



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

MAYARA QUEIROZ DE SANTIAGO

ANÁLISE ESTRUTURAL DA LECTINA DE *Dioclea lasiocarpa*:
UMA PROTEÍNA INDUTORA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE GLIOMA DA
LINHAGEM C6

FORTALEZA

2021

MAYARA QUEIROZ DE SANTIAGO

ANÁLISE ESTRUTURAL DA LECTINA DE *Dioclea lasiocarpa*:
UMA PROTEÍNA INDUTORA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE GLIOMA DA
LINHAGEM C6

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientador: Prof. Dr. Vinícius José da Silva Osterne.

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)

- S226a Santiago, Mayara Queiroz de.
Análise estrutural da lectina de *Dioclea lasiocarpa*: : uma proteína indutora de apoptose em células de glioma da linhagem C6 / Mayara Queiroz de Santiago. – 2021.
98 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. Vinícius José da Silva Osterne.
1. Lectina. 2. *Dioclea lasiocarpa*. 3. Estrutura cristalográfica. 4. Docking molecular. 5. Glioma. I.
Título.

CDD 660.6

MAYARA QUEIROZ DE SANTIAGO

ANÁLISE ESTRUTURAL DA LECTINA DE *Dioclea lasiocarpa*:
UMA PROTEÍNA INDUTORA DE APOPTOSE EM CÉLULAS DE GLIOMA DA
LINHAGEM C6

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Vinícius José da Silva Osterne (Coorientador)
Ghent University

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

Prof. Dr. Eder Almeida Freire
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

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

Prof. Dra. Maria Luciana Lira de Andrade
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

A Deus.

Aos meus pais, Cláudia e Zélio.

Às minhas irmãs, Cibele e Larissa.

Aos meus avós, Soledade e Pedro.

Ao meu parceiro de vida, Vanir Junior.

Aos meus colegas de profissão.

À sociedade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de forma especial, à minha orientadora, Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento, e ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, por terem me recebido em seu laboratório desde a iniciação científica e terem me orientado neste trabalho e em minha carreira acadêmica, sempre acreditando em meu potencial.

Aos amigos e grandes incentivadores do BioMol-Lab.

Aos meus pais, Cláudia e Zélio, por serem o meu alicerce, e em especial à minha mãe pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões, não só profissionais, mas pessoais. Sem você eu não seria o que sou hoje, Mãe!

À minha avó, Soledade, que além de avó é uma segunda mãe e me dá todo apoio e segurança sempre que eu necessito.

Às minhas irmãs, Cibele e Larissa, por todo apoio e carinho.

À minha madrinha Neuma Frota Madeira, minha terceira mãe, por tudo que você é e representa em minha vida, um Anjo da guarda.

Ao meu avô, por todo apoio.

Ao meu companheiro de trabalho e de vida Vanir Reis Pinto Júnior pelo carinho, compreensão, apoio e, principalmente, por seu amor. Parte do que sou hoje profissionalmente devo a você, pois juntos nós construímos o que somos. Te amo!

Agradeço à UFC, CNPq e à Funcap pelo apoio e fomento desta pesquisa.

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

“A experiência é o nome que damos aos nossos erros.”

Oscar Wilde

RESUMO

As lectinas são proteínas de múltiplos domínios com capacidade de reconhecer carboidratos de forma específica além de interagir com moléculas de outras classes, tais como compostos hidrofóbicos ou metabólitos secundários. A caracterização estrutural dessas moléculas é crucial para entender sua função e atividade nos organismos e sistemas. Uma área com elevado potencial de aplicação para as lectinas é a cancerologia visto que a maioria das células cancerígenas exibem alterações nos padrões de glicosilação e as lectinas podem ser capazes de reconhecer essas alterações. Neste trabalho, a lectina isolada da semente de *Dioclea lasiocarpa*, DLL, teve sua estrutura cristalográfica determinada e caracterizada, também foi avaliada quanto à possibilidade de interação com diversos carboidratos por *docking* molecular. O potencial antiglioma da lectina foi avaliado frente às células de glioma da linhagem C6. Os resultados obtidos evidenciaram um alto grau de similaridade da DLL com outras lectinas isoladas de leguminosas da mesma subtribo, apresentando um motivo de ligação do tipo *jellyroll* (β -sanduíche) e um sítio de ligação à metais estabilizando o domínio de reconhecimento a carboidratos. DLL demonstrou interações diferenciais com carboidratos, variando conforme o tipo de ligação glicosídica presente nos ligantes. A molécula elucidada apresentou, como atividade biológica, uma redução da viabilidade celular em células cancerosas da linhagem C6 e demonstrou forte atividade antiglioma por mecanismos que envolvem a ativação de caspases 3. Foi possível concluir que a molécula alvo deste trabalho reconhece carboidratos presentes em células de glioma e se apresenta como uma candidata promissora a prosseguir nos testes de diagnóstico e terapia alternativa para mitigar a resistência ao glioma, tumor bem conhecido por ser resistente à indução da morte celular.

Palavras-chave: Lectina; *Dioclea lasiocarpa*; estrutura cristalográfica; *docking* molecular; glioma.

ABSTRACT

Lectins are multidomain proteins with the ability to recