, e a Universidade de Gante, o meu muito obrigada aos administradores e servidores de ambas as instituições.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por meio do programa CAPRES-PrInt e em parte pelas agências de fomento FUNCAP e CNPq.

Também gostaria de expressar minha gratidão ao time do laboratório CIC biomaGuNE que realizou o glycan array em colaboração, também à equipe da linha de luz MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, onde foram difratados os cristais e à equipe de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, onde foram realizados os experimentos de sequenciamento MSMS.

Por fim, agradeço imensamente à minha família, que significam tudo para mim. Obrigada à minha mãe Rochelane, a minha tia Julia e à minha irmã Nicéa pelo suporte, amor e encorajamento que sempre me deram. Eu sou a pessoa que sou hoje graças a vocês. Dedico a vocês essa vitória.

“If you can’t fly, then run, if you can’t run, then walk, if you can’t walk, then crawl, but whatever you do, you have to keep moving forward”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

Células utilizam glicanos de superfície para codificar informações moduladoras de processos que variam desde o reconhecimento celular e desenvolvimento de tecidos a apoptose. A decodificação dessas mensagens armazenadas em um *glicocódigo* é desempenhada por moléculas ligantes de carboidratos, e dentre estas, as lectinas se destacam devido a elas serem proteínas já bem caracterizadas e que se ligam a sacarídeos de forma específica e reversível. Dessa forma, as lectinas podem ser capazes de reconhecer determinados tipos celulares de acordo com o perfil de glicosilação expresso nas membranas dessas células. Sabe-se que diversas patologias, incluindo câncer e diabetes, apresentam glicanos mutados nas superfícies de tecidos afetados. Este fato desperta o interesse na área de glicobiologia e lectinologia, no que concerne a busca para desvendar a relação entre a mensagem passada por carboidratos alterados e o desenvolvimento e progressão de enfermidades. À vista disso, a bioprospecção e caracterização de novas lectinas que apresentem potenciais biotecnológicos é interessante em vista das comprovadas aplicações que as lectinas já estudadas apresentam. Este trabalho teve como objetivo analisar a atividade anticâncer da lectina de *Canavalia villosa* (Cvill), traçando um paralelo entre essa ação e o perfil de afinidade a carboidratos dessa lectina. A estrutura tridimensional de Cvill também foi resolvida, e a partir disso foram feitas análises de interações com glicanos de câncer *in silico*. Para isso, Cvill, que já apresenta protocolo de isolamento descrito, teve sua sequência de aminoácidos obtida por espectrometria de massas e sequenciamento gênico. A estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia de macromoléculas e difração de raios X. A especificidade a carboidrato fina de Cvill foi analisada por *Glycan Array* e *Docking* molecular, e sua atividade anticâncer foi testada em células HeLa, nas quais foi avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e a ativação de caspases. O nível de expressão de transcritos relacionados com apoptose e autofagia foi avaliado por qPCR. Os resultados mostraram que Cvill apresenta um efeito citotóxico em células HeLa, com participação do CRD e geração de ROS intracelular na maior dose testada. Também foi observado que a morte celular foi desencadeada por mecanismos que envolvem tanto vias autofágicas quanto apoptóticas, com a expressão aumentada de LC3 e a ativação de caspase 8. Cvill apresenta uma estrutura tridimensional típica de lectinas de leguminosas, com um domínio β -sanduíche e sítios de ligação a carboidratos e metais conservados.

Palavras-chave: lectina; glicobiologia; câncer; *Canavalia villosa*.

ABSTRACT

Cells use surface glycans to encode information that modulates processes ranging from cell recognition and tissue development to apoptosis. The decoding of these messages stored in a *glycocode* is performed by carbohydrate-binding molecules, and among these, lectins stand out as they are well-characterized proteins that bind to glycans in a highly specific and reversible way. Thus, lectins may be able to recognize specific cell types according to the glycosylation profile expressed in the membranes of these cells. It is known that several pathologies, including cancer and diabetes, present mutated glycans on the surfaces of affected tissues. This fact raises interest in the area of glycobiology and lectinology as these fields try to unravel the relationship among the message conveyed by altered carbohydrates and the development and progression of diseases. In view of this, the bioprospection and characterization of new lectins that may have biotechnological potential is interesting in view of the proven applications that known lectins have presented so far. This work aimed to analyze the anticancer activity of the lectin from *Canavalia villosa* (Cvill), drawing a parallel among the lectin toxicity and its carbohydrate affinity profile. The three-dimensional structure of this lectin was also solved and used to analyze interactions with cancer glycans in silico. For this, Cvill, which was isolated and partially characterized previously, had its amino acid sequence determined by mass spectrometry and gene sequencing. The three-dimensional structure was solved by macromolecule crystallography and X-ray diffraction. The fine carbohydrate specificity of Cvill was studied by Glycan Array and Molecular Docking, and its anticancer activity was evaluated in HeLa cells, in which ROS production and caspase activation were assessed. The level of apoptosis and autophagy transcripts expression was analyzed by qPCR. The results showed that Cvill has a cytotoxic effect on HeLa cells, with participation of CRD and generation of intracellular ROS at the highest dose tested. It was also observed that cell death was triggered by mechanisms involving both autophagic and apoptotic pathways, with increased expression of LC3 and activation of caspases 8. Cvill presents a three-dimensional structure typical of legume lectins, with a β -sandwich domain and conserved carbohydrate and metal binding sites.

Keywords: lectin; glycobiology; cancer; *Canavalia villosa*.

ABSTRACT

Cellen gebruiken oppervlakteglycanen om informatie te coderen die processen moduleert, variërend van celherkenning en weefselontwikkeling tot apoptose. Het decoderen van deze berichten die zijn opgeslagen in een glycode wordt uitgevoerd door koolhydraatbindende moleculen. Lectines zijn goed gekarakteriseerde eiwitten die op een zeer specifieke en omkeerbare manier aan glycanen kunnen binden. Lectinen zijn aldus in staat om specifieke celtypen te herkennen volgens het glycosyleringsprofiel dat tot expressie wordt gebracht op de membranen van deze cellen. Het is bekend dat verschillende pathologieën, waaronder kanker en diabetes, gemuteerde glycanen presenteren aan het oppervlak van aangetaste weefsels. Dit feit wekt interesse op het gebied van glycobiologie en lectinologie, aangezien onderzoekers de relatie tussen de boodschap die wordt gecodeerd door de gewijzigde koolhydraten en de ontwikkeling en progressie van ziekten willen ontrafelen. Met het oog hierop is de bioprospectie en karakterisering van nieuwe lectines die mogelijk biotechnologisch potentieel bieden, interessant in het licht van de bewezen toepassingen die bekende lectines tot nu toe hebben gepresenteerd. Dit werk was gericht op het analyseren van de antikankeractiviteit van het lectine van *Canavalia villosa* (Cvill), waarbij een parallel werd getrokken tussen de lectinetoxiciteit en het koolhydraatspecificiteit. De driedimensionale structuur van dit lectine werd opgelost en gebruikt om interacties met kankerglycanen *in silico* te analyseren. Hiervoor werd de aminozuursequentie van Cvill, dat eerder geïsoleerd en gedeeltelijk gekarakteriseerd was, bepaald door massaspectrometrie en gensequencing. De driedimensionale structuur werd bestudeerd en opgelost door middel van macromolecuulkristallografie en röntgendiffractie. De fijne koolhydraatspecificiteit van Cvill werd bepaald met behulp van een glycaanarray en moleculaire docking, en de antikankeractiviteit van Cvill werd geëvalueerd in HeLa-cellen, waarin ROS-productie en caspase-activering werden onderzocht. Het niveau van apoptose en expressie van autofagietranscripten werd geanalyseerd met qPCR. De resultaten toonden aan dat Cvill een cytotoxisch effect heeft op HeLa-cellen bij de hoogste geteste dosis, waarbij de koolhydraatbindingsplaats en het genereren van intracellulaire ROS een belangrijke rol spelen. Er werd ook waargenomen dat celdood werd veroorzaakt door mechanismen waarbij zowel autofagische als apoptotische routes betrokken zijn, met verhoogde expressie van LC3 en activering van caspase 8. Cvill vertoont een driedimensionale structuur die kenmerkend is voor vlinderbloemige lectines met een β -sandwich-domein en met geconserveerde bindingsplaatsen voor metalen en koolhydraten.

Sleutelwoorden: lectine; glycobiologie; kanker; *Canavalia villosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Permutação circular de lectinas ConA-like. A lectina madura é obtida como resultado do processamento pós-tradução da pré-pró-proteína	39
Figura 2	– Biblioteca de glicanos usada no experimento de array	60
Figura 3	– Mapa de peptídeos de Cvill oriundos da digestão da lectina com Tripsina, Quimotripsina, Asp-N, Pepsina e Glu-C e sequenciados por MSMS	68
Figura 4	– Gel de eletroforese de agarose 1,5% do DNA genômico extraído de sementes de <i>C. villosa</i>	69
Figura 5	– PCR de colônia de Cvill clonada em TOP10 <i>E. coli</i>	70
Figura 6	– Sequência do gene da lectina de <i>Canavalia villosa</i>	71
Figura 7	– Alinhamento de Cvill com lectinas do gênero <i>Canavalia</i>	73
Figura 8	– Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining demonstrando a distância evolucionária da lectina de <i>C. villosa</i> e outras lectinas de Diocleinae	75
Figura 9	– Cristais de Cvill complexada com α -metil-manosídeo formados na placa de otimização sob a condição PEG1000 17,5%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 5,0 e sulfato de lítio 0,2 M e visualizados em lupa	77
Figura 10	– Estrutura tridimensional da lectina de <i>C. villosa</i>	80
Figura 11	– Homotetrâmero de Cvill	81
Figura 12	– Sítio de Reconhecimento a Carboidratos (CRD) da lectina de <i>C. villosa</i>	83
Figura 13	– Representação tridimensional do MBS de Cvill	85
Figura 14	– Coordenação octaédrica dos íons cálcio e manganês no MBS de Cvill	86
Figura 15	– Sobreposição das estruturas tridimensionais de Cvill com outras lectinas de <i>Canavalia</i>	87
Figura 16	– Análise de Glycan microarray da lectina de <i>C. villosa</i>	90
Figura 17	– N-glicanos selecionados para os experimentos de Docking Molecular	93

Figura 18 – Interações dos N-glicanos complexos fucosilado e não fucosilado no CRD de Cvill	95
Figura 19 – Resultado do <i>docking</i> de dois N-glicanos assimétricos e Cvill	96
Figura 20 – Resultados do <i>docking</i> molecular de Cvill e o N-glicano complexo com galactose terminal e o N-glicano híbrido	97
Figura 21 – Curva dose-resposta da citotoxicidade de Cvill em células HeLa após os tempos de incubação de 24, 48 e 72h	99
Figura 22 – Citotoxicidade e reversão da atividade de Cvill em células HeLa após incubação por 48 h	100
Figura 23 – Morfologia das células HeLa após incubação com diferentes doses de Cvill por 48 h e reversão da atividade pelo açúcar α -metil-manosídeo	102
Figura 24 – Avaliação das espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas após 48 h de incubação de células HeLa com Cvill	103
Figura 25 – Nível de atividade das caspase 3/7, 8 e 9	105
Figura 26 – Gel de agarose 3% mostrando a amplificação bem sucedida do gene GAPDH a partir do cDNA recentemente sintetizado	108
Figura 27 – Expressão relativa de genes relacionados a morte e stress celular em células HeLa tratadas com Cvill a 125,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 32,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e 7,812 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com o controle	109
Figura 28 – Imagem de microscopia confocal da internalização de Cvill por células HeLa após 48 h de incubação	114
Figura 29 – Microscopia de fluorescência de células HeLa incubadas com Cvill nas concentrações de 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 125,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pelo período de 48 h	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lectinas de Diocleinae com estrutura resolvida.....	42
Tabela 2 – Resultados do teste de pré-cristalização.....	58
Tabela 3 – Primers desenhados para as reações de qPCR.....	64
Tabela 4 – Parâmetros da resolução da estrutura de Cvill.....	77
Tabela 5 – Interações entre os resíduos do CRD de Cvill e o ligante α -metil-manosídeo (MMA)	84
Tabela 6 – Valores de desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) de lectinas de Canavalia em relação a estrutura terciária de Cvill	88
Tabela 7 – Nomenclatura completa e scores (PLP.Fitness) dos glycanos testados nos experimentos de docking molecular	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
ATG	Genes Relacionados com Autofagia
Bak	Proteína antagonista homóloga de Bcl-2
Bax	Proteína X associada a Bcl-2
Bcl-2	Proteína 2 reguladora de apoptose da família Linfoma de células B
BCL-XL	Proteína XL reguladora de apoptose da família Linfoma de células B
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
CBol	Lectina de <i>Canavalia boliviana</i>
CD95	Receptor da família TNFR
CFL	Lectina de <i>Cratylia floribunda</i>
CGL	Lectina de <i>Canavalia gladiata</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConC	Lectina de <i>Canavalia cathartica</i>
ConGF	Lectina de <i>Canavalia grandiflora</i>
ConL	Lectina de <i>Canavalia lineata</i>
ConM	Lectina de <i>Canavalia maritima</i>
ConV	Lectina de <i>Canavalia virosa</i>
CPL	Lectina de <i>Camptosema pedicellum</i>
CRD	Domínio de Reconhecimento a Carboidrato
Cvill	Lectina de <i>Canavalia villosa</i>
CY5	Cianina5
DCG	Defeitos Congênitos de Glicosilação
DGL	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>
Dgui	Lectina de <i>Dioclea guianensis</i>
DISC	Complexo Sinalizador de Indução de Morte
DLL	Lectina de <i>Dioclea lasiocarpa</i>
Dly1	Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i>
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DrfL	Lectina de <i>Dioclea reflexa</i>
DRL	Lectina de <i>Dioclea rostrata</i>
DSL	Lectina de <i>Dioclea sclerocarpa</i>
Dvir	Lectina de <i>Dioclea virgata</i>
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
FADD	Proteína associada a Fas
FBS	Soro fetal Bovino
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetil-Galactosamina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Glc	Glicose
GlcNAc	N-Acetil-Glicosamina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
H2DCFDA	Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína
HeLA	Linhagem de célula de câncer cervical
His	Histidina
HPA	Lectina de <i>Helix pomatia</i>
HPRT1	Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase
HS	Sítio Hidrofóbico
IC50	Dose letal para matar 50% da população
LB	Referente ao meio de cultura Luria Bertani
LC3	Cadeia leve da Proteína Associada a Microtúbulo
LCA	Lectina de <i>Lens culinaris</i>
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Man	Manose
MBS	Sítio de Ligação a Metais
Met	Metionina

MMA	α -metil-manosídeo
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PEG	Polietilenoglicol
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
PSA	Lectina de <i>Pisum sativum</i>
PUMA	Modulador de apoptose regulado positivamente por p53
qPCR	Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real
RIP	Proteína Inativadora de Ribossomos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SBA	Lectina de <i>Glycine max</i>
Ser	Serina
Ser	Serina
Thr	Treonina
TNFR	Receptores de Fatores de Necrose Tumoral
TRITC	Isotiocianato de tetra-metil-rodamina
TxLCI	Lectina do bulbo de tulipa
Tyr	Tirosina
VCA	Lectina de <i>Viscum album</i>
amm	α -metil-manosídeo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	Glicobiologia.....	222
2.2	Lectinas.....	29
2.2.1	<i>Breve histórico</i>	29
2.2.2	<i>Classificação das lectinas.....</i>	32
2.2.2.1	<i>Classificação segundo afinidades a carboidratos.....</i>	32
2.2.2.2	<i>Classificação segundo a organização estrutural</i>	33
2.2.3	<i>Lectinas de Plantas.....</i>	34
2.2.4	<i>Lectinas de Leguminosas</i>	36
2.2.5	<i>Lectinas de Diocleinae.....</i>	37
2.2.5.1	<i>Estrutura terciária de lectinas de Diocleinae</i>	40
2.2.5.2	<i>Atividades biológicas e aplicações comerciais das lectinas de Diocleinae.....</i>	43
2.2.5.3	<i>Lectinas de Diocleinae e câncer.....</i>	45
2.2.5.4	<i>Pesquisas com células HeLa</i>	49
2.2.6	<i>A lectina de <i>Canavalia villosa</i></i>	51
3	OBJETIVOS	52
3.1	Objetivo geral.....	52
3.2	Objetivos específicos.....	52
4	METODOLOGIA.....	53
4.1	Isolamento da lectina.....	53
4.2	Determinação da estrutura primária de Cvill	53
4.2.1	<i>Sequenciamento por espectrometria de massas.....</i>	53
4.2.2	<i>Purificação do DNA de sementes de <i>C. villosa</i>.....</i>	54
4.2.3	<i>Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene da lectina.....</i>	54
4.2.4	<i>Sequenciamento por Sanger.....</i>	55
4.3	Análise filogenética	56
4.4	Resolução da estrutura tridimensional de Cvill.....	57
4.4.1	<i>Cristalização de Cvill.....</i>	57
4.4.2	<i>Difração dos cristais</i>	59
4.4.3	<i>Resolução da estrutura tridimensional.....</i>	59

4.5	Análises de interação com carboidratos	60
4.5.1	<i>Glycan array</i>	60
4.5.2	<i>Docking molecular</i>	61
4.6	Avaliação da atividade de Cvill em células HeLa	62
4.6.1	<i>Citotoxicidade em células HeLa</i>	62
4.6.2	<i>Avaliação da produção de ROS</i>	62
4.6.3	<i>Análise da atividade de Caspases</i>	63
4.6.4	<i>Análise por qPCR</i>	63
4.7	Estudo do endereçamento subcelular de Cvill por microscopia confocal	65
4.8	Análise estatística.....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	67
5.1	Sequência da lectina de <i>Canavalia villosa</i>	67
5.2	Elucidação da estrutura tridimensional de Cvill.....	76
5.3	Ensaio de interação com carboidratos	88
5.3.1	<i>Glycan array</i>	88
5.3.2	<i>Docking molecular</i>	92
5.4	Atividades biológicas	98
5.4.1	<i>Citotoxicidade em células HeLa</i>	98
5.4.2	<i>Produção de espécies reativas de oxigênio</i>	103
5.4.3	<i>Atividade de Caspases</i>	104
5.4.4	<i>Análise da expressão gênica em células HeLa tratadas com Cvill</i>	107
5.5	Análise da internalização da lectina por microscopia confocal.....	113
6	CONCLUSÃO.....	116
	REFERÊNCIAS.....	117
	APÊNDICE A - <i>CURRICULUM VITAE</i>	142

1 INTRODUÇÃO

O padrão de glicosilação de proteínas de membrana passa diversas informações acerca do estado fisiológico em que uma determinada célula pode se encontrar. As células utilizam os carboidratos para codificar mensagens relacionadas com funções informacionais como sinalização, comunicação entre células, desenvolvimento de tecidos, coesão celular, mitose, apoptose, dentre muitas outras. Dessa forma, as funções que sacarídeos podem apresentar vão muito além das atribuições energéticas e estruturais conhecidas dos açúcares (WIEDERSCHAIN, 2013). A grande capacidade de codificar informação que glicanos apresentam é derivada da extensiva variedade estrutural que essas moléculas podem apresentar. Diferente de ácidos nucleicos e proteínas, que são polímeros lineares, monossacarídeos podem realizar diferentes ligações glicosídicas entre si para formar carboidratos complexos e ramificados. Além disso, carboidratos também podem apresentar variações nas suas estruturas tridimensionais devido à presença de isômeros. Nesse contexto, o estudo dos carboidratos e de suas funções através da glicobiologia se faz de grande importância para elucidar como essas moléculas agem na transmissão de mensagens diferentes em tecidos, uma vez que já é bastante difundido na literatura que padrões de glicosilações modificados em glicoproteínas podem indicar patologias como câncer (DENNIS; GRANOVSKY; WARREN, 1999).

Moléculas que sejam capazes de decifrar o glicocódigo, como as lectinas, são, portanto, de grande valor em estudos de glicobiologia (AMBROSI et al., 2005). Lectinas são proteínas que identificam e se ligam a carboidratos de forma específica e reversível (SHARON; LIS, 2007; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Lectinas também são ubíquas, e já foram encontradas em todos os modelos de vida já estudados. Elas desempenham diferentes papéis intrínsecos em seus organismos de origem.

Em animais, as lectinas atuam principalmente interagindo com glicoconjugados endógenos em processos de adesão e sinalização celular; diapedese de células brancas pelo endotélio para sítios inflamados; captação, reciclagem e degradação de glicoproteínas pelo fígado; apresentação de antígenos para o sistema imune; modulação da ativação de células T, apoptose e autofagia (SHARON; LIS, 2004; WIEDERSCHAIN, 2013).

Em vegetais, a interação com carboidratos é geralmente direcionada para açúcares exógenos, fazendo com que as lectinas atuem usualmente como moléculas de defesa ou inseticida, no controle da homeostase, na simbiose de plantas com bactérias nitrificantes, e no estresse abiótico (AL ATALAH et al., 2011; MACEDO et al., 2007; OHIZUMI et al., 2009; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Devido ao atributo que as lectinas possuem de interagir de forma fina com carboidratos específico, essas proteínas, isoladas das mais diversas fontes, são ferramentas indispensáveis e são bastante utilizadas em estudos de glicoproteômica (HIRABAYASHI, 2004), como insumos no reconhecimento de tumores (SOUSA et al., 2016), e como moléculas com atividade anti-HIV (MOLCHANOVA et al., 2007; WONG; NG, 2005). Lectinas também já são comercializadas como colunas que reduzem a carga viral de pacientes de Hepatite C (TULLIS et al., 2009) e como uma pomada vaginal que previne infecções contra o vírus do HIV (BEAMAN et al., 1996). Além disso, vem aumentando bastante a utilização de lectinas no campo da pesquisa em bioquímica e glicobiologia com os *microarrays* (HU; WONG, 2009), cromatografias de afinidade e blotting de lectinas (DAN; LIU; NG, 2016).

Dessa forma, considerando as valiosas aplicações que lectinas podem apresentar em diferentes modelos de estudos, essa tese foi desenvolvida em cima de um projeto de isolamento, caracterização e estudos de atividades biológicas de uma lectina de planta, da família das leguminosas, *Canavalia villosa*. O trabalho foi fruto de uma colaboração entre o laboratório BioMol-Lab (Universidade Federal do Ceará, Brasil) coordenado pelos prof. Dr Benildo Sousa Cavada e profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento, e o Laboratório de Bioquímica e Glicobiologia (Universidade de Gante, Bélgica) coordenado pela profa. Dra. Els Van Damme.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Glicobiologia

Carboidratos, também conhecidos como açúcares, glicanos ou hidratos de carbono, são biomoléculas constituídas principalmente por carbono, oxigênio e hidrogênio, que apresentam fórmula empírica $(CH_2O)_n$, e que contém os grupos funcionais aldeído ou cetona em sua estrutura, podendo também possuir duas ou mais hidroxilas por molécula. Os açúcares são conhecidos pelo sabor doce e são responsáveis por grande parte da ingestão calórica da dieta de humanos ao redor do mundo. Amido, por exemplo, é um carboidrato bastante reduzido, e, portanto, de alto valor energético, que é frequentemente utilizado na alimentação, e é encontrado em pães, massas e bolos. Celulose e quitina são polímeros de carboidratos estruturais e são os compostos biológicos mais abundantes do planeta. Os carboidratos exercem papéis diversos e essenciais no metabolismo celular e a glicobiologia é a ciência que estuda e caracteriza os diferentes aspectos dessas biomoléculas (GABIUS, 2018; NELSON; COX, 2018)

Os tipos mais simples de carboidratos, os monossacarídeos, são os blocos construtores dos polímeros como o amido, a celulose e o glicogênio. Os monossacarídeos mais simples são trioses, como o gliceraldeído, que é um composto formado por apenas três carbonos. Monossacarídeos de cinco carbonos (pentoses) ou mais (hexoses em diante) tendem a se ciclicizar quando em solução aquosa formando as piranoses (quando o anel formado é composto por seis átomos) ou furanoses (quando o mesmo é composto por cinco) (NELSON; COX, 2018).

Com exceção da di-hidroxicetona, todos os monossacarídeos apresentam centros quirais em suas estruturas, o que os torna moléculas opticamente ativas. As diferentes configurações estereoisoméricas que carboidratos podem apresentar são um dos motivos pelos quais podemos encontrar grande variedade de estruturas glicídicas na natureza. Os monossacarídeos podem ser classificados quanto a sua estereoisomeria com base na nomenclatura D e L utilizada para diferenciar os dois estereoisômeros do gliceraldeído. Dois estereoisômeros distintos apresentam estruturas tridimensionais diferentes, e portanto, interações que envolvem topologia molecular, como a ligação de um receptor e seu ligante, ou de uma enzima e seu substrato podem resultar em resultados diferentes dependendo do estereoisômero que está envolvido no processo (NELSON; COX, 2018; YURIEV; RAMSLAND, 2012).

Monossacarídeos também são divididos em duas famílias, a das aldoses, que apresentam o grupamento aldeído em sua estrutura, como a glicose, e a das cetoses, que apresentam uma cetona em suas estruturas, como a frutose. A formação de anéis em monossacarídeos em soluções aquosas envolve uma reação entre um grupo hidroxila do monossacarídeo e seu grupamento carbonila. Essa reação resulta na formação de um hemiacetal, no caso de monossacarídeos do tipo aldose, ou hemicetal, no caso de cetoses. As formas cíclicas de monossacarídeos podem ainda gerar dois tipos de anômeros, que são chamados de α - ou β -, dependendo da configuração do carbono anomérico no momento em que o ciclo é fechado (ERNST; HART; SINAÏ, 2008; NELSON; COX, 2018).

Modificações em monossacarídeos como adições ou substituições de hidroxilas por outros grupamentos também são bastante comuns de serem encontradas na natureza. N-acetilglicosamina é um exemplo de uma piranose com uma hidroxila em C2 substituída por uma amina adicionada de um grupo acetila. Essa hexose é sempre encontrada na base de N-glicanos, fazendo a ponte entre o resíduo de asparagina o restante do glicano. Outras hexoses importantes como L-fucose, desoxirribose e o ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) também são derivadas de outras piranoses mais simples (NELSON; COX, 2018).

Dois monossacarídeos podem ser unidos por uma ligação covalente chamada ligação glicosídica. Essa ligação envolve o carbono anomérico de um monossacarídeo com uma das hidroxilas do outro. O produto dessa reação é chamado de dissacarídeo e envolve a formação de um grupamento acetal ou cetal (MIN; DUNN; JONES, 1992). Dissacarídeos como a sacarose, galactose e frutose são encontrados em diversos alimentos bastante consumidos como a cana de açúcar, o leite, e frutas. Dissacarídeos se encaixam em uma categoria chamada oligossacarídeos, que engloba glicanos constituídos entre 2 e 20 monossacarídeos. Polímeros que são construídos com mais de 20 unidades de monossacarídeos se encaixam na categoria de polissacarídeos (NELSON; COX, 2018).

Polímeros de carboidratos podem desempenhar função de fornecimento e armazenamento de energia para a célula. A construção desses polímeros de reserva se dá quando a disponibilidade de açúcares excede a quantidade utilizada para a respiração celular e a síntese de precursores. O amido é um exemplo de um homopolímero ramificado de glicose muito utilizado como reserva energética por plantas. Em células animais, o carboidrato de estocagem preferido é o glicogênio, que também é um homopolímero de glicose com os mesmos tipos de ligações entre os monômeros, porém que difere do amido por ser mais ramificado que este. O armazenamento de combustível na forma de polímeros em vez de monômeros é vantajoso pois

moléculas poliméricas não contribuem para o aumento da pressão osmótica dentro da célula da forma como a mesma massa em monossacarídeos contribuiria (WIEDERSCHAIN, 2013).

Carboidratos também apresentam função estrutural, como a quitina envolvida na formação do exoesqueleto de artrópodes. A quitina é um polissacarídeo impermeável não ramificado e formado por monômeros de N-acetil-glicosamina unidos por ligações $\beta(1-4)$. Outro polissacarídeo estrutural amplamente encontrado na natureza é a celulose. Componente fundamental da estrutura de plantas, a celulose é constituída por monômeros de glicose interligados por ligações $\beta(1-4)$. Devido ao caráter dessas ligações, a celulose não pode ser digerida por enzimas que clivam o amido e o glicogênio, não podendo, portanto, ser digerida a monossacarídeos por humanos ou outros vertebrados (ERNST; HART; SINAÏ, 2008; NELSON; COX, 2018).

Além das funções estruturais e energéticas previamente discutidas, os carboidratos também apresentam funções informacionais, sendo responsáveis pela transmissão de informações em processos celulares que incluem desde a determinação de grupos sanguíneos até a codificação de eventos complexos, como a apoptose. Para entender como as células utilizam essas moléculas para codificar informações tão variadas, é importante lembrar que carboidratos podem apresentar grande complexidade estrutural devido à combinação de diversos fatores na construção de seus polímeros e oligômeros, tais como sequência e conteúdo de monossacarídeos, modificações e substituições de grupos nos anéis, e tamanho do anel. Além disso, diferente de ácidos nucleicos e proteínas, que são polímeros lineares, monossacarídeos podem formar ligações glicosídicas em mais de um ponto do anel, formando cadeias ramificadas, e aumentando significativamente o número de estruturas possíveis de serem construídas para um mesmo conjunto de monômeros. Essa complexidade é incrementada ainda em função da existência de diferentes isômeros que podem existir para um monossacarídeo. Devido a essa ampla variedade de estruturas que podem ser formadas, os carboidratos se tornam moléculas chave que podem ser utilizadas na codificação de diversas mensagens (GABIUS; ROTH, 2017). Dessa forma, a codificação de mensagens biológicas na estrutura compacta e tridimensional de carboidratos é denominada de glicocódigo, e permite grande compartilhamento de informações no espaço limitado da superfície da membrana celular (GABIUS, 2018).

O glicocódigo é uma ferramenta amplamente utilizada em diversos processos celulares altamente específicos e eficientes, como interação e adesão entre células, sinalização biológica, coagulação sanguínea, resposta imune, recrutamento de leucócitos na inflamação,

desenvolvimento de tecidos, recepção de hormônios, fertilização, embriogênese, adesão de agentes infecciosos a células hospedeiras, e metástase (WIEDERSCHAIN, 2013).

Essas funções informacionais muitas vezes são desempenhadas por glicanos que são covalentemente associados a proteínas ou lipídeos, formando os glicoconjugados. A glicosilação de proteínas é uma modificação pós-traducional que ocorre quando, através da atividade de enzimas como glicosiltransferases e glicosidases, resíduos de monossacarídeos são adicionados em sítios específicos de proteínas, sendo chamadas de N-glicosilações quando a adição ocorre no átomo de nitrogênio da cadeia lateral de um resíduo de asparagina incluída no sequon Asn-X-Ser/Thr (onde X pode ser qualquer aminoácido com exceção da prolina) e O-glicosilações quando a conjugação com o açúcar é feita no átomo de oxigênio de resíduos de serina ou treonina (GABIUS et al., 2011). A parte glicídica de glicoproteínas pode desempenhar marcações para atividades de degradação bem como proteção de proteólise, e endereçamento de proteínas livres, além de também poder atuar auxiliando na solubilização e estabilização das mesmas (KATTLA et al., 2011b). De forma semelhante às glicoproteínas, as glicosilações de lipídeos também são estruturalmente diversas e estão envolvidas muitas vezes com funções de sinalização, reconhecimento e adesão celular, de forma que alterações nos padrões de glicosilações desses glicolipídios estão muitas vezes associadas a doenças neurológicas e autoimunes (KOPITZ, 2017). Células de tecidos diferentes apresentam padrões de glicosilações distintos em suas glicoproteínas e glicolipídios, e células de um mesmo tecido também podem apresentar glicanos modificados em condições fisiológicas diferentes desse mesmo tecido (WIEDERSCHAIN, 2013). Esse padrão variante de glicosilação seria responsável portanto pela codificação de diferentes mensagens, que seriam inerentes da condição fisiológica e metabolismo vigente da célula.

Devido ao caráter anfipático que glicoproteínas e esfingolipídeos possuem, é possível encontrar essas moléculas fazendo parte de membranas celulares, incluindo a bicamada lipídica da membrana plasmática, membranas de organelas e até a nuclear. Glicoconjugados de membrana são responsáveis pela reprodução de sinais e desencadeamento de processos celulares. A fração glicídica dessas moléculas complexas podem estar localizados tanto na face externa da membrana plasmática quanto dentro de organelas. Quando localizados na face externa da membrana celular, são os principais constituintes do glicocálice (WIEDERSCHAIN, 2013).

O glicocálice é uma camada densamente ocupada por proteínas e glicanos, que é localizada na superfície externa das células e é responsável pela difusão de receptores de membrana, pela adesão e comunicação entre células, e pela proteção mecânica e contra

patógenos (KUO et al., 2018). Essa estrutura de revestimento é caracterizada pelo seu perfil glicídico variado, e é encontrada em diversos tipos celulares, desde bactérias (fazendo parte da parede celular) até células eucarióticas, como extensão da membrana plasmática. Em células animais, o glicocálice é amplo, complexo e conta com a presença extensiva de glicosaminoglicanos, que fornecem uma carga líquida geral negativa para a membrana (GABIUS et al., 2011). Carboidratos e glicoconjugados também podem ser secretados e exercer suas funções informacionais em fluidos biológicos como matriz extracelular, saliva e sangue. Os hormônios luteinizante e tireotropina, por exemplo, são glicoproteínas que são reconhecidas através de suas porções glicídicas por receptores do tipo lectina em hepatócitos e retirados da circulação sanguínea, o que regula a concentração e o efeito estimulatório desses hormônios no sistema (CAHOREAU; KLETT; COMBARNOUS, 2015).

A função informacional do glicocálice é amplamente utilizada por agentes patogênicos durante processos de infecções, como as que ocorrem pelo vírus da influenza do tipo A e B, e contaminações pelas bactérias *Vibrio cholera*, *Clostridium botulinum* e *Helicobacter pylori* e pelo protozoário *Plasmodium falciparum*. Em todos esses casos, o reconhecimento celular e a subsequente infecção ocorrem após a ligação desses agentes patogênicos a carboidratos sializados. Além disso, mais da metade dos receptores celulares conhecidos são glicoconjugados que se ligam de forma específica e seletiva a seus ligantes correspondentes. O receptor de insulina em células do fígado e adipócitos é uma exemplo desses receptores do tipo glicoproteínas (UEMATSU et al., 2012; WIEDERSCHAIN, 2013). De uma maneira geral, glicosilações fornecem às proteínas mais possibilidades de codificação de mensagens do que as modificações pós traducionais amplamente conhecidas de fosforilação, acetilação e sulfatação (GABIUS et al., 2011).

A glicobiologia é a ciência que estuda toda essa variedade de glicanos que existem nas células, incluindo suas funções, estruturas e metabolismo, além dos processos bioquímicos e físico-químicos de alta especificidade que envolvem essas biomoléculas (MUNRO, 2000; WIEDERSCHAIN, 2013). Também são alvos de estudos da glicobiologia as doenças relacionadas com defeitos do metabolismo de carboidratos e as consequências que elas trazem para o organismo, o que leva a alguns pesquisadores a acreditar que o termo glicomedicina é mais apropriado para tratar desse assunto no contexto atual de pesquisa e desenvolvimento (WIEDERSCHAIN, 2013).

Diversos distúrbios genéticos são conhecidos por causar defeitos no metabolismo de carboidratos. Os chamados Defeitos Congênitos de Glicosilação (DCG) são desordens na glicosilação de lipídeos e de proteínas causadas por mutações em genes de vias biossintéticas

de glicoconjugados, desencadeando o surgimento de diversas síndromes. O desenvolvimento de técnicas potentes de sequenciamento gênico acelerou a identificação dessas mutações e permitiu que fosse mostrada a relação de causalidade entre elas e os fenótipos clínicos de DCG. Em 2015, foi atingido o número de 100 defeitos genéticos catalogados e descritos como causadores de DCG (HENNET; CABALZAR, 2015). A descoberta e o estudo aprofundado dessas patologias ajudaram a trazer conhecimento sobre o papel de glicanos como moléculas informacionais que atuam no metabolismo de células e tecidos (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). Desordens no metabolismo dos carboidratos também estão presentes em doenças como diabetes, Alzheimer, deficiências na cascata de coagulação e distrofias musculares (WIEDERSCHAIN, 2013; ZHANG et al., 2020).

Em tumores malignos, também são observadas mudanças significativas no espectro de glicoconjugados do tecido e na atividade de enzimas responsáveis pela biossíntese ou degradação dessas macromoléculas (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Células tumorais tendem a apresentar um glicocálice mais espesso devido a produção aumentada de glicanos como mucinas, ácido hialurônico e ácidos polisiálicos. Esse espessamento dificulta a interação receptor-ligante da célula cancerígena com outras células do tecido e outras moléculas da matriz extracelular, podendo resultar em perda de adesão e metástase. Até mesmo a densidade de carga líquida do glicocálice de células cancerígenas é diferente do de células saudáveis, sendo carregado positivamente, devido ao pH mais ácido que células cancerígenas tendem a apresentar em seu entorno (KUO et al., 2018).

Algumas mudanças em padrões de glicosilação são detectáveis cedo no desenvolvimento de câncer, progredindo de acordo com o crescimento de tumores (PEIXOTO et al., 2019). Estes padrões alterados de glicosilação podem ser utilizados como biomarcadores moleculares para diagnóstico precoce de câncer. Biomarcadores são moléculas cujo surgimento caracteriza um determinado estado fisiológico de uma célula ou tecido, o que os torna importantes ferramentas para diagnose de doenças (TANIGUCHI; KIZUKA, 2015). Para poder ser utilizada como um biomarcador, uma molécula deve apresentar alta especificidade e sensibilidade em testes de diagnóstico, visando evitar resultados de falsos positivos e falsos negativos, o que torna a identificação de novos biomarcadores um feito extremamente criterioso. A pesquisa e identificação de biomarcadores para câncer é de grande importância pois, além de auxiliar no acompanhamento da progressão do tratamento de pacientes, permitiria um diagnóstico inicial prematuro de cânceres de alto risco e o início precoce de terapias, o que resulta em maiores taxas de sobrevida e recuperação do paciente (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017).

Alguns biomarcadores aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para monitoramento e diagnóstico de cânceres como o antígeno CA 125 de câncer de ovário e o CA 15-3 presente em câncer de mama são glicoproteínas já bem estudadas e documentadas. A descoberta de novos biomarcadores desse tipo, no entanto, é mais laboriosa que biomarcadores proteicos ou gênicos, uma vez que carboidratos apresentam uma maior variedade estrutural e as técnicas atuais de detecção e caracterização de glicanos ainda apresentam limitações quando comparadas com as técnicas de sequenciamento de proteínas e genes (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017).

Nesse contexto, moléculas que sejam capazes de decifrar o glicocódigo e selecionar glicanos específicos marcando-os são de extrema importância em pesquisas bioquímicas e na área da glicobiologia. Dentre as moléculas ligantes de carboidratos, as lectinas chamam a atenção por serem proteínas que se ligam de forma específica a carboidratos e conseguem, dessa forma, decifrar/traduzir o glicocódigo de forma eficiente. Lectinas, do latim *legere*, que significa selecionar, são definidas como (glico)proteínas capazes de se ligar a mono- ou oligossacarídeos de forma altamente específica e reversível, sem apresentar ação catalítica em seu domínio de ligação a carboidrato (GABIUS et al., 2011; PEUMANS; VAN DAMME, 1995; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Essas proteínas são amplamente distribuídas na natureza e estão presentes em diversos seres vivos, existindo relatos de sua presença desde em microrganismos simples como fungos, bactérias e vírus até organismos complexos como plantas e animais (SHARON; LIS, 2004).

Desde o início dos anos 80 a interação de lectinas com glicanos característicos de câncer já é estudada com o relato da ligação da lectina de *Helix pomatia* (HPA) a células em metástase de câncer de mama (LEATHEM; DOKAL; ATKINS, 1983). Desde então, também já foi observado que outras lectinas apresentam atividades semelhantes a HPA, inclusive manifestando fina seletividade à células tumorais, com a interessante propriedade de não desencadear citotoxicidade em células saudáveis, como observado com as lectinas de VCA de *Viscum album* (LYU; PARK, 2007), ConA de *Canavalia ensiformis* (LEI; CHANG, 2007), e ConBr de *Canavalia brasiliensis* (SILVA et al., 2014a), dentre outras (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Dessa forma, uso de lectinas pode facilitar a descoberta de novos biomarcadores devido a algumas dessas proteínas serem capazes de selecionar e se ligar exclusivamente a antígenos específicos de câncer, tornando o isolamento e estudo de marcadores moleculares mais prático e rápido (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017; OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Considerando todas

essas atividades que essas proteínas podem apresentar, uma revisão bibliográfica mais aprofundada sobre elas será apresentada a seguir.

2.2 Lectinas

As lectinas foram inicialmente denominadas hemaglutininas por Elfstrand em 1898 devido à capacidade que essas moléculas apresentam de aglutinar eritrócitos (ELFSTRAND, 1898). Essa propriedade das lectinas se deve a elas usualmente conterem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, sendo, portanto, di- ou polivalentes. A hemaglutinação advém da interação dessas proteínas com as glicoproteínas de membrana dos eritrócitos, formando uma espécie de rede entre lectinas e células, o que resulta na aglutinação que pode ser observada a nível macroscópico (LIS; SHARON, 1998). Em 1954 Boyd e Shapleigh cunharam o termo lectina se baseando no significado latino da palavra para se referir a essas proteínas que seletivamente se ligam a tipos sanguíneos do sistema ABO (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Esse termo é utilizado até hoje em dia para se referir a essas moléculas. A seguir será feito uma breve análise do histórico de isolamento bem como a descrição de fatos interessantes sobre notáveis lectinas.

2.2.1 Breve histórico

Os primeiros trabalhos de detecção e isolamento de lectinas remontam a mais de 130 anos atrás (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), com o pioneirismo sendo de Stillmark, que em 1888, durante os trabalhos de sua tese de doutorado, identificou que a toxina de *Ricinus communis* (ricina), era de origem proteica, causava aglutinação em eritrócitos e precipitava proteínas de soro sanguíneo (STILLMARK, 1888). Ricina é uma proteína do tipo inativadora de ribossomos (RIP), extremamente tóxica e que já foi utilizada em ações de bioterrorismo, as quais ocorreram durante as duas grandes guerras mundiais (OLSNES, 2004) e em intercepções de cartas endereçadas ao presidente dos Estados Unidos em 2013 (PAYNE; SMITH; CRATTY, 2013). Abrina é outra lectina do tipo RIP oriunda de sementes de *Abrus precatorius* cujos trabalhos de identificação e caracterização datam de 1891, pouco tempo depois dos de ricina (HELLIN, 1891). Devido à alta toxicidade que essas lectinas apresentam, ambas foram também extremamente importantes no desenvolvimento da imunologia como ciência, como mostram os trabalhos de Ehrlich, os quais relataram que ratos injetados com essas toxinas a baixas doses e de forma subcutânea desenvolviam imunidade à ação tóxica das

mesmas (EHRLICH, 1891). Ehrlich viria a receber anos depois o prêmio Nobel da medicina em 1908 pelos diversos trabalhos desenvolvidos na área de imunologia (POLITO et al., 2019). As RIPS de *R. communis* (família das Euphorbiaceae) e de *A. precatorius* (família das Fabaceae) são quimerolectinas, e apresentam, portanto, dois domínios com funções distintas, um com a ação de inativação ribossomal, que desencadeia a toxicidade, e o outro com propriedade de ligação a carboidratos (HUNG et al., 1993; OLSNES; KOZLOV, 2001).

Trabalhos de isolamento de novas lectinas prosseguiram efetivamente apenas 30 anos depois, quando Sumner purificou a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) através da cristalização de frações de globulinas por semi-saturação com sulfato de amônio (SUMNER, 1919). Sumner ganhou o prêmio Nobel anos depois, em 1947, pelos trabalhos que desenvolveu em 1926 que envolviam a cristalização da enzima urease (SUMNER, 1926). ConA é uma lectina que não apresenta atividade inibidora de ribossomo como as previamente isoladas ricina e abrina, mas que possui afinidade por manose e glicose. ConA é uma das lectinas de plantas mais famosas e mais bem estudadas. Lectinas oriundas da mesma subtribo que a de *C. ensiformis*, a subtribo das Diocleinae, são chamadas de ConA-like. Essa proteína foi pioneira em estudos de caracterização físico-química e estrutural de lectinas, e já teve sua ação testada nos mais diversos modelos de atividades biológicas. ConA possui interessantes propriedades antineoplásicas (LI et al., 2011), antitumorais (SHI et al., 2014), edematogênicas (BENTO et al., 1993), e vasodilatadoras (ASSREUY et al., 2009), dentre outras (CAVADA et al., 2019b). Devido à ConA ter sido isolada a mais de 100 anos atrás, e ter sido extensivamente caracterizada e testada ao longo dos anos, ela é amplamente utilizada como padrão de comparação quando são avaliadas as propriedades de novas lectinas isoladas, sendo estas da mesma tribo e família que as *Canavalias* ou de clados distintos.

Durante a década de 50, grande parte dos trabalhos desenvolvidos com lectinas envolviam testes de hemaglutinação com diferentes extratos de sementes de leguminosas. Nestes, a atividade era avaliada em eritrócitos de diversas espécies animais ou em eritrócitos de humanos de diferentes tipagens sanguíneas. Foi observado que muitos desses extratos de sementes apresentavam especificidade a somente alguns determinados tipos sanguíneos (SHARON; LIS, 2004). Dessa forma, estudos de inibição das atividades de lectinas por açúcares simples, juntamente com os resultados seletivos de aglutinação dos eritrócitos forneceram indícios sobre qual seria a provável constituição dos glicanos de membrana de hemácias do sistema sanguíneo ABO humano (MORGAN; WATKINS, 2000).

A quantidade de trabalhos que envolviam o isolamento de novas lectinas cresceu consideravelmente apenas depois da década de 60 com o aprimoramento de técnicas

cromatográficas de afinidade (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965). Além disso, também passou a ser dada mais atenção a estudos de interação de lectinas com carboidratos devido às ações mitogênicas apresentadas pelas lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e ConA. O foco na pesquisa com lectinas passou a ser, então, mecanismos celulares desencadeados a partir das interações de lectinas com glicanos de membrana celular e a seletividade que algumas lectinas apresentavam a células de câncer (SHARON; LIS, 2004).

Na década de 70 e 80, outros clados dentro das leguminosas também passaram a ser explorados em busca de novas lectinas. Na sub-família das Caesalpinioideae, foram prospectadas e isoladas lectinas das espécies de *Griffonia simplicifolia* (MURPHY; GOLDSTEIN, 1977) e *Bauhinia purpura* (YOUNG; WATSON; WILLIAMS, 1985). Extratos de diversas sementes do gênero *Acacia* da sub-família Mimosoideae também deram resultados positivos para a atividades de lectinas (HAPNER; JERMYN, 1981). Dentro da tribo Viciae se destacam as lectinas de *Lathyrus ochrus* (ROUGE; SOUSA-CAVADA, 1984) isolada em 1984, *Lens culinaris*, isolada em 1969 (HOWARD; SAGE, 1969), *Vicia cracca*, de 1980 (KARHI; GAHMBERG, 1980) e *Vicia sativa* isolada em 1979 (FALASCA et al., 1979). Os primeiros trabalhos envolvendo identificação e purificação de lectinas de animais e de fungos também ocorreram durante esse período (BORREBAECK; MATTIASON; NORDBRING-HERTZ, 1984; KILPATRICK, 2002).

Também foi durante as décadas de 70 que, com o aprimoramento de técnicas de degradação de Edman, foi determinada a sequência de aminoácidos completa de uma lectina pela primeira vez, em 1972. A sequência de ConA foi determinada por digestão proteica com brometo de cianogênio e sequenciamento de Edman (WANG et al., 1975). Desde então, com o advento das técnicas de espectrometria de massas e de sequenciamento de genomas, mais sequências de lectinas foram resolvidas com o passar dos anos. De posse da informação da estrutura primária de lectinas, estudos de alinhamento e de predição de estrutura podem ser executados trazendo informações importantes sobre a filogenia dessas proteínas.

A estrutura tridimensional de ConA foi resolvida concomitantemente com a estrutura primária, tornando essa lectina também a primeira a ter sua estrutura terciária resolvida por cristalografia de macromoléculas (BECKER et al., 1975). Desde então, dezenas de novas estruturas tem sido resolvidas por técnicas de cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear e crio-microscopia todos os anos. Atualmente existem mais de 2300 estruturas de 564 lectinas diferentes depositadas no PDB (UNILECTIN, 2021).

Lectinas são importantes insumos em estudos de glicobiologia, e apresentam diversas aplicações biotecnológicas nas áreas da saúde e da agricultura (TSANEVA; VAN

DAMME, 2020). Lectinas também são bastante diversas, apresentando diferentes afinidades a carboidratos, diferentes perfis estruturais e origens diferentes. A seguir será discutido um pouco sobre como são feitas as classificações das lectinas de acordo com algumas de suas propriedades.

2.2.2 Classificação das lectinas

As lectinas podem ser classificadas de acordo com suas características bioquímicas, estruturais, funcionais, e também segundo os seus organismos de origem e o tipo de afinidade a açúcar que elas apresentam (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Essas proteínas são conhecidamente ubíquas, já tendo sido encontradas nos mais diversos tipos de organismos, incluindo fungos, bactérias, vírus, plantas, animais invertebrados, animais vertebrados e protistas. Nesses organismos elas desempenham papéis intrínsecos diversos, e podem apresentar também grandes diferenças em suas propriedades estruturais, bioquímicas e de ligação a carboidratos (SHARON; LIS, 2007). Pressupondo isso, algumas vezes torna-se difícil agrupar lectinas tão diferentes dentro de uma mesma classificação, e para esse trabalho, o foco será dado para lectinas de plantas, sem, no entanto, preterir totalmente lectinas de outros reinos das definições utilizadas. A seguir será discutido um pouco mais a respeito das categorizações dessas proteínas segundo suas afinidades a carboidratos e organizações de suas estruturas.

2.2.2.1 Classificação segundo afinidades a carboidratos

Considerando a afinidade que lectinas podem apresentar a monossacarídeos, essas proteínas podem ser divididas entre cinco grupos, sendo eles os das que se ligam à manose, galactose/N-acetil-galactosamina, N-acetil-glicosamina, fucose, ou ácido-N-acetilneuramínico. Interessantemente, esses são os açúcares que mais são encontrados compondo os glicoconjugados de membranas de mamíferos (SHARON; LIS, 2007). Somente dentro do reino Plantae já foram isoladas lectinas pertencentes a cada um desses grupos (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Nas leguminosas se destacam as lectinas com afinidade a manose, glicose e seus derivados devido à grande quantidade de lectinas do tipo ConA-like isoladas. Lectinas diferentes porém com o mesmo perfil de afinidade não necessariamente desencadearão as mesmas respostas em atividades biológicas nem apresentarão a mesma especificidade fina a açúcares em ensaios de *glycan array*, apesar da alta similaridade que pode ser encontrada entre as sequências de lectinas de legume (CAVADA et al., 2019b). De maneira geral, lectinas

interagem mais fracamente com monossacarídeos, apresentando interações mais fortes com glicanos do tipo oligossacarídeo em diante (SHARON; LIS, 2007).

2.2.2.2 Classificação segundo a organização estrutural

Além da classificação descrita anteriormente, outra possibilidade de categorização de lectinas está relacionada com a capacidade que essas proteínas podem possuir de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Essa classificação se baseia na estrutura madura de lectinas, e agrupa essas moléculas nas quatro classes descritas a seguir: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As merolectinas apresentam um único sítio de interação a carboidratos em sua estrutura. Protômeros desse tipo não oligomerizam, e devido a isso, elas são consideradas monovalentes, não podendo aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (CAVADA et al., 2001). Devido a merolectinas não serem capazes de causar hemaglutinação em eritrócitos, a primeira definição de lectinas, que as retratavam exclusivamente como “proteínas causadoras de aglutinação” (ELFSTRAND, 1898) torna-se de fato equivocada, visto que merolectinas não deixam de ser lectinas por não aglutinarem. O exemplo de merolectina mais famoso é o da heveína, uma pequena proteína monomérica ligante de quitina, isolada do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991).

As hololectinas, diferentemente das merolectinas, apresentam pelo menos dois domínios de reconhecimento a carboidrato em sua estrutura, sendo estes obrigatoriamente idênticos entre si ou estruturalmente bastante semelhantes, o que faz com que esse tipo de lectina estabeleça interações com somente um tipo de carboidrato, apesar dos sítios múltiplos. Por serem proteínas di- ou multivalentes, elas são capazes de causar aglutinação celular. A maioria de lectinas de plantas isoladas, como ConA e PHA, pertence a essa classe (CAVADA et al., 2001).

As quimerolectinas apresentam de forma concomitante em suas estruturas pelo menos um sítio de reconhecimento a carboidrato e um outro sítio com função diferente. O sítio não lectínico pode apresentar uma função enzimática, ou uma outra função biológica, que deve obrigatoriamente ser capaz de desempenhar sua atividade independentemente do CRD. Dependendo do número de unidades ligantes a açúcares, as quimerolectinas podem apresentar comportamento similar ao de merolectinas ou ao de hololectinas (VAN DAMME et al., 1998). RIPs do tipo 2 são exemplos de quimerolectinas, que apresentam um domínio de reconhecimento a carboidratos e um sítio com atividade de nuclease (FERRIZ-MARTINEZ et

al., 2010). A lectina de *Parkia platycephala* também é uma quimerolectina com atividade de quitinase e afinidade a glicose/manose (MANN et al., 2001).

As superlectinas apresentam pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, que devem obrigatoriamente reconhecer açúcares estruturalmente distintos. As superlectinas se diferenciam das hololectinas porque estas últimas são capazes de reconhecer somente um tipo de açúcar (CAVADA et al., 2001). Alguns autores, no entanto, podem considerar as superlectinas como um subtipo de quimerolectinas (ITAKURA et al., 2017). Como exemplo de superlectina, podemos citar TxLCI, extraída dos bulbos de tulipa e que apresenta afinidade a manose e N-acetil-galactosamina (VAN DAMME et al., 1996).

2.2.3 Lectinas de Plantas

Estudos envolvendo a identificação e o isolamento de lectinas foram relatados desde o final de 1900 e, até o presente, lectinas foram identificadas em todas as formas de vida, incluindo desde bactérias simples a organismos complexos, como animais e plantas (SHARON; LIS, 2007). Lectinas de plantas e animais são um grupo de proteínas amplamente estudado, com grande quantidade de informações estruturais depositadas em bancos de dados de proteínas. As lectinas animais apresentam grande variedade de sequências e podem ser agrupadas, segundo Kilpatrick, em doze famílias evolutivamente relacionadas que apresentam semelhanças na arquitetura de suas estruturas (KILPATRICK, 2002; LOH et al., 2017). As lectinas das plantas também são divididas em doze famílias (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), que serão discutidas posteriormente com mais detalhes. Lectinas de plantas e animais com origens não homólogas e sequências não relacionadas podem apresentar estruturas terciárias semelhantes, como o caso do motivo beta-sanduiche, que pode ser encontrada tanto em galectinas de vertebrados quanto em lectinas de leguminosas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; LORIS, 2002). Normalmente, a existência de motivos comuns em lectinas de grupos altamente não relacionados é o resultado da evolução convergente (LOH et al., 2017; LORIS, 2002).

Embora haja menos informações sobre sequências de lectinas de microrganismos e de fungos depositadas em bancos de dados, a evidência de homologia entre essas proteínas e lectinas de plantas já pôde ser rastreada, uma vez que estudos relataram que subdomínios evolutivamente relacionados de ricina estão presentes em ambas lectinas de fungos e plantas (CANDY et al., 2001, 2003). Domínios homólogos conservados também já foram encontrados

em lectinas de bactérias e algas e em lectinas superiores de plantas (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

Lectinas de algas apresentam atividades biológicas interessantes e geralmente são proteínas monoméricas de baixo peso molecular que apresentam propriedades de ligação de carboidratos termoestáveis devido à presença de ligações dissulfeto (SINGH; THAKUR; BANSAL, 2015). As lectinas vegetais e animais também apresentam aplicações biotecnológicas relevantes e são conhecidas por serem estruturalmente diversas. Essas lectinas são agrupadas em várias famílias estruturais e podem cumprir uma variedade de funções inatas em seu organismo de origem, geralmente lectinas de plantas estão envolvidas em mecanismos de crescimento e defesa, enquanto as lectinas animais são responsáveis por processos de reconhecimento e comunicação celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; WIEDERSCHAIN, 2013).

Devido ao trabalho pioneiro desenvolvido inicialmente com lectinas vegetais, esse grupo de proteínas foi, por muito tempo, o foco principal de pesquisa com lectinas de diversos grupos. As interessantes aplicações biológicas que essas moléculas apresentam e a relativa facilidade com que essas lectinas poderiam ser purificadas em quantidades razoáveis a partir de plantas também contribuíram para o grande interesse de grupos de pesquisa por essas proteínas. Como resultado, as sequências de aminoácidos de lectinas foram resolvidas muito mais rápido do que a sequência de qualquer outro grupo de proteínas vegetais (SHARON, 2007; VAN DAMME et al., 1998). Existem atualmente 2.332 depósitos de estruturas terciárias de lectinas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) de um total de 308 espécies. A maioria dessas espécies com lectinas resolvidas, totalizando 98, são de plantas (BONNARDEL et al., 2019; UNILECTIN, 2021).

Apesar das notáveis diferenças que lectinas de plantas podem apresentar nas suas estruturas tridimensionais, nas afinidades a carboidratos, e nas atividades biológicas, as quais podem levar a errônea conclusão que elas são um grupo de proteínas extensivamente complexo e heterogêneo; quando essas proteínas são analisadas a nível de clonagem molecular e sequenciamento gênico, fica claro que lectinas de plantas apresentam domínios em comum e que elas podem ser subdivididas em doze famílias relacionados evolutivamente, sendo elas: a família da lectina de *Agaricus bisporus*, da amarantina, de lectinas ligantes de quitina, da cianovirina, da EUL, da GNA, da heveina, da jacalina, das lectinas de leguminosas, de lectinas com domínio LysM, da família nictaba e finalmente da ricina-B (TSANEVA; VAN DAMME,

2020). O estudo da homologia dentro do grupo de lectinas de plantas traz valiosas informações acerca das relações que podem ser definidas a nível evolucionário e de filogenia.

Dentre as famílias citadas anteriormente, o grupo das leguminosas merece particular destaque devido ao número de espécies que já tiveram aglutininas trabalhadas. A maioria dos estudos desenvolvidos com lectinas de legume é feito com proteínas extraídas principalmente das sementes. A quantidade total de lectina que pode ser encontrada por semente varia em média em torno de 10% do valor em peso das proteínas totais (LORIS, 2002), o que fornece um bom rendimento para protocolos de isolamento de alta eficiência, como cromatografias de afinidade. A concentração de lectinas nas sementes, no entanto, pode variar amplamente entre espécies diferentes ou mesmo dentro de uma mesma espécie em condições fisiológicas diferentes (RUDIGER; GABIUS, 2002).

2.2.4 Lectinas de Leguminosas

As lectinas de leguminosa são de histórica relevância uma vez que parte dos estudos pioneiros de lectinas foram realizados com elas. Pode-se dizer, portanto, que elas ajudaram a estabelecer as primeiras definições do que são lectinas (SHARON, 2008; VAN DAMME et al., 1998). Estudos com ConA, uma leguminosa da subtribo Diocleinae, forneceram as primeiras evidências de inibição de lectinas por açúcares (SUMMER, J. B.; HOWELL, 1936), e essa lectina também foi a primeira proteína desse tipo a ter sua estrutura primária e terciária resolvida, como mencionado anteriormente (BECKER et al., 1975). Dessa forma, conclui-se que ConA foi fundamental tanto para o desenvolvimento da lectinologia quanto das áreas de bioquímica e biofísica (VAN DAMME et al., 1998).

Lectinas de leguminosas também apresentam interessantes atividades biológicas documentadas nas áreas de pesquisa biomédica, como as ações antitumorais das lectinas de PHA e ConA, (BLOMME et al., 2009), as atividades antimicrobianas de *Arachis hypogaea*, ConA e *P. sativum* (PSA) (ISLAM; KHAN, 2012), e antivirais de ConA e PSA (HANSEN et al., 1989). Além dessas, lectinas de leguminosas também já demonstraram apresentar atividades inseticidas e antifúngicas de bom potencial, o que é um grande atrativo para as áreas de biotecnologia agrícola também (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

As lectinas de leguminosas são proteínas metalo-dependentes, que apresentam Sítios de Ligação a Metais (MBS) constituídos por regiões de resíduos conservados. Geralmente são encontrados os íons cálcio ou manganês fazendo a coordenação dos resíduos

do sítio. Lectinas de leguminosas podem apresentar ou não glicosilações em suas estruturas maduras e geralmente apresentam cadeia única composta por em torno de 250 aminoácidos, com peso molecular aparente de 30 kDa em média. Essas lectinas podem sofrer processamento pós-traducional, no qual pode ocorrer a digestão da cadeia em fragmentos, ou a adição de glicosilações (RUDIGER; GABIUS, 2002; VAN DAMME et al., 1998).

Cerca de 20% dos resíduos de aminoácidos que constituem as sequências de lectinas de leguminosas são invariáveis. Adicionado a estes, existem mais outros 20% de resíduos que são bastante similares entre as lectinas dessa família. Os aminoácidos conservados geralmente envolvem aqueles que fazem parte do CRD ou MBS. A estruturas secundárias dessas lectinas é composta majoritariamente por fitas beta e loops, com a ausência ou pequena participação de alfa hélices em geral (AMBROSI et al., 2005).

O protômero de lectinas de leguminosas geralmente se oligomeriza em dímeros ou tetrâmeros. A dimerização dentro dessa família não ocorre seguindo um único formato de interação entre monômeros, e padrões dos tipos dímeros canônico, GS-IV-like, EcoL-like e DB58-like são possíveis de serem encontrados (RUDIGER; GABIUS, 2002). Isoformas também podem estar presentes na expressão da proteína madura, e a oligomerização destas, formando heterotetrâmeros, já foi observada nas lectinas PHA e de *Robinia pseudoacacia* (VAN DAMME et al., 1998).

O perfil de afinidade a carboidratos de lectinas de leguminosas é bastante diverso, sendo ela a família de lectinas de mais ampla variedade de seleção de açúcares. Já foram isoladas lectinas de leguminosas ligantes de Glc, GlcNAc, Man, Gal, GalNAc, Fuc e glicanos complexos (RUDIGER; GABIUS, 2002).

Dentro da família das leguminosas, a sub-tribo das Diocleinae contém lectinas que apresentam extensa similaridade de sequência, porém atividades biológicas variadas, o que torna essas lectinas interessantes ferramentas para estudos da relação estrutura-função de proteínas. As extensamente estudadas ConA e ConBr pertencem a esse grupo, e uma espécie de Diocleinae será o alvo desse trabalho.

2.2.5 Lectinas de Diocleinae

A subtribo Diocleinae é composta por 13 gêneros, *Camptosema*, *Canavalia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cratyliia*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*, *Lackeya*, *Luzonia*, *Macropsychanthus*, *Neorudolphia*, *Rhodopsis*. Dentre estes, três (*Canavalia*, *Cratyliia* e *Dioclea*) são mais amplamente conhecidas no que concerne o estudo de lectinas (CAVADA et al., 2019b).

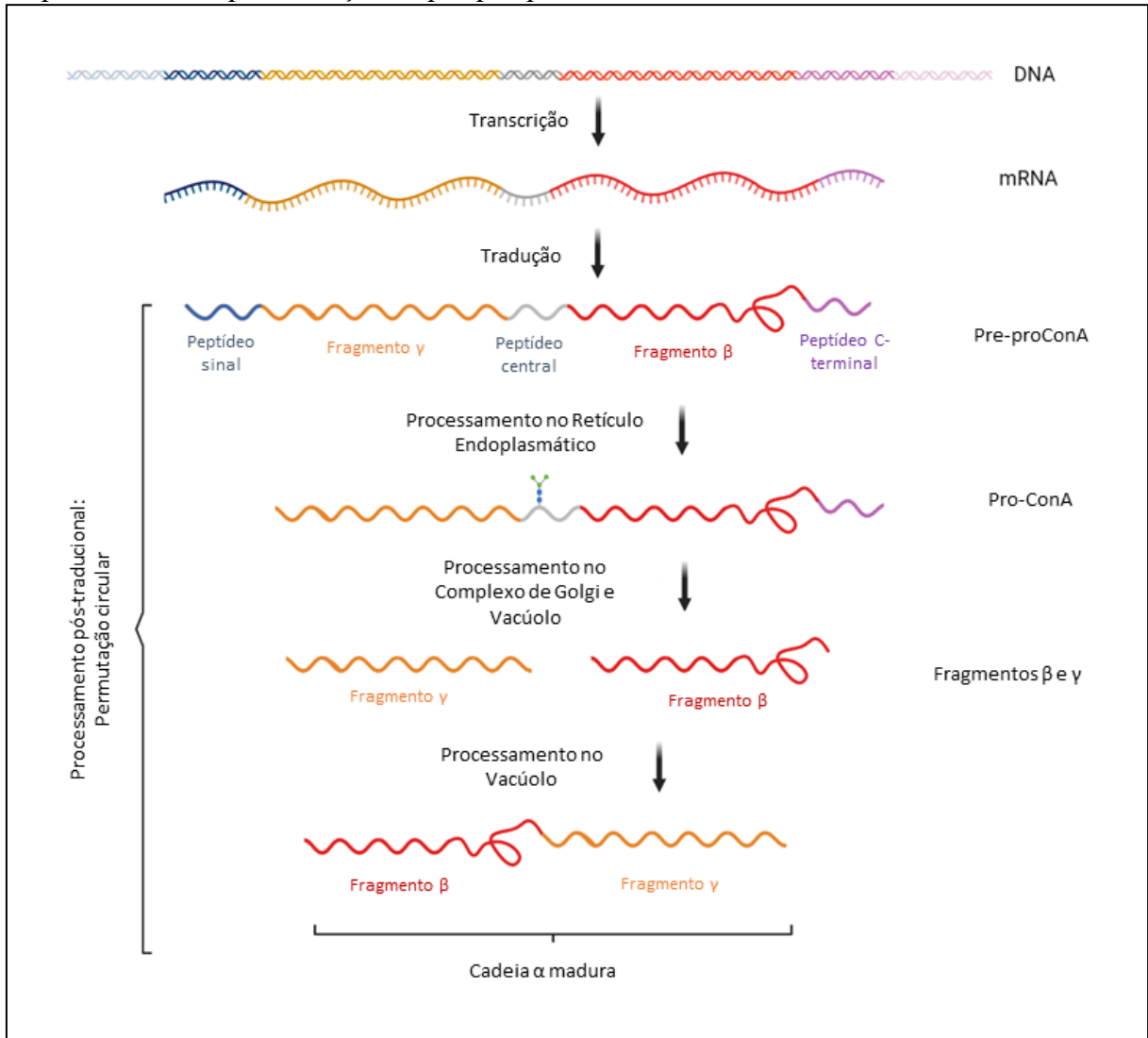
Como visto anteriormente, a lectina de *Canavalia ensiformis*, ConA, foi a primeira aglutinina de Diocleinae a ser isolada e caracterizada estruturalmente. Alguns anos depois do isolamento de ConA, outras lectinas de Diocleinae como a de *Dioclea grandiflora* (DGL) isolada em 1983, (MOREIRA et al., 1983), a de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), em 1984 (CAVADA; MOREIRA, 1984) e a de *Canavalia bonariensis* (CaBo), em 1996 (CAVADA et al., 1996) passaram a ter trabalhos desenvolvidos com elas. Atualmente existem cerca de 20 lectinas de Diocleinae isoladas e com a sequência depositada em bancos de dados, todas são metaloproteínas que apresentam grandes similaridades físico-químicas e estruturais, com oligomerização usualmente dependente do pH (CAVADA et al., 2019b).

A biossíntese e o processamento de lectinas pertencentes às espécies da subtribo Diocleinae é bastante peculiar e foi primeiramente descrito para a ConA (BOWLES et al., 1986). ConA é sintetizada como uma pré-proteína, contendo um peptídeo sinal de em torno de 30 aminoácidos que tem como função direcionar a pré-proteína ao retículo endoplasmático. Uma vez nessa organela, essa pré-proteína é convertida por meio de uma cotranslação (remoção de seu peptídeo sinal), e o peptídeo central é glicosilado (proConA). O oligossacarídeo ancorado à porção central da proConA, por sua vez, tem por finalidade direcionar a proConA ao complexo de Golgi, onde o glicano passará por modificações na estrutura. Em seguida, a prolectina é direcionada ao vacúolo, onde, pela ação de endopeptidases e carboxipeptidases, perde o peptídeo C-terminal e o central. Os peptídeos produto da clivagem são as cadeias β e γ , que são em seguida religados em uma ordem inversa, e o processamento é finalizado, formando a cadeia α madura (CAVADA et al., 2019b). Esse processamento pós-traducional foi denominado permutação circular, e é exclusivo dessa subtribo, não ocorrendo em outras lectinas de leguminosas (NONIS et al., 2021; RUDIGER; GABIUS, 2002).

Lectinas de Diocleinae, também chamadas de ConA-like, apresentam afinidade por manose, glicose e derivados desses monossacarídeos, geralmente sem interagir com lactose, galactose e fucose (CAVADA et al., 2019b). As interações que essas lectinas realizam com oligossacarídeos e glicanos complexos são geralmente mais fortes do que as com monossacarídeos, isso ocorre devido ao chamado “sítio de ligação estendido” que envolve resíduos nas proximidades do CRD, que interagem com outros resíduos do glicano, estabilizando a interação (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Em N-glicanos complexos, lectinas ConA-like interagem com o núcleo tri-manosídico, como demonstrado por microcalorimetria para sete lectinas de Diocleinae (DAM et al., 1998), por experimentos de

varredura como *glycan array* (MANIMALA et al., 2006) e por experimentos de *docking* molecular (CAVADA et al., 2018).

Figura 1. Permutação circular de lectinas ConA-like. A lectina madura é obtida como resultado do processamento pós-tradução da pré-pró-proteína.



Fonte: Ilustração criada pela ferramenta Biorender.com.

A diferente distribuição dos grupamentos hidroxila no espaço tridimensional em carboidratos epímeros como glicose e galactose gera diferentes interações possíveis com a topologia do CRD de lectinas. Ao mesmo tempo, a possibilidade de rotação que essas hidroxilas apresentam possibilita a formação de ligações de hidrogênio direcionais com resíduos de aminoácidos polares, como Asn, Asp, Gln, Glu, Arg, His e Lys, que são comumente encontrados em sítios de lectinas. Porções alifáticas (C-H) e não polares (como metilações) de moléculas de açúcares também se emparelham em interações hidrofóbicas e de Van der Waals com resíduos das proximidades do sítio. Dessa forma, o conjunto desses fatores coordena as

possíveis interações que essa proteína pode fazer, determinando assim, a sua afinidade (GABIUS, 2011; GABIUS et al., 2011).

Dentre as técnicas mais utilizadas nos estudos de especificidade de lectinas a carboidratos pode-se citar experimentos de inibição da atividade hemaglutinante; ensaios envolvendo métodos físicoquímicos como ressonância de plasma de superfície (RAMOS et al., 2002) e microcalorimetria de titulação isotérmica (DAM et al., 2000); também métodos *in silico*, como experimentos de docking e dinâmica molecular (NASCIMENTO et al., 2017); e métodos de varredura como glycan array (VAN DAMME et al., 2011). Por esses métodos, a constante de associação e outros parâmetros cinéticos, termodinâmicos ou relativos das ligações podem ser avaliados, fornecendo, assim, informações de alta relevância sobre a natureza dos sítios de ligação e do perfil da afinidade fina dessas proteínas.

Os protocolos de isolamento dessas lectinas geralmente exploram a afinidade delas a ligantes específicos, utilizando-se geralmente de extrações em pHs neutros e cromatografias de afinidade para obtenção de lectinas puras de forma eficiente. Geralmente são utilizadas matrizes de manose imobilizada ou matrizes de polímeros de dextranos como Sephadex G-50 (CAVADA et al., 2019b).

Além das lectinas específicas a manose encontradas em sementes de Diocleinae, também já foi relatado que essa subtribo pode conter uma segunda lectina, dessa vez específica a lactose, em suas sementes. As lectinas lactose-específicas de Diocleinae são encontradas em menores concentrações que as ConA-like, e já foram isoladas das espécies *Dioclea lehmanni* (PÉREZ, 1998), *Dioclea grandiflora* e *Canavalia ensiformis* (MELGAREJO; VEGA; PÉREZ, 2005). A descoberta dessas lectinas que apresentam consideráveis diferenças de afinidade e alinhamento com as ConA-like, mostra que apesar dos muitos estudos já realizados, essa subtribo ainda pode ser muito explorada no quesito bioprospecção de lectinas.

2.2.5.1 Estrutura terciária de lectinas de Diocleinae

O estudo da interação lectina-carboidrato é importante para elucidar como essas proteínas exercem suas funções. Essas informações são obtidas principalmente por meio da resolução da estrutura tridimensional dessas proteínas acoplados a ensaios de atividade biológica. Além disso, o uso de técnicas *in silico* como docking molecular se tornam valiosas estratégias no estudo das bases moleculares do reconhecimento de oligossacarídeos e glicoproteínas por lectinas (SOUSA et al., 2016).

Para resolução de estruturas tridimensionais de proteínas, as técnicas mais utilizadas são a cristalografia de raios X, utilizando fonte de luz Síncrotron, a ressonância magnética nuclear e a crio-eleto microscopia. Essas técnicas desempenham um papel fundamental na bioquímica moderna e na biologia molecular (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; JONIC; VÉNIEN-BRYAN, 2009). A maioria das estruturas de lectinas depositadas PDB (<https://www.rcsb.org/>) foram obtidas por meio de cristalografia de raios-X. Essa técnica é usada para resolver a estrutura tridimensional de moléculas com detalhes em nível atômico. Para isso, é necessário obter cristais da proteína pura, que serão utilizados para difração de raios-X. Os dados coletados são então analisados e a estrutura da proteína cristalizada é por fim resolvida com os dados resultantes da difração (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

A estrutura terciária de uma proteína só pode ser resolvida por cristalografia de raios-X se a informação de sua sequência já tiver sido elucidada. Desse modo, diferentes técnicas podem ser usadas para obter a estrutura primária da proteína alvo. A técnica mais usada em nível de proteína é a espectrometria de massa. Além das informações de sequência, esta técnica também pode ser usada para analisar a glicosilação de proteínas e seu processamento pós-tradução. Usando uma abordagem *bottom-up*, é possível obter a sequência completa de proteínas puras por meio da análise de seus peptídeos em um espectrômetro de massa em tandem. Nesse equipamento, os peptídeos da proteína alvo são ionizados, vaporizados e fragmentados por meio de colisões com gases inertes (geralmente argônio). A relação massa/carga de cada fragmento gerado é medida em um detector e os espectros contendo a série complementar íons recém-gerados são construídos. Com as informações do espectro em mãos, cada sequência de peptídeo pode ser elucidada e a estrutura primária da proteína completa pode ser montada posteriormente (HO et al., 2003).

Assim como as lectinas de leguminosas em geral, as ConA-like são metaloproteínas que apresentam uma massa molecular aparente de em torno de 30 kDa. Os metais cálcio e manganês interagem fortemente com resíduos conservados do MBS seguindo uma geometria molecular octaédrica, com cada íon coordenando 4 resíduos e duas moléculas de água. A interação com metais atua estabilizando uma ligação do tipo *cis-peptide* que posiciona os resíduos do CRD em uma conformação “aberta” e funcional para interação com glicanos. Tanto os resíduos constituintes do MBS quanto do CRD são bastante conservados. A cadeia madura da lectina é constituída por 237 aminoácidos (CAVADA et al., 2019b).

A estrutura tridimensional dos monômeros das ConA-like adquire uma conformação conhecida por β -sanduíche ou *jellyroll* (CAVADA et al., 2019a). Além dos sítios

de ligação a carboidrato e a metais, esse monômero também apresentam um sítio hidrofóbico conservado (EDELMAN; WANG, 1978). Monômeros de lectinas de Diocleinae tendem a apresentar oligomerização dependente de pH, ocorrendo preferencialmente a formação de dímeros em pH ácidos e tetrâmeros em pHs neutros e básicos, de acordo com o estado de protonação de resíduos chave na interação entre monômeros. Os dímeros formados são do tipo canônico, e os tetrâmeros são formados pela dimerização destes (CAVADA et al., 2019b).

A estrutura tridimensional de ConA foi resolvida pela primeira vez em 1972. Desde então, foram obtidos cristais da lectina de *C. ensiformis* em diversas outras condições e ConA foi resolvida e depositada mais de 60 vezes em bancos de dados de estruturas de proteínas. Cerca de outras 20 espécies de Diocleinae também tiveram as estruturas de suas lectinas resolvidas e depositadas no PDB, com o depósito mais recente tendo sido em 2020, da lectina de *C. brasiliensis* complexada com ácido indol-3-acético (PDB ID 6VB8). Com exceção de ConA e seus 63 depósitos, a tabela 1 expõe as 20 espécies de Diocleinae que apresentam estruturas tridimensionais de suas lectinas resolvidas juntamente com os identificadores do PDB de cada estrutura.

Tabela 1 – Lectinas de Diocleinae com estrutura resolvida

Espécie	Identificador PDB
<i>Camptosema pedicellum</i>	3U4X
<i>Canavalia boliviana</i>	4K1Y, 4K1Z, 4K20, 4K21
<i>Canavalia bonariensis</i>	5U3E
<i>Canavalia brasiliensis</i>	1AZD, 3JU9, 4H55, 4P14, 4PCR, 6VB8
<i>Canavalia cathartica</i>	5F5Q, 6GW9
<i>Canavalia gladiata</i>	1WUV, 2D7F, 2EF6, 2OVU, 2P2K
<i>Canavalia grandiflora</i>	4L8Q
<i>Canavalia lineata</i>	4TZD, 4I30, 4TYS, 3SNM
<i>Canavalia maritima</i> (<i>C. rosea</i>)	2CWM, 2CY6, 2CYF, 2OW4, 2P34, 2P37, 2CYF
<i>Cratylia floribunda</i>	2D3P, 2D3R
<i>Cratylia mollis</i>	1MVQ
<i>Cymbosema roseum</i>	3A0K
<i>Dioclea grandiflora</i>	1DGL, 2JE9, 2JEC, 4Z8B

Continua na próxima página

Espécie	Identificador PDB
<i>Dioclea guianensis</i>	1H9P, 1H9W, 2JDZ, 2JE7
<i>Dioclea lasiophylla</i>	6CJ9
<i>Dioclea reflexa</i>	5TG3
<i>Dioclea rostrata</i>	2ZBJ
<i>Dioclea sclerocarpa</i>	4NOT
<i>Dioclea violacea</i>	3AX4, 2GDF
<i>Dioclea virgata</i>	3RRD, 3RS6, 5UUY
<i>Dioclea wilsonii</i>	3SH3

Fonte: Elaborado pela autora.

2.2.5.2 Atividades biológicas e aplicações comerciais das lectinas de Diocleinae

Como visto anteriormente, as lectinas podem atuar na detecção, isolamento e caracterização de oligossacarídeos, como ocorre em ensaios de tipagem sanguínea e de ligação seletiva a células de câncer (FAHEINA-MARTINS et al., 2012; KILPATRICK, 2002). Em outros termos, lectinas podem ser utilizadas na identificação e/ou seleção de determinadas condições celulares que por sua vez modulam diferentes padrões de glicosilações do glicocálice celular. Considerando isso, a comunidade científica atualmente enxerga as lectinas como moléculas de bastante interesse biotecnológico, visto que elas são proteínas com atividades biológicas promissoras e são purificadas de forma relativamente fácil e com bom rendimento (VAN DAMME et al., 1998).

Empresas de biotecnologia atualmente comercializam algumas lectinas como insumos principalmente para a área de pesquisa em glicobiologia. Essas lectinas se encontram geralmente imobilizadas em colunas como as de ConA-Sepharose® 4B e a HiTrap® ConA 4B ambas da Sigma-Merck e a de DGL imobilizada em agarose, da EY Laboratories. Lectinas de Diocleinae também são amplamente encontradas para venda na forma livre como ConA pela ThermoFisher Scientific e as lectinas de soja SBA (*Glycine max*) e de lentilha LCA (*Lens culinaris*) pela Vector Laboratories. Lectinas conjugadas com corantes fluorescentes como ConA-FITC (Sigma-Merck), DGL-TRITC (EY Laboratories) e PNA-CY®5 (Vector Laboratories), também são extensivamente utilizadas em ensaios de glico-histoquímica e imunofluorescência e comercializadas por diversas empresas. Ainda como exemplos de aplicações comerciais, atualmente já estão disponíveis por empresas como a Abcam e Plexera® microarrays de lectinas para caracterização de perfil de glicanos de células ou tecidos

(HENDRICKSON; ZHERDEV, 2018).

Considerando a área biomédica, existem filtros a base de lectinas, como o *The Hemopurifier*® da *Aethlon Medical Inc.* que possui uma permissão de acesso expandida do FDA para tratamento de pacientes de Ebola. Esse filtro atua reduzindo a carga viral de pacientes em hemodiálise acometidos por infecções virais e também se mostrou de alta eficiência na ligação com os vírus de Hepatite C e HIV (NASH, 2016; TULLIS et al., 2009). Testes pré-clínicos mostraram que *The Hemopurifier*® também é capaz de interagir com um amplo espectro de vírus glicosilados, incluído os vírus da chikungunya, dengue e varíola humana, tendo inclusive também potencial de se ligar a vírus da família coronavírus.

Dentro da área biomédica ainda, lectinas de Diocleinae são conhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas promissoras. Em ensaios de inflamação, lectinas ConA-like podem apresentar efeitos pro-inflamatórios como o das lectinas de DGL, ConBr, ConA, ConGF e ConV, quando administradas via intraperitoneal, subcutânea ou intraplantar (BENTO et al., 1993; OSTERNE et al., 2017; SIMÕES et al., 2012). Lectinas ConA-like, no entanto, também podem apresentar efeitos anti-inflamatórios como DVL, CFL e Dgui apresentaram quando administradas de forma sistêmica (ASSREUY et al., 1997). Ainda no âmbito de estudos inflamatórios, também foi observado que lectinas de Diocleinae são capazes de causar estimulação ou inibição da nocicepção com efeitos também dependentes da via de administração (DELATORRE et al., 2011; PINTO-JUNIOR et al., 2017a) e indução da vasodilatação em modelos de anéis de aorta (DO NASCIMENTO et al., 2012; GADELHA et al., 2005).

Lectinas de Diocleinae também apresentam efeito imunoestimulador, como foi observado com a lectina de ConBr que estimulou produção de citocinas e óxido nítrico, além de desencadear efeito mitótico em esplenócitos murinos (DE OLIVEIRA SILVA et al., 2011). Resultados semelhantes de imunoestimulação com produção aumentada de citocinas também foram observados em ConA, DVL (*Dioclea violacea*) e Dvir (MURAILLE et al., 1999; SOUZA et al., 2013). ConBr, Dvir (de *Dioclea virgata*), DRL (de *Dioclea rostrata*), DGL, DVL, ConA e CFL também estimularam a proliferação de linfócitos (BARRAL-NETTO et al., 1992). O aumento de liberação de histaminas por mastócitos tratados por ConA e ConBr também já foi reportado (LOPES et al., 2005).

Considerando atividades antivirais, algumas lectinas específicas a D-glicose ou a N-acetil-D-glicosamina já demonstraram ação inibitória do efeito citopático induzido pelo HIV, bem como da replicação do vírus em células hospedeiras (MOLCHANOVA et al., 2007). Outras lectinas específicas a manose atuaram evitando a infecção entre leucócitos contaminados e

sadios (BALZARINI et al., 1992), além de também serem capazes de inibir a atividade da transcriptase reversa (Li *et al.*, 2008). No caso de lectinas de legume e Diocleinae, ConA se liga à glicoproteínas no envelope viral como a gp120, neutralizando o vírus e fazendo com que ele perca a capacidade de interagir com o receptor da célula hospedeira (AKKOUH et al., 2015). As lectinas ConBr, ConM (de *Canavalia maritima*), DLL (de *Dioclea lasiocarpa*) e DSL (de *Dioclea sclerocarpa*) apresentam promissores resultados semelhantes à ConA nesse quesito (GONDIM et al., 2019). Lectinas de planta ligantes de manose também manifestaram forte atividade antiviral contra a família dos coronavírus, causadores de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), quando comparadas com lectinas de especificidade a outros açúcares. Essas proteínas atuam inibindo o ciclo de replicação do vírus. Devido a atual pandemia causada pelo SARS-CoV-2, essa propriedade de lectinas de plantas ligante de manose se torna extremamente valiosa, pois abre possibilidades de utilização dessa ferramentas biotecnológicas para estudos de isolamento e/ou inativação viral (KEYAERTS et al., 2007; SAUVION et al., 2004).

Além do emprego nas áreas da saúde, as lectinas de Diocleinae também mostram potenciais aplicações nas áreas de biotecnologia vegetal e de alimentos, como as lectinas de ConBr, DVL e DRL que apresentaram atividade contra fungos patogênicos à uvas (GOMES et al., 2012) e as lectinas DVL e ConA que exibem ação inseticida contra espécies de lepidópteros e afídeos respectivamente (OLIVEIRA et al., 2015; SAUVION et al., 2004).

As lectinas, portanto, são vistas atualmente como importantes elementos para a pesquisa em diversas áreas, e sua utilização vem aumentando principalmente nas áreas de imunologia, farmacologia, bioquímica e biologia celular.

2.2.5.3 Lectinas de Diocleinae e câncer

As atividades mitogênicas e antiproliferativas de lectinas de leguminosas em células de câncer serão tratadas em maior detalhe neste tópico, visto o grande potencial que lectinas ligantes de manose e lectinas de plantas em geral apresentam como moléculas antitumorais em diferentes modelos de câncer (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005). As atividades antitumorais de lectinas ocorrem em decorrência de suas propriedades de reconhecimento de carboidratos. Em tumores geralmente são observadas mutações nos esqueletos glicídicos e hiperglicosilações nas membranas celulares, o que pode corroborar para que as células cancerígenas escapem da vigilância imunológica (CHAVEZ; GARCIA; YNALVEZ, 2018). Encontrar lectinas que reconheçam exclusivamente esses glicanos mutados e não se liguem ou

não causem toxicidade a tecidos saudáveis faz com que essas moléculas se tornem potentes ferramentas em estudos de glicobiologia do câncer.

Em células de glioma, foram vistos promissores resultados de indução de morte celular de forma dose e tempo dependente pelas lectinas de CaBo, DVL, DLL, ConV, ConA, ConBr e DlyL usualmente desencadeando inibição de migração e de proliferação das mesmas. As células tratadas com essas lectinas também apresentavam concisa mudança de morfologia, geralmente se tornando arredondadas e perdendo adesão à matriz extracelular (CAVADA et al., 2018; LEAL et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018, 2017; OSTERNE et al., 2017; PRATT; ROY; ANNABI, 2012; SINA et al., 2010; WOLIN et al., 2021)

Em modelos de melanoma e carcinoma também já foram documentadas indução de apoptose por ConA (LIU et al., 2009; SHI et al., 2014), por ConBr (SILVA et al., 2014a) e pela lectina de *Pisum sativum* (PSA) (KABIR et al., 2013). Em hepatoma, no entanto, ConA induziu morte celular não por apoptose, mas pelo mecanismo de autofagia, que desencadeou a internalização da lectina e teve a participação da mitocôndria no processo autofágico (CHANG et al., 2007), (LEI; CHANG, 2009). Em linhagens de células de leucemia, ConA e ConBr desencadearam apoptose a valores baixos de IC50, envolvendo a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelularmente (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). A lectina de DLL, que foi testada em diversos modelos celulares tumorais, também apresentou atividade antiproliferativa em câncer de ovário, pulmão, mama e próstata, desencadeando apoptose por intermédio da ativação da caspase 9 e se acumulando intracelularmente na região perinuclear (GONDIM et al., 2017).

Em células HeLa, já foi observado que a lectina de *C. ensiformis* provoca morte celular por autofagia desencadeada pela interação de ConA com receptores da membrana plasmática dessas células. Posteriormente ocorre a ativação de vias metabólicas apoptóticas, indicando que ocorre um *crosstalk* entre esses dois mecanismos de morte celular causada por ConA em HeLa. (ROY et al., 2014).

Dessa forma, é interessante notar como lectinas de Diocleinae apresentam ações citotóxicas e seletivas em modelos tumorais diversos, sendo também capazes de diferenciar muitas vezes células tumorais de tecidos saudáveis, como observado nos casos de tratamento com as lectinas ConA e ConBr em células de leucemia (FAHEINA-MARTINS et al., 2012) e *Cratylia mollis* em câncer de mama (BELTRÃO et al., 1998). Geralmente o mecanismo de morte celular causado por essas lectinas de Diocleinae nesses modelos de câncer envolve autofagia e/ou apoptose com a ação de caspases.

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada evolutivamente conservado e importante no desenvolvimento de tecidos e para eliminar células defeituosas (OUYANG et al., 2012). Células apoptóticas apresentam morfologia característica, que inclui condensação nuclear e formação de bolhas na membrana plasmática (HENGARTNER, 2000). De forma geral, a apoptose é desencadeada por dois mecanismos principalmente, o da via intrínseca, ou mitocondrial, e o da via extrínseca, ou de receptores de morte celular (BHUSHAN et al., 2007).

A via intrínseca está relacionada com a família de proteínas Bcl-2, especialmente BCL-XL e Bcl-2, que apresentam funções anti-apoptóticas uma vez que sequestram as proteínas pró-apoptose Bak e Bax e impedem que estas causem a permeabilização da membrana mitocondrial. Esse processo de formação de poros na mitocôndria seguido de liberação de seu conteúdo no citoplasma causa um desequilíbrio de espécies oxidativas intracelularmente, o que por si só pode desencadear apoptose (OUYANG et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2004). Dessa forma, as proteínas anti-apoptóticas barram a liberação de conteúdo mitocondrial, incluindo do citocromo c, que está envolvido com a ativação da caspase 9, que por sua vez causa a subsequente clivagem das caspases 3 e 7 a suas formas maduras, que são responsáveis por desencadear a apoptose de fato (ADAMS; CORY, 1998)(BHUSHAN et al., 2007).

Caspases são cisteíno-proteases que são as executoras principais de todos os processos apoptóticos. Elas são sintetizadas como proteínas inativas, e sua clivagem em dois fragmentos faz parte do seu processamento de ativação. Um grande número de proteínas parece fazer parte da família de substratos das caspases, algumas delas responsáveis por papéis importantes do ciclo celular (MARTIN, 2014; STROH; SCHULZE-OSTHOFF, 1998). As caspases 8 e 9 são chamadas de indutoras pois estão relacionadas com a ativação de outras caspases, enquanto as caspases 3 e 7 são chamadas de efetoras pois de fato clivam componentes proteicos das células. A caspase 9 é um dos representantes da iniciação da apoptose intrínseca, enquanto que a caspase 8 indica apoptose extrínseca, desencadeada pela formação do Complexo de Sinalização Indutor de Morte (DISC) (MARTIN, 2014; OUYANG et al., 2012).

A via extrínseca está relacionada com a modulação da apoptose pela interação de ligantes específicos com receptores de membrana do tipo glicoproteínas da família TNFR (Receptores de Fatores de Necrose Tumoral). Esses receptores, como o TRAIL-R1 e o Fas, também chamado de CD95, quando interagem com seus ligantes desencadeiam a formação do DISC que inclui internalização do receptor celular e ligação com a proteína FADD. A formação desse complexo desencadeia a ativação da caspase 8, que é do tipo iniciadora, e que ativa caspases efetoras, como as caspases 3 e 7 (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013). Em

células de câncer, receptores da família TNFR podem apresentar glicosilações alteradas ou defeituosas, aumentando a sensibilidade destas a interações com moléculas ligantes de carboidrato e estimulando apoptose pela via extrínseca. Casos como este mostram o potencial que glicanos e lectinas podem ter como alvos terapêuticos em câncer (MICHEAU, 2018; WAGNER et al., 2007).

A indução de morte celular por apoptose é um dos principais mecanismos utilizados em terapias anticâncer, e moléculas capazes de desencadear essa via são fortes candidatas a fármacos para tratamentos oncológicos. ConA é um exemplo de lectina que desencadeia morte celular em câncer por meio de apoptose pela via mitocondrial com liberação de citocromo c e ativação de caspases (LIU et al., 2009; SUEN et al., 2000). As lectinas de *S. flavescens* (LIU et al., 2008) e frutalina (OLIVEIRA et al., 2011) também são antitumorais por vias apoptóticas.

A autofagia também é um mecanismo celular conservado, que pode desempenhar dois papéis antagônicos no metabolismo celular. Ela pode ser um instrumento de preservação da homeostase, atuando na degradação de macromoléculas e organelas danificadas, atuando também na manutenção energética em condições de inanição celular, reciclando componentes que serão reutilizados pela célula; e por fim tendo a função de degradar moléculas nocivas ou tóxicas à célula de forma seletiva (RADOGNA; DICATO; DIEDERICH, 2015).

A autofagia é finamente regulada pela célula com o propósito de manutenção tecidual, inclusive em células tumorais. Dessa forma, há uma discussão no âmbito da pesquisa de câncer a respeito de qual metodologia deve ser tomada nos tratamentos, se a da indução ou a da inibição da autofagia, uma vez que essa via pode acabar por proteger a célula de tratamentos quimioterápicos (MIZUSHIMA et al., 2008).

Por outro lado, também há a possibilidade que a ativação da autofagia gere um estresse celular grande, e acabe por desencadear a morte em vez da proteção celular, como observado nos tratamentos de glioma e hepatoma com lectinas ConA-like (CHANG et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2019; WOLIN et al., 2021). Nesse caso, a autofagia desencadeia uma “autodigestão” celular, com a formação de autofagossomos e autolisossomos, porém deixando o núcleo intacto (LEVINE; KLIONSKY, 2004). O que acontece em cada caso parece depender do tipo celular e do tratamento em questão, mas de fato, sabe-se que falhas no processo de autofagia pode desencadear diversas condições patológicas como câncer e doenças neurodegenerativas (MIZUSHIMA et al., 2008). Mais estudos precisam ser feitos nessa área para entender os mecanismos celulares que são ativados em tecidos submetidos a tratamentos distintos.

Alguns genes relacionados com a autofagia, chamados ATG (do inglês *autophagy-related genes*) já foram identificados, mas muito ainda falta a ser descrito a respeito do mecanismo de ação destes. Algumas proteínas regulatórias como PIK3 classe I, Bcl-2 e TOR exercem funções de inibição da autofagia, enquanto que outras como Beclin 1 e LC3-II e PUMA estão presentes ou atuam intrinsecamente no desencadeamento do processo autofágico (KANG et al., 2011; ROY et al., 2014). O acompanhamento do nível de expressão ou da ação dessas proteínas, bem como o monitoramento da formação de vacúolos acídicos autofágicos pode ajudar na identificação da ativação ou supressão da autofagia.

Atualmente sabe-se que ocorre um *crosstalk* entre autofagia e apoptose, e as duas vias podem exercer papéis sinérgicos no processo de morte celular. Apoptose e autofagia apresentam algumas proteínas em comum em suas vias, como a família Bcl-2, que sequestra tanto a proteínas pró-apoptose Bax e Bak quanto a pró-autofágica Beclin-1, impedindo suas ações (BHAT et al., 2018; MAIURI et al., 2007). Alguns exemplos de proteínas que ativaram tanto apoptose quanto autofagia em seus ensaios de toxicidade incluem abrina, em células e HeLa (BEHERA et al., 2014), a lectina da soja em HeLa (PANDA et al., 2014) e ConA em diversos modelos celulares (LI et al., 2011).

2.2.5.4 Pesquisas com células HeLa

As células HeLa foram a primeira linhagem de câncer imortalizada e repicada com sucesso em laboratório. Elas foram isoladas a partir de um tumor de câncer cervical da paciente Henrietta Lacks no Hospital John Hopkins, a cerca de 70 anos atrás. Desde então, as células HeLa tem sido extensivamente utilizadas em pesquisas envolvendo desde estudos de caracterização de vias metabólicas ao desenvolvimento de vacinas (TWEEDALE, 2002).

O estabelecimento das células HeLa como a primeira linhagem humana imortal cultivável em laboratório, no entanto, traz consigo consideráveis questões éticas da pesquisa científica. Henrietta era uma jovem negra de 30 anos de idade quando parte de seu tumor foi retirado e suas células foram cultivadas em laboratório, sem consentimento. Pouco tempo depois ela viria a falecer devido ao agravamento de sua doença. A agressividade do câncer dela foi, inclusive, um dos fatores que tornou possível o cultivo e sobrevivência dessas células *in vitro*. Porém por mais de 20 anos após sua morte nem o viúvo de Henrietta nem seus 5 filhos tinham conhecimento que as células dela eram utilizadas em pesquisas científicas e cultivadas em laboratórios no mundo inteiro. A família Lacks não teve direito sobre os lucros gerados com a comercialização da linhagem celular, nem tiveram suas informações genéticas e direito

à privacidade preservadas (BESKOW, 2016). Dessa forma, a história das células HeLa trazem à tona um importante debate acerca da importância do consentimento informado. É importante frisar para futuras gerações de pesquisadores como a ética na ciência progrediu e como a pesquisa era desenvolvida há 70 anos atrás e como ela é feita atualmente.

De toda forma, devido as células HeLa terem sido o primeiro caso bem sucedido de cultura de tecido humano há mais de 70 anos atrás, elas são a linhagem celular de câncer mais estudada e testada até hoje (TWEEDALE, 2002). As células HeLa são modelos utilizados tanto em estudos de câncer em geral quanto pesquisas específicas de carcinoma de colo de útero, que é o quarto tipo de câncer mais comum de ser encontrado em mulheres, de acordo com a World Health Organization (WHO, 2020).

HeLa também já foi extensivamente utilizada em estudos de detecção de biomarcadores de câncer e de caracterização de glicanos mutados, típicos de tecidos tumorais (MALEROD et al., 2013). Sabe-se que glicoproteínas de membrana de células de câncer estão envolvidas intrinsecamente com metástase, e com o processo de reconhecimento, comunicação e desenvolvimento tumoral (PINHO; REIS, 2015). Uma das principais mudanças encontradas em células metastáticas envolve a terminação precoce do processamento de N-glicanos complexos, gerando estruturas *high mannose* a grandes concentrações em neoplasias (OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017). Dessa forma, e visando identificar as peculiaridades do glicoma de tumores, pesquisas de glico-marcadores são desenvolvidas buscando facilitar o diagnóstico precoce da doença e início imediato do tratamento (KAILEMIA; PARK; LEBRILLA, 2017).

Assim como observado em outras células tumorais, o glicocálice de HeLa é composto em sua maioria por N-glicanos do tipo *high-mannose* (HORVAT et al., 2012; TURIÁK et al., 2019), o que pode ser o motivo pelo qual lectinas manose específicas se mostraram capazes de interagir com essas células e causar toxicidade de maneira eficaz (LIU et al., 2008; NAIK et al., 2017; SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021). Dentre as Diocleinae, no entanto, apenas ConA foi testada em HeLa, como visto anteriormente, desencadeando a morte celular por autofagia e apoptose (ROY et al., 2014). Dessa forma, a avaliação da toxicidade de outras lectinas de Diocleinae em células HeLa se torna uma ferramenta interessante para desvendar os mecanismos de ação dessas lectinas na indução de morte celular em câncer.

2.2.6 A lectina de *Canavalia villosa*

Canavalia villosa é uma espécie de leguminosa pertencente à família Fabaceae, tribo Phaseoleae e gênero *Canavalia*. A lectina de *C. villosa* (Cvill) foi isolada em matriz de afinidade Sephadex G-50 e mostrou ter afinidade aos monossacarídeos glicose, manose, α -metil-D-manosídeo, e às glicoproteínas fetuína e ovoalbumina. Em ensaios de SDS-PAGE, a lectina apresentou o perfil de 3 bandas compostas pela cadeia α e os fragmentos β e γ característicos de lectinas ConA-like. Em primeiro trabalho publicado, foi apresentado 40% de estrutura primária de Cvill, que foi sequenciada por espectrometria de massas (LOSSIO et al., 2017)

Quanto às suas atividades biológicas já testadas, essa lectina apresentou toxicidade contra náuplios de artêmia e efeitos edematogênicos e hipernociceptivos em ratos, com reversão da ação tóxica pelo açúcar α -metil-D-manosídeo. Cvill também apresentou alta redução da viabilidade e mudanças morfológicas em células de glioma da linhagem C6 a concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (LOSSIO et al., 2017; WELTER, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Visando entender por meio de quais vias metabólicas a lectina de *Canavalia villosa* desencadeia morte celular em células de câncer cervical (HeLa), este trabalho investigou a ação citotóxica de Cvill por meio de ensaios que avaliaram o nível de atividade de caspases, expressão de transcritos e produção de ROS. As estruturas primária e terciária da lectina de *Canavalia villosa* também foram elucidadas, e sua especificidade fina a açúcares foi estudada, visando também investigar a relação entre a estrutura desta lectina e sua atividade citotóxica em células HeLa.

3.2 Objetivos específicos

- Sequenciar a lectina de *Canavalia villosa* por espectrometria de massas;
- Purificar o DNA a partir das sementes de *Canavalia villosa* e isolar o gene da lectina;
- Clonar, amplificar e sequenciar o gene pelo método de Sanger;
- Obter cristais da lectina pura pelo método de difusão de vapor de gota suspensa;
- Resolver a estrutura tridimensional da lectina por difração de raios-X;
- Estudar a interação da lectina com os carboidratos típicos de glicocálice de células de câncer através das ferramentas de Docking Molecular;
- Avaliar a especificidade fina de Cvill através de *Glycan Array*;
- Estimar a citotoxicidade da lectina em células HeLa;
- Avaliar a atividade de Cvill quanto a produção de ROS e ativação de caspases em HeLa;
- Estudar os níveis de expressão de genes relacionados com morte celular por qPCR;
- Estudar a localização subcelular da lectina em HeLa através de microscopia confocal de fluorescência.

4 METODOLOGIA

4.1 Isolamento da lectina

A lectina Cvill foi isolada das sementes de *Canavalia villosa* por cromatografia de afinidade usando coluna Sephadex G-50, segundo protocolo já descrito (LOSSIO et al., 2017). A pureza e atividade da lectina foram monitoradas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e testes de atividade hemaglutinante usando eritrócitos de coelho a 3% nativos e enzimaticamente tratados segundo protocolo adaptado de Ainouz et al (AINOUZ et al., 1992).

4.2 Determinação da estrutura primária de Cvill

A fim de determinar a estrutura primária completa da lectina de *C. villosa*, técnicas de espectrometria de massas e sequenciamento gênico foram empregadas em uma abordagem *bottom up*.

4.2.1 Sequenciamento por espectrometria de massas

Em Lossio et al (LOSSIO et al., 2017) foi obtido aproximadamente 40% da sequência da cadeia α da lectina por espectrometria de massas utilizando espectrômetro MALDI-TOF/TOF da Bruker Daltonics e sequenciamento manual *de novo*. De posse desses dados, e visando aumentar a cobertura da sequência da proteína, a amostra foi preparada novamente para análise em espectrômetro de massa, dessa vez utilizando equipamento Q-TOF com fonte de ionização do tipo *nanoelectrospray*. Para isso, a proteína foi separada em bandas através de SDS-PAGE e somente a banda correspondente à cadeia α foi recortada e digerida *in gel* seguindo protocolo estabelecido por Shevchenko (SHEVCHENKO et al., 2007) com adaptações para *electrospray*. As enzimas tripsina, quimiotripsina, pepsina, Asp-N e Glu-C foram utilizadas na digestão da cadeia α de Cvill seguindo os protocolos e a razão enzima:substrato recomendada pelo fabricante. Os peptídeos foram extraídos em solução de ácido fórmico 5% em acetonitrila (1:1), sendo coletados em um novo tubo de microcentrífuga. A amostra foi injetada no espectrômetro de massas Q-TOF Premier (Waters Corporation, USA) usando uma coluna C-18 (100 μ m x 100 mm) acoplada em cromatógrafo NanoAcquity UPLC a um fluxo de 600 nL/min com um gradiente de 0 – 90% de acetonitrila em ácido fórmico 0.1%. O equipamento operou com uma voltagem de 3.5 kV na fonte de ionização e com uma aquisição

de dados de íons com m/z variando entre 100 e 2,000. As corridas foram processadas e os dados analisados usando o pacote de software *MassLynx* 4.1 (Waters Corporation, USA). A ferramenta MaxEnt3 foi utilizada na deconvolução dos espectros MS/MS multicarregados através do método de entropia máxima (FERRIGE et al., 1992). Os peptídeos foram sequenciados manualmente usando a ferramenta PepSeq, ambas incluídas no pacote de software *MassLynx* 4.1. A sequência parcial da lectina Cvill foi montada baseada na informação fornecida pelas diferentes digestões.

4.2.2 Purificação do DNA de sementes de *C. villosa*

DNA genômico foi isolado a partir de sementes de *Canavalia villosa* seguido protocolo adaptado de CTAB (HEALEY et al., 2014). A semente foi macerada em nitrogênio líquido até a obtenção de uma farinha fina que em seguida foi adicionada ao tampão CTAB previamente aquecido à 65 °C. A suspensão foi incubada a 65 °C por 30 min com agitação ocasional em intervalos de 10 min. Após incubação, as amostras foram centrifugadas e ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de solução de clorofórmio em álcool isoamílico na proporção 24:1 (v/v). Após nova centrifugação, o sobrenadante aquoso foi transferido para um novo tubo, e foi adicionado etanol 95%, seguido de incubação a -20 °C por 1 h. O material genético precipitado foi em seguida lavado com etanol 70% e seco em câmara de fluxo laminar à temperatura ambiente. O DNA, então, foi solubilizado em água ultrapura autoclavada, teve sua pureza e quantificação avaliada por leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop (ThermoFisher Scientific) e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.2.3 Amplificação, clonagem e sequenciamento do gene da lectina

Considerando a informação da sequência obtida por espectrometria de massas, um par de primers que amplificaria parcialmente o gene foi desenhado (Fw: TGATCCTTCAAGGTGACGCC; Rv: GAGAGAATGGTATTGGTTTCTTTGT) utilizando a ferramenta Primer3-web V4.1.0 (KÖRESSAAR et al., 2018) e levando em consideração o processamento pós traducional que lectinas ConA-like sofrem. Uma reação de PCR utilizando o DNA genômico de *C. villosa* foi preparada com a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) seguindo protocolo estabelecido pelo fornecedor para uma reação de 25 µL de volume final e utilizando o seguinte programa:

Passo 1: Desnaturação inicial: 95 °C – 2 min

Passo 2: Desnaturação: 95 °C – 30 s

Passo 3: Anelamento: 60 °C – 30 s

Passo 4: Amplificação: 72 °C – 30 s

Passo 5: Amplificação final: 72 °C – 5 min

35 ciclos dos passos 2 a 4

O produto da PCR foi avaliado quanto a sua pureza e tamanho por eletroforese em gel de agarose 1,5% e quantificado usando espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop (ThermoFisher Scientific). O amplicon foi inserido no vetor de clonagem do tipo pJET para extremidades cegas (ThermoFisher Scientific) utilizando a enzima T4 DNA ligase fornecida no kit e de acordo com o protocolo estabelecido pelo fornecedor do vetor. A reação foi preparada com o amplicon na proporção de 3:1 para o plasmídeo. Células de *E. coli* Top10 competentes foram transformadas por choque térmico e incubadas por 1h a 37 °C a uma agitação constante de 185 RPM em meio de cultura LB contendo carbenicilina. Em seguida, foi realizada a semeadura das bactérias em meio seletivo contendo carbenicilina e a placa foi incubada overnight. PCR de colônia foi realizada no dia seguinte nas mesmas condições da primeira PCR de amplificação do gene visando confirmar a seleção de clones transformados, que foram, posteriormente, incubados overnight em meio líquido LB contendo carbenicilina. O crescimento bacteriano foi acompanhado com leituras a 600 nm em espectrofotômetro, e, uma vez atingida a O.D. de 0.6, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação à 5000 x g por 15 min. A purificação do plasmídeo foi realizada utilizando o kit Miniprep da Qiagen.

4.2.4 Sequenciamento por Sanger

O sequenciamento do plasmídeo contendo o gene da lectina foi realizado em *facility (LGC Genomics Technology)* utilizando a metodologia de Sanger e sequenciador 3730XL DNA Analyzer System (ThermoFisher Scientific), com qualidade PHRED 20. Os primers próprios do vetor, pJET1.2 Forward e pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, foram utilizados na reação de sequenciamento. Os arquivos gerados foram lidos pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed que atribuem escores às bases, e realizam a montagem da contig a partir das reads obtidas (EWING; GREEN, 1998). A contig corresponde, portanto, à sequência parcial do gene da lectina. Os dados foram tratados com a ferramenta VecScreen

(NCBI), que excluiu fragmentos de sequências de nucleotídeos oriundas do vetor. A tradução da informação de nucleotídeo para proteína foi realizada pela ferramenta de bioinformática Translate Tool da plataforma ExPASy (ARTIMO et al., 2012), no qual os frames de leitura foram analisados e o correspondente ao gene da lectina foi escolhido. A sequência de proteína traduzida, junto com as informações dos peptídeos obtidos por espectrometria de massas, contribuíram para a obtenção da sequência completa da lectina. O processamento pós traducional que lectinas ConA-like sofrem foi levado em consideração na montagem da sequência. Possíveis sítios de glicosilação foram preditos utilizando a ferramenta online NGlycPred Server (CHUANG et al., 2012).

4.3 Análise filogenética

Cvill foi comparada a nível de sequência com outras proteínas depositadas em bancos de dados não redundantes através da ferramenta de alinhamento Blastp (NCBI). Dezesseis outras lectinas foram escolhidas afim de se realizar a análise filogenética da lectina de *Canavalia villosa* dentro da subtribo Diocleinae, sendo elas as lectinas dos organismos citados a seguir: *Canavalia grandiflora* (ConGr, ncbi ID: A0A067XG71.1), *Canavalia cathartica* (ConC, ncbi ID: P81461.1), *Canavalia gladiata* (CGL ncbi ID: 1WUV_A), *Canavalia virosa* (ConV, ncbi ID: C0HJY1.1), *Canavalia lineata* (ConL, ncbi ID: P81460.1), *Canavalia maritima* (ConM, ncbi ID: 2OW4_A), *Canavalia brasiliensis* (ConBr, ncbi ID: P55915.1), *Canavalia boliviana* (CBol, ncbi ID: A0A023GPI8.1), *Canavalia bonariensis* (CaBo, ncbi ID: 5U3E_A), *Dioclea virgata* (DvirL, ncbi ID: P58907.2), *Dioclea lasiocarpa* (DLL, ncbi ID: 5UUY_A), *Dioclea rostrata* (DRL, ncbi ID: P58908.2), *Dioclea guianensis* (Dgui, ncbi ID: 1H9W_A), *Dioclea lasyophylla* (DlyL, ncbi ID: 6CJ9_A), *Dioclea reflexa* (DrfL, ncbi ID: C0HK81.1), *Camptosema pedicellum* (CPL, ncbi ID: J9PBR3), e finalmente *Bowringia mildbraedii* (ID: P42088), que foi utilizada como grupo externo na análise. O alinhamento das sequências de proteínas foi realizado utilizando a ferramenta MUSCLE e a árvore filogenética foi construída segundo o método estatístico de *Neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987), utilizando o teste de filogenia de Bootstrap, com 500 replicações e o modelo de correção de Poisson (ZUCKERKANDL; PAULING, 1965), todas ferramentas do pacote de softwares MEGA X (KUMAR et al., 2018).

A predição da estrutura secundária foi realizada através do software online ESPrpt 3 (GOUET et al., 1999). Para tal, foi feito alinhamento de Cvill com ConGr, ConC, CGL, ConV,

ConL, ConM, ConBr, CBol e CaBo e utilizado modelo tridimensional da lectina ConGr (PDB ID: 4L8Q).

4.4 Resolução da estrutura tridimensional de Cvill

A cristalização de macromoléculas é a técnica mais visada para estudos de resolução da estrutura tridimensional de compostos com importância biológica. À vista disso, e visando aprofundar o conhecimento acerca da interação proteína-carboidrato de Cvill, essa lectina foi cristalizada na condição nativa e conjugada a seus ligantes específicos. Os cristais obtidos foram difratados em raios-X e a estrutura foi resolvida por bioinformática.

4.4.1 Cristalização de Cvill

Cvill foi cristalizada na ausência de ligantes, e na presença de açúcares do tipo oligomanosídico (XMAN), e simples (α -metil-manosídeo). Inicialmente Cvill passou pelo teste de pré-cristalização com quatro tampões (Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 com sulfato de amônio 2,0 M; tris-HCl 0,1 M pH 8,5 com sulfato de amônio 1,0 M, tris-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo Cloreto de Magnésio 0,2 M e PEG 4000 30% p/v; e tris-HCl 0,1 M pH 8,5 contendo Cloreto de Magnésio 0,2 M e PEG 4000 15% p/v) para definir a concentração ótima a qual a proteína deve ser preparada. A concentração típica de amostras para cristalização deve estar entre 5 e 100 mg/mL. Cvill foi solubilizada a 12,5 mg/mL em tampão tris-HCl 0,025 M pH 7,6. O ensaio foi montado em uma placa de cristalização VDX de 24 poços (Hampton Research), com 1 mL de cada um dos tampões previamente citados sendo alocado em poços diferentes da placa. Em lamínulas siliconizadas, foi pipetado 1 μ L da solução da lectina e 1 μ L de um dos tampões teste, totalizando 2 μ L por lamínula. Cada lamínula foi posicionada invertida sobre o poço do tampão correspondente, de forma que as gotas ficaram suspensas. Os resultados foram interpretados de acordo com a tabela de resultados (Tabela 2) do kit de pré-cristalização da Hampton Research (PCT Pre Crystallization Test).

Uma vez definida a melhor concentração da lectina, foram iniciados os testes de screening. Nessa etapa, diferentes tampões, agentes precipitantes e sais, nas mais variadas concentrações são combinados em diversas soluções indutoras de cristalização. Foram utilizados os kits de screening Cristal screen I e II (Hampton Research), e o kit JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience). O método de cristalização por difusão de vapor seguido foi o de gota sentada em placas de 48 poços MCR Swissci da Hampton Research. O screen foi montado

automaticamente pelo robô de cristalização mosquito® crystal (ttplabtech). A lectina foi cristalizada nativa e conjugada com os ligantes a concentrações de 0,1 M. Foram utilizados 100 µL de condição de cristalização em cada poço. As gotas sentadas foram montadas a partir de 100 nL da solução de lectina e 100 nL da solução do poço, totalizando 200 nL a uma proporção 1:1. A placa foi selada com filme ViewDrop™ II (TTP Labtech). A presença de cristais foi conferida semanalmente, cada condição que apresentou cristais prosseguiu para a etapa de otimização.

Tabela 2 – Resultados do teste de pré-cristalização

Resultados tampões 1 e 3	Resultados Tampões 2 e 4	Ação recomendada
Precipitado grande e amorfo	Precipitado grande e amorfo	Diluir amostra 1:1 e repetir teste de pré-cristalização
Solução límpida	Solução límpida	Concentrar a amostra para metade do volume original e repetir teste de pré-cristalização
Precipitado leve e granular	Solução límpida	Iniciar <i>screening</i>
Solução límpida	Precipitado leve e granular	Iniciar <i>screening</i>
Precipitado grande e amorfo	Precipitado leve e granular	Iniciar <i>screening</i>
Precipitado grande e amorfo	Solução límpida	Realizar teste de pré-cristalização com tampões 3 e 4
Solução límpida	Precipitado grande e amorfo	Realizar teste de pré-cristalização com tampões 3 e 4

Fonte: Manual do Usuário. Teste de pré-cristalização, Hampton Research (2018).

A otimização foi realizada em placa VDX de 24 poços. Novas condições foram preparadas a partir das soluções que apresentaram bons resultados no teste de *screening*. Para isso, pequenas modificações nos valores de pH e concentração de agentes precipitantes foram combinadas para construir essas novas condições. A ferramenta online *Make Tray* (Hampton Research) foi utilizada na formatação da placa de otimização. A técnica de gota suspensa foi a metodologia de difusão de vapor utilizada na otimização. As gotas foram montadas em

lamínulas siliconizadas na proporção de 1:1 da solução otimizadora e da solução de lectina, totalizando 4 μ L na gota.

4.4.2 Difração dos cristais

As placas de otimização nas quais foi observado o crescimento de cristais foram levadas para o Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, SP). Os cristais foram pescados com o auxílio de *cryoloops* (Hampton Research) e aqueles que continham PEG a uma concentração de pelos menos 30% na solução de cristalização não precisaram ser crioprotetidos. Os que não continham PEG, no entanto, foram mergulhados em uma solução de glicerol 20% para evitar a formação de gelo dentro e ao redor do cristal. Os cristais foram então levados para a linha de luz MX2 do LNLS, onde foram difratados por raios X duros (5 a 15 keV) a 100 K. As imagens foram coletadas pelo detector PILATUS2M (DECTRIS) e os dados foram armazenados para análise e resolução da estrutura tridimensional. Cada conjunto da proteína com ligante ou nativa continha 360 imagens no total, obtidas e gravadas pelo método de rotação de 0,5° do cristal em torno de um eixo fixo.

4.4.3 Resolução da estrutura tridimensional

Os conjuntos obtidos foram analisados pelo pacote de programas CCP4 (WINN et al., 2011). Os programas são responsáveis pelo processamento dos conjuntos de imagens, escalonamento dos dados, e conversão do formato do arquivo de saída para outros que rodem em programas externos ao pacote CCP4. Os spots foram integrados e indexados pelo programa iMOSFILM e o melhor grupo espacial foi definido pelo POINTLESS. De posse do arquivo mtz de saída do POINTLESS, o número de moléculas por unidade assimétrica foi definido utilizando o coeficiente de Mathews e parâmetros de multiplicidade, completeza e Rmerge foram avaliados pelo SCALA. A continuação do processamento foi dada por substituição molecular, pelo o programa MOLREP (VAGIN; TEPLYAKOV, 2010), e utilizando as coordenadas da lectina ConGr (PDB ID: 4L8Q) como modelo de referência das coordenadas. O refinamento foi realizado nos programas PHENIX (ADAMS et al., 2010) e WinCoot (EMSLEY et al., 2010), e o modelo foi validado pela ferramenta PDB Validation Tool (READ et al., 2011). O modelo da estrutura tridimensional da lectina Cvill conjugada com o ligante α -methyl-mannosideo foi depositado no PDB sob o número de identificação: 5BKR. O número de interações polares e hidrofóbicas de Cvill com o ligante α -metil-manosídeo foi avaliado pelo

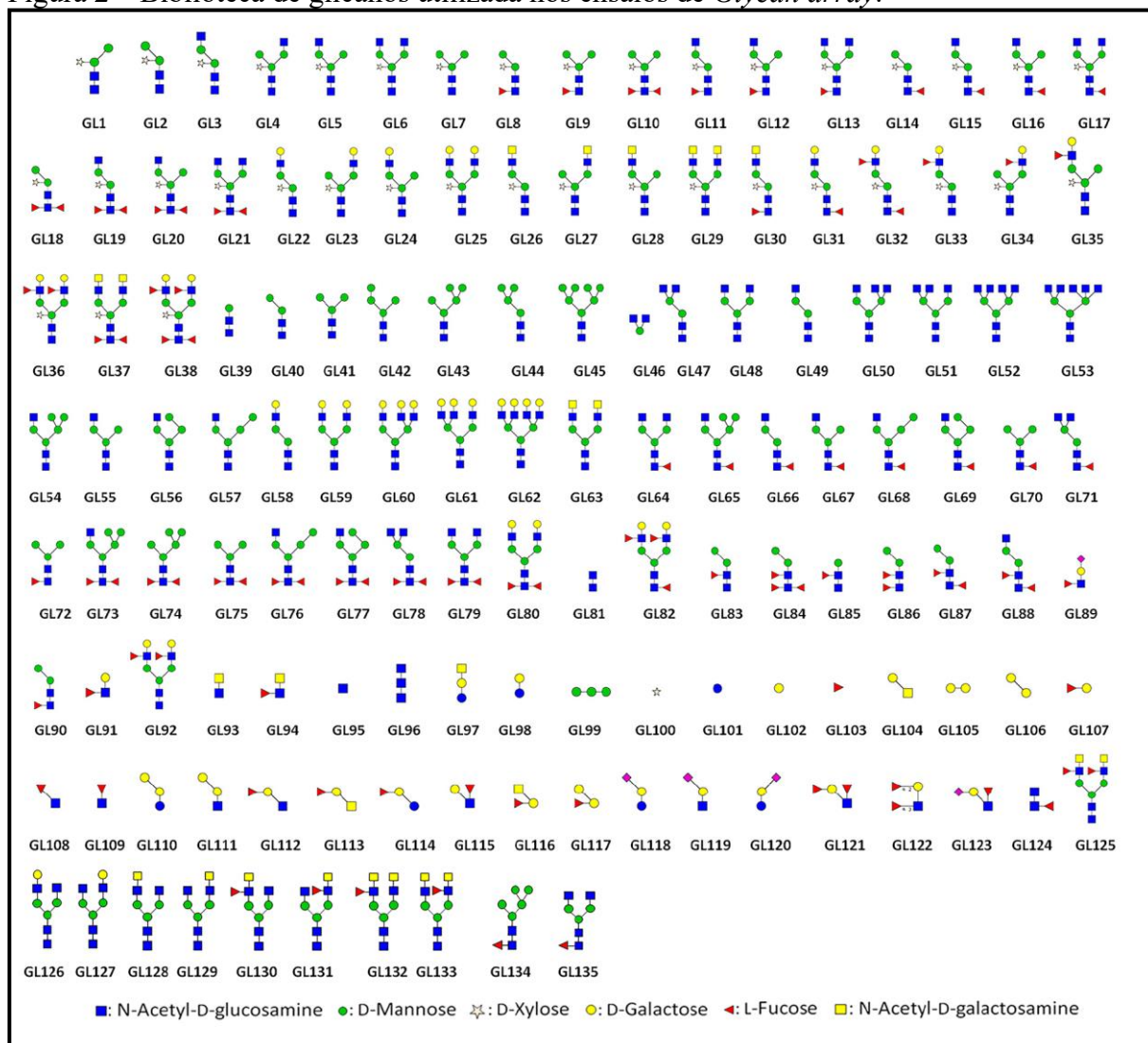
programa CONTACT (CCP4). A construção de figuras foi realizada utilizando os softwares PyMOL (SCHRÖDINGER, 2015) e LIGPLOT (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995).

4.5 Análises de interação com carboidratos

Experimentos de Glycan array e Docking molecular foram realizados para estudar o perfil de interação de Cville com glicanos alvos de interesse biotecnológico.

4.5.1 Glycan array

Figura 2 – Biblioteca de glicanos utilizada nos ensaios de *Glycan array*.



Fonte: Achilli S. et al. Tetralec, artificial tetrameric lectins: A tool to screen ligand and pathogen interactions, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 1–20. doi:10.3390/ijms21155290. (Figura 1 em Materiais Suplementares).

Experimentos de glycan array foram realizados utilizando biblioteca sintética contendo 135 glicanos do tipo N- e O-ligados previamente utilizada e detalhada em (ACHILLI et al., 2020) e descrita na Figura 2. A lectina de *Canavalia villosa* foi marcada com o corante fluorescente Cy3 e o experimento foi realizado de forma semelhante como descrito em (ECHEVERRIA et al., 2018). A lectina foi preparada em solução de incubação Tris-HCl 25 mM pH 7.5 contendo NaCl 150 mM, CaCl₂ 4 mM, Albumina Bovina Sérica (BSA) 0.5% e Tween-20 0.005% (v/v). A incubação da lectina com o slide do array ocorreu pelo período de 18 h a temperatura de 4 °C. Após lavagem do slide do microarray, a fluorescência da lectina marcada foi aferida utilizando equipamento de scanner Agilent G2565BA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com leitura a 568 nm. O software ProScanArray Express (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) processou a quantificação da fluorescência e os resultados foram disponibilizados em medidas arbitrárias de fluorescência relativa (do inglês *Relative Fluorescence Units*, RFU) em função do glicano testado na forma de histogramas.

4.5.2 Docking molecular

De posse da estrutura tridimensional de C_vill resolvida e validada, e considerando também os resultados do Glycan array, foram realizados experimentos de docking com N-glicanos complexos, híbridos e high mannose modelados a partir da ferramenta *Carbohydrate builder* do portal GLYCAM-Web (ALOCCI et al., 2018) ou baixados a partir da biblioteca de N-glicanos do mesmo portal. Foram selecionados para esse ensaio glicanos que são componentes do glicocálice de células HeLa, ou glicanos que apresentaram interessantes resultados no glycan array. O programa GOLD - Cambridge Crystallographic Data Centre (JONES et al., 1997) foi utilizado para realizar o experimento de docking com C_vill. O docking foi utilizado para estudar o comportamento de ligantes e a geometria da interação dos N-glicanos no sítio de reconhecimento à carboidratos da lectina. O sítio de ligação foi definido por um raio de 11 Å a partir das coordenadas do α -metil-manosídeo no CRD. A proteína foi considerada rígida e os ligantes foram flexibilizados. Os scores das interações foram calculados pela função ChemPLP. Figuras foram elaboradas com o auxílio dos programas PyMOL e LIGPLOT.

4.6 Avaliação da atividade de Cvill em células HeLa

Considerando atividades antitumorais e mitogênicas que lectinas de *Canavalia* já apresentaram em células de câncer, foi avaliada a ação de Cvill em células HeLa através de experimentos de citotoxicidade, produção de ROS, atividade de caspases e qPCR.

4.6.1 Citotoxicidade em células HeLa

Células HeLa foram cultivadas em meio DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino (FBS) e penicilina/streptomicina (p/v) a 1% em uma incubadora a 37 °C e a uma atmosfera de 5% de CO₂. Cvill foi solubilizada em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,4 estéril a uma concentração de 10 µM (1 mg/mL). A lectina foi diluída seriadamente em meio de cultura até as concentrações finais de 250,0 µg/mL, 125,0 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL 15,6 µg/mL e 7,81 µg/mL.

As passagens 6 a 10 de células HeLa foram utilizadas nos experimentos. Células foram contadas utilizando um hemocítômetro. A curva de viabilidade celular foi construída dentro de um intervalo de contagem de células variando entre 325 e 20.000 células por poço. Viabilidade celular foi determinada pelo método de PrestoBlue™, no qual foi adicionado 10 µL do reagente a cada poço e a fluorescência foi medida a 560/600 nm após incubação por 30 min a 37 °C, e 5% de CO₂ no escuro.

O controle continha células em meio de cultura sem a adição de lectinas (dose 0). Três replicatas foram preparadas para cada concentração testada. Os experimentos foram repetidos três vezes. A participação do CRD da lectina na toxicidade foi avaliada pela prévia incubação de Cvill com α -metil-manosídeo (α mm) antes de cada ensaio. Células foram semeadas a uma concentração final de 10.000 células por poço em placas de 96 poços estéreis. As placas foram incubadas a 37 °C pelos períodos de 24, 48 e 72 horas. Após cada período de incubação, a viabilidade celular foi avaliada utilizando PrestoBlue™. A fluorescência foi medida a 560/600 nm utilizando leitor de placas Tecan (Tecan Group Ltd, Suíça). A viabilidade celular foi expressa em função da concentração de proteína e tempo de incubação.

4.6.2 Avaliação da produção de ROS

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) foi avaliada utilizando Diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (H2DCFDA) (Sigma-Aldrich). Células HeLa foram

semeadas a 10.000 células por poço em meio de cultura DMEM suplementado com 10% FBS e 1% p/s em placas de 96 poços e foram incubadas com três concentrações diferentes de Cvil (125,0 µg/mL, 31,25 µg/mL e 7,81 µg/mL) preparada da mesma forma que no ensaio de citotoxicidade. Após incubação por 48 h, a 37 °C a uma atmosfera de 5% CO₂, todo meio foi cuidadosamente removido da placa e 100 µL da solução de trabalho de H2DCFDA, preparada a 5 µM em PBS estéril, foi adicionada em cada poço e a placa foi novamente incubada nas mesmas condições anteriores no escuro por 30 min. O controle negativo foram as células incubadas apenas com PBS e controle positivo foram as células tratadas com 100 µM de peróxido de hidrogênio por 15 minutos antes da adição de H2DCFDA. As medias de fluorescência foram feitas em equipamento leitor de microplacas Tecan, utilizando os comprimentos de onda de 485 nm para excitação e 538 nm de emissão (OPARKA et al., 2016).

4.6.3 Análise da atividade de Caspases

A ativação das caspases 3/7, 8 e 9 foi avaliada utilizando kit Cell Meter™ Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Assay (ATT Bioquest). As células foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% FBS e 1% p/s e a lectina foi adicionada nas concentrações de 125,0 µg/mL, 31,25 µg/mL e 7,81 µg/mL. Após incubação por 48 h a 37 °C com 5% de CO₂, 100 µL de solução de trabalho do kit das caspases foi adicionada a cada poço da placa e tudo foi incubado por 30 min no escuro. As leituras de fluorescência foram realizadas nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 535/620 nm para as Caspases-3/7, 490/525 nm para Caspase-8 e 360/470 nm para Caspase-9, de acordo com as recomendações do fabricante do kit. As medidas de fluorescência foram normalizadas pela viabilidade celular utilizando reagente PrestoBlue™.

4.6.4 Análise por qPCR

Para analisar o nível de expressão de genes relacionados a morte celular, foram selecionados primers para genes envolvidos com mecanismos pro-apoptóticos (PUMA, Bax e Bak), e anti-apoptóticos (Bcl-2 e BCL-XL), genes de regulação de autofagia (LC3), genes envolvidos com a apoptose pela via intrínseca (Caspase 3 e Citocromo C) e genes envolvidos com a via extrínseca da apoptose (Caspase-8 e FADD). Os genes GAPDH, HPRT1 e β-actina foram escolhidos como genes de referência (KRAINOVA et al., 2013).

Tabela 3 – Primers desenhados para as reações de qPCR

Gene	Primers
<i>Pro-apoptose</i>	
<i>PUMA</i>	Fw: 5' ATGCCTGCCTCACCTTCATC 3' Rv: 5' TCAGCCAAAATCTCCCACCC 3'
<i>BAX</i>	Fw: 5' AGTAACATGGAGCTGCAGAGG 3' Rv: 5' ATGGTTCTGATCAGTTCCGG 3'
<i>BAK</i>	Fw: 5' ACTCTACCCCTGCTCCCATT 3' Rv: 5' CTTGGAGGCTTCTGACACGT 3'
<i>Apoptose pela via mitocondrial</i>	
<i>Caspase-3</i>	Fw: 5' ATACCAGTGGAGGCCGACTTC 3' Rv: 5' CAAAGCGACTGGATGAACCA 3'
<i>Citocromo-C</i>	Fw: 5' CCTCTGGGGCATTATCCATC 3' Rv: 5' ATATTTGCACAGTGAAACATAGGA 3'
<i>Autofagia</i>	
<i>LC3</i>	Fw: 5' AGAAGGCGCTTACAGCTCAA 3' Rv: 5' AGATTGGTGTGGAGACGCTG 3'
<i>Apoptose pela via extrínseca</i>	
<i>Caspase-8</i>	Fw: 5' GGATGGCCACTGTGAATAACTG 3' Rv: 5' TCGAGGACATCGCTCTCTCA 3'
<i>FADD</i>	Fw: 5' GTGCGGGAGTCACTGAGAAT 3' Rv: 5' CTCCTGTTCTGGAGGTCACG 3'
<i>Anti-apoptose</i>	
<i>BCL-2</i>	Fw: 5' GGAGCGTCAACAGGGAGATG 3' Rv: 5' GATGCCGGTTCAGGTACTCAG 3'
<i>BCL-XL</i>	Fw: 5' AGACCCAGACCTTCTCTTTCT 3' Rv: 5' CCCGGTTGCTCTGAGACATTT 3'
<i>Genes de referência</i>	
<i>GAPDH</i>	Fw: 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' Rv: 5' GAAGATGGTGATGGGATTTC 3'
<i>HPRT1</i>	Fw: 5' TGAGGATTTGGAAAGGGTGTT 3' Rv: 5' CAGAGGGCTACAATGTGATGG 3'
<i>B-actina</i>	Fw: 5' TCTGGCACCACACCTTCTACAATG 3' Rv: 5' GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA 3'

Fonte: elaborado pela autora

As células HeLa foram cultivadas em placas de 24 poços a uma contagem de 50.000 células por poço em meio DMEM suplementado com FBS 10% e p/s 1% a 37 °C e a uma atmosfera de 5% CO₂. Foram administradas as doses de 125,0 µg/mL, 31,25 µg/mL e 7,81 µg/mL de Cvill pelo período 48 h. O controle foram células incubadas com PBS (dose 0) pelos períodos de tempo anteriormente citados. O experimento foi realizado com três replicatas

biológicas.

RNA e DNA foram isolados das células tratadas e do controle de HeLa de acordo com metodologia de isolamento de ácidos nucleicos utilizando Trizol (TRIzol Reagent, ThermoFisher) seguindo protocolo estabelecido pelo fornecedor para células crescidas em monocamadas. O RNA isolado foi precipitado com cloreto de lítio overnight para se livrar de contaminantes e foi posteriormente tratado com DNase I (ThermoFisher Scientific) de acordo com protocolo do fabricante. A quantificação foi monitorada usando espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop (ThermoFisher Scientific). O cDNA de cada amostra foi sintetizado a partir de 1000 ng de RNA utilizando a transcriptase reversa M-MLV (ThermoFisher Scientific) segundo manual do fabricante.

Um pool de cDNA foi preparado em triplicata para construir uma curva de diluição de 6 pontos para o teste de eficiência de primers. A especificidade de cada primer foi checada também por eletroforese em gel de agarose 3%, na qual primers que resultaram na amplificação e presença de uma única banda no gel com o tamanho esperado prosseguiram no experimento.

RT-qPCR foi realizada com três replicatas técnicas para cada uma das replicatas biológicas. As reações foram preparadas com 0.5 μ M de cada primer, 10 μ L de SYBR® Green SuperMix (BioRad) e 1 μ L de cDNA em um volume total de 20 μ L por poço. O programa usado incluiu um passo inicial de 95 °C por 10 min, e 42 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 25 s e 72 °C por 20 s. Os experimentos foram realizados em equipamento termociclador Bio-Rad CFX96 qPCR e as corridas foram controladas por software Bio-Rad CFX Manager 3.1. A eficiência das reações e a estabilidade dos genes de referência foi analisada utilizando software qBase+ (Biogazelle). A análise da expressão gênica relativa foi feita utilizando o software Relative Expression Software Tool (REST 2009) versão 2.0.13 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Os dois genes de referência foram utilizados para a normalização dos resultados, que foram plotados em gráficos de whisker-box. O método de Bootstrap foi utilizado para analisar a significância da expressão gênica usando intervalos de confiança de 95% e 2000 randomizações.

4.7 Estudo do endereçamento subcelular de Cvill por microscopia confocal

Cvill foi marcada com o corante fluorescente tetrametil-rodamina isotiocianato (TRITC, Sigma-Aldrich) seguindo o protocolo de Barauna e colaboradores (BARAUNA et al., 2006) com adaptações. Cvill foi solubilizada em tampão bicarbonato de sódio 100 mM pH 9.0 a uma concentração de 4 mg/mL. O sítio de reconhecimento de carboidrato da lectina foi protegido pela adição de α -metil-manosídeo a uma concentração final de 100 mM. TRITC foi

preparado em DMSO a 1 mg/mL e adicionada à lectina a uma proporção de 50 µL de TRITC por 1 mL da solução de lectina. A solução foi incubada sob constante agitação por 2 h a temperatura ambiente. TRITC que não se ligou à lectina foi separado da solução de Cvill marcada com TRITC por dialise contra solução de cloreto de sódio 150 mM. O conteúdo final de proteína e a proporção TRITC:Cvill foram determinados por espectrofotometria.

As células HeLa foram preparadas em pratos de cultura de células para microscopia confocal com fundo de vidro a 35.000 células/placa em meio DMEM contendo 10% FBS e 1 % p/s. Cvill-TRITC foi adicionado aos pratos nas concentrações de 125,0 µg/mL e 31,25 µg/mL e incubadas por 48h a 37 °C, 5% de CO₂ no mesmo meio de cultura. As células foram coradas com Calcein (Thermofisher) por 45 min a 37 °C com 5% de CO₂ e lavadas duas vezes com PBS antes dos experimentos de microscopia confocal.

Para cada dose da lectina foram preparados 3 pratos de microscopia confocal, e a partir destes pratos foram construídas 4 imagens confocais por dose. Cerca de 140 células foram analisadas individualmente para a conclusão dos resultados. As imagens foram obtidas usando um microscópio confocal invertido da Nikon Instruments A1. O software NIS-Elements C (Laboratory Imaging) foi usado para coleta de dados e análise de imagens. Os comprimentos de onda de emissão/excitação foram 525/488 para Calceína e 595/560 para TRITC. Lentes objetivas de imersão em água do tipo Plan Apo ELWD 60x DIC H foram utilizadas na coleta das imagens. Os softwares NIS-Elements Viewer 5.21 e ImageJ (NIH) foram utilizados nas construções das imagens.

4.8 Análise estatística

A análise estatística dos testes de citotoxicidade, ROS e caspases foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6.01. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA) e pelo teste de múltiplas comparações de Turkey. A IC₅₀ foi calculada por regressão não linear. A indicação da significância foi dada pelos valores de p-value, com ($p < 0.01$) a não ser que indicado explicitamente outro valor de p-value no texto. Os resultados da estatística dos experimentos de qPCR foram analisados pelo software REST 2009. A significância foi dada pelo método de Bootstrap usando intervalos de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Sequência da lectina de *Canavalia villosa*

A lectina de *Canavalia villosa* (Cvill) é composta por 237 resíduos de aminoácidos, passa pelo processamento pós traducional comum em lectinas de *Diocleinae* chamado de permutação circular (CAVADA et al., 2019b), e apresenta pelo menos cinco isoformas, como pode ser notado por mudanças pontuais em posições específicas da sequência proteica e por eletroforese bidimensional em resultados previamente publicados (LOSSIO et al., 2017).

Em trabalhos anteriores, utilizando espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics), foi obtido uma cobertura de 40% da estrutura primária de Cvill (LOSSIO et al., 2017). Em novos experimentos de espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro do tipo ESI-qTOF, foram conseguidos novos íons e foi possível aumentar a cobertura da sequência de Cvill para 80%. Nesses novos experimentos, a proteína foi digerida pelas enzimas tripsina, quimiotripsina, Asp-N, Pepsina e Glu-C. Os peptídeos foram organizados usando a sequência da lectina de *Canavalia grandiflora* como molde, devido a ConGr ser a lectina que apresentou maior identidade com os peptídeos em alinhamento feito pela ferramenta Blastp. Os peptídeos foram depositados na forma de sequência parcial no banco de dados UNIPROT. O alinhamento dos peptídeos contra o template pode ser visualizado na Figura 3. Informação sobre a ordem que os peptídeos ocupam pode ser obtida ao se observar regiões de interseções de sequências entre peptídeos adjacentes e entre peptídeos oriundos de digestões com diferentes enzimas, como ocorre em T4, T10 e A2 (Figura. 3).

Primers degenerados foram desenhados a partir da informação da sequência proteica obtida por espectrometria de massas. O desenho dos primers foi realizado considerando o processamento pós-traducional pelo o qual lectinas de *Diocleinae* passam. Com o objetivo de obter primers que amplificassem próximo ao gene completo da lectina, porém que fossem o mais específicos o possível, foram testadas várias regiões da sequência no processo do design dos primers. Devido a isso, foi observado que as regiões que entregariam melhores primers, grifadas em negrito na Figura 3, não amplificariam a região central da proteína nativa, que corresponde as regiões iniciais e finais da sequência do gene . Essa deficiência na informação do sequenciamento gênico, no entanto, não seria um grande problema na obtenção da sequência completa de Cvill, uma vez que a cobertura de dados por espectrometria de massa dessa região central compensaria a deficiência de informação do gene (Figura 3).

Figura 3 – Mapa de peptídeos de Cvill oriundos da digestão da lectina com Tripsina, Quimotripsina, Asp-N, Pepsina e Glu-C e sequenciados por MSMS. As regiões marcadas em amarelo indicam seções sem cobertura de dados por espectrometria de massas. Consequentemente, na figura, são regiões que mantiveram a informação de sequência da lectina de ConGr, que foi utilizada como template na montagem da ordem dos peptídeos de Cvill. Em negrito estão marcadas as regiões da sequência utilizadas para desenho de primers. As regiões cobertas por dados de MS/MS de Cvill tiveram a informação da sequência de ConGr substituída pela sequência de Cvill.

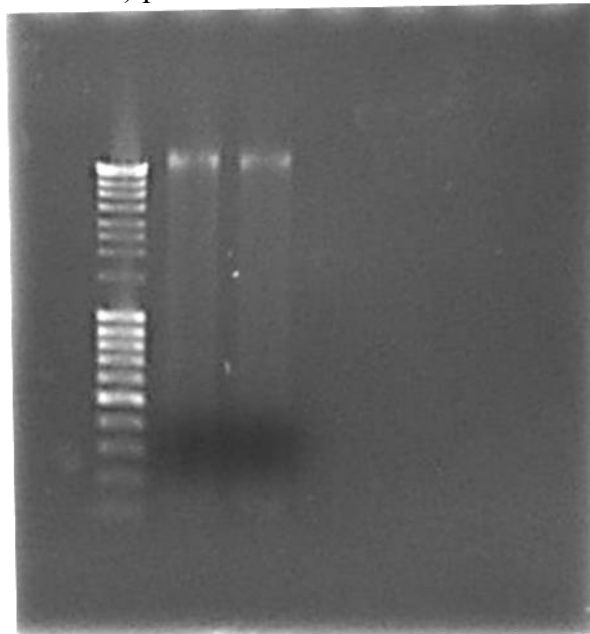


Fonte: autoria própria

O DNA genômico (Figura 4) foi isolado de sementes de *Canavalia villosa* segundo método do CTAB (HEALEY et al., 2014). A PCR foi realizada com a enzima Phusion High-

Fidelity DNA Polymerase, para garantir a informação precisa da sequência. A reação de PCR apresentou *amplicon* com o tamanho esperado 661 pb. O produto de PCR foi inserido diretamente no vetor de clonagem pJET sem etapa de purificação em gel. Plasmídeos positivos para as inserções de 661 bp foram usados para transformar cepas TOP10 de *E. coli*. Os clones recombinantes cresceram em meio seletivo contendo carbenicilina. Os clones selecionados foram confirmados ainda quanto à presença do vetor contendo o inserto do gene da Cvill por PCR de colônia (Figura 5).

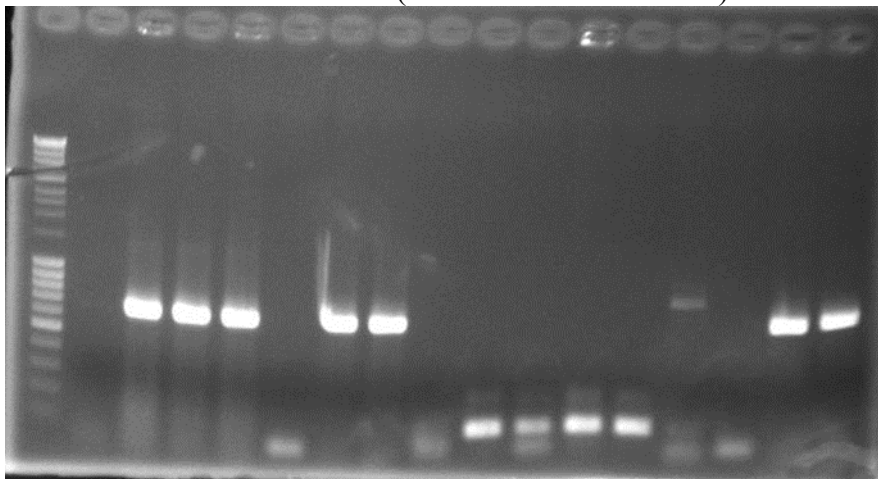
Figura 4 – Gel de eletroforese de agarose 1,5% mostrando o DNA genômico extraído de sementes de *C. villosa* (raias 2 e 3). Marcador de peso molecular Ladder Mix (ThermoFisher Scientific) presente na raia 1.



Fonte: elaborado pela autora.

Dentre quinze clones selecionados para a PCR de colônia, apenas sete confirmaram a presença do inserto, amplificando com sucesso a banda esperada de 661 bp (Figura 5). Duas dessas colônias (chamadas A e B) foram então selecionadas e inoculadas *overnight* em 5mL de meio LB líquido contendo carbenicilina a 37 °C. Posteriormente, os plasmídeos foram purificados (plasmídeos A e B) com o kit Qiagen Miniprep e enviados para sequenciamento Sanger em facility. O sequenciador utilizado foi o 3730XL DNA Analyzer System (ThermoFisher Scientific). Os plasmídeos A e B foram submetidos a sequenciamento *forward* e *reverse* para aumentar a confiança da informação. Devido a isso, cada plasmídeo originou duas contigs, chamadas agora de contigs *forwardA* e *forwardB* e contigs *reverseA* e *reverseB*

Figura 5 – PCR de colônia de Cvill clonada em TOP10 *E. coli*. Gel de agarose 1% apresentando sete bandas de peso aparente de 661 referentes a colônias positivamente transformadas com o gene de interesse e oito raias sem nenhuma amplificação. Marcador MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific) na raia 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fragmentos de sequência que seriam oriundos do vetor pJET foram excluídos das contigs com o auxílio da ferramenta VecScreen (NCBI). O alinhamento de cada contig forward com o reverso complemento da sua contig reverse confirmou perfeitamente a correta chamada de base de cada sequenciamento. Quando alinhadas entre si, as contigs A e B apresentaram diferenças pontuais em alguns nucleotídeos, o que pode ser explicado devido à lectina de *Canavalia villosa* apresentar isoformas, como previamente observado em Lossio et al (LOSSIO et al., 2017). Dessa forma, a contig A corresponde a uma isoforma de Cvill e a contig B corresponde a outra. A presença de isoformas em lectinas ConA-like manose específicas é bastante comum e já foi previamente reportada nas lectinas de *C. bonariensis* (TORQUATO et al., 2016), *C. marítima* e *D. lehmanni* (PEREZ et al., 1991). As contigs A e B do gene da lectina de *C. villosa* foram depositadas no banco de dados GenBank, sob os códigos identificadores MW677574 e MW677575.

A tradução das sequências de MW677574 e MW677575 em proteína foi feita utilizando a ferramenta Translate Tool (ExpASy). O frame escolhido foi aquele em que se observou dados coincidentes com os de MSMS, considerando que a ORF estaria incompleta, devido aos primers desenhados não abrangerem o gene completo da lectina, a metionina iniciadora não estaria inclusa na informação do gene. O gene, quando traduzido, cobriu 86% da sequência de aminoácidos, não incluindo dados correspondentes a 32 aminoácidos da região central da proteína. A região central, no entanto, já estava coberta pelos dados de espectrometria

de massas. A sequência final de Cvill foi obtida, portanto pela combinação dos dados de MSMS e sequenciamento gênico. O alinhamento entre a sequência final e MW677574 e MW677575 traduzidas pode ser visualizado na Figura 6. Em alguns pontos da sequência de aminoácidos é possível encontrar mais de uma possibilidade de resíduo podendo compor a sequência. Essas regiões pontuais correspondem a áreas de diferenciação entre isoformas. Durante o sequenciamento *de novo* por espectrometria de massas também foi comumente encontradas essas regiões pontuais de variação entre isoformas. Alguns exemplos dessas regiões de isoformas incluem, por exemplo, a posição 4 que pode ser ocupada por uma Ile por Val, e a posição 223 que pode ser ocupada por uma Arg ou Met.

Figura 6 – Sequência do gene da lectina de *Canavalia villosa*. A estrutura primária completa da lectina (Cvill_fullsequence) foi obtida pela combinação dos dados de espectrometria de massa e sequenciamento gênico. MW677575 e MW677574 correspondem às sequências de duas isoformas do gene de Cvill traduzidas. O alinhamento foi feito respeitando o processamento pós-traducional que a lectina sofre.

Cvill_fullsequence	SDTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKKKTARWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR	60
MW677575	SDTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKKKTARWNMQNGKVGTAHITYNSVCKR	60
MW677574	SDTVVAVELDTYPNPDIGDPNYPHIGIDIKSIRSKKKTARWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR	60
	.**.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Cvill_fullsequence	LSAIVSYPNGDSATVSYDVLDLNVLPWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNSST	120
MW677575	LSAIVSYPNGDSATVSYDVLDLNVLPWVRVGLSASTGLNKETNTIL-----	107
MW677574	LSAIVSYPNGDSSTVSYDVLDLNVLPWVRVGLSASTGLNKETNTIL-----	107
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Cvill_fullsequence	AETNALHFTLNQFTKDQKDLILQGDATTSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSVGRALFYAPVH	180
MW677575	-----LILQGDATTSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSMGRALFYAPVH	148
MW677574	-----LFHQGDATADSDGNLQLTRVSSNGTPQGNSVGRALFYAPVH	148
	*:*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	
Cvill_fullsequence	IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDSDPADGITFFISNMDSTLPRGSTGMLLGLFPDAN	237
MW677575	IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFISNMDSTLPMGSTGMLLGLFPDAN	205
MW677574	IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDRDPADGITFFISNMDSTLPMGSTGMLLGLFPDAN	205
	*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****	

Fonte: elaborado pela autora.

Dois pequenos fragmentos totalizando cinco resíduos de aminoácidos não tiveram cobertura de informação nem por espectrometria de massas nem por sequenciamento do gene, são eles os fragmentos Leu115-Lis116 e Asp137-Lis139. Esses dois trechos seriam pequenos peptídeos gerados como produto da digestão de Cvill pela enzima tripsina que provavelmente não voaram bem no analisador do espectrômetro de massas. Ambos os peptídeos nas adjacências desses dois fragmentos foram encontrados nos experimentos de espectrometria de massas, o que indica que o resíduo C-terminal de ambos os fragmentos desconhecidos deveriam ser uma lisina ou uma arginina, obrigatoriamente. Além disso, ambos esses fragmentos são

altamente conservados em outras estruturas primárias de *Canavalias* e *Diocleas*. A confirmação final da sequência desses fragmentos foi dada pelos experimentos de resolução da estrutura tridimensional da lectina, nos quais foi observado um bom encaixe desses resíduos no mapa de densidade eletrônica da estrutura tridimensional da lectina, como feito anteriormente por Souza et al (DE SOUZA et al., 2003) para elucidar a sequência dessa mesma região da lectina de *Cratylia mollis*. Em regiões de isoformas, a nuvem eletrônica também foi utilizada para discernir entre duas possibilidades de resíduos e foi fundamental na definição da sequência final da lectina utilizada para determinação da estrutura terciária. Dessa forma, a sequência da lectina foi concluída com base no conjunto de dados oriundos dos experimentos de espectrometria de massas, sequenciamento gênico e de resolução de estrutura tridimensional.

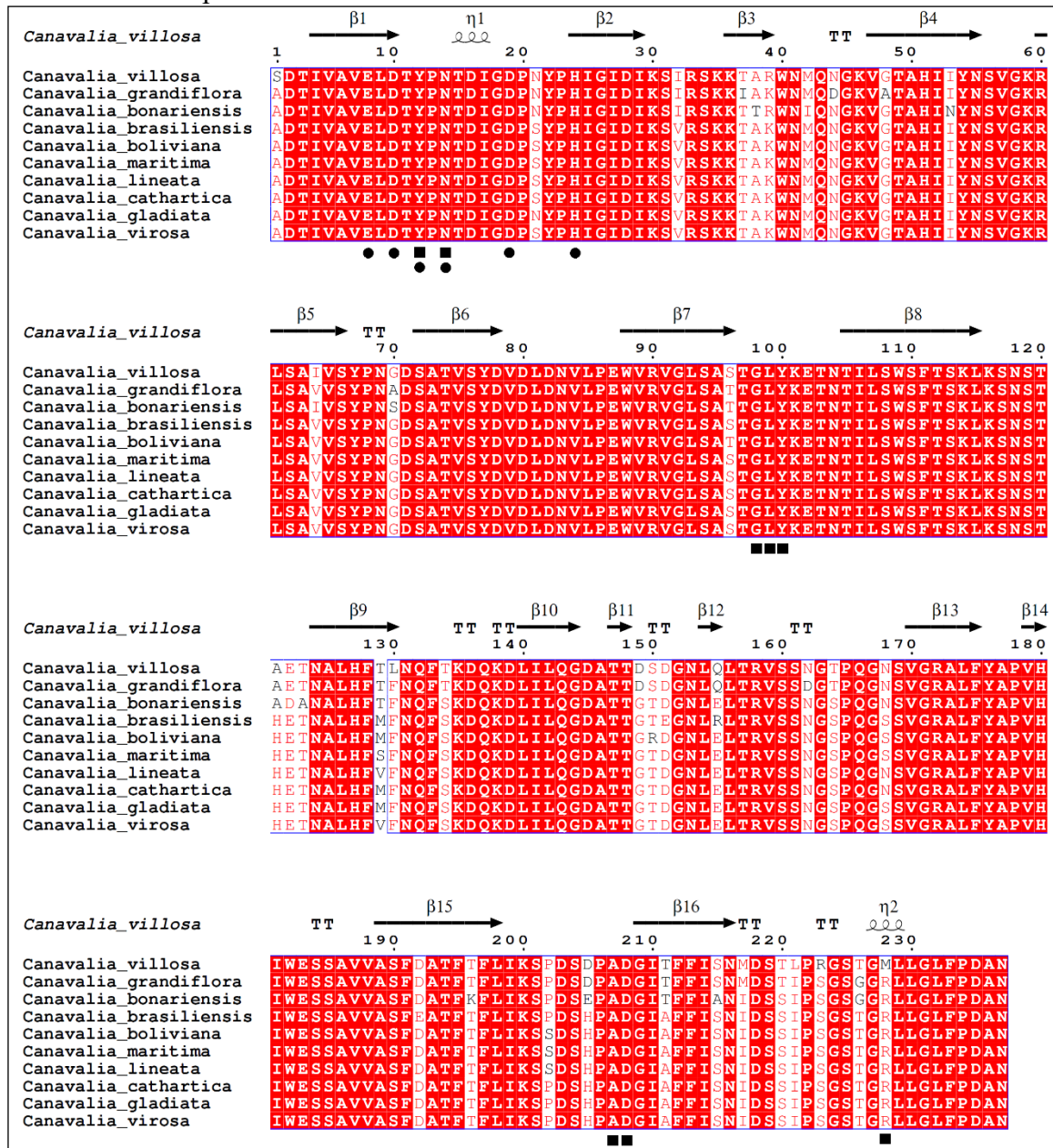
Considerando modificações pós-traducionais, foi concluído que Cvill definitivamente passa pelo processamento de permutação circular uma vez que é observado que a região N-terminal do fragmento γ está covalentemente ligada ao resíduo C-terminal do fragmento β . Essa ligação foi comprovada nos experimentos de espectrometria de massas, no qual foi observado que o peptídeo T3 (Figura 3) é constituído pelos resíduos finais do fragmento β e iniciais do fragmento γ (Ser117-Asn118 e Ser119 em diante, respectivamente), indicando o ponto de religação do processamento de lectinas de *Diocleinae*. Esses dois fragmentos ligados covalentemente formam a cadeia alfa de lectinas manose específicas da subtribo *Diocleinae* (CAVADA et al., 2019c; SANTIAGO et al., 2014; TORQUATO et al., 2016).

A predição de possíveis sítios de N-glicosilação foi feita através do algoritmo do servidor NGlycPred Server (CHUANG et al., 2012), que utiliza a estrutura tridimensional e padrões de glicosilação de bancos de dados para prever glicosilações de proteínas desconhecidas. Como resultado, foi indicado que Cvill seria glicosilada em seu resíduo Asn162, o que não coincide com os resultados experimentais de bancada previamente observados, que demonstraram pelo teste colorimétrico do reagente de Schiff que a lectina não apresenta glicosilações em nenhuma de suas isoformas (LOSSIO et al., 2017). Os dados de espectrometria de massas também confirmam a ausência de glicosilação nessa região. Lectinas ConA-like específicas a manose tendem a não apresentar glicosilações em suas formas maduras (GRANGEIRO et al., 1997; PINTO-JUNIOR et al., 2015; PINTO et al., 2013b).

Os resultados do alinhamento Blastp indicaram que Cvill é 94,09% idêntica à lectina de *Canavalia grandiflora* (ConGr), 91,56% idêntica à lectina de *Canavalia cathartica* (ConC), 91,56% idêntica à lectina de *Canavalia gladiata* (CGL) e 91,14% idêntica à lectina de *Canavalia virosa* (ConV). O alinhamento de Cvill com essas lectinas, assim como também com as lectinas de *C. bonariensis* (CaBo), *C. brasiliensis* (ConBr), *C. boliviana* (CboL), *C. maritima*

(CML), e *C. lineata* (ConL) pode ser encontrado na Figura 7. O alinhamento deixa claro o alto grau de similaridade e homologia que essas lectinas apresentam entre si.

Figura 7 – Alinhamento de Cvill com lectinas do gênero *Canavalia*. Resíduos envolvidos com o Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (CRD) estão representados por um quadrado subscrito, enquanto resíduos envolvidos com o Sítio de Ligação do Metal (MBS) estão marcados por um círculo subscrito.



Fonte: elaborado pela autora. Alinhamento realizado pela ferramenta online ClustalW. Construção gráfica das similaridades entre sequência e predição da estrutura secundária realizada pelo programa ESPrift 3.0.

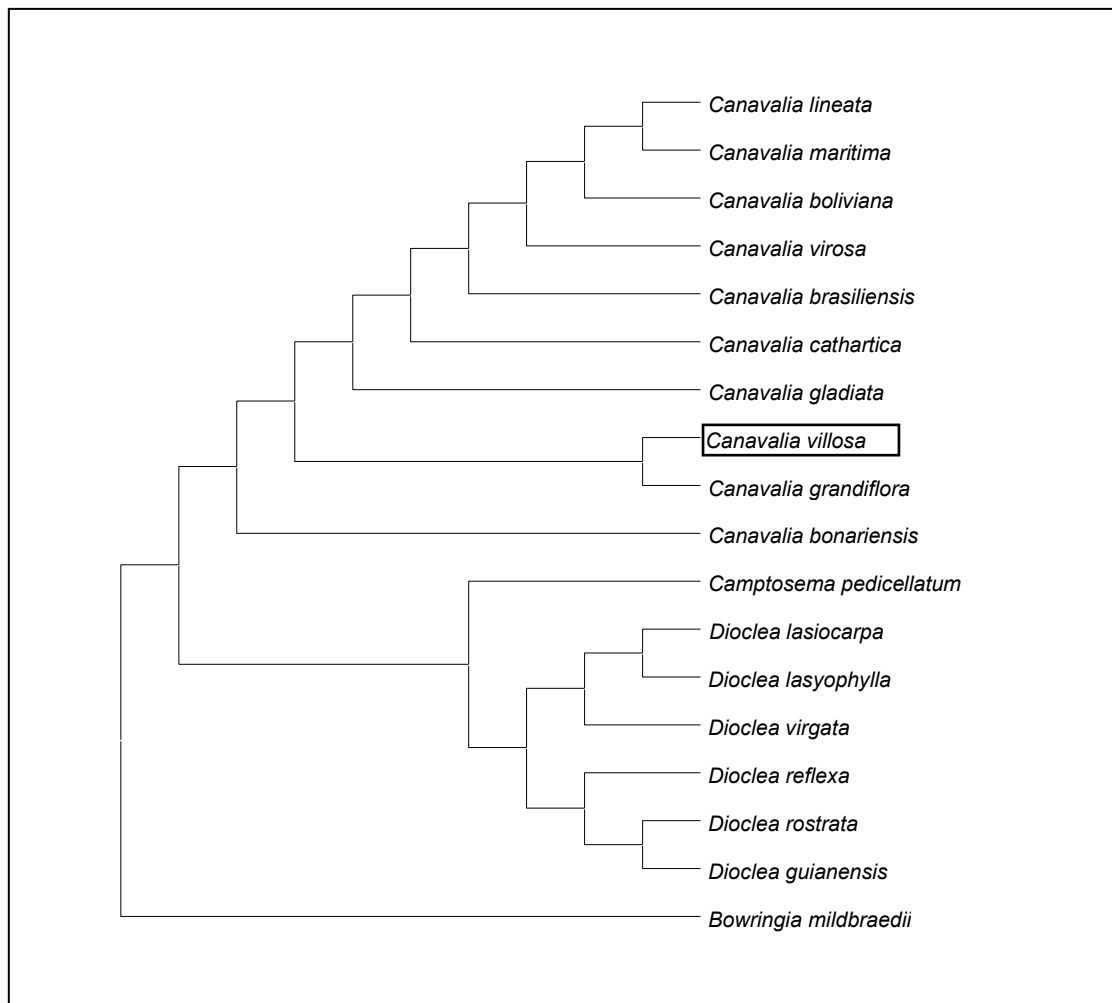
Uma diferença marcante entre Cvill e outras lectinas do gênero *Canavalia* nos resíduos envolvidos com o Domínio de Reconhecimento a Carboidrato (CRD) é a mutação do resíduo Arg228 pela Met228. Essa mutação é interessante visto que esses dois resíduos

apresentam propriedades químicas bem distintas, além de ser a primeira vez que ela é observada em lectinas ConA-like nesta posição. A forma como a metionina vai atuar no CRD é um ponto interessante a ser analisado com a resolução da estrutura tridimensional. Ainda considerando modificações em resíduos chave do sítio de ligação a carboidratos, é relevante citar que no sequenciamento do gene foi encontrada uma asparagina ocupando a posição da Tyr100. A presença de Tyr 100 ou Asn100 pode ser vista em dados de espectrometria de massa, porém a grande parte dos peptídeos sequenciados por MSMS que englobavam essa região da sequência incluíam uma tirosina ocupando a posição 100 da sequência. Além disso, a Tyr100 também melhor se encaixou na nuvem eletrônica de Cvill. A presença da Tyr100 ou Asn100 em dados de MSMS indica que Asn100 não foi introduzido por primers de PCR no sequenciamento de genes. Os outros resíduos que constituem o CRD se apresentaram conservados quando comparados a outras lectinas de *Canavalia*, assim como os resíduos do Sítio de Ligação a Metais (MBS) de Cvill, compostos pelos aminoácidos Glu8, Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 e His24 (Figura 7). Em trabalho anterior foi observado que Cvill não apresentou mudanças na atividade hemaglutinante quando dialisada contra solução de EDTA (LOSSIO et al., 2017), o que indicaria que essa lectina não seria dependente de metais. A explicação mais plausível, no entanto, é que os metais estão fortemente ligados a estrutura da lectina, e a diálise contra esse agente quelante não foi o suficiente para retirá-los da estrutura de Cvill, assim como foi observado anteriormente com a lectina de *C. virosa*, que é metalo-dependente como comprovado por experimentos de resolução de estrutura (OSTERNE et al., 2017).

Algumas outras peculiaridades da sequência de Cvill incluem o primeiro resíduo da sequência, uma serina, que ocupou a posição Ala1. Essa é a primeira vez que é observada essa modificação em sequências de Diocleinae, com essa alteração sendo observada tanto em dados de MSMS quando no gene de Cvill. Outra modificação interessante da região N-terminal da lectina é a presença tanto de uma isoleucina quanto uma valina ocupando a posição 4 da sequência, modificando a famosa sequência inicial ADTIVAVELD de lectinas desse tipo, e indicando que a posição 4 da sequência é uma região de modificação em isoformas. À vista disso, o N-terminal SDTVVAVELD passa a ser uma possibilidade de ser encontrado em lectinas ConA-like.

A predição da estrutura secundária usando o software ESPript 3.0 (GOUET et al., 1999) indicou que Cvill segue o padrão observado nas lectinas Diocleinae com grande predominância de fitas beta em sua estrutura secundária.

Figura 8 – Árvore filogenética construída pelo método de Neighbor-Joining demonstrando a distância evolucionária da lectina de *C. villosa* e outras lectinas de Diocleinae. A lectina de *B. mildbraedii* foi escolhida como grupo externo.



Fonte: elaborado pela autora. A árvore foi construída através do software MEGA X e as distâncias evolucionárias foram calculadas pelo método de Poisson.

Na árvore filogenética construída a partir da sequência de aminoácidos de lectinas de Diocleinae (Figura 8) é possível observar a proximidade evolutiva já esperada entre as lectinas de *C. grandiflora* e *C. villosa*, devido à alta similaridade de sequência entre essas duas lectinas. Também é possível notar que Cvill é uma das lectinas mais primitivas do gênero *Canavalia*, junto com as lectinas de *C. grandiflora* e *C. bonariensis*. Cvill, ConGr e CaBo se posicionam próximas evolutivamente do ramo correspondente ao gênero *Dioclea* na árvore. As lectinas são interessantes moléculas a serem utilizadas em estudos de filogenia e relações evolutivas devido a estas proteínas serem ubíquas, e apresentarem homólogos fora do reino Plantae. Considerando isso, além de estudos estruturais e de aplicações dessas moléculas, também deve-se buscar compreender a origem evolutiva dessas proteínas, auxiliando o entendimento sobre qual papel elas podem ter desempenhado na adaptação das plantas ao

ambiente terrestre e como se diferenciaram entre si desde então (SUVARNA; SHARMA, 2020; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

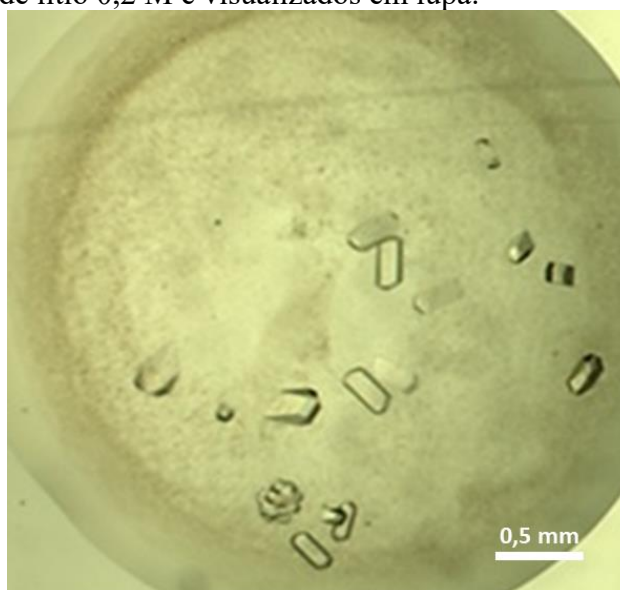
5.2 Elucidação da estrutura tridimensional de Cvill

A estrutura terciária de Cvill conjugada com α -metil-manosídeo foi resolvida por cristalografia de macromoléculas e difração de raios-X. Os experimentos de cristalização se iniciaram com os testes de pré-cristalização, que confirmaram a concentração de 12,5 mg/mL da lectina como ótima para o início do *screening* de cristalografia. A lectina nativa e conjugada com os carboidratos X-MAN e α -metil-manosídeo a 5 mM foi submetida ao screening utilizando os kits Crystal screen I e II (Hampton Research) e JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience). Após um período relativamente rápido de 2 semanas de incubação, os poços que continham Cvill complexada com α -metil-manosídeo nas condições A6 (PEG1000 20%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M), C1 (PEG8000 20%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 4,2 e cloreto de sódio 0,2 M) e C11 (acetato de sódio 0,1 M pH 4,6 e sulfato de amônio 2 M) do kit JBScreen JCSG++ apresentaram cristais e foram, portanto, selecionadas para a etapa de otimização.

Para a construção das placas de otimizações, pequenas variações dos valores de pH do tampão fosfato-citrato de potássio 0,1 M (pHs 4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8 e 5,0) foram combinadas com variações de concentrações dos agentes precipitante PEG1000 (17,5%, 20%, 22,5% e 25%) e PEG 8000 (18%, 20%, 22% e 24%) para condições A6 e C1 respectivamente. A concentração dos aditivos sulfato de lítio e cloreto de sódio não foram alteradas nas condições criadas sendo mantidas a 0.2 M. A otimização para a condição C11 foi feita de forma semelhante, com variações de pH do tampão acetato de sódio 0,1 M (pHs 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0 e 5,2) sendo combinadas com variações de molaridade do aditivo sulfato de amônio (1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00 e 3,25 M). A condição C11 não continha agentes precipitantes incluída na sua composição. A lectina incubada com α -metil-manosídeo foi montada nas placas pelo método de gota suspensa. Cresceram cristais de tamanho apropriado para difração em luz síncrotron nas seguintes quatro condições: PEG1000 17,5%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M; PEG1000 17,5%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 5,0 e sulfato de lítio 0,2 M; PEG1000 25%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 4,2 e sulfato de lítio 0,2 M e PEG8000 24%, fosfato-citrato de potássio 0,2 M, pH 4,4 e cloreto de sódio 0,2 M. As placas foram levadas, então, para Campinas (SP) ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), onde os cristais foram laçados e difratados na linha de luz MX2 a uma temperatura de 100 K.

O tempo de exposição do cristal à radiação e a resolução foram ajustados manualmente. Um total de 360 imagens de cada cristal foram obtidas. Cada imagem foi obtida pela oscilação do cristal a um ângulo de 0,5 grau, cobrindo, portanto, 180° de rotação do cristal.

Figura 9 – Cristais de Cville complexada com α -metil-manosídeo formados na placa de otimização sob a condição PEG1000 17,5%, fosfato-citrato de potássio 0,1 M pH 5,0 e sulfato de lítio 0,2 M e visualizados em lupa.



Fonte: elaborado pela autora.

As imagens geradas pela difração eletrônica do cristal de Cville foram analisadas utilizando o pacote de softwares CCP4. O programa iMOSFILM foi utilizado na indexação das imagens, no refinamento de célula e na integração dos spots. Cville apresentou grupo espacial ortorrômbico do tipo I222, e uma unidade assimétrica por célula unitária. Os parâmetros de avaliação da qualidade das reflexões foram analisados pelo SCALA. Mais detalhes sobre os parâmetros de coleta de dados, substituição molecular e refinamento podem ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4 – Parâmetros da resolução da estrutura de Cville

Parâmetro	Valor
Coleta de dados	
Grupo espacial	I 2 2 2

Continua na próxima página

Parâmetro	Valor
Constantes da célula	(61.49 Å; 84.44 Å; 89.07 Å) (90.00°; 90.00°; 90.00°)
Número de reflexões	40,674
Número de reflexões únicas	8,301
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limites de resolução	27.48 – 2.50
Completeza (%)	99.63
R _{merge} ^a (%)	11.2
Multiplicidade	4.9
Média I/σ(I)	8.9
Substituição molecular	
wRfactor	0.431
Score	0.6826
Refinamento	
Limites de resolução	27.48 – 2.50
Número total de átomos	1839
R _{factor} ^b (%)	23.34
R _{free} ^c (%)	26.54
Número de reflexões	8295
Reflexões usadas no R-free	408
Número de resíduos em unidade assimétrica	236
Número de moléculas de água	37
Variações dos valores ideais de RMS	
Comprimento das ligações (Å)	0.021
Ângulos das ligações (graus)	1.59

Continua na próxima página

Parâmetro	Valor
Fatores de temperatura	
B value para toda a cadeia	46.8
Ligantes & solventes	54.9 & 47.8
Rotâmetros e gráfico de Ramachandran	
Rotâmetros fora da curva (%)	0.50
Resíduos nas regiões mais favorecidas (%)	93.89
Resíduos em regiões adicionais permitidas (%)	6.11
Resíduos em regiões permitidas generosamente (%)	0

Fonte: Elaborado pela autora.

$$^a R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_j |I_{hkl-j} - (1-hkl)|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl-j}}$$

$$^b R_{factor} = \frac{\sum |F_{calc} - F_{obs}|}{\sum |F_{obs}|}$$

^c Rfree foi calculado a partir de 5% das reflexões excluídas do refinamento

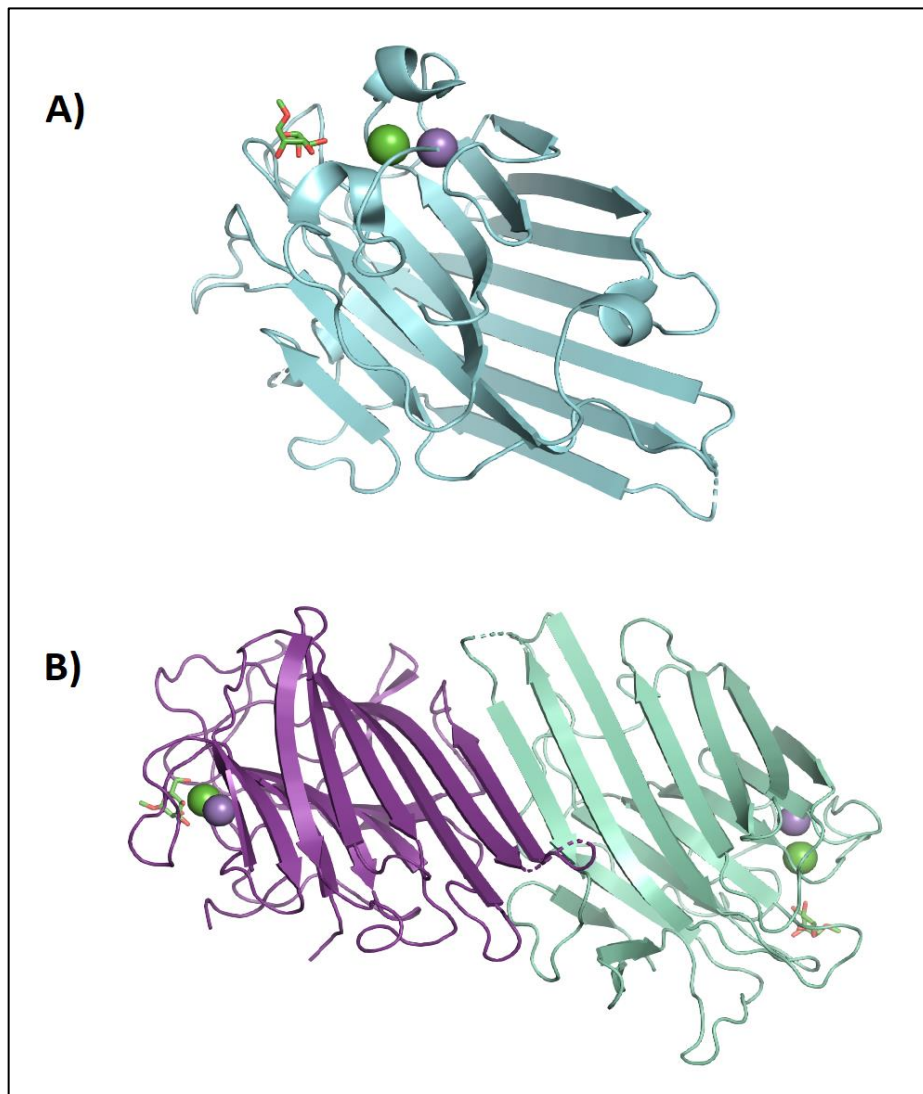
O programa MOLREP foi utilizado para encaixar a sequência de aminoácidos dentro da nuvem eletrônica por substituição molecular. O modelo da lectina de ConGr (PDB ID: 4L8Q) foi utilizado devido a ela apresentar a maior similaridade com a lectina de Cvill por alinhamento utilizando a ferramenta Blastp. O encaixe do ligante e o refinamento foram realizados utilizando Phenix e manualmente utilizando WinCoot. O modelo foi validado pela ferramenta PDB validation (READ et al., 2011) e depositado no PDB sob o código de identificação: 5BKR.

Cvill apresenta estrutura tridimensional com motivo do tipo jellyroll ou β -sanduíche, que se caracteriza no caso de lectinas ConA-like pela presença de duas folhas beta sobrepostas, como em um sanduíche. As folhas betas são constituídas por fitas anti-paralelas, com seis fitas-beta longas e planas formando uma folha beta e sete fitas encurvadas compondo a outra folha. Cada uma destas estruturas é conectada por loops, que geralmente são as regiões em que grande parte das alterações de sequência entre lectinas se apresentam.

A formação do tipo β -sanduíche é amplamente conservada em lectinas de Fabaceae (CAVADA et al., 2019b, 2019c; LORIS et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2020). A figura 10A mostra o protômero do tipo jellyroll de Cvill. A oligomerização de monômeros compondo dímeros é termodinamicamente favorável e estável em lectinas de leguminosas. Essas

oligomerizações sempre envolvem interações não covalentes entre as folhas- β de dois monômeros diferentes (MANOJ; SUGUNA, 2001).

Figura 10 – Estrutura tridimensional da lectina de *C. villosa*. (A) Monômero de Cvill. Os íons cálcio e manganês se encontram representados como as esferas verde e roxa respectivamente e o ligante α -metil-manosídeo está posicionado no sítio da lectina. (B) Dímero canônico de Cvill, as 12 fitas- β alinhadas que caracterizam o dímero canônico estão mostradas à frente da estrutura.

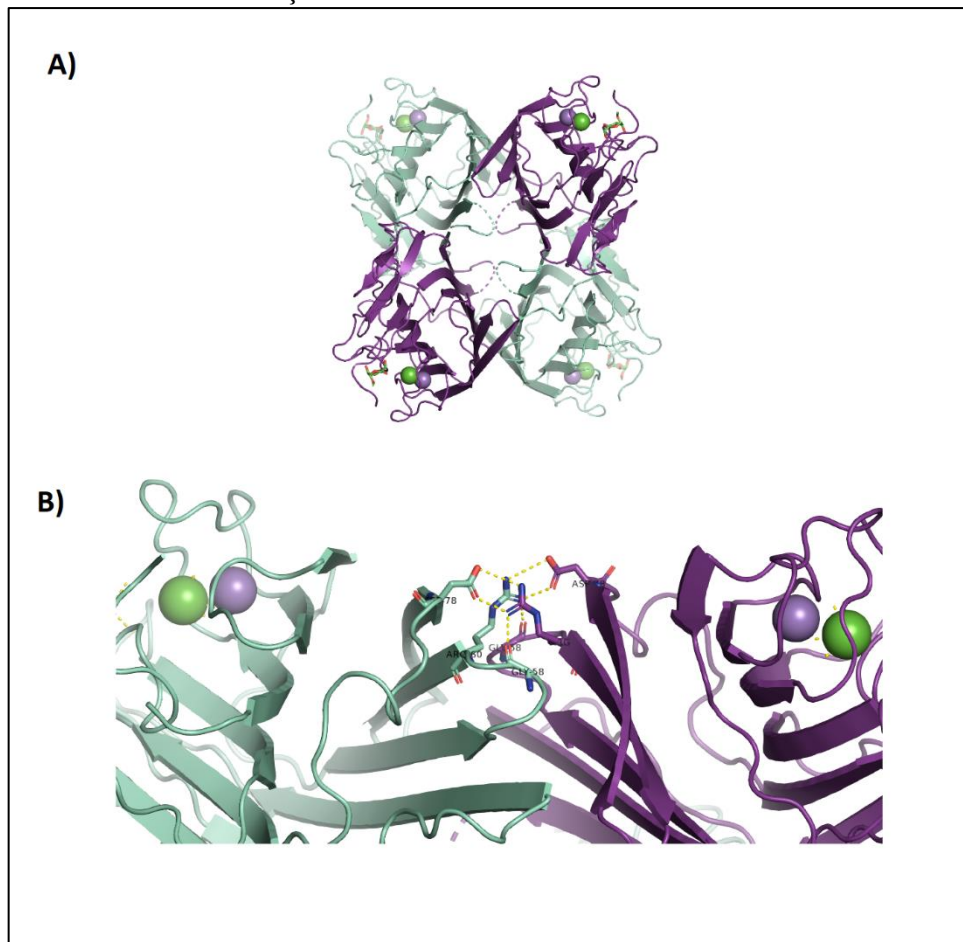


Fonte Preparado pela autora. Estrutura tridimensional resolvida usando o pacote de software CCP4. Refinamento realizado nos softwares WinCoot e Phenix. A representação gráfica em cartoon do monômero e dímero Cvill foi construída usando o software PyMOL 2.0.

No caso de Cvill, é observada a formação do dímero canônico, ou dímero do tipo II (Figura 10B). A dimerização de Cvill foi predita utilizando a ferramenta online de predição de oligomerização PISA (EMBL-EBI), que calcula e monta estruturas quaternárias

termodinamicamente favoráveis a partir de estruturas monoméricas carregadas nos formatos PDB ou mmCIF. Esse tipo de dimerização é caracterizado pelo posicionamento de dois monômeros lado-a-lado, com as seis fitas- β de um jellyroll se alinhando com as seis fitas beta de outro jellyroll, de forma a se obter uma estrutura que se assemelha a 12 fitas- β contínuas. Outros padrões de dimerizações em leguminosas podem ser observados, com os monômeros dispostos em “xis”, da lectina de *Arachis hypogaea* (PNA) (CAGNONI et al., 2020), porém a grande maioria dos dímeros em lectinas de Diocleinae, são do tipo canônico (BARROSO-NETO et al., 2016a; CAVADA et al., 2018; MANOJ; SUGUNA, 2001).

Figura 11 – Homotetrâmero de Cvill. (A) Estrutura quaternária de Cvill com os íons cálcio e manganês no MBS (B) Interações polares entre os resíduos Gly58, Arg60 e Asp78 da região periférica de dois dímeros canônicos atuando na estabilização do tetrâmero.



Fonte: elaborado pela autora. Estrutura tridimensional do tetrâmero predita pela ferramenta PISA (EMBL-EBI). A representação gráfica em cartoon do tetrâmero de Cvill foi construída usando o software PyMOL 2.0.

A construção de tetrâmeros nessas lectinas muitas vezes é descrita como a formação de “dímeros de dímeros”, com um tetrâmero sendo composto por dois dímeros canônicos. A

folha beta constituída pelas seis fitas- β mais planares participa da formação das interações entre dímeros, que estabilizam a estrutura quaternária (CAVADA et al., 2019c). O estado de oligomerização de lectinas de Diocleinae geralmente é dependente do pH, com a presença de dímeros sendo mais frequente em pH mais baixos, enquanto que a formação de tetrâmeros é favorecida a pH neutros e básicos (DEL SOL; CAVADA; CALVETE, 2007; NAGANO et al., 2008), algumas exceções existem, como a lectina de *D. grandiflora*, a qual a oligomerização independente do pH (ROZWARSKI et al., 1998). As variações de oligomerização em decorrência do pH estão relacionadas com o estado de protonação dos resíduos envolvidos nas interações entre dímeros (CAVADA et al., 2019c).

O cristal resolvido de Cvill foi obtido a condições ácidas de pH, em torno de 5,0, e devido a isso, a presença da forma dimérica nas proteínas que constituíram o cristal seria esperada em detrimento da tetramérica. Considerando isso, é importante ressaltar que as interações de estrutura quaternária que seriam esperadas em uma lectina resolvida a pH 7,0 talvez não sejam observadas no tetrâmero de Cvill, que foi predito *in silico* usando as coordenadas de um monômero resolvido a condições de baixo pH.

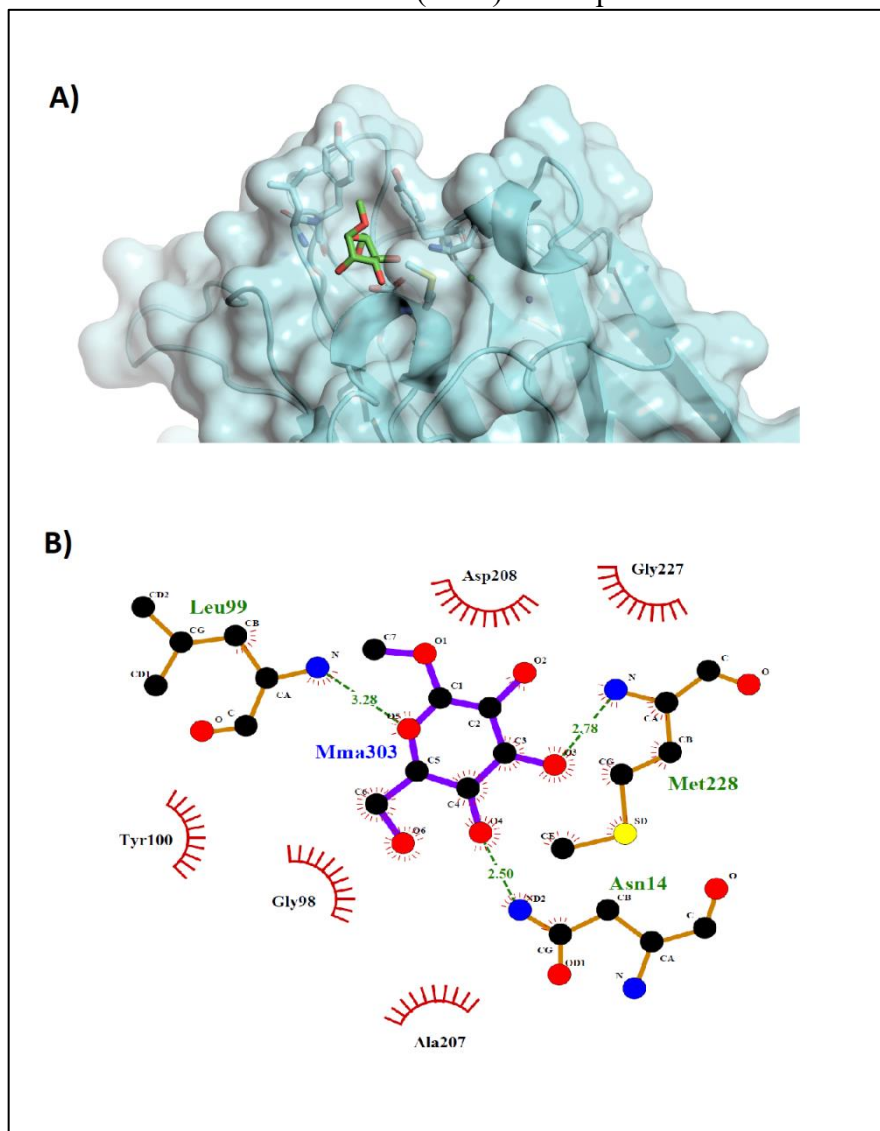
O tetrâmero de Cvill (Figura 11A) foi predito utilizando a ferramenta online PISA (EMBL-EBI) (KRISSEL; HENRICK, 2007), nele é possível observar a participação dos resíduos Gly58, Arg60 e Asp78 da região periférica da estrutura atuando na estabilização do tetrâmero (Figura 11B). A participação de Arg60 e Asp78 na estabilização do tetrâmero já foi previamente observada nas lectinas CFL (DEL SOL; CAVADA; CALVETE, 2007; NAGANO et al., 2008). Resíduos do loop 117-123 e His51 também já foram citados como participantes das interações que estabilizam o tetrâmero de lectinas desse tipo (CAVADA et al., 2019b).

Em Cvill, no entanto, devido a densidade eletrônica da região deste loop ter sido deficiente, não foi possível resolver a estrutura do mesmo por completo. Essa deficiência se deve provavelmente a instabilidade posicional do loop, que é flexível e pode apresentar diferentes conformações. Nesse loop também se encontra a região composta pelos resíduos do ponto de reconexão entre os fragmentos β e γ , podendo-se encontrar no cristal moléculas covalentemente religadas ou cadeias α não religadas nessa posição, o que contribui ainda mais à instabilidade que é retratada na difração eletrônica do loop (BEZERRA et al., 2011; CAVADA et al., 2019c).

O CRD de Cvill é emoldurado por 4 loops envolvendo as sequências Thr11-Pro23, Ser96-Asn104, Leu198-Asp208 e Ser225-Leu232. A cadeia lateral do resíduo Asn14, e o nitrogênio da cadeia principal dos resíduos Leu99 e Met228 interagem diretamente com os oxigênios O4, O5 e O3 do ligante α -metil-manosídeo por meio de ligações de hidrogênio

(Figura 12). Como observado previamente em outras ConA-like, a hidroxila de C2 não pareceu exercer influência na ligação (CAVADA et al., 2019b). Os resíduos Gly98, Tyr100, Ala207, Asp208, e Gly227 também estabelecem interações com o ligante por meio de interações hidrofóbicas, como demonstrado na Figura 12B.

Figura 12 – Domínio de Reconhecimento a Carboidratos (CRD) da lectina de *C. villosa*. (A) Representação do posicionamento tridimensional do ligante α -metil-manosídeo (α mm) em verde no sítio da lectina. (B) Imagem representando as interações que ocorrem entre o ligante α mm e resíduos posicionados no sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD) e suas proximidades.



Fonte: elaborado pela autora. A imagem da representação em superfície do CRD de *Cvill* (A) foi construída usando o software PyMOL 2.0. O software LigPlot foi usado para representar as interações do ligante com os resíduos do CRD (B).

A interação da Met228 com o ligante é dada pela formação de uma ponte de hidrogênio entre o oxigênio O6 do α -metil-manosídeo e o nitrogênio da cadeia principal da Met228 e não através da cadeia lateral deste resíduo (Figura 12B). Isso pode ser um dos motivos pelo qual a mutação de troca da arginina do CRD por essa metionina não causou grande diferença no perfil de afinidade a manose típico de ConA-likes observado em Cvill.

Tabela 5 – Interações entre os resíduos do CRD de Cvill e o ligante α -metil-manosídeo (MMA)

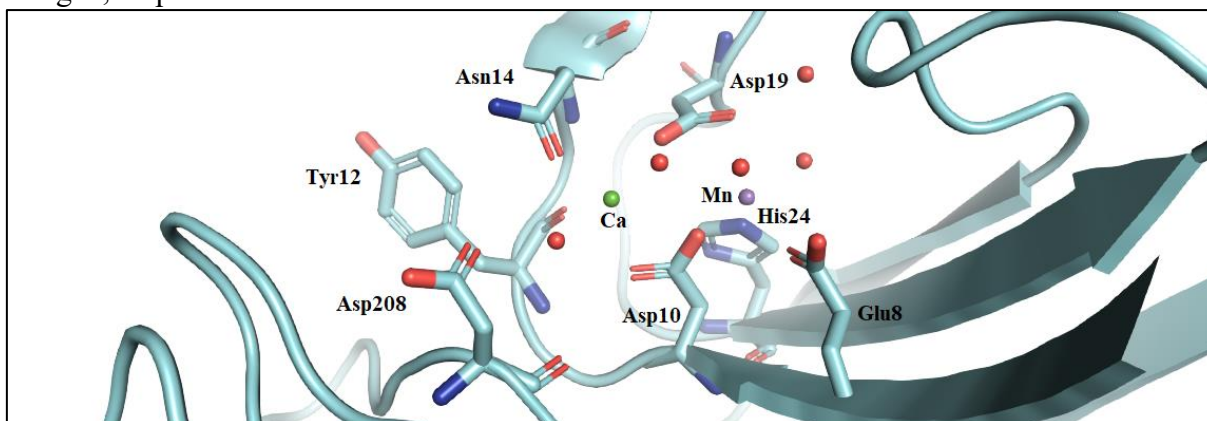
Resíduo e átomo de Cvill	Átomo do ligante	Distância (Å)
<i>Interações polares</i>		
Asn14/ND2	MMA/O4	2,50
Gly98/N	MMA/O6	3,39
Leu99/N	MMA/O5	3,28
Asp208/OD1	MMA/O6	3,39
Asp208/OD1	MMA/O4	2,85
Asp208/OD2	MMA/O6	2,39
Met228/N	MMA/O3	2,78
<i>Interações de Van der Waals</i>		
Gly98/CA	MMA/O6	3,25
Ala207/CB	MMA/O6	3,21
Asp208/CG	MMA/O6	3,20
Asp208/OD2	MMA/C4	3,40
Gly207/CA	MMA/O3	3,33
Met208/CG	MMA/O3	3,37
Met208/CE	MMA/C3	3,10
Met208/CE	MMA/O3	2,75

Fonte: elaborado pela autora. Interações foram calculadas pelo programa CONTACT (CCP4).

As interações computadas pelo programa CONTACT, assim como as distâncias interatômicas medidas em Angstroms (Å), estão dispostas na tabela 5. Esses resultados mostram que o ligante α -metil-manosídeo estabeleceu 7 interações polares e 8 interações do tipo Van der Waals com resíduos do CRD. Todas essas interações contribuem para a especificidade fina de Cvill a α -metil-manosídeo.

A presença dos íons cálcio e manganês foi confirmada na estrutura terciária de Cvill, confirmando essa lectina como uma metaloproteína, que apresenta coordenação dos íons por uma geometria molecular do tipo octaédrica. Os resíduos participantes do sítio de ligação a metais (MBS) são bastante conservados, com o íon cálcio sendo coordenado pelos resíduos Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 da lectina e duas águas e o íon manganês sendo coordenado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19, e His24 e duas águas (Figuras 13 e 14). O MBS se encontra nas proximidades do CRD, sendo fundamental para o estabelecimento da conformação apropriada e ativa deste (OSTERNE et al., 2017).

Figura 13 – Representação tridimensional do MBS de Cvill. Os resíduos envolvidos no sítio estão representados em bastão, o resto da estrutura terciária da lectina está representado em cartoon. As esferas verde, roxo e vermelhas representam os íons cálcio e manganês e moléculas de água, respectivamente



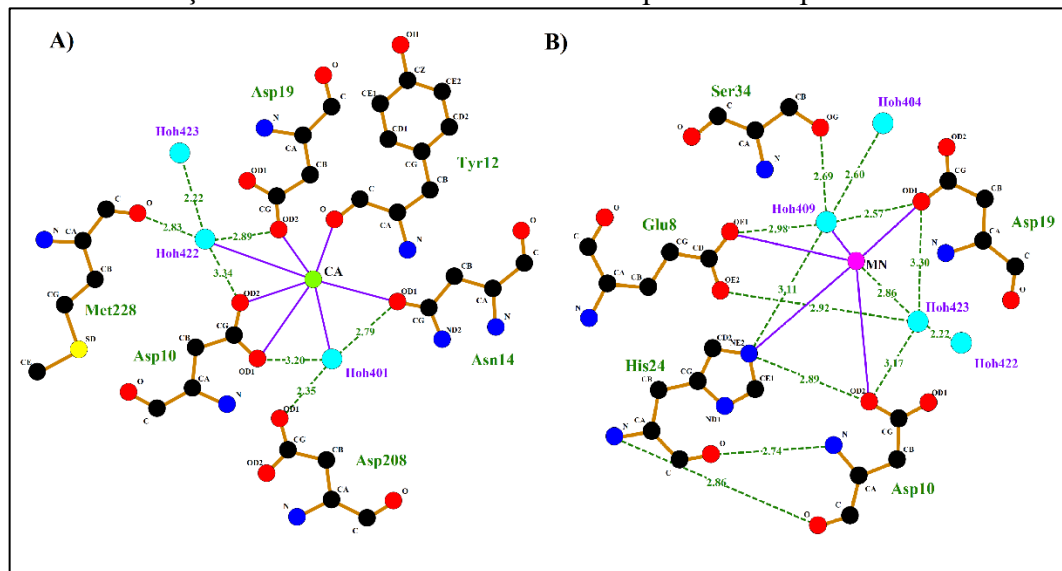
Fonte: elaborado pela autora. A imagem da representação em graveto e esferas do MBS de Cvill foi construída utilizando o software PyMOL 2.0.

A coordenação do resíduo Asp208 (Figura 14) pelo íon cálcio por meio de uma ponte com uma molécula de água é o que torna possível o estabelecimento da ligação do tipo “*cis-peptide*” entre os resíduos Ala207 e Asp208, típico de lectinas de leguminosas, que atua estabilizando a conformação apropriada do CRD (Figura 13) (CAVADA et al., 2019c; LORIS et al., 1998).

Assim como o Asp208, a Met228 também é coordenada pelo cálcio por intermédio de uma molécula de água. Essa interação pode ser a responsável pela forte ligação do cálcio ao MBS, dificultado ainda mais a demetalização por agentes quelantes, como foi observado em bancada com Cvill (LOSSIO et al., 2017). A Met228 também participa das interações com o ligante no CRD. Cvill foi a primeira lectina de Diocleinae a possuir uma metionina na posição 228. Estudar a interação dessa lectina com outros ligantes por bioinformática ou por experimentos de bancada ajudará a elucidar qual a diferença que essa mutação causa no perfil

de afinidade a carboidratos de Cvill.

Figura 14 – Coordenação octaédrica dos íons cálcio e manganês no MBS de Cvill. A esferas verde (Ca), roxa (Mn) e azul claro (Hoh401, Hoh404, Hoh409, Hoh422 e Hoh423) representam os íons cálcio, manganês e moléculas de água respectivamente. Ligações de hidrogênio estão representadas pelo tracejado verde, e as coordenação com os átomos de metais são representadas pelas linhas lilás.



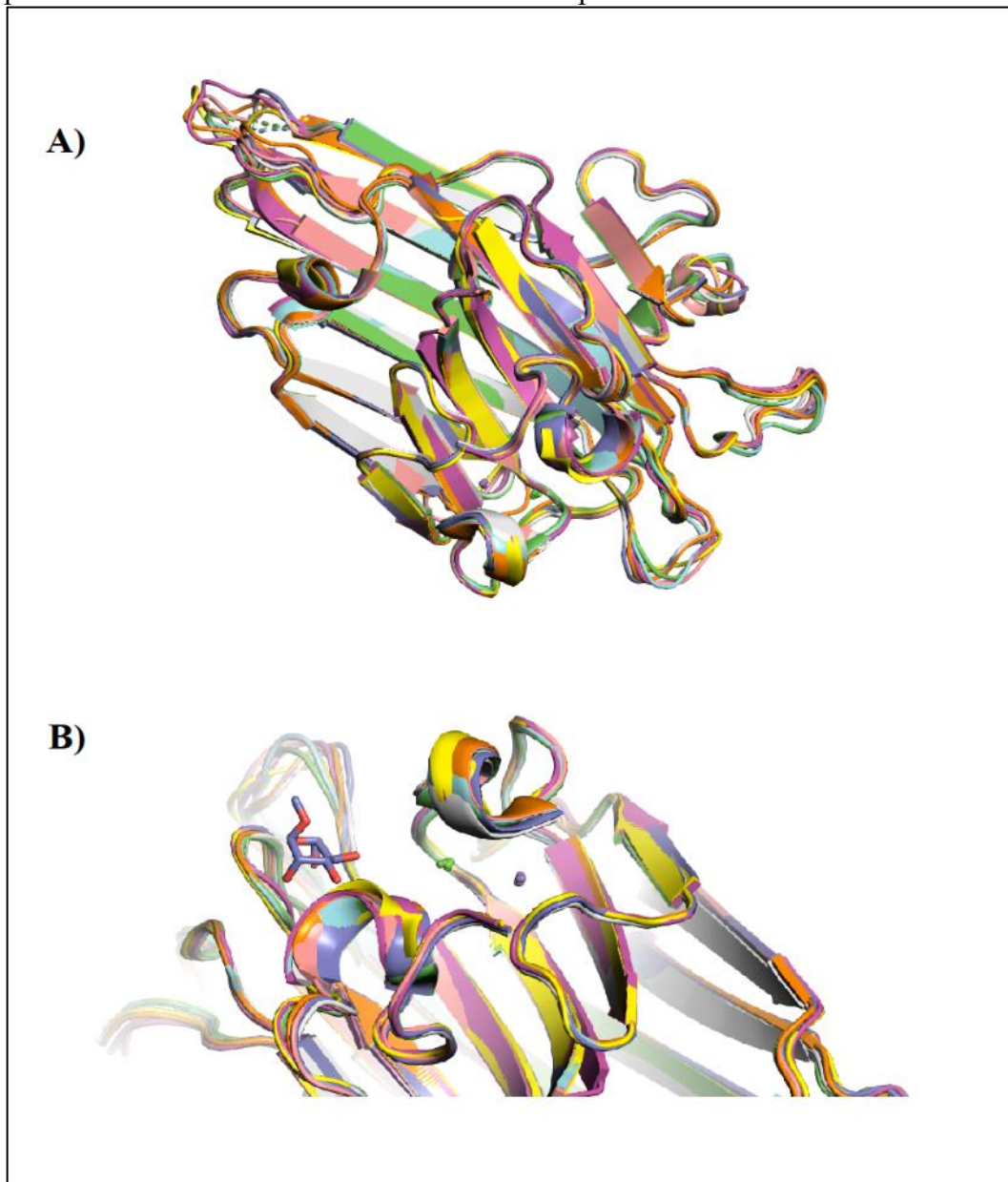
Fonte: elaborado pela autora utilizando o software LigPlot.

A figura 15A mostra o alinhamento entre a estrutura tridimensional de Cvill com as das lectinas de *C. boliviana* (PDB ID 4K1Y), *C. bonariensis* (PDB ID 5U3E), *C. brasiliensis* (1AZD), *C. gladiata*, (PDB ID 2P2K), *C. grandiflora* (PDB ID 4L8Q), *C. maritima* (PDB ID 2P34), e *C. virosa* (PDB ID 5F5Q), dando um enfoque à região do CRD e MBS (Figura 15B). Através desse alinhamento é possível visualizar que a estrutura tridimensional do β -sanduíche é visivelmente bem conservada entre essas lectinas e que as mudanças estruturais possíveis de serem visualizadas se encontram concentradas principalmente nas regiões dos loops. Curiosamente, as semelhanças nas estruturas tridimensionais não significam necessariamente que essas lectinas apresentem os mesmos resultados nas atividades biológicas, pois é sabido que as lectinas do tipo ConA podem apresentar resultados consideravelmente diferentes nas atividades de inflamação e nocicepção, dependendo da via de administração da lectina, por exemplo (CAVADA et al., 2019b).

O alinhamento dos monômeros foi feito usando o plugin de alinhamento do PyMOL (SCHRÖDINGER, 2015), e a estrutura resolvida e depositada de Cvill como referência (PDB ID 5BKR). Pelos valores de desvio quadrático médio das posições atômicas (Tabela 6), CaBo foi a lectina que melhor se sobrepôs a Cvill, enquanto que a lectina de *C. grandiflora* (ConGF) apresentou maior diferença nos valores de RMSD, o que são resultados não esperados, visto

que dentre as lectinas alinhadas, ConGr é a que apresenta maior identidade de sequência com Cvill. Os resultados de RMSD, no entanto, em geral são bem parecidos, não indicando diferenças notáveis de sobreposição das estruturas terciárias dentro desse do grupo.

Figura 15 – Sobreposição das estruturas tridimensionais de Cvill (em roxo) com outras lectinas de *Canavalia*. (A) A lectina de *C. villosa* foi utilizada como referência na sobreposição com as lectinas de CBol, CaBo, ConBr, CGL, ConGF, ConM e ConV, cujas cores de cada estrutura estão explanadas na tabela 6. (B) Destaque das regiões dos CRDs e MBSs com o ligante α -metil-manosídeo (em roxo) posicionado no CRD. Esferas verdes e roxas representam os íons Ca e Mn.



Fonte: elaborado pela autora. A imagem da sobreposição das estruturas de lectinas de *Canavalia* foi construída utilizando o software PyMOL 2.0.

Além da atenção já dada aos sítios de reconhecimento a carboidratos e ao sítio de ligação a metais, é interessante notar outras regiões conservadas que podem indicar a presença de mais sítios, como o sítio hidrofóbico (HS), já observado nas lectinas de CGL (PDB ID 2D7F) (DELATORRE et al., 2007), e ConBr (PDB ID 3JU9) (BEZERRA et al., 2011). Essas lectinas já tiveram suas estruturas resolvidas com ligantes hidrofóbicos ocupando o HS, o qual é formado principalmente pelos resíduos conservados Leu115, Leu126 e Val179, e é posicionado entre as folhas beta de um β -sanduíche. Cvill apresenta esses resíduos conservados, o que indica que ela também pode ser capaz de interagir com ligantes hidrofóbicos por meio desse sítio.

Tabela 6 – Valores de desvio quadrático médio das posições atômicas (RMSD) de lectinas de *Canavalia* em relação a estrutura terciária de Cvill

Espécie	Lectina	PDB ID	RMSD	Cor na Figura 14
<i>C. boliviana</i>	CBol	4K1Y	0.429	Rosa
<i>C. bonariensis</i>	CaBo	5U3E	0.317	Salmão
<i>C. brasiliensis</i>	ConBr	1AZD	0.412	Amarelo
<i>C. gladiata</i>	CGL	2P2K	0.454	Verde
<i>C. grandiflora</i>	ConGF	4L8Q	0.466	Cinza
<i>C. maritima</i>	ConM	2P34	0.390	Ciano
<i>C. virosa</i>	ConV	5F5Q	0.380	Laranja

Fonte: elaborado pela autora. Cálculo do RMSD foi realizado pelo software PyMol.

5.3 Ensaios de interação com carboidratos

5.3.1 Glycan array

Os resultados de *glycan array* expuseram interessantes informações acerca do perfil de afinidade a carboidratos de Cvill, como a confirmação da especificidade dessa lectina pelo núcleo tri-manosídico de N-glicanos complexos, afinidade típica de lectinas ConA-like e observadas anteriormente nas lectinas de ConA, DGL, ConBr e DVL (DAM et al., 1998; DAM; OSCARSON; BREWER, 1998; MANIMALA et al., 2006; MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012).

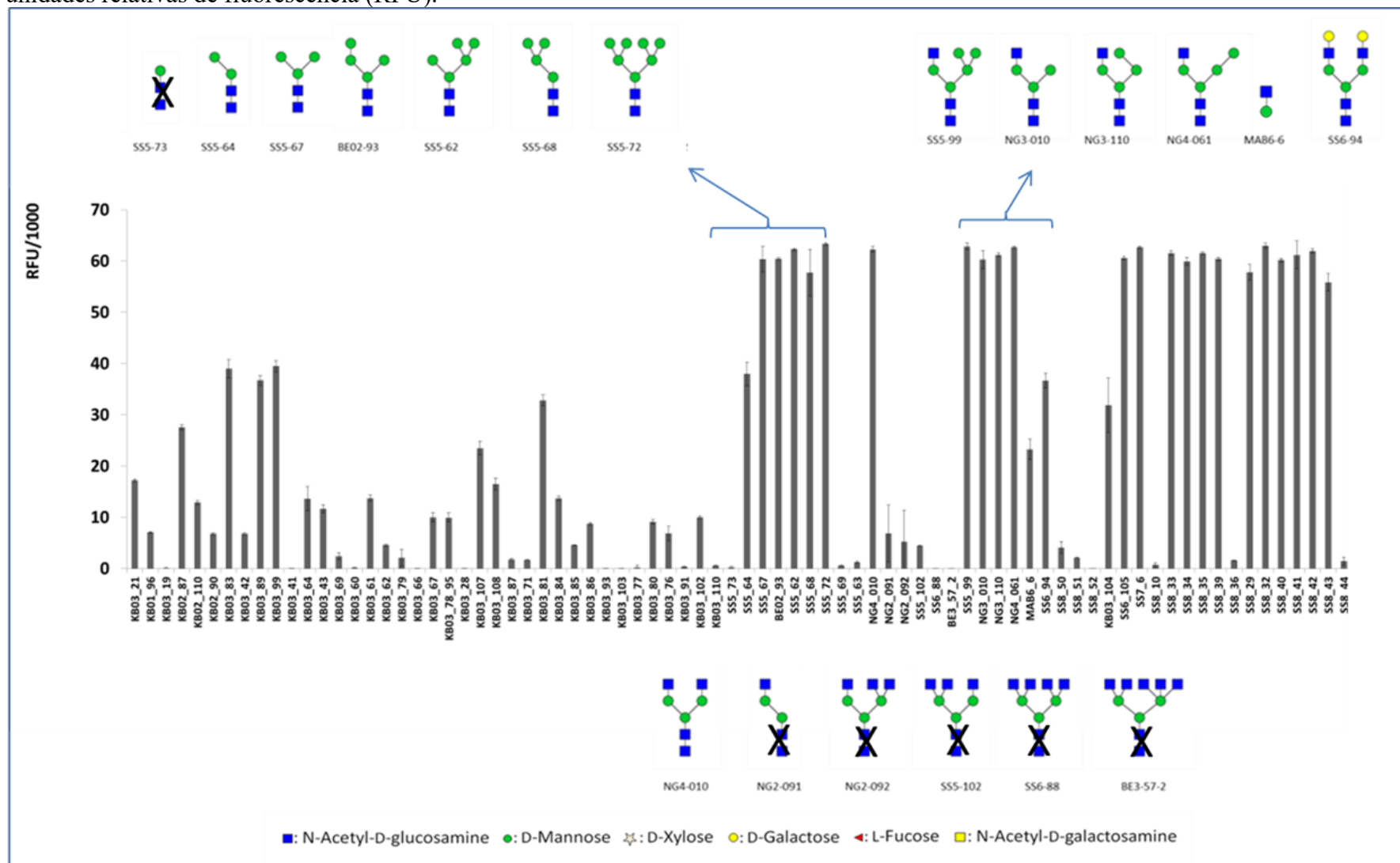
A presença de GlcNAc ou GalNAc terminal não pareceu exercer grande influência na afinidade de Cvill ao núcleo tri-manosídico de N-glicanos biantenados (DAM et al., 1998). Também apresentaram bons resultados as interações que envolviam glicanos do tipo *high-mannose* e híbridos, como esperado devido a Cvill ser uma lectina manose específica (Figura 16) (CAVADA et al., 2019b).

A presença de fucose ligada ao GlcNAc da extremidade redutora de N-glicanos pareceu não causar grande diferença na intensidade das interações com Cvill. Há relatos, no entanto, de lectinas, como a de *Lens culinaris* (LCA), que apresentam uma interação aumentada com N-glicanos *core*-fucosilados em comparação com os não fucosilados. Essa diferença geralmente é devida a fucose interagir com o sítio hidrofóbico localizado próximo ao CRD dessa lectina, posicionando favoravelmente o núcleo manosídico do N-glicano no CRD, e contribuindo, por fim, com a interação com a lectina (MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012).

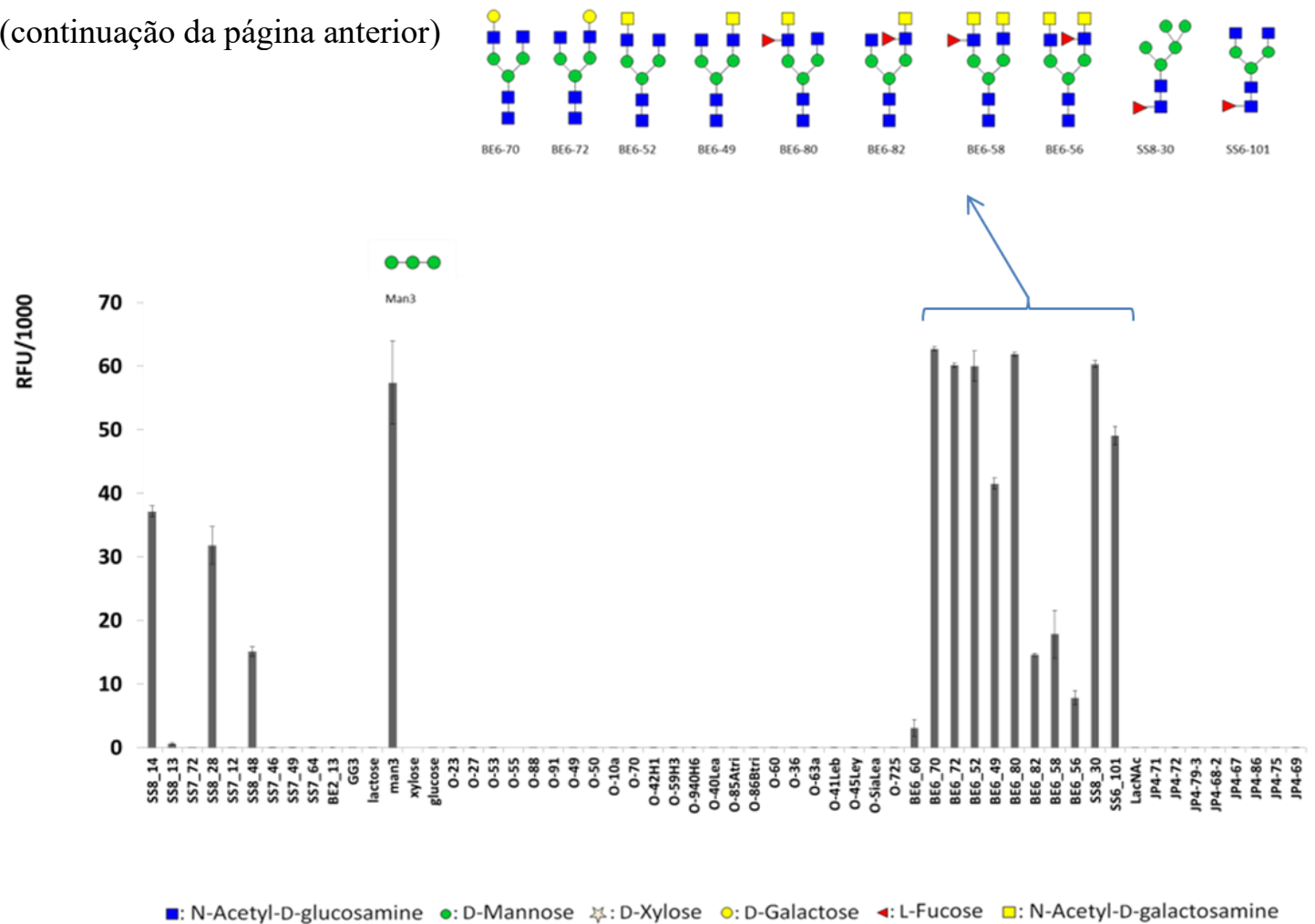
Glicanos complexos multiantenados que apresentem 3 ramificações ou mais tiveram suas interações com Cvill bastante prejudicadas ou completamente anuladas, provavelmente devido a impedimentos estéricos que as multiantenas causam. Também foram registradas interações fracas ou inexistentes com glicanos contendo D-xilose adicionada ao núcleo de manose. Esse tipo de N-glicano adicionado de D-xilose é amplamente encontrado em plantas (STRASSER et al., 2004). Considerando que Cvill é uma lectina de planta, e que muitas das funções intrínsecas dessas proteínas estão relacionadas com mecanismos de defesa nesses organismos (DELATORRE et al., 2007; PEUMANS; VAN DAMME, 1995), uma das razões pela qual Cvill interage fracamente com N-glicanos modificados por D-xilose pode ser devido a um mecanismo da planta que direciona a interação da lectina para glicanos exógenos, de agentes patogênicos.

Cvill também foi capaz de diferenciar entre glicanos com ramificações assimétricas. A interação de Cvill com glicanos complexos biantenados com uma fucose e GalNAc adicionado a uma única antena foi drasticamente diferente dependendo se as adições estavam ligadas no braço 3 ou 6 (Figura 16, glicanos BE6-80 e BE6-82). A influência de ambas fucose e GalNAc parece ser fundamental nessa ligação, uma vez que não são observadas diferenças grandes na interação entre os mesmos N-glicanos na ausência da fucose (Figura 16, glicanos BE6-52 e BE6-49) ou em glicanos que continham GalNAc terminal em ambos os braços, apenas com a posição da fucose diferente entre eles (Figura 16, glicanos BE6-58 e BE6-56). De maneira semelhante, foi anteriormente reportado que a lectina de *Platytodium elegans*, (PELa) uma leguminosa da subtribo Dalbergiae, também foi capaz de diferenciar entre N-glicanos assimétricos (BENEVIDES et al., 2012a). Dessa forma, é interessante observar como a isomeria de carboidratos pode ser fundamental na determinação da interação com lectinas (ECHEVERRIA et al., 2018; WANG et al., 2013), reforçando a ideia de que glicanos estereoisômeros atuando como moléculas informacionais podem transmitir diferentes sinais apesar das semelhanças nas estruturas.

Figura 16 – Análise de Glycan array da lectina de *C. villosa*. A intensidade de ligação de Cvill com os ligantes estão demonstradas em unidades relativas de fluorescência (RFU).



(continuação da página anterior)



Fonte: realizado em colaboração com o centro de pesquisa CIC biomaGuNE.

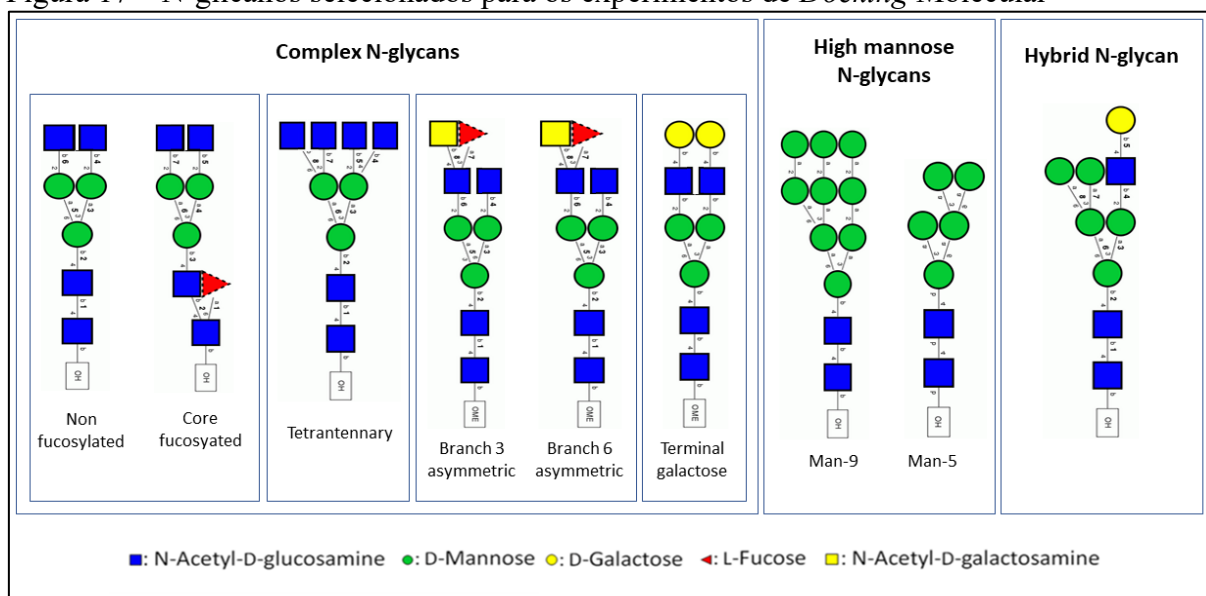
A pandemia do novo coronavírus, que se estendeu no ano de 2020 e ainda se encontra ativa em 2021, fez muitas vítimas até agora e causou drásticas consequências econômicas em todo o planeta. Visando mitigar os efeitos letais e restritivos dessa pandemia, a comunidade científica tem investido vigorosamente em pesquisa de base sobre o vírus SARS-CoV-2 e suas variantes. Estudos que são desenvolvidos na área da glicobiologia sobre o coronavírus são constantemente atualizados, e parte da composição de glicanos da proteína *spike* do SARS-CoV-2 já foram caracterizados. É interessante notar, a título de informação, que alguns glicanos testados no glycan array estão presentes na *spike protein* do novo coronavírus e se ligam bem a C_{vill}, como os N-glicanos Man-3 (id SSS-67 no glycan array) e o N-glicano complexo biantenado com galactose terminal (id SS6-94, no glycan array). Neste vírus, esses carboidratos estão expostos de forma propensa a interações com lectinas uma vez que ele podem chegar a cobrir cerca de mais de 40% da área exposta da *spike protein* (GRANT et al., 2020).

Os glicanos testados no ensaio de *glycan array* foram previamente utilizados em (ACHILLI et al., 2020) e em (ECHEVERRIA et al., 2018).

5.3.2 Docking molecular

Buscando entender melhor os tipos de interações que sacarídeos estabelecem com o CRD de C_{vill}, e procurando também estudar a possível geometria que esses ligantes flexibilizados adquirem durante essa ligação, alguns dos N-glicanos com resultados interessantes no *glycan array* foram escolhidos para experimentos de *docking* molecular. Não por acaso, parte desses glicanos selecionados são carboidratos de membrana que conhecidamente fazem parte do glicocálice de células de câncer, como HeLa. Sabe-se que células em metástase e células de câncer cervical apresentam glicocálice rico em N-glicanos do tipo *high mannose* (HORVAT et al., 2012; OLIVEIRA-FERRER; LEGLER; MILDE-LANGOSCH, 2017; TURIÁK et al., 2019), e uma vez que C_{vill} apresenta especificidade a esse tipo de glicano, como mostrados nos experimentos de inibição da atividade por açúcares (LOSSIO et al., 2017) e de *Glycan Array*, os experimentos de Docking foram focados em prever como C_{vill} interagiria com essas moléculas alvo típicas de tumores. Os N-glicanos complexos biantenados com galactose terminal e os *high mannose* Man-5 e Man-9 se encaixavam nesse perfil de moléculas alvo e foram, portanto, selecionados (ABDEL RAHMAN et al., 2015; GAO et al., 2017; HORVAT et al., 2012; TURIÁK et al., 2019).

Figura 17 – N-glicanos selecionados para os experimentos de *Docking Molecular*



Fonte: elaborado pela autora utilizando as imagens dos glicanos baixadas do portal GLYCAM-Web.

Como previamente mencionado, N-glicanos do tipo 9man, biantenados com galactose terminal e core fucosilados também fazem parte das glicosilações que constituem a *spyke protein* do SARS-Covid-2 (GRANT et al., 2020), reforçando a escolha desses carboidratos para esse experimento. Os glicanos selecionados estão descritos na Figura 17 e as nomenclaturas dos mesmos bem como os valores de escore obtidos como resultados do *docking* se encontram na Tabela 7.

Os carboidratos mutados que constituem o glicocálce de células de câncer como HeLa podem ser responsáveis pela capacidade de progressão e metástase de tumores (PINHO; REIS, 2015), e devido a isso, o estudo do modo como esses glicoconjugados interagem com proteínas como lectinas pode ser esclarecedor acerca dos mecanismos de modulação de respostas celulares. Os N-glicanos de HeLa que foram incluídos nos experimentos de docking tiveram sua estrutura tridimensional caracterizada por espectrometria de massas e depositada em bancos de dados (GAO et al., 2017; HORVAT et al., 2013; TURIÁK et al., 2019).

Os resultados de docking molecular mostram que Cville interagiu bem com todos os ligantes selecionado, com exceção do N-glicano complexo tetra-antenado, que apresentou uma interação fraca com Cville. Os melhores scores foram atribuídos aos N-glicanos *high mannose* Man-9 e ao N-glicano híbrido, conforme exposto na Tabela 7. A afinidade de ligação foi definida pela função de escore PLP.PLP do software GOLD. Quanto mais negativo for o valor do escore empírico atribuído ao complexo, mais forte é a interação entre Cville e o glicano

testado. A validação foi realizada com a deleção e o redocking do α -metil-manosídeo no CRD de Cvilla, que apresentou um RMSD de 0,52.

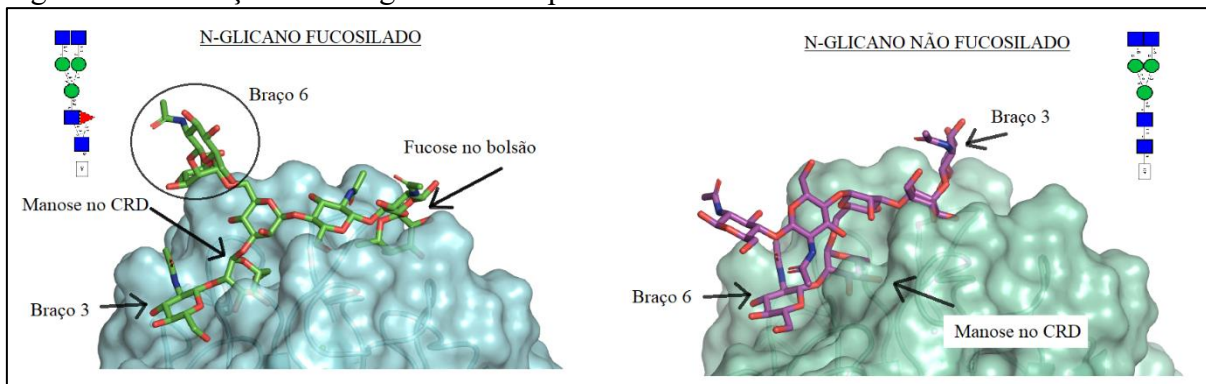
Tabela 7 – Nomenclatura completa e scores (PLP.PLP) dos glicanos testados nos experimentos de docking molecular

Glicano	Nomenclatura condensada GLYCAM	Score
Complexo não fucosilado	DGlcNac β 1-2DMan α 1-6[DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-61,89
Complexo core fucosilado	DGlcNac β 1-2DMan α 1-6[DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4[LFuc α 1-6]DGlcNac β 1-OH	-66.61
Complexo tetra-antenado	DGlcNac β 1-6[DGlcNac β 1-2]DMan α 1-6[DGlcNac β 1-2[DGlcNac β 1-4]DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-36.89
Assimétrico braço 3	DGalpNac β 1-4[LFuc α 1-3]DGlcNac β 1-2DMan α 1-6[DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OME	-64.27
Assimétrico braço 6	DGalpNac β 1-4[LFuc α 1-3]DGlcNac β 1-2DMan α 1-3[DGlcNac β 1-2DMan α 1-6]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OME	-48.83
Complexo Galactose terminal	DGalp β 1-4DGlcNac β 1-2DMan α 1-6[DGalp β 1-4DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OME	-65.07
High mannose 5man	DMan α 1-6[DMan α 1-3]DMan α 1-6[DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-58.32
High mannose 9man	DMan α 1-2DMan α 1-6[DMan α 1-2DMan α 1-3]DMan α 1-6[DMan α 1-2DMan α 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-69.33
Híbrido	DMan α 1-6[DMan α 1-3]DMan α 1-6[DGalp β 1-4DGlcNac β 1-2DMan α 1-3]DMan β 1-4DGlcNac β 1-4DGlcNac β 1-OH	-67.30
MMA	α -metil-manosídeo	-30.39

Fonte: elaborado pela autora. Os experimentos de *docking* e os scores foram calculados pelo programa GOLD.

De maneira geral, Cvilla tem afinidade pelas manoses do núcleo Man3GlcNac2 do N-glicano, algumas vezes interagindo com a manose do braço 3, outras vezes interagindo com a do braço 6. Outras lectinas de Diocleinae também apresentam esse perfil de afinidade pelas *core* manose de N-glicanos como observado previamente em experimentos de microcalorimetria e *docking* molecular (CAVADA et al., 2018; DAM et al., 1998; LEAL et al., 2018). Cvilla usualmente entregou como resultado interações com coordenadas bastante específicas, com *core* manoses ocupando geometrias que se sobrepõem quase que perfeitamente às coordenadas que o α -metil-manosídeo ocupa na estrutura cristalizada.

Figura 18 – Interações dos N-glicanos complexos fucosilado e não fucosilado no CRD de Cvill.



Fonte: elaborado pela autora. Imagens construídas utilizando PyMOL.

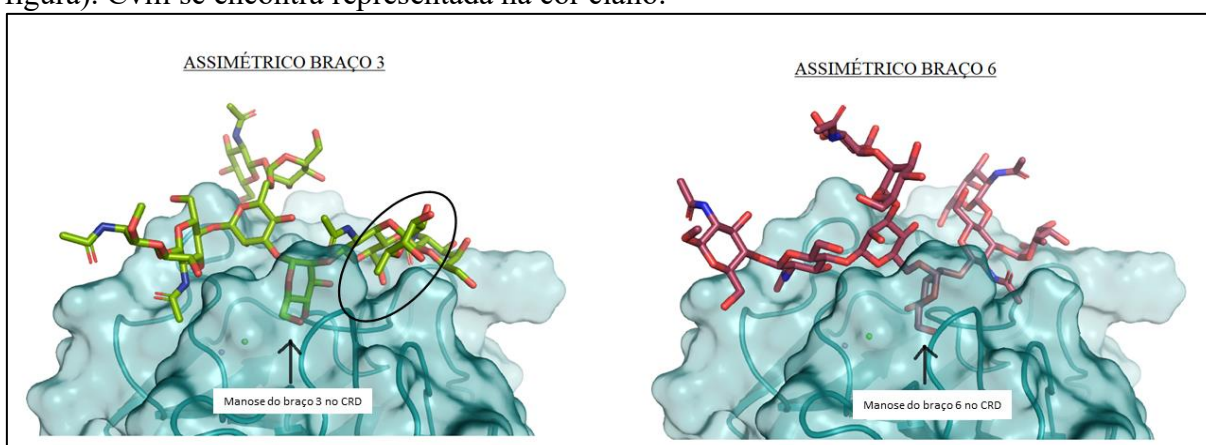
Os glicanos do tipo complexos fucosilado e não fucosilado se ligaram com altos escores ao CRD de Cvill. Apesar de o escore do N-glicano core fucosilado ser um pouco melhor que o do não-fucosilado, a diferença não foi tão expressiva, e sendo assim, tais resultados confirmam que a fucosilação no núcleo de GlcNAc não causa grande diferença na intensidade das ligações. Considerando a geometria da interação, a fucose se encaixa em um bolsão hidrofóbico próximo ao CRD, estabilizando o ligante no sítio, de forma semelhante à como ocorre com a lectina LCA (MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012). Essa interação da fucose, no entanto, não é suficiente para tornar a diferença de escore grande entre esses dois glicanos, uma das razões para isso pode ser devido ao N-glicano não fucosilado também se encaixar bem ao sítio, porém de forma diferente do primeiro, posicionando ambos os braços em sucros na estrutura da lectina (Figura 17).

Como mostrado na Tabela 7, o N-glicano complexo tetra-antenado interagiu fracamente Cvill, uma vez que as quatro antenas proporcionaram considerável impedimento estérico ao encaixe do núcleo manosídico no CRD da lectina. Parte das estruturas geradas por *docking* propuseram interações de um GlcNAc desse ligante no sítio, porém experimentos de bancada mostraram que esse monossacarídeo não é capaz de inibir Cvill. Dessa forma, Cvill não deve se ligar a GlcNAc (LOSSIO et al., 2017). Os complexos glicano-Cvill gerados que sugeriam GlcNAc no CRD foram descartados e o escore avaliado foi referente somente a estruturas as quais o encaixe ao CRD era direcionado ao núcleo de manose. Considerando que o *docking* molecular usa apenas modelos matemáticos nos cálculos de seus resultados em cima de uma estrutura rígida, é importante avaliar bem os resultados e conhecer a molécula alvo profundamente para considerar as diversas variáveis químicas, conformacionais e biológicas

que também podem ter grande influência nos resultados de interações com os ligantes. Esse modelo de estudo de interações entre moléculas se torna, no entanto, extremamente válido uma vez que se conheça suas limitações, pois ele fornece resultados valiosos de interação e geometria molecular e é um ponto de partida importante para estudos mais aprofundados e precisos de dinâmica molecular.

Considerando os resultados dos N-glicanos assimétricos, foi observado que a ligação com CRD era direcionada sempre à manose pertencente ao braço que continha a fucose e a galactose adicionadas. Essa troca entre as antenas que interagem com CRD causa uma grande diferença na intensidade da ligação nos ensaios de *glycan array*. O N-glicano assimétrico com Fuc/GalNAc adicionada ao braço 3 interage de forma mais intensa com Cville do que o do braço 6 (Figura 16). No *docking* molecular foi visto que de fato o glicano que continha a assimetria no braço 3 interagiu melhor, confirmando o que foi previamente visto no *glycan array* (Figura 19). É interessante notar como a assimetria entre esses ligantes pode causar interações tão contrastantes, e como a lectina é sensível para identificar esse tipo de isomeria. Na Figura 19 é possível observar que a fucose, quando ligada no braço 3, se encaixa em um bolsão hidrofóbico (destacado na figura por um círculo em preto) o que pode contribuir para a diferença de intensidade na interação entre esses dois casos.

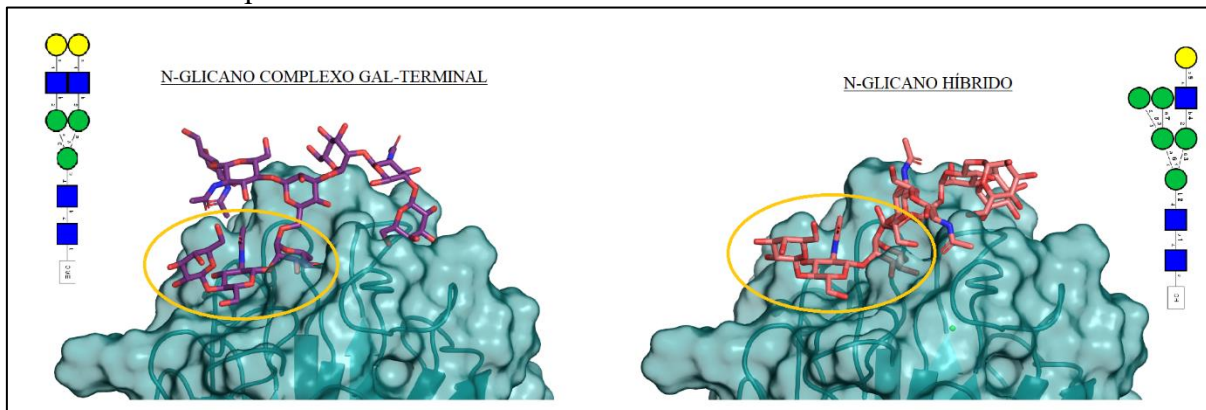
Figura 19. Resultado do *docking* de dois N-glicanos assimétricos e Cville. As duas interações apresentaram resultados contrastantes, com o glicano que possuía a assimetria no braço 3 possuindo uma interação mais forte. O motivo para isso pode ser a estabilização devido ao encaixo da fucose em um bolsão hidrofóbico próximo ao CRD (marcado com um círculo na figura). Cville se encontra representada na cor ciano.



Fonte: elaborado pela autora. Imagens construídas usando o software PyMOL.

No caso de N-glicanos *high mannose*, Cville interagiu bem com a *core* manose de ambos os N-glicanos Man-5 e Man-9, com Man-9 apresentando o melhor score entre os glicanos que foram testados.

Figura 20 – Resultados do docking molecular de Cvill e o N-glicano complexo com galactose terminal e o N-glicano híbrido. A região destacada com o círculo em amarelo representa o braço Gal-GlcNAc-Man posicionado no CRD em ambos os casos.



Fonte: elaborado pela autora. Imagens construídas utilizando o software PyMOL

O N-glicano complexo com Gal terminal e o glicano híbrido apresentaram geometria de interação com o sítio semelhantes entre si (Figura 20), com a interação acontecendo com o braço Gal-GlcNAc-Man posicionado no CRD em ambos os casos. Ambos os complexos também apresentaram altos valores de score. A estabilização pode ser devido ao encaixe favorável desses glicanos no sítio estendido da lectina, como pode ser visualizado na figura, em que outros resíduos componentes do sacarídeo de encaixam bem nos sulcos da proteína.

O perfil dos resultados observados no *docking* reforça bem o que foi observado anteriormente na análise do *glycan array*. De maneira geral, os experimentos mostraram que Cvill consegue ligar N-glicanos do tipo complexo, *high mannose* e híbridos, focando as interações no núcleo trimanosídico dos N-glicanos, de forma semelhante como observado em outras lectinas específicas a manose de Diocleinae (CAVADA et al., 2019b, 2018; LEAL et al., 2018). Cvill também interagiu bem com N-glicanos presentes no glicocálice de células HeLa, bem como com os N-glicanos da *spyke protein* do vírus SARS-CoV-2 (GRANT et al., 2020). Sabe-se que algumas lectinas de plantas, principalmente as específicas a manose, se mostraram fortes inibidoras de coronavírus, como demonstrado em experimentos de inibição da replicação viral em cepas de SARS-CoV de 2002 (KEYAERTS et al., 2007). A capacidade de Cvill interagir bem com glicanos da proteína *spyke* pode indicar que para o caso das cepas de 2019, a inibição também seria bem sucedida caso fosse testada com essa lectina. Esses promissores resultados mostram o grande potencial que Cvill apresenta para ser utilizada como ferramenta biotecnológica no estudo de interação com modelos de câncer e vírus.

5.4 Atividades biológicas

Considerando os resultados dos estudos de caracterização de estrutura tridimensional e de afinidade a ligantes, bem como o perfil citotóxico que lectinas homólogas a Cvill apresentam quando testadas em diferentes modelos de câncer, Cvill foi avaliada quanto a sua atividade biológica em modelo de HeLa.

5.4.1 Citotoxicidade em células HeLa

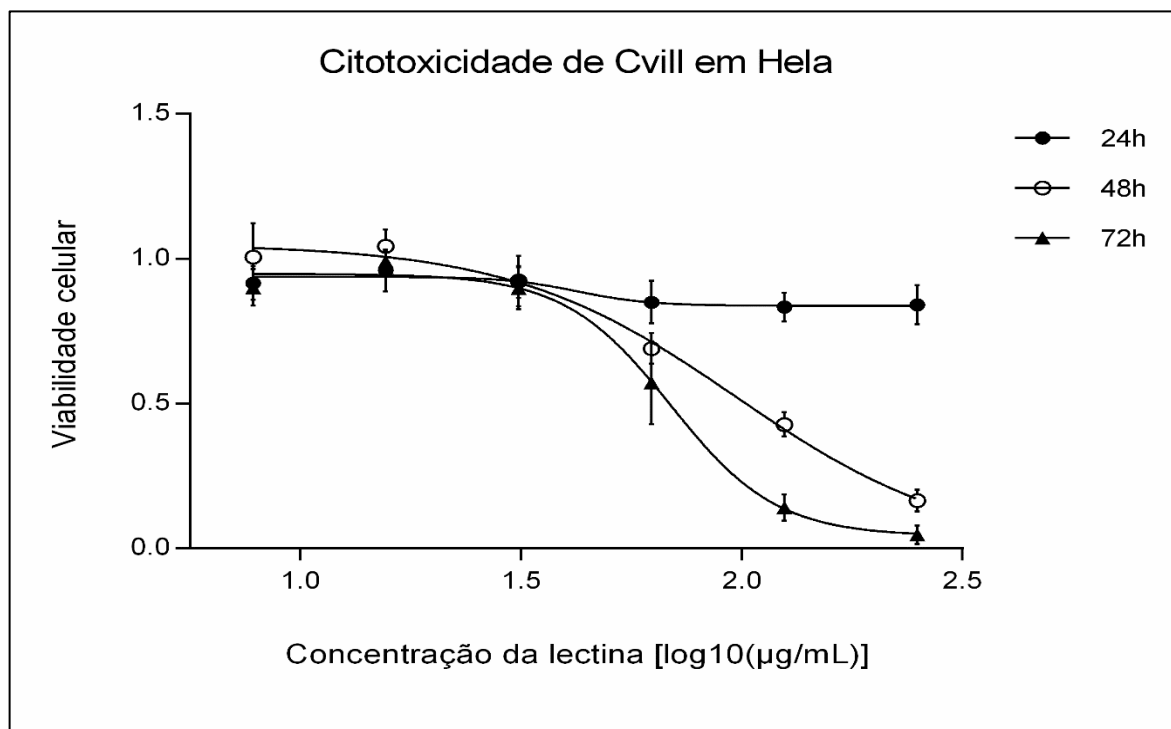
A lectina de *Canavalia villosa* apresentou citotoxicidade de perfil dose-dependente em células HeLa com participação do CRD na atividade. As seis doses testadas de Cvill (250,0 µg/mL, 125,0 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,6 µg/mL e 7,81 µg/mL) foram preparadas em PBS estéril por diluições em série. A incubação da lectina com seu açúcar específico α -metil-manosídeo antes do ensaio preveniu a atividade tóxica da lectina. O açúcar α -metil-manosídeo também não apresentou ação citotóxica contra as células quando incubado sozinho a 100 mM. Os resultados do Cvill foram obtidos a partir de três experimentos independentes, cada um deles realizado em triplicata. Os três diferentes tempos de incubação testados, 24 h, 48 h e 72 h, apresentaram resultados significativamente diferentes entre si nas doses mais altas da aplicação da lectina (Figura 21). A atividade citotóxica de Cvill já havia sido previamente reportada em trabalho de monografia não publicado que mostrou que a lectina de *C. villosa* induziu morte celular e inibição da proliferação de células da linhagem de glioma C6 com dependência do CRD (WELTER, 2018).

Cvill apresentou valores de LC50 para células HeLa de 97,09 µg/mL para o período de incubação de 48h ($R^2 = 0,9534$) e de 68,97 µg/mL para as células incubadas por 72 h ($R^2 = 0,9606$). Os valores CL50 foram calculados por meio de regressão não linear usando o software GraphPad Prism 6. Para o período de incubação de 24 h não foi possível calcular o valor de CL50 devido ao próprio padrão da curva dose-resposta e a não fornecer valores de R^2 confiáveis.

A ação citotóxica de lectinas de leguminosas em células neoplásicas é documentada desde meados da de 70 até os dias de hoje. Os trabalhos de Sandvig (SANDVIG; OLSNES; PIHL, 1976; SANDVIG, 1978) envolvendo a lectina do tipo RIP Abrina de *Abrus precatorius* foi um dos pioneiros em estudos dessa área utilizando células HeLa. A capacidade que lectinas apresentavam de aglutinar especificamente células tumorais, observada nesses estudos iniciais, corroborou a teoria de que células de câncer apresentam padrões de glicosilação diferentes de

células sadias (SHARON, 2008).

Figura 21 – Curva dose-resposta da citotoxicidade de Cvill em células Hela após os tempos de incubação de 24, 48 e 72h. A viabilidade celular é expressa como a razão entre as respostas citotóxica e o controle. Os pontos nas curvas representam as médias entre os valores das triplicatas e as barras representam os desvios padrões. Cada experimento foi realizado em triplicata e foi repetido três vezes.



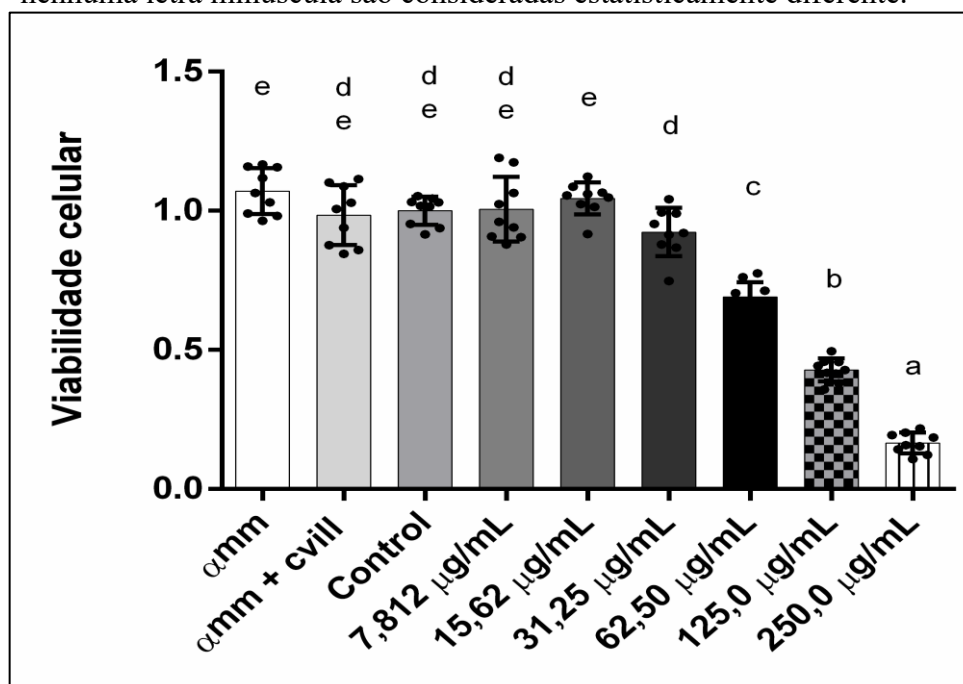
Fonte: Elaborado pela autora. Gráfico construído pelo software GraphPad Prism.

Desde então, diversas lectinas de leguminosas como ConA (ROY et al., 2014), ConBr (SILVA et al., 2014a), ConV (OSTERNE et al., 2017), CaBo (CAVADA et al., 2018), DVL (NASCIMENTO et al., 2019), PSA (lectina de *Pisum sativum*) (KABIR et al., 2013), SFL (lectina de *Sophora flavescens*, tribo Sophoreae) (LIU et al., 2008), e AMML (lectina de *Astragalus mongholicus*) (YAN et al., 2009), também tiveram suas ações citotóxicas e antiproliferativas avaliadas em modelos de câncer cervical ou de cânceres do tipo glioblastoma, carcinoma ou melanoma, para citar alguns. Fora da família das Leguminosas, também pode-se observar potencial anticâncer já documentado nas lectinas de planta de *Musa acuminata* (família das Musaceae) (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021), *Pinellia ternata* (família das Araceae) (ZUO et al., 2012), *Viscum álbum* (família das Viscaceae) (BANTEL et al., 1999), *Triticum aestivum* (família das Poaceae), e *Artocarpus incisa* (família Moraceae) dentre outras, indicando que tal competência não está limitada somente às lectinas da família

das Fabaceae.

A lectina de *A. incisa*, também chamada de frutalina, é uma jacalina-like galactose específica que apresentou valores de LC50 em HeLa de 100 $\mu\text{g/mL}$ (OLIVEIRA et al., 2011), bastante semelhante ao de Cvill para o período de 48 h de incubação. Outras lectinas, em geral, apresentam valores menores de LC50, sendo, portanto, mais tóxicas que Cvill para células HeLa, como as lectinas de *Musa acuminata* (MAL), específica a manose, com LC50 de 13,25 $\mu\text{g/mL}$ para incubações de 24 h (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021), e a lectina de *Pinelia ternata* (PTL), com uma LC50 menor que 10 $\mu\text{g/mL}$ para incubações de 48 h (ZUO et al., 2012). A exceção à regra foi a lectina de *Indian hyacinth*, que apresentou LC50 de 158 $\mu\text{g/mL}$, dose maior que a dose necessária de Cvill para diminuir a viabilidade celular em 50% da população das células HeLa (NAIK et al., 2017).

Figura 22 – Citotoxicidade e reversão da atividade de Cvill em células HeLa após incubação por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de PrestoBlue é expressa como a razão entre as respostas citotóxica e o controle. O experimento de reversão foi realizado com a lectina preparada a 250 $\mu\text{g/mL}$ e incubada com α -metil-manosídeo a 100 mM previamente ao ensaio de toxicidade. A significância foi avaliada usando one-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey com um intervalo de confiança de 95%. As barras representam a média \pm DP de três experiências em triplicata. Barras que não compartilham nenhuma letra minúscula são consideradas estatisticamente diferente.



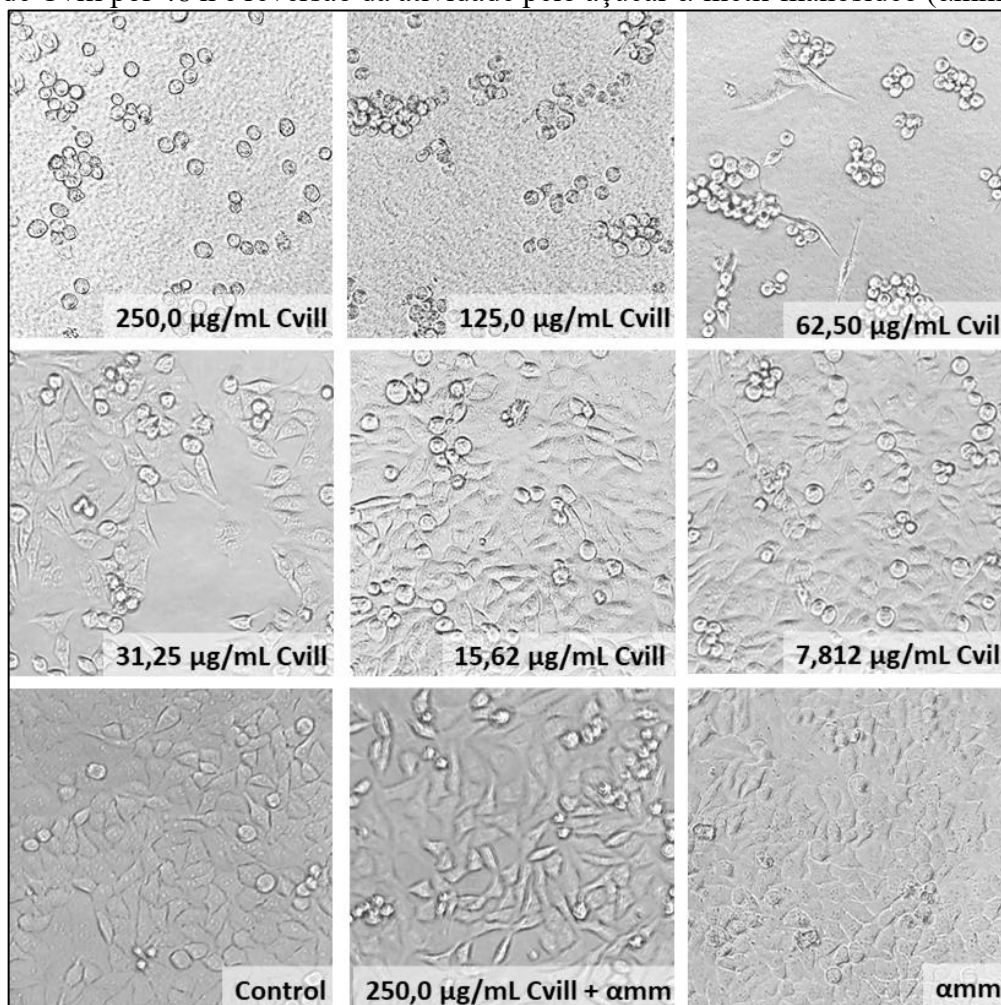
Fonte: elaborado pela autora. Gráfico construído pelo software GraphPad Prism.

Considerando os valores de LC50 de lectinas de *Canavalia*, é interessante notar que eles variam de acordo com o modelo celular testado. ConA se mostrou bastante tóxica em diferentes culturas celulares, apresentando uma LC50 de 15 µg/mL em células de carcinoma de mama humano (SHI et al., 2014), de 5 µg/mL em cultura de hepatoma (CHANG et al., 2007), de 3 µg/mL em células de leucemia (FAHEINA-MARTINS et al., 2012) e em torno de 40 µg/mL em células HeLa (ROY et al., 2014), enquanto que ConV, que apresenta identidade de 91,14% com Cvill, teve uma LC50 de 100 µg/mL em células de glioma (OSTERNE et al., 2017), resultado bastante semelhante ao de Cvill em cultura de HeLa.

Observando em detalhe os resultados da incubação de Cvill com as células HeLa no intervalo de 48 h (Figura 22), é possível observar que as doses 250,0 µg/mL, 125,0 µg/mL, 62,50 µg/mL, 31,50 µg/mL e 15,62 µg/mL foram estatisticamente diferentes quando comparadas entre si. A incubação de α -metilmanosídeo a 100 mM (na figura chamado de α mm) com HeLa não resultou em um resultado estatisticamente diferente do controle, o que mostra que o açúcar sozinho não exerce efeito algum sobre as células testadas. Os experimentos de reversão com açúcar mostraram que a lectina preparada a 250,0 µg/mL perdeu completamente sua atividade citotóxica quando previamente incubada com seu açúcar específico a 100 mM. Desse modo, a lectina ligada ao açúcar não apresentou diferença estatística com o controle, porém Cvill com o sítio livre apresentou clara distinção quando comparada a dose de 250,0 µg/mL com o controle. Esses dados indicam que definitivamente a lectina exerce sua atividade citotóxica com o envolvimento do CRD.

Para investigar as mudanças ocorridas na morfologia celular foi utilizado um microscópio ótico com aumento de 20x. Mudanças no número e na morfologia celular foram possíveis de se observar nos três períodos de incubação testados, principalmente nas doses mais altas da lectina. A Figura 23 mostra que, no período de 48 h, Cvill claramente causou aglutinação das células HeLa nas doses 250,0 µg/mL, 125,0 µg/mL e 62,50 µg/mL, especialmente nas duas doses superiores. As células aglutinadas tornaram-se redondas e perderam a capacidade de aderir ao fundo dos poços e, em vez disso, aderiram-se umas às outras. Em doses mais baixas, as células mantiveram a morfologia alongada das células HeLa, assim como no controle, atingindo confluência. A incubação da lectina com seu açúcar específico α -metil-manosídeo (α mm) por 30 minutos antes do ensaio reverteu os efeitos tóxicos e aglutinantes da lectina. A incubação das células apenas do açúcar α -metil-manosídeo não resultou em mudanças de morfologia ou aglutinação.

Figura 23 – Morfologia das células HeLa após incubação com diferentes doses de Cvill por 48 h e reversão da atividade pelo açúcar α -metil-manosídeo (α mm).



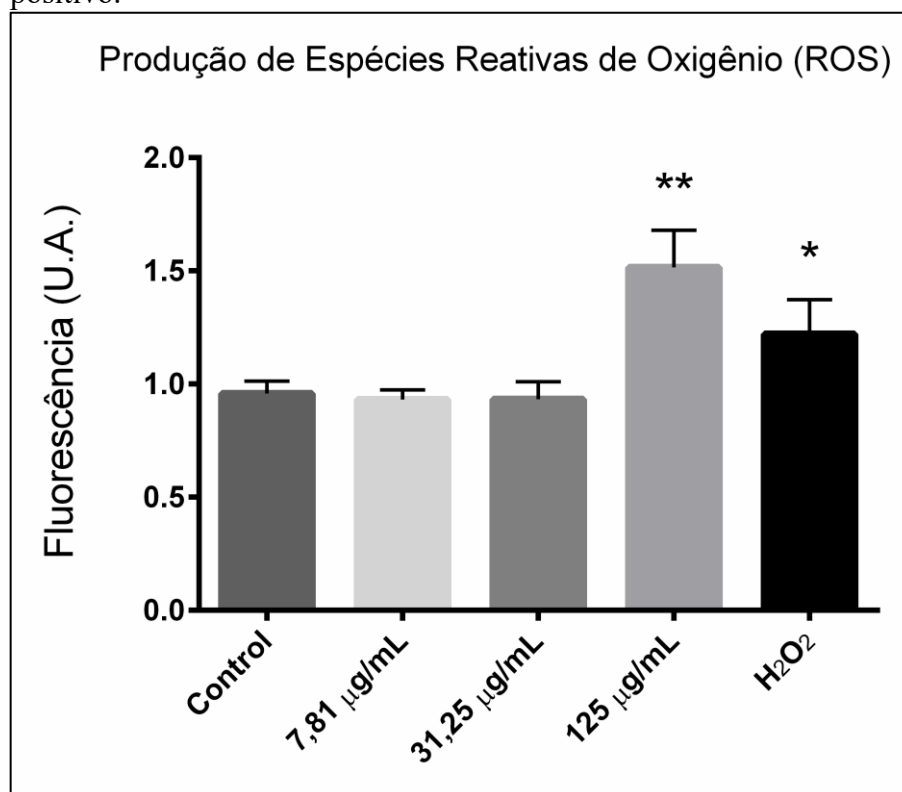
Fonte: elaborado pela autora. Fotos com microscópio óptico com aumento de 20x.

Mudanças semelhantes na morfologia celular de células HeLa também foram observadas em ensaios com as lectinas nativa e recombinante de Frutalina (OLIVEIRA et al., 2011) e na lectina manose específica MAL (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021). Nestes, as células também perderam a aderência ao fundo do poço e se tornaram arredondadas e aglutinadas. ConA e SFL também apresentaram resultado citotóxico promissor e semelhante em células de carcinoma humano de mama MCF-7, sem apresentar tais mudanças morfológicas na linhagem celular não cancerosa MCF-10A (SHI et al., 2014). Em modelos de glioma, as lectinas de ConBr, ConV, CaBo e DVL apresentaram mudanças morfológicas que também envolviam a alteração do formato achatado da célula para arredondado e perda de adesão com a placa (CAVADA et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2019; OSTERNE et al., 2017; WOLIN et al., 2021). O perfil morfológico que as células adquirem após o tratamento com lectinas, incluindo Cvill, demonstrou ser dependente da dose e do tempo de incubação. Essas alterações também refletiram considerável diminuição da viabilidade celular nas células mais afetadas.

5.4.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

Considerando os resultados dos experimentos de citotoxicidade, é interessante entender como e por quais vias metabólicas a lectina está atuando e causando a perda da viabilidade celular nas células de câncer. Dessa forma, a avaliação do nível de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um interessante experimento a ser considerado inicialmente, que dá respostas rápidas sobre o nível de estresse oxidativo da célula e sobre o envolvimento mitocondrial no dano celular.

Figura 24 – Avaliação das espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas após 48 h de incubação de células HeLa com Cvill. A dose de 125,0 $\mu\text{g/mL}$ causou aumento na produção de ROS quando comparada ao controle e às demais doses testadas. A significância foi avaliada pelo teste ANOVA e (** $p < 0,001$ e * $p < 0,01$ em relação ao controle). Peróxido de hidrogênio 100 μM foi usado como controle positivo.



Fonte: elaborado pela autora utilizando software GraphPad Prism.

Para a realização desses experimentos, foram escolhidas três doses alternadas da lectina que envolviam resultados baixos (7,812 $\mu\text{g/mL}$), intermediários (31,25 $\mu\text{g/mL}$) e altos (125,0 $\mu\text{g/mL}$) de citotoxicidade, além de um controle positivo, preparado com células tratadas

com peróxido de hidrogênio 100 μM , e um controle negativo, de células na ausência da lectina. É possível observar nos resultados (Figura 24) que nas duas concentrações menores de Cvill testadas não houve indicação de produção exacerbada de ROS, enquanto que na dose de 125 $\mu\text{g/mL}$ houve o acúmulo de ROS e confirmação de estado de estresse oxidativo celular. O acúmulo de ROS intracelular pode desencadear o processo de apoptose na células, além de ser um indício de dano na membrana mitocondrial (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; DA MOTA et al., 2012). De posse desses dados, pode-se supor, que Cvill deva causar morte celular por diferentes mecanismos na dose mais alta quando comparado com as doses intermediária e mais baixa.

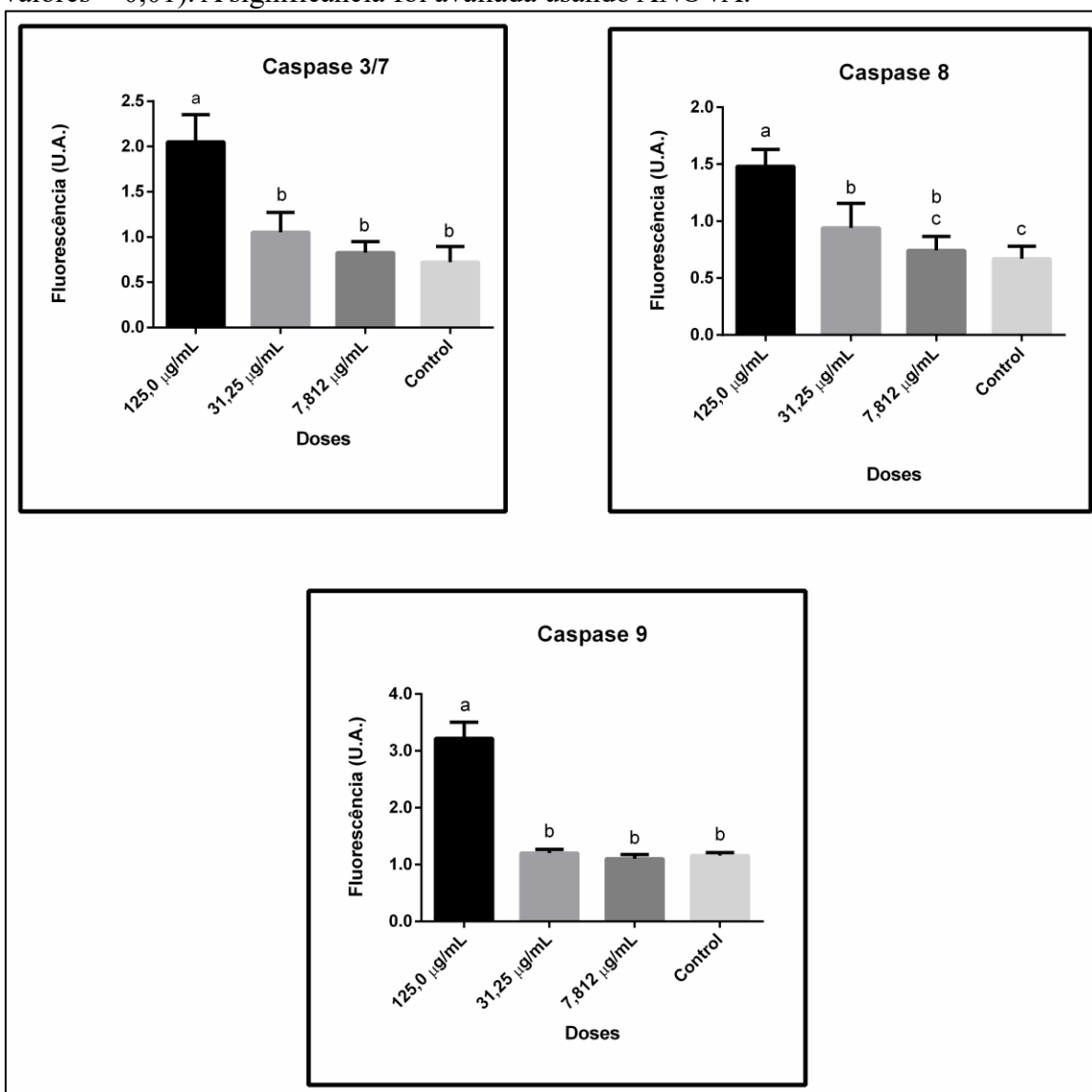
O aumento da produção de ROS em modelos de células HeLa tratadas com aglutininas foi observado anteriormente nas lectinas Eutirucallin (lectina galactose específica, extraída do látex de *Euphorbia tirucalli*, da família das Euphorbiaceae) (PALHARINI et al., 2017), também com a RIP Abrina (BEHERA et al., 2014) e com a lectina da soja SBA (PANDA et al., 2014). Em células de glioma, os tratamentos com DVL, ConA e ConBr não alteraram o nível de ROS intracelular (NASCIMENTO et al., 2019; WOLIN et al., 2021), entretanto, em células de leucemia, ConA e ConBr estimularam a produção de ROS consideravelmente, porém somente na concentração mais alta das lectinas, não tendo resposta significativa em doses baixas (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). Esses resultados positivos somente em concentrações elevadas das lectinas indicam que provavelmente a apoptose não é única via de morte celular ativa, uma vez que a perda de viabilidade e mudanças na morfologia celular também são observadas nas outras doses que não apresentaram ROS aumentado. Além disso, a diferença entre as respostas nas diferentes células também mostra que a via de ação citotóxica que a lectina age e a produção exacerbada de ROS depende intrinsecamente da linhagem de câncer em análise e do tipo de lectina testada.

5.4.3 Atividade de Caspases

Considerando os resultados da produção de ROS, e a possibilidade de a apoptose ser uma das vias pelas quais Cvill causa morte celular em células HeLa, foi estudado então o possível papel que as Caspases 3/7, 8 e 9 podem desempenhar na atividade citotóxica da lectina de *C. villosa* através do kit Cell Meter™ Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 Activity Assay. Níveis elevados de atividade de caspases indicam o envolvimento de processos apoptóticos. As caspases 8 e 9 são proteases iniciadoras, enquanto 3 e 7 são caspases efetoras. Ambas as caspases 8 e 9 podem ativar as caspases 3 e 7, além de a caspase 3 também poder ser ativada

pela via mitocondrial, independente da caspase 8 (BRENTNALL et al., 2013; CORY; ADAMS, 2002). A presença de somente a caspase 8 ativa indica o início do processo apoptótico pela via extrínseca, enquanto que as caspases 3 e 9 ativas indicam que a via iniciadora é a intrínseca ou mitocondrial. No entanto as vias não são excludentes entre si, podendo ambas serem ativadas ao mesmo tempo (HENGARTNER, 2000). A ausência de qualquer atividade de caspase, como ocorre na menor dose, de 7,812 $\mu\text{g/mL}$ mostra que provavelmente não há apoptose em desenvolvimento nessa condição para aquele momento avaliado.

Figura 25 – Nível de atividade das caspase 3/7, 8 e 9. Três doses de Cvill foram incubadas com células HeLa por 48 h. Os gráficos indicam a atividade da caspase-3/7 (A), caspase-8 (B) e caspase-9 (C). Cada barra representa a média \pm DP de três experimentos diferentes em triplicata. Barras rotuladas com diferentes letras minúsculas indicam dados estatisticamente diferentes (p-valores $< 0,01$). A significância foi avaliada usando ANOVA.



Fonte: elaborado pela autora. Gráficos e estatística realizados utilizando software GraphPad Prism.

O ensaio das caspases mostrou que o nível de atividade de todas quatro cisteíno proteases foi aumentado na dose mais alta testada, 125,0 µg/mL (Figura 25). Esse resultado corrobora com os resultados de ROS, uma vez que, elevadas concentrações de espécies oxidativas indicam participação da mitocôndria no processo metabólico em andamento, e considerando o alto nível de atividade das caspases 3/7 e 9, pode-se inferir que a apoptose foi iniciada, pelo menos em parte, pela via intrínseca ou mitocondrial. O alto nível de atividade da caspase 8 indica que parte das caspases 3 e 7 ativas podem ter vindo pela ação da Cas8, porém devido ao alto índice de ROS intracelular e de caspase 9 pode-se supor que a via mitocondrial também esteve envolvida no processo.

A caspase 9 também está envolvida com apoptose intrínseca. Essa caspase desempenha papel na ativação de caspases efetoras, liberação do citocromo C da mitocôndria e aumento da produção de ROS (BRENTNALL et al., 2013), dessa forma, a alta presença de ROS intracelular observada em células tratadas com a maior concentração de Cvill vai de acordo com a alta atividade de Cas9 encontrada nessa concentração também. Assim como Cvill, a lectina de *V. album* também desencadeou apoptose em células HeLa (BANTEL et al., 1999), e ConA em células de melanoma (LIU et al., 2009) através de mecanismo que envolvia a ativação das Caspases 3, 8 e 9 e liberação de Citocromo C. No caso de lectinas de *Canavalia*, o que se observa é que a atividade antineoplásica é usualmente desencadeada pela ativação de vias de autofagia (BHUTIA et al., 2019; CAVADA et al., 2018; WOLIN et al., 2021), mas trabalhos como o de Liu (LIU et al., 2009) e Shi (SHI et al., 2014) demonstraram que apoptose pela via mitocondrial também é possível de ser desencadeada no caso de lectinas desse gênero.

Na dose intermediária 31,25 µg/mL somente a caspase 8 estava ativa (Figura 25), o que indica que, para essa concentração, o mecanismo de apoptose pela via intrínseca, envolvendo a mitocôndria, não está ocorrendo, já que a caspase 9 se encontra inoperante. A atividade da caspase 8 indica que apoptose foi iniciada pela via não mitocondrial, geralmente através da interação com receptores de morte celular TNFR (HENGARTNER, 2000). Esses resultados mais uma vez são validados pelos dados dos experimentos de ROS, que indicaram não haver estresse oxidativo na dose 31,25 µg/mL acusando o não envolvimento da mitocôndria para essa dose. A morte celular de células tumorais desencadeada pela ativação da caspase 8 também já foi observada em SFL (LIU et al., 2008), MAL (SRINIVAS; SHIVAMADHU; JAYARAMA, 2021) e ConBr (WOLIN et al., 2021). Em 2008, Benoist et al (BENOIST et al., 2009) demonstrou que a lectina Morniga M, uma jacalina-like manose específica, também causou apoptose ativada por caspase 8 em células de leucemia. Nesse trabalho, Benoist defende que a apoptose foi desencadeada pela interação da lectina com o receptor Fas, da família dos

TNFR, uma vez que células FADD-deficientes tiveram a apoptose significativamente suprimida. Foi observado anteriormente que Cvill tem alta afinidade por glicanos complexos bi-anteados e do tipo high manose, e, considerando que células HeLa são ricas nesse tipo de glicanos, pode-se inferir que, um dos mecanismos pelo qual Cvill causa apoptose pode ser através da ligação a um receptor glicosilado da superfamília TNFR. Li et al demonstrou que ConA é capaz de se ligar fortemente aos glicanos do receptor Fas (LI et al., 2007). Já foi também previamente observado que a interação da galectina 3 com o N-glicano do receptor Fas desencadeia apoptose pela via extrínseca, ativando a caspase 8 e posteriormente a Cas3 (FUKUMORI et al., 2004), dessa forma, pode-se supor que Cvill possa desencadear resposta semelhante ao reconhecer e se ligar aos N-glicanos desse tipo de receptor.

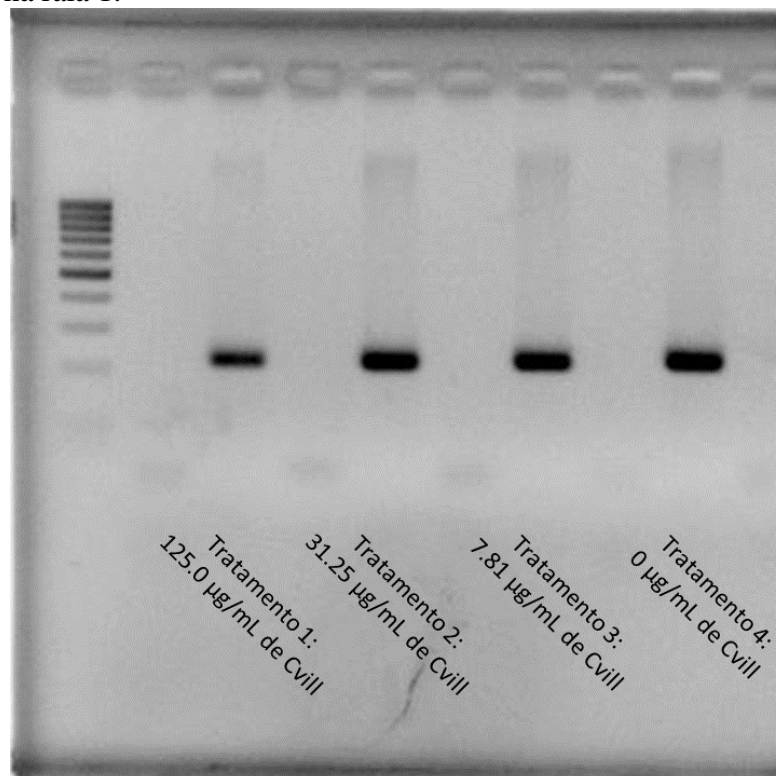
Uma vez que essas lectinas já se mostraram importante ferramentas no reconhecimento de células tumorais e efetivas moléculas com ações antineoplásicas, é importante desvendar o mecanismo pelo qual a lectina atua porque esse é um passo fundamental que moléculas de alto potencial terapêutico devem passar para se tornarem novos fármacos em terapias anticâncer. Nesse contexto, o nível de expressão de genes relacionados a mecanismos de morte celular foi avaliado por qPCR.

5.4.4 Análise da expressão gênica em células HeLa tratadas com Cvill

Considerando os resultados dos experimentos anteriores, para os experimentos de qRT-PCR foi buscado avaliar qual seria o mecanismo ativado no processo de morte celular por meio da avaliação da expressão de genes pro-apoptóticos das vias intrínsecas e extrínsecas (Bax e Bak, Citocromo C, Caspase 3, Caspase 8, FADD, PUMA), anti-apoptóticos (Bcl-2 e BCL-XL), e autofágicos (LC3), usando os genes de referência GAPDH, HPRT1 e β -actina.

Dessa forma, foi preparado um ensaio em que células HeLa foram tratadas com três doses de Cvill (125,0 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 7,81 $\mu\text{g/mL}$) por 48 h. A extração de RNA foi bem sucedida para o período testado e após tratamento com cloreto de lítio, os RNAs de todas as doses apresentaram uma razão 260/230 maior que 1.8. Dessa forma, as amostras estavam boas o suficiente para prosseguir para a etapa de produção de cDNA, após tratamento com DNase. Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1000 ng de RNA de cada amostra usando a enzima M-MLV Reverse transcriptase. Antes de se iniciarem as reações em tempo real, foi realizada uma amplificação do gene de referência GAPDH por meio de uma de PCR simples para averiguar se as sínteses dos cDNAs foram bem sucedidas (Figura 26).

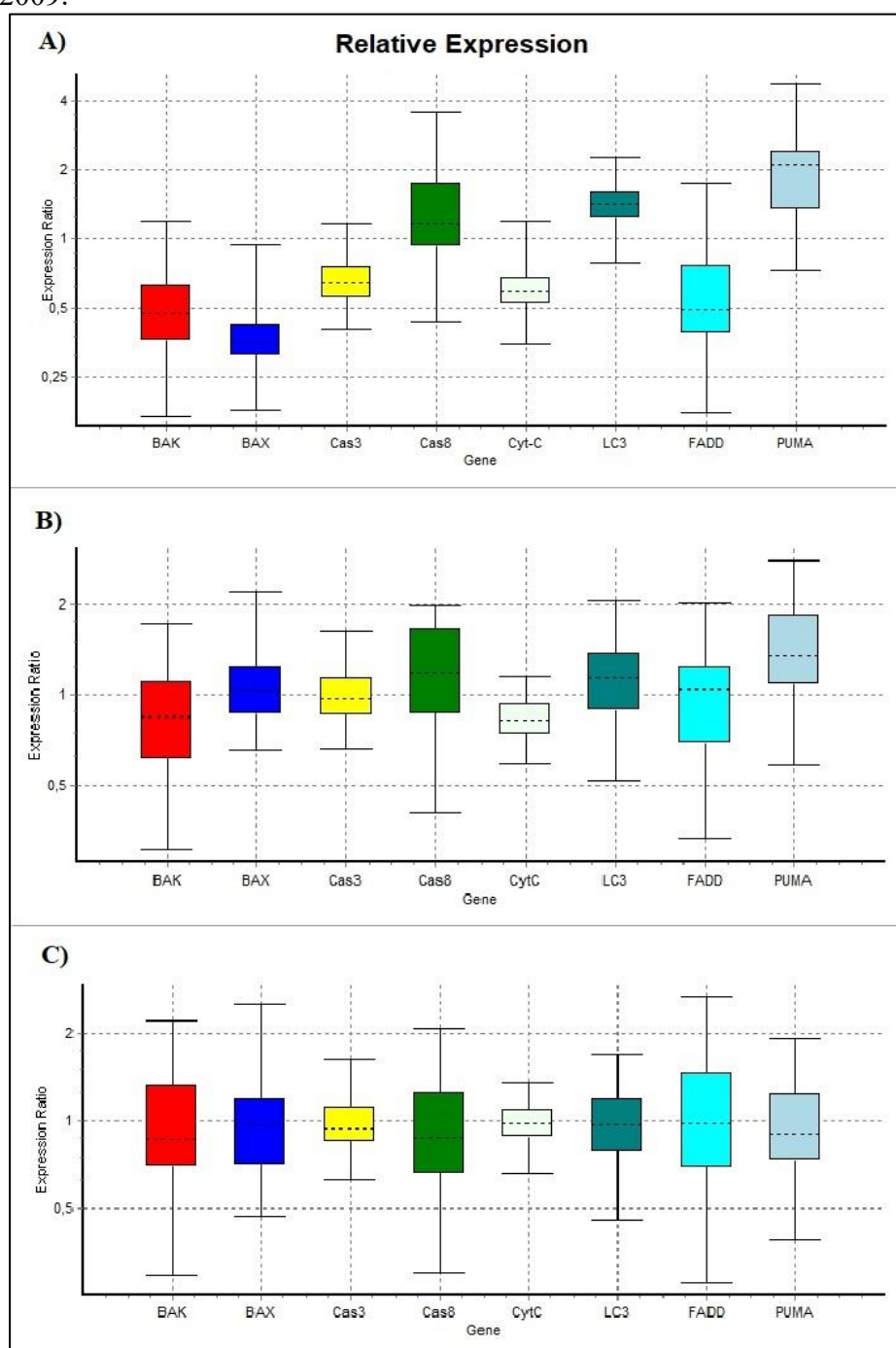
Figura 26 – Gel de agarose 3% mostrando a amplificação do gene GAPDH a partir do cDNA sintetizado. Células HeLa foram tratadas com quatro doses de Cvill (125.0 $\mu\text{g/mL}$, 31.25 $\mu\text{g/mL}$, 7.81 $\mu\text{g/mL}$ and 0 $\mu\text{g/mL}$ de Cvill respectivamente). O RNAm total foi extraído das células submetidas a cada tratamento e a transcriptase reversa MMLV foi utilizada para a síntese do cDNA. Os resultados de PCR apresentaram o tamanho esperado de 226 bp. Marcador de DNA de baixo peso molecular foi posicionado na raia 1.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para o teste de especificidade dos primers, foi feito um pool de cDNA, e realizada uma PCR com os primers dos genes escolhidos. Todos os amplicons obtidos apresentaram banda única em gel de agarose 3%. Os amplicons eram dos tamanhos correspondentes aos esperados indicando que as reações foram específicas. O pool de cDNA também foi utilizado para a construção de uma curva de diluição de 6 pontos para o cálculo da eficiência dos primers. Destes, somente os primers para os genes BCL-2 e BCL-XL não obtiveram bons resultados de eficiência, uma vez que eles apresentaram Cq's muito tardios ou não amplificaram de forma alguma. Os dois pares de primers desses genes foram, portanto, descartados dos próximos passos do experimento e das reações de qPCR. Os outros primers apresentaram valores de eficiência muito próximos ou iguais a 2.

Figura 27 – Expressão relativa de genes relacionados a morte e stress celular em células HeLa tratadas com Cvill a 125,0 $\mu\text{g/mL}$ (A), 32,25 $\mu\text{g/mL}$ (B), e 7,812 $\mu\text{g/mL}$ (C) com o controle (dose 0). O diagrama de caixa propicia a visualização da assimetria e da dispersão dos dados, os quais 50% estão distribuídos dentro da caixa e 50% estão dentro do intervalo delimitado pelas retas. A linha tracejada dentro das caixas representa a mediana dos valores das razões de expressão. Caixas que se afastam do valor de razão igual a 1 para cima indicam expressão aumentada daquele gene em relação ao controle, enquanto para baixo indicam expressão diminuída. Os dois genes de referência HPRT1 e GADPH foram utilizados para normalizar os dados de expressão. A estatística foi calculada com base em um intervalo de confiança de 95% considerando 2000 randomizações. Os gráficos foram gerados utilizando o programa REST 2009.



Fonte: elaborado pela autora utilizando o software REST 2009.

Os genes de referência GADPH e HPRT1 apresentaram valores aceitáveis de estabilidade para os parâmetros de GeNorm M (0,708 para GADPH e 0,782 para HPRT1) e CV (0,267 para GADPH e 0,369 para HPRT1) quando analisados no software qBase+. A β -actina, no entanto, não apresentaram resultados satisfatórios (GeNorm M de 1.202 e CV de 0.434) e esta não foi utilizada, portanto, como gene de referência.

A figura 27 mostra os resultados da qPCR que retrata o nível de expressão de genes envolvidos com morte celular em células HeLa tratadas com diferentes doses de Cvill. A menor dose de Cvill, de 7,812 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou diferença estatística no nível de expressão de qualquer gene em relação ao controle (Figura 27 C). Como observado nos diversos experimentos citados previamente, essa dose se mostrou bastante diluída, não apresentando resultados significativos de citotoxicidade, de atividade de caspases, de mudança da morfologia celular, e nem a de nível de expressão gênica.

Na dose intermediária, de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27 B), foi observada diferença estatística somente na expressão dos genes Puma, que estava *upregulated* e Citocromo C, que estava *downregulated* em relação à dose 0 (controle). Na dose mais alta, de 125,0 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 27 A) foi observado que, além de Puma, a expressão de LC3 também estava significativamente aumentada. A expressão de transcritos de Caspase 8 também estava aumentada nas duas doses mais altas, mas não o suficiente para atingir significância estatística nos experimentos de qPCR. No entanto, pode-se afirmar que a atividade da Caspase 8 foi de fato aumentada tanto na dose 125,0 $\mu\text{g/mL}$ quanto na dose 31,25 $\mu\text{g/mL}$ uma vez que a ação delas foi avaliada também a nível de proteína, pelo kit Cell Meter™ Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9, que mostrou que essa caspase estava ativa com uma diferença estatística do controle de $p < 0,01$.

O aumento da expressão de Puma que foi observado nas duas doses mais altas geralmente está relacionado com atividade apoptótica intrínseca, uma vez que essa proteína, é da família das Bcl-2 e interage ligando-se às proteínas anti-apoptose BCL-XL e Bcl-2, deixando Bak e Bax livres para atuarem na formação de poros na mitocôndria, que a permeabilizam e causam a liberação do Citocromo C para o citosol (CORY; ADAMS, 2002). Durante esse processo, em células apoptóticas é esperado, portanto, o aumento da expressão de Bak, Bax e Puma em detrimento da diminuição da expressão de BCL-XL e Bcl-2 como observado anteriormente com ConA (AMIN et al., 2007), com a lectina de *Solanum tuberosum* (KABIR et al., 2016) e com a lectina de ervilha (KABIR et al., 2013), em células de carcinoma, e ConA e SFL em células de câncer de mama (SHI et al., 2014). Os resultados de Cvill, contudo, expuseram o aumento de expressão de PUMA contraposto pela diminuição da expressão de Bak, Bax e Citocromo C nas doses mais alta e intermediária do tratamento da lectina. Esse

resultado é um interessante ponto a ser analisado, visto que não é o padrão que ocorre em células apoptóticas. Apesar de Cvill ter apresentado alta atividade de caspases e produção de ROS intracelular na dose de 125,0 µg/mL, não se pode concluir precipitadamente que as células HeLa estão em apoptose exclusivamente, visto que os resultados da qPCR vão de encontro a essa suposição.

Além de Bax e Bak, Fadd também teve sua expressão significativamente diminuída com o aumento da dose de Cvill. Para o caso de Fadd, o aumento da expressão gênica estaria relacionado com a ativação da via apoptótica extrínseca, que não envolve a mitocôndria e nem Bax ou Bak. Fadd participa da formação do Complexo Sinalizador Indutor de Morte (DISC), o qual é modulado a partir da interação de um receptor da superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral (TNFR) como Fas (CD95) ou TRAIL a seus ligantes, FasL e citocinas. Após essa interação, há a formação do DISC e ativação da caspase 8, que desencadeiam a apoptose pela via extrínseca (GRIFFITH et al., 2009). A interação desses receptores, que são glicoproteínas, com seus ligantes e o desencadeamento da apoptose pela via extrínseca pode ser modulado pela porção glicídica dessas moléculas. Portanto, lectinas que interajam com os glicanos desses receptores podem desencadear a transdução de sinal de início da apoptose, como a galectina I desencadeia ao se ligar a Fas em células de leucemia (MICHEAU, 2018).

No caso de Cvill, a baixa expressão de FADD pode indicar que a lectina provavelmente não interagiu com receptores TNFR para desencadear a ativação da Cas8 especificamente, e que ativação da caspase deve ter sido promovida por outro mecanismo, provavelmente de forma semelhante como a lectina de *V. album* também desencadeou a ativação de Caspase 8 de forma independente de receptores celulares (BANTEL et al., 1999).

Dessa forma, e considerando que apoptose pode não ser o único mecanismo a estar ativado, é importante considerar que a expressão aumentada de Puma também pode ser um indicativo de estresse celular que desencadeia autofagia como resposta, como discutido em Wolin et al (2021) (WOLIN et al., 2021), em que foi observado que células de glioma tratadas com ConBr iniciaram o processo de autofagia envolvendo um *crosstalk* com a ativação da Caspase-8. Em casos de autofagia, PUMA atua impedindo que as proteínas anti-apoptose BCL-XL e Bcl-2 se liguem a Beclin1, que é um indutor da autofagocitose e inibam sua ação (KANG et al., 2011). Em Wolin (2021), também foi observado que não ocorreu alteração no nível de expressão das proteínas pró-apoptóticas Bak nem Bad, mas houve aumento da expressão de PUMA e indução da clivagem de LC3, assim como ativação da atividade da Caspase 8. Cvill também apresentou atividade aumentada da Caspase 8 além de regular positivamente a

expressão de LC3, que é uma proteína associada ao microtúbulo envolvida com a maturação do autofagossomo e o posterior desencadeamento da autofagia (BHAT et al., 2018). A indução de autofagia por lectinas em células de câncer também já foi documentada em ConA no caso de células de hepatoma (CHANG et al., 2007), de glioma (PRATT; ROY; ANNABI, 2012), e HeLa (ROY et al., 2014), e no caso de DVL (NASCIMENTO et al., 2019), Cabo (CAVADA et al., 2018) e ConV (OSTERNE et al., 2017) em glioma. Em trabalho de monografia anterior não publicado também foi mostrado que Cvill desencadeia morte celular por mecanismos que podem envolver tanto apoptose quanto autofagia, uma vez que foi observado aumento da marcação de fosfatidilserina por anexina V, além também do aumento da presença de organelas vesiculares ácidas e dos níveis intracelulares de LC3II quando células de linhagem de glioma C6 são tratadas com Cvill por períodos de incubação tão curtos quanto 6 h (WELTER, 2018).

Considerando-se os paralelos possíveis de serem traçados entre os resultados citados de Cvill e ConA em células HeLa, e Cvill e ConBr em glioma, pode-se dizer que, pelo menos parcialmente, um dos prováveis mecanismos de morte celular que Cvill desencadeia em HeLa é a autofagia. Cvill, ConBr e ConA são lectinas do gênero *Canavalia* específicas a manose que apresentam alto nível de identidade de sequência entre si. A sobreposição da estrutura tridimensional dessas lectinas também resulta em valores de RMSD baixos, indicando similaridade estrutural alta entre essas proteínas. Resultados correlatos entre essas lectinas pode ser uma consequência de tais similaridades.

Dessa forma, dado os indícios de ativação de autofagia ao mesmo tempo que ocorre a ativação de caspases, é possível se afirmar que Cvill provavelmente causa morte celular pela combinação das vias apoptóticas e autofágicas. Devido à somente a Caspase 8 estar ativa na dose 31,25 µg/mL, pode-se supor que o processo de apoptose se inicia de forma extrínseca através da Caspase 8 e pela autofagia devido à expressão aumentada de PUMA e LC3. Na dose mais alta, de 125,0 µg/mL, todas as caspases se encontram ativas, e a produção de ROS também se encontra alta. Esses processos podem ter sido desencadeados a partir da Cas8, com ativação das caspases efetoras, e o somatório dos processos de apoptose e autofagia ocorrendo simultaneamente em tal dose de Cvill. Os mecanismos de morte celular não são auto excludentes, e pode haver uma combinação de processos ocorrendo na célula de forma a depender da concentração, ou do tempo de contato com o agente indutor de toxicidade. Faheina-Martins et al em seu trabalho de 2012 mostrou que as vias metabólicas podem ser ativadas no processo de morte celular de forma dose-dependente, uma vez que as lectinas ConA e ConBr desencadearam necrose em concentrações altas em células de leucemia, e apoptose em concentrações mais baixas (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). De forma semelhante, também

foi demonstrado que a lectina ConV, que desencadeia autofagia em células de glioma pode causar necrose em concentrações maiores da lectina (OSTERNE et al., 2017).

5.5 Análise da internalização da lectina por microscopia confocal

Nas imagens de microscopia confocal de Cville e HeLa é constatado que a lectina é internalizada em ambas as doses testadas (Figura 28) após incubação de 48 h. Aglutinação celular e perda de adesão ao fundo da placa também é observada em ambas as doses, de forma mais acentuada na dose mais concentrada de 125 µg/mL (Figura 29). Devido a isso, as células adquirem um padrão arredondado, como observado previamente nas imagens de morfologia celular em aumento de 20x. As alterações morfológicas esperadas de apoptose, que incluem encolhimento celular e formação de vesículas membranais estavam presentes em algumas das imagens confocais que foram analisadas. Entretanto, algumas características de um tipo específico de apoptose, denominado anoikis, também estavam indubitavelmente presentes nos resultados de Cville. Uma célula em anoikis apresenta uma alteração morfológica de perda de adesão celular, sendo também caracterizada por marcadores de apoptose clássicos que incluem o desencadeamento de mecanismos de apoptose intrínsecos e extrínsecos, participação de proteínas da superfamília Bcl-2 e ativação de caspases. O aumento dos níveis de ROS e a indução da autofagia também podem ocorrer nas células que passam por anoikis (PAOLI; GIANNONI; CHIARUGI, 2013). A indução de anoikis por lectina de *Morus alba* específica a galactose foi relatada anteriormente em células de câncer de mama (SARANYA et al., 2017).

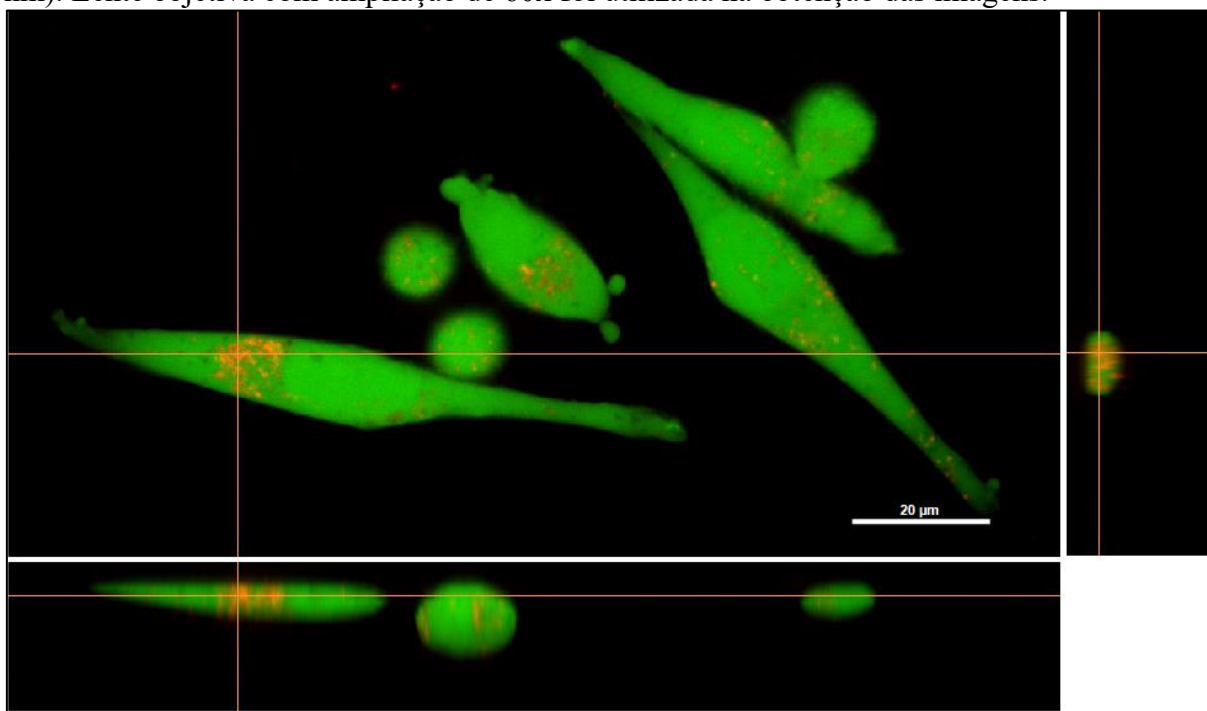
Através do exame minucioso da região do núcleo celular caracterizado por ser mais condensado na marcação com calceína, pode-se concluir que Cville após ser internalizada se concentra nas proximidades do núcleo, sem adentrá-lo, e que o núcleo se encontra intacto.

Considerando que células HeLa apresentam glicocálice rico em manose, um dos possíveis mecanismos de internalização de Cville pela célula que pode ocorrer envolve a interação da lectina com glicanos de receptores. Mecanismos de apoptose e autofagia podem ser iniciados desde a ligação com o receptor extracelularmente ou após a incorporação da lectina pela célula. Assim como Cville, a lectina específica a manose SFL (LIU et al., 2008) também foi incorporada por células HeLa durante o processo de desencadeamento de morte celular. Em células de hepatoma, ConA também foi internalizada e se acumulou em mitocôndrias, onde desencadeou autofagia (LEI; CHANG, 2009), ConA também apresentou resultados semelhantes em células de macrófagos da linhagem PU5-1.8, onde, no entanto, desencadeou apoptose (SUEN et al., 2000). Não está claro se Cville se acumula dentro de uma organela

específica em células HeLa, como foi observado com a lectina ConA, que se acumulou nas mitocôndrias de macrófagos e de células de hepatoma. O que se pode inferir das imagens confocais é que a lectina está concentrada em locais específicos dentro da célula, mais precisamente nas vizinhanças do núcleo. O acúmulo de lectina pode ser visto como os corpos relativamente grandes marcados em vermelho na figura 28. Outras lectinas manose-específicas como as lectinas artocarpina e moringa M também foram endocitadas rapidamente por células de linfócito (BENOIST et al., 2009).

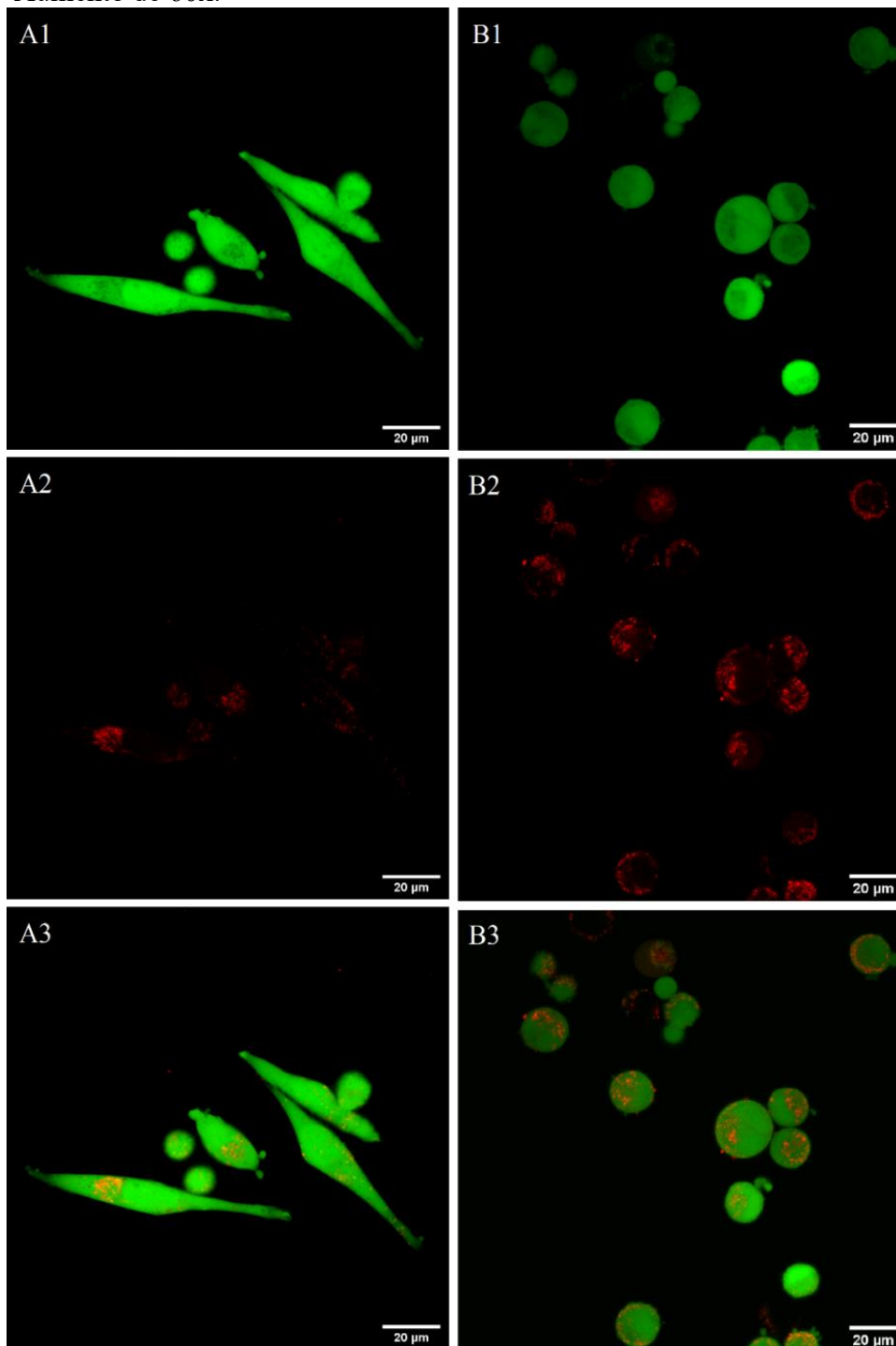
A lectina específica a galactose frutalina também foi internalizada por células HeLa, porém esta foi direcionada ao núcleo, localizando-se tanto nas regiões perinucleares quando dentro do mesmo, tendo um endereçamento diferente do que foi observado com as manose específicas (OLIVEIRA et al., 2011). Futuros experimentos podem determinar se Cvill segue o padrão de ConA de acúmulo na mitocôndria e qual o papel, a partir daí, que a lectina desempenha no desenvolvimento da autofagia ou apoptose.

Figura 28 – Internalização de Cvill preparada a 31,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e visualizada por microscopia confocal. As imagens do quadro inferior (eixos XZ) e quadro lateral (eixos YZ) representam cortes transversais e longitudinais do eixo XY (quadro central), nos quais é possível ver que a lectina foi incorporada pela célula se localizando em regiões perinucleares. A imagem mostrada aqui representa a os resultados observados pela repetição do experimento em triplicata e observação manual de diversas células isoladamente. Cvill foi marcada com TRITC (emissão na faixa do vermelho – 560 nm) e as células HeLa foram coradas com calceína (verde – 488 nm). Lente objetiva com ampliação de 60x foi utilizada na obtenção das imagens.



Fonte: elaborado pela autora. Imagem construída pela ferramenta de visualização de camadas da imagem confocal do software NIS Elements Viewer.

Figura 29 – Microscopia de fluorescência de células HeLa incubadas com Cvill nas concentrações de 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 125,0 $\mu\text{g/mL}$ (B) pelo período de 48 h. Os canais calceína 488 nm (A1 e B1) e rodamina 560 nm (A2 e B2) estão dispostos individualmente na figura. As figuras A3 e B3 correspondem aos canais verde e vermelho de cada dose mesclados. Aumento de 60x.



Fonte: elaborado pela autora. Imagens construídas utilizando software ImageJ.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho de tese foi descrito, através de experimentos de viabilidade celular, qPCR, ação de caspases e produção de ROS intracelular, que a lectina de *Canavalia villosa* apresenta ação citotóxica em células HeLa por meio de mecanismos de morte celular que envolve tanto vias autofágicas quanto apoptóticas.

A estrutura primária de Cvill também foi obtida por sequenciamento gênico e espectrometria de massas. De posse da informação da sequência, a estrutura tridimensional da lectina foi resolvida por cristalografia de macromoléculas. A estrutura terciária de Cvill é composta pelo motivo jellyroll, típico de lectinas do tipo ConA-like, Cvill também se oligomeriza para formar tetrâmeros estáveis. Estudos de afinidade a carboidratos foram realizados por meio de experimentos de *Glycan array* e *Docking Molecular*, visando estabelecer um paralelo entre a interação de Cvill com componentes glicídicos alvo da membrana HeLa e a citotoxicidade que foi observada. Cvill interage bem com N-glicanos do tipo *high mannose*, que são comumente encontrados e hiper expressos no glicocálice de células HeLa. Essa interação de Cvill com esses glicanos, que podem ser constituintes de receptores da membrana, pode desencadear a internalização da lectina pela célula, que por sua vez causa a ação citotóxica observada. Experimentos de microscopia confocal mostraram que a lectina é incorporada pela célula, e se acumula na região perinuclear.

Como perspectivas para esse trabalho pode-se citar experimentos de dinâmica molecular, para avaliar por simulação computacional a ligação de Cvill com N-glicanos alvo considerando a variável de tempo e a flexibilidade do complexo como um todo. Também podem ser inclusos aplicações em modelos de vírus, visto que Cvill reconheceu glicanos da proteína *spyke* de Sars-Covid-2 no *Docking*. E por fim, em modelos de HeLa, pode ser feita uma avaliação das vias de morte celular por *blotting* de proteínas, visando acompanhar a nível proteico, e não somente de transcrito, a ativação das vias envolvidas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL RAHMAN, Anas M.; RYCZKO, Michael; NAKANO, Miyako; PAWLING, Judy; RODRIGUES, Tania; JOHSWICH, Anita; TANIGUCHI, Naoyuki; DENNIS, James W. Golgi N-glycan branching N-acetylglucosaminyltransferases I, v and VI promote nutrient uptake and metabolism. **Glycobiology**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 225–240, 2015. DOI: 10.1093/glycob/cwu105.
- ACHILLI, Silvia et al. Tetralec, artificial tetrameric lectins: A tool to screen ligand and pathogen interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 15, p. 1–20, 2020. DOI: 10.3390/ijms21155290.
- ADAMS, Jerry M.; CORY, Suzanne. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. **Science**, [S. l.], v. 281, n. 5381, p. 1322–1326, 1998. DOI: 10.1126/science.281.5381.1322.
- ADAMS, Paul D. et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 66, n. 2, p. 213–221, 2010. DOI: 10.1107/S0907444909052925.
- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, [S. l.], v. 96, n. 3, p. 23–25, 1965. DOI: 10.1042/bj0960023C.
- AINOUZ, IL; SAMPAIO, AH; BENEVIDES, NMB; FREITAS, ALP; COSTA, FHF; CARVALHO, MR; PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by brazilian marine algal extract. **Botânica Marina**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 475–479, 1992.
- AKKOUH, Ouafae; NG, Tzi Bun; SINGH, Senjam Sunil; YIN, Cuiming; DAN, Xiuli; CHAN, Yau Sang; PAN, Wenliang; CHEUNG, Randy Chi Fai. Lectins with anti-HIV activity: A review. **Molecules**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 648–668, 2015. DOI: 10.3390/molecules20010648.
- AL ATALAH, Bassam et al. Expression analysis of the nucleocytoplasmic lectin “Oryzata” from rice in *Pichia pastoris*. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 278, n. 12, p. 2064–2079, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08122.x.
- ALOCCHI, Davide; GHRAICHY, Marie; BARLETTA, Elena; GASTALDELLO, Alessandra; MARIETHOZ, Julien; LISACEK, Frederique. Understanding the glycome : an interactive view of glycosylation from glycompositions to glycoepitopes. **Glycobiology**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 349–362, 2018. DOI: 10.1093/glycob/cwy019.
- AMBROSI, Moira; CAMERON, R.; DAVIS, Benjamin G.; CAMERON, Neil R.; DAVIS, Benjamin G. Lectins : tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [S. l.], p. 1593–1608, 2005.
- AMIN, A. R. M. Ruhui.; PAUL, Rajib K.; THAKUR, Vijay S.; AGARWAL, Munna L. A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, concanavalin A. **Cancer Research**, [S. l.], v. 67, n. 12, p. 5617–5621, 2007. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0655.

ARTIMO, Panu et al. ExpASy: SIB bioinformatics resource portal. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 40, n. W1, p. 597–603, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks400.

ASSREUY, A. M. S.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; DE SOUZA, M. L. P.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 6, p. 201–210, 1997.

ASSREUY, Ana Maria Sampaio; FONTENELE, Sabrina Rodrigues; DE FREITAS PIRES, Alana; FERNANDES, Débora Costa; RODRIGUES, Natália Velloso Fontenelle C.; BEZERRA, Eduardo Henrique Salviano; MOURA, Tales Rocha; DO NASCIMENTO, Kyria Santiago; CAVADA, Benildo Sousa. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S. l.], v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009. DOI: 10.1007/s00210-009-0465-1.

BALZARINI, Jan; NEYTS, Johan; SCHOLS, Dominique; HOSOYA, Mitsuaki; VAN DAMME, Els; PEUMANS, Willy; DE CLERCQ, Erik. The mannose-specific plant lectins from *C. hybrid* and *E. helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *U. dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replicati. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 191–207, 1992. DOI: 10.1016/0166-3542(92)90038-7.

BANTEL, Heike; ENGELS, Ingo H.; VOELTER, Wolfgang; SCHULZE-OSTHOFF, Klaus; WESSELBORG, Sebastian. Mistletoe lectin activates caspase-8/FLICE independently of death receptor signaling and enhances anticancer drug-induced apoptosis. **Cancer Research**, [S. l.], v. 59, n. 9, p. 2083–2090, 1999.

BARAUNA, Sara C.; KASTER, Manuella P.; HECKERT, Bettina T.; DO NASCIMENTO, Kyria S.; ROSSI, Francesco M.; TEIXEIRA, Edson H.; CAVADA, Benildo S.; RODRIGUES, Ana Lúcia S.; LEAL, Rodrigo B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 160–169, 2006. DOI: 10.1016/j.pbb.2006.07.030.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 297–303, 1992. DOI: 10.3109/08820139209069369.

BARROSO-NETO, Ito L. et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 82, p. 464–470, 2016. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052>.

BARROSO-NETO, Ito L. et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **International journal of biological macromolecules**, Netherlands, v. 82, p. 464–470, 2016. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052.

BEAMAN, Inventors Brain S.; PARK, Hyde; FUAD, E.; Y, N.; JAMES, L. United States Patent. [S. l.], 1996. DOI: 10.1074/JBC.274.42.30033.(51).

BECKER, Joseph W.; REEKE, G. N.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Biological Chemistry**, [S. l.], v. 260, n. 4, p. 1513–1524, 1975.

BEHERA, Birendra; MISHRA, Debasish; ROY, Bibhas; DEVI, K. Sanjana P.; NARAYAN, Rajan; DAS, Joyjyoti; GHOSH, Sudip K.; MAITI, Tapas K. Abrus precatorius agglutinin-derived peptides induce ROS-dependent mitochondrial apoptosis through JNK and Akt/P38/P53 pathways in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 222, p. 97–105, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.08.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.08.017>.

BELTRÃO, Eduardo I. C.; CORREIA, Maria T. S.; FIGUEREDO-SILVA, José; COELHO, Luana C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from Cratylia mollis lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 74, n. 3, p. 125–134, 1998. DOI: 10.1007/BF02825961.

BENEVIDES, Raquel Guimaraes et al. A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. **The Journal of biological chemistry**, United States, v. 287, n. 31, p. 26352–26364, 2012. a. DOI: 10.1074/jbc.M112.375816.

BENEVIDES, Raquel Guimarães et al. A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 31, p. 26352–26364, 2012. b. DOI: 10.1074/jbc.M112.375816.

BENOIST, Hervé; CULERRIER, Raphaël; POIROUX, Guillaume; SÉGUI, Bruno; JAUNEAU, Alain; VAN DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; BARRE, Annick; ROUGÉ, Pierre. Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 86, n. 1, p. 103–114, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0708434.

BENTO, C. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T.; MOREIRA, R. a; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and actions**, [S. l.], v. 38, p. 48–54, 1993. DOI: 10.1007/BF02027213.

BERG, JM; TYMOCZKO, JL; STRYER, L. Three-Dimensional Protein Structure Can Be Determined by NMR Spectroscopy and X-Ray Crystallography. In: FREEMAN, WH (org.). **Biochemistry**. New York. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22393/>.

BESKOW, Laura M. Lessons from HeLa Cells: The Ethics and Policy of Biospecimens. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [S. l.], v. 17, p. 395–417, 2016. DOI: 10.1146/annurev-genom-083115-022536.

BEZERRA, E. H. et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, [S. l.], v. 408, p. 566–570, 2011. DOI: 10.2210/PDB3JU9/PDB. Disponível em: <http://www.rcsb.org/structure/3JU9>. Acesso em: 1 fev. 2019.

BHAT, Punya; KRIEL, Jurgen; SHUBHA PRIYA, Babu; BASAPPA; SHIVANANJU,

Nanjunda Swamy; LOOS, Ben. Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. **Biochemical Pharmacology**, [*S. l.*], v. 147, p. 170–182, 2018. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.11.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.021>.

BHUSHAN, Shashi; KUMAR, Ajay; MALIK, Fayaz; ANDOTRA, Samar Singh; SETHI, Vijay Kumar; KAUR, Indu Pal; TANEJA, Subhash Chandra; QAZI, Ghulam Nabi; SINGH, Jaswant. A triterpenediol from *Boswellia serrata* induces apoptosis through both the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in human leukemia HL-60 cells. **Apoptosis**, [*S. l.*], v. 12, n. 10, p. 1911–1926, 2007. DOI: 10.1007/s10495-007-0105-5.

BHUTIA, Sujit K. et al. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death. **Pharmacological Research**, [*S. l.*], v. 144, n. January, p. 8–18, 2019. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.04.001.

BLOMME, Bram; VAN STEENKISTE, Christophe; CALLEWAERT, Nico; VAN VLIERBERGHE, Hans. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. **Journal of Hepatology**, [*S. l.*], v. 50, n. 3, p. 592–603, 2009.

BONNARDEL, François; MARIETHOZ, Julien; SALENTIN, Sebastian; ROBIN, Xavier; SCHROEDER, Michael; PEREZ, Serge; LISACEK, Frcrossed D. Signdcrosse.; IMBERTY, Anne. Unilectin3d, a database of carbohydrate binding proteins with curated information on 3D structures and interacting ligands. **Nucleic Acids Research**, [*S. l.*], v. 47, n. D1, p. D1236–D1244, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky832.

BORREBAECK, C. A. K.; MATTIASON, B.; NORDBRING-HERTZ, B. Isolation and partial characterization of a carbohydrate-binding protein from a nematode-trapping fungus. **Journal of Bacteriology**, [*S. l.*], v. 159, n. 1, p. 53–56, 1984. DOI: 10.1128/jb.159.1.53-56.1984.

BOWLES, Dianna J.; MARCUS, Susan E.; PAPPIN, Darryl J. C.; FINDLAY, John B. C.; ELIOPOULOS, Elias; MAYCOX, Peter R.; BRUGESS, Jeremy. Posttranslational Processing of Concanavalin A precursors in Jackbean Cotyledons. **Journal of Cell Biology**, [*S. l.*], v. 102, n. April, p. 1284–1297, 1986.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, [*S. l.*], v. 119, n. 3091, p. 1954, 1954.

BRENTNALL, Matthew; RODRIGUEZ-MENOCAL, Luis; DE GUEVARA, Rebeka Ladron; CEPERO, Enrique; BOISE, Lawrence H. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Cell Biology**, [*S. l.*], v. 14, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1471-2121-14-32. Disponível em: BMC Cell Biology.

CAGNONI, Alejandro J. et al. Crystal structures of peanut lectin in the presence of synthetic β -N- And β -S-galactosides disclose evidence for the recognition of different glycomimetic ligands. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**, [*S. l.*], v. 76, p. 1080–1091, 2020. DOI: 10.1107/S2059798320012371.

CAHOREAU, Claire; KLETT, Danièle; COMBARNOUS, Yves. **Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors** *Frontiers in*

Endocrinology, 2015. DOI: 10.3389/fendo.2015.00026.

CANDY, Laure; PEUMANS, Willy J.; MENU-BOUAOUICHE, Laurence; ASTOUL, Corinne Houllès; VAN DAMME, Jo; VAN DAMME, Els J. M.; ERARD, Monique; ROUGÉ, Pierre. The Gal/GalNAc-specific lectin from the plant pathogenic basidiomycete *Rhizoctonia solani* is a member of the ricin-B family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 282, n. 3, p. 655–661, 2001. DOI: 10.1006/bbrc.2001.4626.

CANDY, Laure; VAN DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; MENU-BOUAOUICHE, Laurence; ERARD, Monique; ROUGÉ, Pierre. Structural and functional characterization of the GalNAc/Gal-specific lectin from the phytopathogenic ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 308, n. 2, p. 396–402, 2003. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)01406-2.

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. DOI: 10.2174/1389203013381152.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). Isolation, Characterization and Behavior during Germination. **Biologia Plantarum**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 113–120, 1984.

CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; LOSSIO, C. F.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OLIVEIRA, M. V.; SILVA, M. T. L.; LEAL, R. B.; NASCIMENTO, K. S. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 134, 2019. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100.

CAVADA, Benildo S.; PINTO-JUNIOR, Vanir R.; OSTERNE, Vinicius J. S.; NASCIMENTO, Kyria 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, 2019. b. DOI: 10.3390/ijms20010030.

CAVADA, Benildo Sousa et al. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lind. seeds. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 11, p. 74–80, 1996.

CAVADA, Benildo Sousa 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023>.

CAVADA, Benildo Sousa; OSTERNE, Vinicius Jose Silva; PINTO-JUNIOR, Vanir Reis; NASCIMENTO, Kyria Santiago. 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, 2019. c. DOI: 10.2174/1389203720666190104123210.

CHANDRA, Joya; SAMALI, Afshin; ORRENIUS, Sten. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 29, n. 3–4, p. 323–333, 2000. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00302-6.

CHANG, Chih Peng; YANG, Ming Cheng; LIU, Hsiao Sheng; LIN, Yee Shin; LEI, Huan Yao. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 286–296, 2007. DOI: 10.1002/hep.21509.

CHAVEZ, Veronica; GARCIA, Alexis; YNALVEZ, Ruby. Plant lectin-induced apoptosis in cancer cells: a mini-review. **BIOS**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 79–89, 2018.

CHUANG, Gwo Yu; BOYINGTON, Jeffrey C.; GORDON JOYCE, M.; ZHU, Jiang; NABEL, Gary J.; KWONG, Peter D.; GEORGIEV, Ivelin. Computational prediction of N-linked glycosylation incorporating structural properties and patterns. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 28, n. 17, p. 2249–2255, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts426.

CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 647–656, 2002. DOI: 10.1038/nrc883.

DA MOTA, Mariana Flavia; BENFICA, Polyana Lopes; BATISTA, Aline Carvalho; MARTINS, Frederico Severino; DE PAULA, José Realino; VALADARES, Marize Campos. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 139, n. 2, p. 319–329, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2011.04.055. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.055>.

DAM, Tarun K.; CAVADA, Benildo S.; GRANGEIRO, Thalles B.; SANTOS, Claudia F.; CECCATTO, Vania M.; DE SOUSA, Flavia A. M.; OSCARSON, Stefan; BREWER, C. Fred. Thermodynamic binding studies of lectins from the diocleinae subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 21, p. 16119–16126, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M000670200.

DAM, Tarun K.; CAVADA, Benildo S.; GRANGEIRO, Thalles B.; SANTOS, Claudia F.; DE SOUSA, Flavia A. M.; OSCARSON, Stefan; BREWER, C. Fred. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 20, p. 12082–12088, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.20.12082.

DAM, Tarun K.; OSCARSON, Stefan; BREWER, C. Fred. Thermodynamics of binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea grandiflora* lectin. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 49, p. 32812–32817, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32812. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.49.32812>.

DAN, Xiuli; LIU, Wenlong; NG, Tzi Bun. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Medicinal Research Reviews**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 221–247, 2016. DOI: 10.1002/med.21363. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.21363>.

DE MEJÍA, Elvira González; PRISECARU, Valentin 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. DOI: 10.1080/10408390591034445.

DE OLIVEIRA SILVA, Flávio et al. Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 346, n. 2, p. 237–244, 2011. DOI: 10.1007/s00441-011-1239-x.

DE SOUZA, Gustavo A. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 961–972, 2003. DOI: 10.1093/glycob/cwg115.

DEL SOL, Francisca Gallego; CAVADA, Benildo S.; CALVETE, Juan 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. DOI: 10.1016/j.jsb.2006.08.014.

DELATORRE, Plinio et al. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC structural biology**, England, v. 7, p. 52, 2007. DOI: 10.1186/1472-6807-7-52.

DELATORRE, Plínio et al. Mass spectrometry and X-ray diffraction analysis of two crystal types of *Dioclea virgata* lectin: An antinociceptive protein candidate to structure/function analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 164, n. 6, p. 741–754, 2011. DOI: 10.1007/s12010-011-9170-x.

DENNIS, James W.; GRANOVSKY, Maria; WARREN, Charles E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1473, n. 1, p. 21–34, 1999. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00167-1.

DO NASCIMENTO, Antônia Sâmia F. et al. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 25, n. 12, p. 657–664, 2012. DOI: 10.1002/jmr.2222.

ECHEVERRIA, Begona; SERNA, Sonia; ACHILLI, Silvia; VIVÈS, Corinne; PHAM, Julie; THÉPAUT, Michel; HOKKE, Cornelis H.; FIESCHI, Franck; REICHARDT, Niels Christian. Chemoenzymatic Synthesis of N-glycan Positional Isomers and Evidence for Branch Selective Binding by Monoclonal Antibodies and Human C-type Lectin Receptors. **ACS Chemical Biology**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 2269–2279, 2018. DOI: 10.1021/acscchembio.8b00431.

EDELMAN, GERALD M.; WANG, JOHN L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 253, n. 9, p. 3016–3022, 1978.

EHRlich, Paul. Experimentelle untersuchungen über immunität. I. Ueber ricin. **DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift**, [S. l.], v. 17, n. 32, p. 976–979, 1891.

ELFSTRAND, M. Über blutkörperchenagglutinierende Eiweisse. **Görberdorfer Veröffentlichungen a. Band I**, [S. l.], p. 1–159, 1898.

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 66, n. 4, p.

486–501, 2010. DOI: 10.1107/S0907444910007493.

ERNST, Beat; HART, Gerald Warren; SINAÏ, Pierre. **Carbohydrates in chemistry and biology**. [s.l.] : Wiley Blackwell, 2008.

EWING, Brent; GREEN, Phil. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Research**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 186–194, 1998. DOI: 10.1101/gr.8.3.186. Disponível em: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.8.3.186>.

FAHEINA-MARTINS, Glaucia V.; DA SILVEIRA, Alethéia Lacerda; CAVALCANTI, Bruno C.; RAMOS, Márcio V.; MORAES, Manoel O.; PESSOA, Cláudia; ARAÚJO, Demetrius A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.06.017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>.

FALASCA, A.; FRANCESCHI, C.; ROSSI, C. A.; STIRPE, F. Purification and partial characterization of a mitogenic lectin from *Vicia sativa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 577, p. 71–81, 1979. DOI: 10.1016/0005-2795(79)90009-6.

FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 69–78, 2010. DOI: 10.1007/s10863-010-9268-9.

FERRIGE, A. G.; SEDDON, M. J.; GREEN, B. N.; JARVIS, S. A.; SKILLING, J.; STAUNTON, J. Disentangling electrospray spectra with maximum entropy. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 6, n. 11, p. 707–711, 1992. DOI: 10.1002/rcm.1290061115. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.1290061115>.

FERRIZ-MARTINEZ, Roberto A.; TORRES-ARTEGA, Iovanna C.; BLANCO-LABRA, Alejandro; GARCIA-GASCA, Teresa. The role of plant lectins in cancer treatment. **New Approaches in the Treatment of Cancer**. Nova Science, [S. l.], p. 71–89, 2010. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303603.

FUKUMORI, Tomoharu; TAKENAKA, Yukinori; OKA, Natsuo; YOSHII, Tadashi; HOGAN, Victor; INOHARA, Hidenori; KANAYAMA, Hiro Omi; KIM, Hyeong Reh Choi; RAZ, Avraham. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Research**, [S. l.], v. 64, n. 10, p. 3376–3379, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0336.

GABIUS, H. J. **The sugar code : fundamentals of glycosciences**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2011.

GABIUS, Hans Joachim. The sugar code: Why glycans are so important. **BioSystems**, [S. l.], v. 164, p. 102–111, 2018. DOI: 10.1016/j.biosystems.2017.07.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.07.003>.

GABIUS, Hans Joachim; ANDRÉ, Sabine; JIMÉNEZ-BARBERO, Jesús; ROMERO, Antonio; SOLÍS, Dolores. From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 298–313, 2011. DOI: 10.1016/j.tibs.2011.01.005.

GABIUS, Hans Joachim; ROTH, Jürgen. An introduction to the sugar code. **Histochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 111–117, 2017. DOI: 10.1007/s00418-016-1521-9.

GABOR, Franz; KLAUSEGGER, Ursula; WIRTH, Michael. The Interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, [S. l.], v. 221, n. 1–2, p. 35–47, 2001. DOI: 10.1016/S0378-5173(01)00650-0.

GADELHA, Carlos Alberto De Almeida et al. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 152, n. 3, p. 185–194, 2005. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.07.012.

GAO, Wenjie; JIANG, Yanhua; ZHANG, Zhihui; ZHANG, Yifang; LIU, Yanyan; ZHOU, Yanhong; LIU, Xin. A facile method for cellular N-glycomic profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **RSC Advances**, [S. l.], v. 7, n. 57, p. 35687–35693, 2017. DOI: 10.1039/c7ra06071h.

GHAZARIAN, Haïke; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, [S. l.], v. 113, n. 3, p. 236–247, 2011. DOI: 10.1016/j.acthis.2010.02.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>.

GOMES, B. S. et al. Antifungal activity of lectin against yeasts of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 770–778, 2012.

GONDIM, Ana C. S. et al. The potent anti-cancer activity of *Dioclea lasiocarpa* lectin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [S. l.], v. 175, n. March, p. 179–189, 2017. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2017.07.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.07.011>.

GONDIM, Ana C. S. et al. Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. **Medicinal Chemistry Communications**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 390–398, 2019. DOI: 10.1039/c8md00508g.

GOUET, Patrice; COURCELLE, Emmanuel; STUART, David I.; MÉTOZ, Frédéric. ESPrict: Analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 305–308, 1999. DOI: 10.1093/bioinformatics/15.4.305.

GRANGEIRO, Thalles B.; SCHRIEFER, Albert; CALVETE, Juan J.; RAIDA, Manfred; URBANKE, Claus; BARRAL-NETTO, Manoel. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 48, p. 43–48, 1997.

GRANT, Oliver C.; MONTGOMERY, David; ITO, Keigo; WOODS, Robert J. 3D Models of glycosylated SARS-CoV-2 spike protein suggest challenges and opportunities for vaccine development. **bioRxiv**, [S. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.030445>.

GRIFFITH, Thomas; STOKES, Brittany; KUCABA, Tamara; EAREL JR., James; VANOOSTEN, Rebecca; BRINCKS, Erik; NORIAN, Lyse. TRAIL Gene Therapy: From Preclinical Development to Clinical Application. **Current Gene Therapy**, [S. l.], v. 9, n. 1, p.

9–19, 2009. DOI: 10.2174/156652309787354612.

HANSEN, John-Erik; NIELSEN, Carsten M.; NIELSEN, Claus; HEEGAARD, P.; MATHIESEN, L. R.; NIELSEN, J. O. Correlation between carbohydrate structures on the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 and HIV-2 and syncytium inhibition with lectins. **AIDS (London, England)**, [*S. l.*], v. 3, n. 10, p. 635–641, 1989.

HAPNER, K. D.; JERMYN, M. A. Lectin activity in Acacia seeds. **Annals of Botany**, [*S. l.*], v. 48, n. 1, p. 89–91, 1981.

HEALEY, Adam; FURTADO, Agnelo; COOPER, Tal; HENRY, Robert J. Protocol : a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. [*S. l.*], v. 10, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1186/1746-4811-10-21.

HELLIN, Heinrich. **Der giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut**. 1891. Universität zu Dorpat, [*S. l.*], 1891.

HENDRICKSON, O. D.; ZHERDEV, A. V. Analytical Application of Lectins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [*S. l.*], v. 48, n. 4, p. 279–292, 2018. DOI: 10.1080/10408347.2017.1422965.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, [*S. l.*], v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000. DOI: 10.1038/35037710.

HENNET, Thierry; CABALZAR, Jürg. Congenital disorders of glycosylation: A concise chart of glycocalyx dysfunction. **Trends in Biochemical Sciences**, [*S. l.*], v. 40, n. 7, p. 377–384, 2015. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.03.002.

HIRABAYASHI, Jun. Lectin-based structural glycomics: Glycoproteomics and glycan profiling. **Glycoconjugate Journal**, [*S. l.*], v. 21, n. 1–2, p. 35–40, 2004. DOI: 10.1023/B:GLYC.0000043745.18988.a1.

HO, CS; LAM, CWK; CHAN, MHM; CHEUNG, RCK; LAW, LK; LIT, LCW; NG, KF; SUEN, MWM; TAI, HL. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. **The Clinical Biochemist Reviews**, [*S. l.*], v. 24, n. 1, p. 3–12, 2003. DOI: 10.1002/9781118307816.ch34.

HORVAT, Tomislav; DEŽELJIN, Martina; REDŽIĆ, Irma; BARIŠIĆ, Darko; HERAK BOSNAR, Maja; LAUC, Gordan; ZOLDOŠ, Vlatka. Reversibility of Membrane N-Glycome of HeLa Cells upon Treatment with Epigenetic Inhibitors. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0054672.

HORVAT, Tomislav; MUŽINIĆ, Ana; BARIŠIĆ, Darko; BOSNAR, Maja Herak; ZOLDOŠ, Vlatka. Epigenetic modulation of the HeLa cell membrane N-glycome. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [*S. l.*], v. 1820, n. 9, p. 1412–1419, 2012. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.12.007.

HOWARD, Irmgard K.; SAGE, Harvey J. Isolation and Characterization of a Phytohemagglutinin from the Lentil. **Biochemistry**, [*S. l.*], v. 8, n. 6, p. 2436–2441, 1969. DOI: 10.1021/bi00834a028.

HU, Shen; WONG, David T. Lectin microarray. **Proteomics - Clinical Applications**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 148–154, 2009. DOI: 10.1002/prca.200800153. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/prca.200800153>.

HUNG, Chih-Hung; LEE, Ming-Chih; LEE, Te-Chang; LIN, Jung-Yaw. Primary Structure of Three Distinct Isoabrinins Determined by cDNA Sequencing. Conservation and Significance. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 229, p. 263–267, 1993.

ISLAM, Barira; KHAN, Asad U. Lectins: to combat infections. **Protein Purification**, [S. l.], v. 1, p. 167–188, 2012.

ITAKURA, Yoko; NAKAMURA-TSURUTA, Sachiko; KOMINAMI, Junko; TATENO, Hiroaki; HIRABAYASHI, Jun. Sugar-binding profiles of chitin-binding lectins from the hevein family: A comprehensive study. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 6, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061160.

JONES, G.; WILLETT, Peter; GLEN, Robert; LEACH, Andrew R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 267, n. 3, p. 727–48, 1997. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0897. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9126849>.

JONIC, Slavica; VÉNIEN-BRYAN, Catherine. Protein structure determination by electron cryo-microscopy. **Current Opinion in Pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 636–642, 2009. DOI: 10.1016/j.coph.2009.04.006.

KABIR, Syed Rashel; NABI, Md Mahamodun; HAQUE, Ariful; ZAMAN, Rokon Uz; MAHMUD, Zahid Hayat; REZA, Md Abu. Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest in vivo in mice. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 20, n. 14, p. 1288–1296, 2013. DOI: 10.1016/j.phymed.2013.06.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.010>.

KABIR, Syed Rashel; RAHMAN, Md Musfikur; AMIN, Ruhul; KARIM, Md Rezaul; MAHMUD, Zahid Hayat; HOSSAIN, M. Tofazzal. Solanum tuberosum lectin inhibits Ehrlich ascites carcinoma cells growth by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest. **Tumor Biology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 8437–8444, 2016. DOI: 10.1007/s13277-015-4735-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-015-4735-x>.

KAILEMIA, Muchena J.; PARK, Dayoung; LEBRILLA, Carlito B. Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 409, n. 2, p. 395–410, 2017. DOI: 10.1007/s00216-016-9880-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9880-6>.

KANG, R.; ZEH, H. J.; LOTZE, M. T.; TANG, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 571–580, 2011. DOI: 10.1038/cdd.2010.191. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.191>.

KARHI, Kimmo K.; GAHMBERG, Carl G. Isolation and characterization of the blood group A-specific lectin from *Vicia cracca*. **Biochimica et Biophysica Acta**, [S. l.], v. 622, p. 337–343, 1980.

KATTLA, J. J.; STRUWE, W. B.; DOHERTY, M.; ADAMCZYK, B.; SALDOVA, R.; RUDD, P. M.; CAMPBELL, M. P. **Protein Glycosylation**. Second Edition. [s.l.] : Elsevier B.V., 2011. a. v. 3 DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0>.

KATTLA, J. J.; STRUWE, W. B.; DOHERTY, M.; ADAMCZYK, B.; SALDOVA, R.; RUDD, P. M.; CAMPBELL, M. P. Protein Glycosylation. *In: Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Second Edition. [s.l.] : Elsevier B.V., 2011. b. v. 3p. 467–486. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00230-0>.

KEYAERTS, Els; VIJGEN, Leen; PANNECOUQUE, Christophe; VAN DAMME, Els; PEUMANS, Willy; EGBERINK, Herman; BALZARINI, Jan; VAN RANST, Marc. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. **Antiviral Research**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 179–187, 2007. DOI: 10.1016/j.antiviral.2007.03.003.

KILPATRICK, David C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00308-2.

KOPITZ, Jürgen. Lipid glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. **Histochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 175–198, 2017. DOI: 10.1007/s00418-016-1518-4.

KÕRESSAAR, Triinu; LEPAMETS, Maarja; KAPLINSKI, Lauris; RAIME, Kairi; ANDRESON, Reidar; REMM, Mairo. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. **Bioinformatics (Oxford, England)**, England, v. 34, n. 11, p. 1937–1938, 2018. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty036.

KRAINOVA, N. A. et al. Evaluation of Potential Reference Genes for qRT-PCR Data Normalization in Evaluation of Potential Reference Genes for qRT – PCR Data Normalization in HeLa Cells. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S. l.], v. 49, n. 9, p. 743–749, 2013. DOI: 10.1134/S0003683813090032.

KRISSINEL, Evgeny; HENRICK, Kim. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 372, p. 774–797, 2007. Disponível em: http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html.

KUMAR, Sudhir; STECHER, Glen; LI, Michael; KNYAZ, Christina; TAMURA, Koichiro. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

KUO, Joe Chin Hun; GANDHI, Jay G.; ZIA, Roseanna N.; PASZEK, Matthew J. Physical biology of the cancer cell glycocalyx. **Nature Physics**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 658–669, 2018. DOI: 10.1038/s41567-018-0186-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41567-018-0186-9>.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, p. 680–685, 1970.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061242.

LEAL, Rodrigo Bairy et al. Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 114, p. 64–76, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080>.

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

LEI, Huan Yao; CHANG, Chih Peng. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. **Autophagy**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 402–404, 2007. DOI: 10.4161/auto.4280.

LEI, Huan Yao; CHANG, Chih Peng. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–12, 2009. DOI: 10.1186/1423-0127-16-10.

LEVINE, Beth; KLIONSKY, Daniel J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 463–477, 2004. DOI: 10.1016/S1534-5807(04)00099-1.

LI, Wen wen; YU, Jia ying; XU, Huai long; BAO, Jin ku. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 414, n. 2, p. 282–286, 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.072. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.072>.

LI, Yi; YANG, Xiaojing; NGUYEN, Alana H. T.; BROCKHAUSEN, Inka. Requirement of N-glycosylation for the secretion of recombinant extracellular domain of human Fas in HeLa cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1625–1636, 2007. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.04.002.

LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: When glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 976–986, 2013. DOI: 10.1038/cdd.2013.50.

LIS, Halina; SHARON, Nathan. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical Reviews (Washington, DC, United States)**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 637–674, 1998. DOI: 10.1021/cr940413g. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/cr940413g>.

LIU, Bo; LI, Chun yang; BIAN, He jiao; MIN, Ming wei; CHEN, Long fei; BAO, Jin ku. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 482, n. 1–2, p.

1–6, 2009. DOI: 10.1016/j.abb.2008.12.003. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.003>.

LIU, Zhen; LIU, Bo; ZHANG, Zi Ting; ZHOU, Ting Ting; BIAN, He Jiao; MIN, Ming Wei; LIU, Yan Hong; CHEN, Jing; BAO, Jin Ku. A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 15, n. 10, p. 867–875, 2008. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.02.025.

LOH, So Hee; PARK, Jin Yeon; CHO, Eun Hee; NAH, Seung Yeol; KANG, Young Sun. Animal lectins: Potential receptors for ginseng polysaccharides. **Journal of Ginseng Research**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1016/j.jgr.2015.12.006. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgr.2015.12.006>.

LOPES, F. C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; GOMES, J. C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 935–941, 2005. DOI: 10.1590/S0100-879X2005000600016.

LORIS, Remy. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1572, n. 2–3, p. 198–208, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00309-4.

LORIS, Remy; HAMELRYCK, Thomas; BOUCKAERT, Julie; WYNS, Lode. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [S. l.], v. 1383, n. 1, p. 9–36, 1998. DOI: 10.1016/S0167-4838(97)00182-9.

LOSSIO, Claudia F. et al. Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 105, p. 272–280, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038>.

LYU, Su-Yun; PARK, Won-Bong. Effects of Korean Mistletoe Lectin *Viscum album coloratum* on Proliferation and Cytokine Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and T-Lymphocytes. **Archives of Pharmacal Research**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1252–1264, 2007. DOI: 10.1007/bf02980266. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02980266>.

MACEDO, Maria Lúcia Rodrigues; FREIRE, Maria das Graças Machado; DA SILVA, Maria Barbosa Reis; COELHO, Luana Cassandra Breitenbach Barroso. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, [S. l.], v. 146, n. 4, p. 486–498, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.01.020.

MAIURI, M. Chiara; ZALCKVAR, Einat; KIMCHI, Adi; KROEMER, Guido. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 9, p. 741–752, 2007. DOI: 10.1038/nrm2239.

MALEROD, Helle; GRAHAM, Robert L. J.; SWEREDOSKI, Michael J.; HESS, Sonja. Comprehensive profiling of N-linked glycosylation sites in HeLa cells using hydrazide

enrichment. **Journal of Proteome Research**, [*S. l.*], v. 12, n. 1, p. 248–259, 2013. DOI: 10.1021/pr300859k.

MANIMALA, Joseph C.; ROACH, Timothy A.; LI, Zhitao; GILDERSLEEVE, Jeffrey C. High-throughput carbohydrate microarray analysis of 24 lectins. **Angewandte Chemie - International Edition**, [*S. l.*], v. 45, n. 22, p. 3607–3610, 2006. DOI: 10.1002/anie.200600591.

MANN, Karlheinz; FARIAS, Creuza M. S. A.; GALLEGO, Francisca; SOL, Del; SANTOS, Claudia F.; GRANGEIRO, Thalles B.; NAGANO, Celso S.; CAVADA, Benildo S.; CALVETE, Juan J. The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. [*S. l.*], v. 4422, p. 4414–4422, 2001.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Engineering, Design and Selection**, [*S. l.*], v. 14, n. 10, p. 735–745, 2001. DOI: 10.1093/protein/14.10.735. Disponível em: <https://academic.oup.com/peds/article-lookup/doi/10.1093/protein/14.10.735>.

MARTIN, S. J. Caspases: Executioners of Apoptosis. **Pathobiology of Human Disease: A Dynamic Encyclopedia of Disease Mechanisms**, [*S. l.*], v. 16, p. 145–152, 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-386456-7.01411-8.

MAUPIN, Kevin A.; LIDEN, Daniel; HAAB, Brian B. The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier motif analysis of glycan array data. **Glycobiology**, [*S. l.*], v. 22, n. 1, p. 160–169, 2012. DOI: 10.1093/glycob/cwr128.

MELGAREJO, Luz Marina; VEGA, Nohora; PÉREZ, Gerardo. Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. ex Benth. seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [*S. l.*], v. 17, n. 3, p. 315–324, 2005. DOI: 10.1590/S1677-04202005000300006.

MICHEAU, Olivier. Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand signaling by glycosylation. **International Journal of Molecular Sciences**, [*S. l.*], v. 19, n. 3, 2018. DOI: 10.3390/ijms19030715.

MIN, W.; DUNN, A J.; JONES, D. H. Non-glycosylated recombinant pro-concanavalin A is active without polypeptide cleavage. **The EMBO Journal**, [*S. l.*], v. 11, n. 4, p. 1303–7, 1992. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05174.x. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=556578&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

MIZUSHIMA, Noboru; LEVINE, Beth; CUERVO, Ana Maria; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, [*S. l.*], v. 451, n. 7182, p. 1069–1075, 2008. DOI: 10.1038/nature06639.

MOLCHANOVA, Valentina; CHIKALOVETS, Irina; CHERNIKOV, Oleg; BELOGORTSEVA, Natalia; LI, Wei; WANG, Jian Hua; YANG, Dong Yun Ou; ZHENG, Yong Tang; LUKYANOV, Pavel. A new lectin from the sea worm *Serpula vermicularis*: Isolation, characterization and anti-HIV activity. **Comparative Biochemistry and**

Physiology - C Toxicology and Pharmacology, [*S. l.*], v. 145, n. 2, p. 184–193, 2007. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.11.012.

MOREIRA, R. A.; BARROS, Ana C. H.; STEWART, James C.; PUSZTAI, Arpad. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). **Planta**, [*S. l.*], v. 158, p. 63–69, 1983. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)80431-8.

MOREMEN, Kelley W.; TIEMEYER, Michael; NAIRN, Alison V. Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [*S. l.*], v. 13, n. 7, p. 448–462, 2012. DOI: 10.1038/nrm3383.

MORGAN, Walter T. J.; WATKINS, Winifred M. Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. **Glycoconjugate Journal**, [*S. l.*], v. 17, n. 7–9, p. 501–530, 2000. DOI: 10.1023/A:1011014307683.

MUNRO, Sean. **Essentials of Glycobiology Trends in Cell Biology**, 2000. DOI: 10.1016/s0962-8924(00)01855-9.

MURAILLE, Eric; PAJAK, Bernard; URBAIN, Jacques; LEO, Oberdan. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: Interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cellular Immunology**, [*S. l.*], v. 191, n. 1, p. 1–9, 1999. DOI: 10.1006/cimm.1998.1401.

MURPHY, L. A.; GOLDSTEIN, I. J. Five α D galactopyranosyl binding isolectins from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. **Journal of Biological Chemistry**, [*S. l.*], v. 252, n. 13, p. 4739–4742, 1977. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)40221-3. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40221-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40221-3).

NAGANO, Celso S.; CALVETE, Juan J.; BARETTINO, Domingo; PEREZ, Alicia; CAVADA, Benildo S.; SANZ, Libia. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **The Biochemical Journal**, England, v. 409, n. 2, p. 417–428, 2008. DOI: 10.1042/BJ20070942.

NAIK, Sanjay; RAWAT, Ravindra Singh; KHANDAI, Santripti; KUMAR, Mukesh; JENA, Sidhartha S.; VIJAYALAKSHMI, Mookambeswaran A.; KUMAR, Sanjit. Biochemical characterisation of lectin from Indian hyacinth plant bulbs with potential inhibitory action against human cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [*S. l.*], v. 105, p. 1349–1356, 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.170. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.170>.

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, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.203.

NASCIMENTO, Ana Paula 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.106>.

NASCIMENTO, K. S.; SILVA, M. T. L.; OLIVEIRA, M. V.; LOSSIO, C. F.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; CAVADA, B. S. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 144, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.117.

NASCIMENTO, Kyria Santiago et al. Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 92, n. August, p. 79–89, 2017. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.09.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.014>.

NASH, Franklin David. Reduction in Pathogenic Load in Overwhelming Viremia. **International Journal of Complementary & Alternative Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 1–2, 2016. DOI: 10.15406/ijcam.2016.04.00098.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. [s.l.] : Artmed Editora, 2018.

NONIS, Samuel G.; HAYWOOD, Joel; SCHMIDBERGER, Jason W.; MACKIE, Emily R. R.; SOARES DA COSTA, Tatiana P.; BOND, Charles S.; MYLNE, Joshua S. Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. **The Plant Cell**, [S. l.], n. July, 2021. DOI: 10.1093/plcell/koab130.

OHIZUMI, Yuki et al. Mannose-binding lectin from yam (*Dioscorea batatas*) tubers with insecticidal properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 2896–2902, 2009. DOI: 10.1021/jf8040269.

OLIVEIRA-FERRER, Leticia; LEGLER, Karen; MILDE-LANGOSCH, Karin. Role of protein glycosylation in cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, [S. l.], v. 44, p. 141–152, 2017. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.03.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.002>.

OLIVEIRA, Carla; NICOLAU, Ana; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, Lucília. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on Hela cervical cancer cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/568932.

OLIVEIRA, Carolina Turatti; KUNZ, Daniele; SILVA, Carlos Peres; MACEDO, Maria Lígia Rodrigues. Entomotoxic properties of *Dioclea violacea* lectin and its effects on digestive enzymes of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 81, p. 81–89, 2015. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2015.07.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.007>.

OLSNES, Sjur. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 361–370, 2004. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.05.003.

OLSNES, Sjur; KOZLOV, Jurij V. Ricin. **Toxicon**, [S. l.], v. 39, n. 11, p. 1723–1728, 2001. DOI: 10.1016/S0041-0101(01)00158-1.

OPARKA, Monika; WALCZAK, Jarosław; MALINSKA, Dominika; OPPEN, Lisanne M. P.

- E. Van; SZCZEPANOWSKA, Joanna; KOOPMAN, Werner J. H.; WIECKOWSKI, Mariusz R. Quantifying ROS levels using CM-H 2 DCFDA and HyPer. **Methods**, [S. l.], v. 109, p. 3–11, 2016. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.06.008.
- OSTERNE, Vinicius Jose Silva 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.020.
- OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- PALHARINI, Julio G. et al. Eutirucallin: A lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. APR, p. 1–13, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00136.
- PANDA, Prashanta Kumar et al. Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. **Life Sciences**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 27–35, 2014. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.07.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.004>.
- PAOLI, Paolo; GIANNONI, Elisa; CHIARUGI, Paola. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1833, n. 12, p. 3481–3498, 2013. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>.
- PAYNE, Ed; SMITH, Matt; CRATTY, Carol. FBI confirms letters to Obama, others contained ricin. **CNN**, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://edition.cnn.com/2013/04/18/politics/tainted-letter-intercepted/index.html>.
- PEIXOTO, Andreia; RELVAS-SANTOS, Marta; AZEVEDO, Rita; LARA SANTOS, Lúcio; FERREIRA, José Alexandre. Protein glycosylation and tumor microenvironment alterations driving cancer hallmarks. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 9, p. 1–24, 2019. DOI: 10.3389/fonc.2019.00380.
- PÉREZ, Gerardo. Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 30, n. 7, p. 843–853, 1998. DOI: 10.1016/S1357-2725(98)00045-4.
- PEREZ, Gerardo; PEREZ, Cecilia; SOUSA-CAVADA, Benildo; MOREIRA, Renato; RICHARDSON, Michael. Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Cavanalia maritima*. **Phytochemistry**, [S. l.], v. 30, n. 8, p. 2619–2621, 1991.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995. DOI: 10.1104/pp.109.2.347.
- PFAFFL, Michael W.; HORGAN, Graham W.; DEMPFFLE, Leo. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 30, n. 9, 2002. DOI:

10.1093/nar/30.9.e36.

PINHO, Salomé S.; REIS, Celso A. Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015. DOI: 10.1038/nrc3982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3982>.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. **Biochimie**, [S. l.], v. 135, 2017. a. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.02.002.

PINTO-JUNIOR, Vanir R. et al. Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* hook seeds with inflammatory activity. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 134–141, 2015. DOI: 10.1002/jmr.2512.

PINTO-JUNIOR, Vanir Reis 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. b. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.092.

PINTO, Vanir Reis et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 10857–10869, 2013. a. DOI: 10.3390/molecules180910857.

PINTO, Vanir Reis et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. **Molecules**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 10857–10869, 2013. b. DOI: 10.3390/molecules180910857.

POLITO, Letizia; BORTOLOTTI, Massimo; BATTELLI, Maria Giulia; CALAFATO, Giulia; BOLOGNESI, Andrea. Ricin: An ancient story for a timeless plant toxin. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 1–16, 2019. DOI: 10.3390/toxins11060324.

PRATT, Jonathan; ROY, René; ANNABI, Borhane. Concanavalin-A-induced autophagy biomarkers requires membrane type-1 matrix metalloproteinase intracellular signaling in glioblastoma cells. **Glycobiology**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 1245–1255, 2012. DOI: 10.1093/glycob/cws093.

RADOGNA, Flavia; DICATO, Mario; DIEDERICH, Marc. Cancer-type-specific crosstalk between autophagy, necroptosis and apoptosis as a pharmacological target. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 1–11, 2015. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.12.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.018>.

RAMOS, Marcio V.; CAVADA, Benildo S.; MAZARD, Anne Marie; ROUGÉ, Pierre. Interaction of diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 275–279, 2002. DOI: 10.1590/S0074-02762002000200025.

READ, Randy J. et al. A new generation of crystallographic validation tools for the Protein Data Bank. **Structure**, [S. l.], v. 19, n. 10, p. 1395–1412, 2011. DOI: 10.1016/j.str.2011.08.006.

ROUGE, Pierre; SOUSA-CAVADA, Benildo. Isolation and partial characterization of two isolectins from *Lathyrus ochrus* (L.) DC. seeds. **Plant Science Letters**, [S. l.], v. 37, p. 21–27, 1984. DOI: 10.1016/0304-4211(84)90197-4.

ROY, Bibhas; PATTANAIK, Arup K.; DAS, Joyjyoti; BHUTIA, Sujit K.; BEHERA, Birendra; SINGH, Prashant; MAITI, Tapas K. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 210, n. 1, p. 96–102, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.01.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.003>.

ROZWARSKI, Denise A.; SWAMI, Bale M.; BREWER, C. Fred; SACCHETTINI, James C. Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 49, p. 32818–32825, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32818. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.49.32818>.

RUDIGER, Harold; GABIUS, Hans-J. Plant lectins : Occurrence , biochemistry , functions and applications. [S. l.], p. 589–613, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

SANDVIG, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 251, n. 13, p. 3977–3984, 1976. DOI: 10.1016/s0021-9258(17)33344-6. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)33344-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)33344-6).

SANDVIG, Kirsten. Cell density affects the binding of the toxic lectin Abrin to HeLa cells in monolayers cultures. [S. l.], v. 89, n. 2, p. 233–236, 1978.

SANTIAGO, M. Q. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Journal of Molecular Recognition**, [S. l.], v. 27, n. 3, 2014. DOI: 10.1002/jmr.2340.

SARANYA, Jayaram; SHILPA, Ganesan; RAGHU, Kozhiparambil G.; PRIYA, Sulochana. Morus alba leaf lectin (MLL) sensitizes MCF-7 cells to anoikis by inhibiting fibronectin mediated integrin-FAK signaling through Ras and activation of P38 MAPK. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, n. FEB, p. 1–12, 2017. DOI: 10.3389/fphar.2017.00034.

SAUVION, Nicolas; NARDON, Christiane; FEBVAY, Gérard; GATEHOUSE, Angharad M. R.; RAHBÉ, Yvan. Binding of the insecticidal lectin Concanavalin A in pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) and induced effects on the structure of midgut epithelial cells. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 1137–1150, 2004. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2004.10.006.

SCHRÖDINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0**, 2015.

SHARON, Nathan. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 5, p. 2753–2764, 2007.

DOI: 10.1074/JBC.X600004200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/JBC.X600004200>.

SHARON, Nathan. Lectins: Past, present and future. **Biochemical Society Transactions**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1457–1460, 2008. DOI: 10.1042/BST0361457.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004. DOI: 10.1093/glycob/cwh122.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. **Lectins**. Second ed ed. [s.l.] : Springer, 2007.

SHEVCHENKO, Andrej; TOMAS, Henrik; HAVLI, Jan; OLSEN, Jesper V; MANN, Matthias. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2006.468. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nprot.2006.468>.

SHI, Zheng; CHEN, Jie; LI, Chun Yang; AN, Na; WANG, Zi Jie; YANG, Shu Lin; HUANG, Kai Feng; BAO, Jin Ku. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta Pharmacologica Sinica**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 248–256, 2014. DOI: 10.1038/aps.2013.151.

SILVA, Flávio de Oliveira et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014. a. DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.01.005.

SILVA, Flávio de Oliveira et al. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014. b. DOI: 10.1016/J.RVSC.2014.01.005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528814000290?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio. 2018.

SIMÕES, Rafael Conceição et al. Protein crystal content analysis by mass spectrometry and preliminary X-ray diffraction of a lectin from *Canavalia grandiflora* seeds with modulatory role in inflammation. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 811–818, 2012. DOI: 10.1002/rcm.6171.

SINA, Asmaa; PROULX-BONNEAU, Sébastien; ROY, Alain; POLIQUIN, Laurent; CAO, Jian; ANNABI, Borhane. The lectin concanavalin-A signals MT1-MMP catalytic independent induction of COX-2 through an IKK γ /NF- κ B-dependent pathway. **Journal of Cell Communication and Signaling**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 31–38, 2010. DOI: 10.1007/s12079-009-0084-0.

SINGH, Ram Sarup; THAKUR, Shivani Rani; BANSAL, Parveen. Algal lectins as promising biomolecules for biomedical research. **Critical Reviews in Microbiology**, [S. l.], v. 41, n. 1, p. 77–88, 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2013.798780.

SOUSA, Bruno L. et al. Structural characterization of a *Vatairea macrocarpa* lectin in complex with a tumor-associated antigen: A new tool for cancer research. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 72, p. 27–39, 2016. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.12.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.016>.

SOUZA, Maria A.; CARVALHO, Fernanda C.; RUAS, Luciana P.; RICCI-AZEVEDO, Rafael; ROQUE-BARREIRA, Maria Cristina. 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. DOI: 10.1007/s10719-012-9464-4.

SRINIVAS, Balaji Kyathegowdanadoddi; SHIVAMADHU, Madhu Chakkere; JAYARAMA, Shankar. Musa acuminata lectin exerts anti-cancer effects on HeLa and EAC cells via activation of caspase and inhibitions of Akt, Erk, and Jnk pathway expression and suppresses the neoangiogenesis in in-vivo models. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 166, p. 1173–1187, 2021. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.272. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.272>.

STILLMARK, Hermann. **Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiacacen**. 1888. University of Dorpat, [S. l.], 1888.

STRASSER, R.; ALTMANN, F.; MACH, L.; GLÖSSL, J.; STEINKELLNER, H. Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking β 1,2-linked xylose and core α 1,3-linked fucose. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 561, n. 1–3, p. 132–136, 2004. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00150-4.

STROH, C.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Death by a thousand cuts: An ever increasing list of caspase substrates. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 997–1000, 1998. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400451.

SUEN, Y. K.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M.; LEE, C. Y.; CHAN, C. W.; KONG, S. K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 369–377, 2000. DOI: 10.1023/A:1009691727077.

SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. Hematin and the peroxidase of fig sap. **Enzymologia**, [S. l.], v. 1, p. 133, 1936.

SUMNER, James B. the Globulins of the Jack Bean, *Canavalia ensiformis*. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 137–142, 1919. DOI: 10.1016/s0021-9258(18)86371-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)86371-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(18)86371-2).

SUMNER, James B. Note. The recrystallization of urease. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 97–98, 1926.

SUVARNA, Geetha; SHARMA, Bhagya B. An analogy of *Canavalia* lectins by molecular phylogenetic characterization. **Journal of Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 193–203, 2020. DOI: 10.1007/s42485-020-00041-y. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42485-020-00041-y>.

TAKAHASHI, Akiyuki; MASUDA, Atsushi; SUN, Mao; CENTONZE, Victoria E.; HERMAN, Brian. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). **Brain Research Bulletin**, [S. l.], v. 62, n. 6, p. 497–504, 2004. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2003.07.009.

TANIGUCHI, Naoyuki; KIZUKA, Yasuhiko. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. **Advances in Cancer Research**, [S. l.], v. 126, p. 11–51, 2015. DOI: 10.1016/bs.acr.2014.11.001.

TORQUATO, Mayara et al. Structural Characterization , Docking and Dynamics Simulations of *Canavalia bonariensis* Lectin. **Journal of Drug Design and Research**, [S. l.], v. 3, p. 1–8, 2016.

TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 533–551, 2020. DOI: 10.1007/s10719-020-09942-y.

TULLIS, Richard H.; DUFFIN, R. Paul; HANDLEY, Harold H.; SODHI, Puneet; MENON, Jeevan; JOYCE, James A.; KHER, Vijay. Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients. **Blood Purification**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 64–69, 2009. DOI: 10.1159/000167011.

TURIÁK, Lilla; SUGÁR, Simon; ÁCS, András; TÓTH, Gábor; GÖMÖRY, Ágnes; TELEKES, András; VÉKEY, Károly; DRAHOS, László. Site-specific N-glycosylation of HeLa cell glycoproteins. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-51428-x.

TWEEDALE, Geoffrey. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 311–315, 2002. DOI: 10.1038/nrc774.

UEMATSU, Jun et al. Legume lectins inhibit human parainfluenza virus type 2 infection by interfering with the entry. **Viruses**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 1104–1115, 2012. DOI: 10.3390/v4071104.

UNILECTIN. **UniLectin3D Curated Database**. 2021. Disponível em: <https://unilectin.eu/unilectin3D/>. Acesso em: 19 jun. 2021.

VAGIN, Alexei; TEPLYAKOV, Alexei. Molecular replacement with MOLREP. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 22–25, 2010. DOI: 10.1107/S0907444909042589.

VAN DAMME, E. J.; BRIKÉ, F.; WINTER, H. C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **European Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 236, n. 2, p. 419–27, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612611>.

VAN DAMME, Els J. M.; PEUMANS, Willy J.; BARRE, Annick; ROUGÉ, Pierre. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [S. l.], v. 17, n. June, p. 576–692, 1998.

VAN DAMME, Els J. M.; SMITH, David F.; CUMMINGS, Richard; PEUMANS, Willy J. Glycan arrays to decipher the specificity of plant lectins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 705, p. 757–767, 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419-7877-6_39.

VAN HOLLE, Sofie; VAN DAMME, Els J. M. Messages from the past: New insights in plant lectin evolution. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, n. January, p. 1–14, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00036.

VAN PARIJS, Jan; BROEKAERT, Willem F.; GOLDSTEIN, Irwin J.; PEUMANS, Willy J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, [S. l.], v. 183, n. 2, p. 258–264, 1991. DOI: 10.1007/BF00197797.

WAGNER, Klaus W. et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1070–1077, 2007. DOI: 10.1038/nm1627.

WALLACE, A. C.; LASKOWSKI, R. A.; THORNTON, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. **Protein Engineering**, England, v. 8, n. 2, p. 127–134, 1995. DOI: 10.1093/protein/8.2.127.

WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The Covalent Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. I. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragments F1 and F2. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 250, n. 4, p. 1490–1502, 1975.

WANG, Zhen; CHINOY, Zoeisha S.; AMBRE, Shailesh G.; PENG, Wenjie; MCBRIDE, Ryan; DE VRIES, Robert P.; GLUSHKA, John; PAULSON, James C.; BOONS, Geert Jan. A general strategy for the chemoenzymatic synthesis of asymmetrically branched N-glycans. **Science**, [S. l.], v. 341, n. 6144, p. 379–383, 2013. DOI: 10.1126/science.1236231.

WELTER, Priscilla Gomes. **Análise dos efeitos biológicos da lectina extraída de *Canavalia villosa* (Cvill) em linhagem de glioma C6 (*Rattus norvegicus*)**. 2018. Universidade Federal de Santa Catarina., [S. l.], 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/192274>.

WHO. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer). Acesso em: 27 maio. 2021.

WIEDERSCHAIN, G. Ya. Glycobiology: progress, problems, and perspectives. **Biochemistry**, [S. l.], v. 78, n. 7, p. 679–96, 2013. DOI: 10.1134/S0006297913070018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24010832>.

WINN, Martyn D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 235–242, 2011. DOI: 10.1107/S0907444910045749.

WOLIN, Ingrid A. V. et al. ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. **Biochimie**, [S. l.], v. 180, p. 186–204, 2021. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.11.003.

WONG, Jack Ho; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose / mannose / rhamnose-specific W c lectin from the knife bean *Canavalia gladiata*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 439, p. 91–98, 2005. DOI: 10.1016/j.abb.2005.05.004.

YAN, Qiaojuan; LI, Yanxia; JIANG, Zhengqiang; SUN, Yan; ZHU, Lifeng; DING, Zufeng. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 16, n. 6–7, p. 586–593, 2009. DOI: 10.1016/j.phymed.2008.12.024.

YANG, Qianwen; WANG, Ning; ZHANG, Jie; CHEN, Geng; XU, Hui; MENG, Qingguo; DU, Yuan; YANG, Xin; FAN, Huaying. In vitro and in silico evaluation of stereoselective effect of ginsenoside isomers on platelet P2Y12 receptor. **Phytomedicine**, [S. l.], v. 64, n. March, p. 152899, 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152899. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152899>.

YOUNG, N. Martin; WATSON, David C.; WILLIAMS, Ross E. Lectins and legume chemotaxonomy. Characterization of the N-acetyl-D-galactosamine specific lectin of *Bauhinia purpurea*. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 182, n. 2, p. 403–406, 1985. DOI: 10.1016/0014-5793(85)80342-2.

YURIEV, Elizabeth; RAMSLAND, Paul A. **Structural glycobiology**. [s.l.] : CRC Press, 2012.

ZHANG, Qi; MA, Cheng; CHIN, Lih Shen; LI, Lian. Integrative glycoproteomics reveals protein n-glycosylation aberrations and glycoproteomic network alterations in Alzheimer's disease. **Science Advances**, [S. l.], v. 6, n. 40, p. 1–19, 2020. DOI: 10.1126/sciadv.abc5802.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. In: **Evolving Genes and Proteins**. [s.l.] : Academic Press, 1965. p. 97–166. DOI: doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6.

ZUO, Zhenyu; FAN, Handong; WANG, Xue; ZHOU, Wei; LI, Lingling. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. **SpringerPlus**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1186/2193-1801-1-13.

APÊNDICE A - *CURRICULUM VITAE*

(Atualizado em: 17/06/2021)

Informações pessoais

Nome: Claudia Figueiredo Lossio

Data de nascimento: 11 de abril de 1989

Email: cflossio@gmail.com

Endereço: Rua Dr. Jose Lino, 262 apto 201. Fortaleza – CE. Brasil. CEP: 60175-426

Área de especialização: Biotechnology, Biochemistry and Protein chemistry

Educação

- 2010 – 2013 **Universidade Federal do Ceará & Iowa State University (Graduação sanduíche)**
Biotechnology
- 2014 – 2016 **Universidade Federal do Ceará**
Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais
- 2016 - 2021 **Universidade Federal do Ceará & Ghent University (joint PhD)**
Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais (UFC)
Orientadores:
Kyria Santiago do Nascimento
Benildo Sousa Cavada
Doctoral School of Bioscience Engineering: Biotechnology (Ugent)
Orientadora:
Els Van Damme

Publicações e apresentações

Atigos completos publicados em periódicos internacionais	23
Eventos científicos	10
Resumos apresentados em eventos	09
Patentes	3

Artigos completos publicados

1. B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, M.V. Oliveira, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, K.S. Nascimento, A review of Viciaeae lectins studies: End of the book or a story in the writing?, *Int. J. Biol. Macromol.* 181 (2021) 1104-1123. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.04.062.
2. B.S. Cavada, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, L.A.G. Souza, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, C. Correia-Neto, M.V. Oliveira, J.L.A. Correia, A.H.B. Neco, J.L.C. Domingos, W.P. Ferreira, G.A. Farias, K.S. Nascimento, Molecular dynamics and binding energy analysis of *Vatairea guianensis* lectin: a new tool for cancer studies, *J. Mol. Model.* 26 (2020). doi:10.1007/s00894-019-4281-3.
3. B.S. Cavada, V.J.S. Osterne, M.V. Oliveira, V.R. Pinto-Junior, M.T.L. Silva, A.U. Bari, L.D. Lima, C.F. Lossio, K.S. Nascimento, Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins, *Int. J. Biol. Macromol.* 154 (2020) 159-165. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.113.
4. K.S. Nascimento, M.T.L. Silva, M.V. Oliveira, C.F. Lossio, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, B.S. Cavada, Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe, *Int. J. Biol. Macromol.* 144 (2020). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.117.
5. B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, J.L.A. Correia, S.E.G. Correia, C.S. Nagano, M.V. Oliveira, L.D. Lima, A.P.M.S. Vital, R.B. Leal, K.S. Nascimento, A Diocleinae type II lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds specific to α -lactose/GalNAc, *Process Biochem.* 93 (2020) 104-114. doi:10.1016/j.procbio.2020.03.026.
6. B.S. Cavada, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, M.V. Oliveira, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, A.U. Bari, L.D. Lima, C.H.D. Souza-Filho, K.S. Nascimento, Comprehensive review on Caesalpinioideae lectins: From purification to biological activities, *Int. J. Biol. Macromol.* 162 (2020) 333-348. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.161.
7. B.S. Cavada, M.T.L. Silva, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, C.F. Lossio, J.C. Madeira, M.G. Pereira, R.B. Leal, W.P. Ferreira, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, Exploring the carbohydrate-binding ability of *Canavalia bonariensis* lectin in inflammation models, *J. Mol. Recognit.* 33 (2020). doi:10.1002/jmr.2870.
8. B.S. Cavada, A.U. Bari, V.R. Pinto-Junior, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, L.A.G. Souza, M.V. Oliveira, C.H.D. Souza-Filho, S.E.G. Correia, A.P.M.S. Vital, L.D. Lima, V.J.S. Osterne, K.S. Nascimento, 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, *Int. J. Biol. Macromol.* 145 (2020). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.102.
9. A.P.M. Nascimento, I.A.V. Wolin, P.G. Welter, I.A. Heinrich, A. Zanotto-Filho, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, M.T.L. Silva, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, R.B. Leal, Lectin from *Dioclea violacea* induces autophagy in U87 glioma cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 134 (2019). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.04.203.
10. B.S. Cavada, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, V.R. Pinto-Junior, M.V. Oliveira, M.T.L. Silva, R.B. Leal, K.S. Nascimento, One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review, *Int. J. Biol. Macromol.* 134 (2019). doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100.
11. B.S. Cavada, M.T.L. Silva, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, A.P.M. Nascimento, I.A.V. Wolin, I.A. Heinrich, C.A.S. Nobre, C.G. Moreira, C.F. Lossio, C.R.C. Rocha, J.L. Martins, K.S. Nascimento, R.B. Leal, *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular

- bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018). doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023.
12. B.S. Cavada, D.A. Araripe, I.B. Silva, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, A.H.B. Neco, E.P.P. Laranjeira, C.F. Lossio, J.L.A. Correia, A.F. Pires, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, Structural studies and nociceptive activity of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (nPELa), *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 236-246. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.174.
 13. A.H.B. Neco, V.R. Pinto-Junior, D.A. Araripe, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, C.A.S. Nobre, M.V. Oliveira, M.T.L. Silva, M.G.Q. Martins, J.B. Cajazeiras, G.F.O. Marques, D.R. Costa, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from *Centrolobium microchaete* seeds, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 124-133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.166.
 14. A.S. de Oliveira, C.F. Lóssio, A.J. Rangel, M.G.Q. Martins, F.E.P. do Nascimento, M.L.L. de Andrade, B.S. Cavada, S.R. Lacerda, K.S. do Nascimento, Detection, purification and characterization of a lectin from freshwater green algae *Spirogyra* spp, *An. Acad. Bras. Cienc.* 89 (2017). doi:10.1590/0001-3765201720160150.
 15. D.A. Araripe, V.R. Pinto-Junior, A.H.B. Neco, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, A.F. Pires, C.F. Lossio, M.G.Q. Martins, J.L.A. Correia, R.G. Benevides, R.B. Leal, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, 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.* 102 (2017) 323-330. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.03.193.
 16. V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, M.Q. Santiago, C.F. Lossio, C.S. Nagano, C.R.C. Rocha, J.C.F. Nascimento, F.L.F. Nascimento, I.B. Silva, A.S. Oliveira, J.L.A. Correia, R.B. Leal, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, K.S. Nascimento, Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein, *Biochimie.* 135 (2017). doi:10.1016/j.biochi.2017.02.002.
 17. V.R. Pinto-Junior, M.Q. Santiago, C.B. Nobre, V.J.S. Osterne, R.B. Leal, J.B. Cajazeiras, C.F. Lossio, B.A.M. Rocha, M.G.Q. Martins, C.A.S. Nobre, M.T.L. Silva, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Crystal structure of *Pisum arvense* seed lectin (PAL) and characterization of its interaction with carbohydrates by molecular docking and dynamics, *Arch. Biochem. Biophys.* 630 (2017). doi:10.1016/j.abb.2017.07.013.
 18. C.F. Lossio, C.G. Moreira, R.M.F. Amorim, C.S. Nobre, M.T.L. Silva, C.C. Neto, V.R. Pinto-Junior, I.B. Silva, J. Campos, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, K.S. Nascimento, Lectin from *Canavalia villosa* seeds: A glucose/mannose-specific protein and a new tool for inflammation studies, *Int. J. Biol. Macromol.* 105 (2017). doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.038.
 19. K.S. Nascimento, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, F.W.V. Martins, A.P.M. Nascimento, I.A.V. Wolin, I.A. Heinrich, M.G.Q. Martins, M.T.L. Silva, C.F. Lossio, C.R.C. Rocha, R.B. Leal, B.S. Cavada, Structural analysis of *Dioclea lasiocarpa* lectin: A C6 cells apoptosis-inducing protein, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 92 (2017). doi:10.1016/j.biocel.2017.09.014.
 20. A.M.S. Assreuy, L. De Paula Pereira, G.F.O. Marques, C.C. Neto, C.F. Lóssio, V.J. Da Silva Osterne, K.S. Do Nascimento, B.S. Cavada, Stimulation of leukocyte migration and nitric oxide release into rat peritoneal cavity by *Canavalia* lectins: Molecular and structural insights, *Curr. Top. Pharmacol.* 21 (2017).
 21. A.C. Almeida, V.J. Da Silva Osterne, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, J.C. Silva-Filho, C.F. Lossio, F.L.F. Nascimento, R.P.H. Almeida, C.S. Teixeira, R.B. Leal, P.

- Delatorre, B.A.M. Rocha, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 596 (2016) 73-83. doi:10.1016/j.abb.2016.03.001.
22. A.C. Alves, M.A. Vasconcelos, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, V.J. Silva Osterne, C.F. Lossio, P.H. Souza Ferreira Bringel, R.R. Castro, C.S. Nagano, P. Delatorre, L.A.G. Souza, K.S. Nascimento, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, A novel vasorelaxant lectin purified from seeds of *Clathrotropis nitida*: Partial characterization and immobilization in chitosan beads, *Arch. Biochem. Biophys.* 588 (2015). doi:10.1016/j.abb.2015.10.020.
23. M.Q. Santiago, C.C.F. Leitão, F.N. Pereira-Junior, V.R. Pinto-Junior, V.J.S. Osterne, C.F. Lossio, J.B. Cajazeiras, H.C. Silva, F.V.S. Arruda, L.P. Pereira, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, B.S. Cavada, Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams, *J. Mol. Recognit.* 27 (2014) 117-123. doi:10.1002/jmr.2340.

Experiência profissional

2017 – atual Tecnóloga – formação - Biotecnologia
Universidade Federal do Ceará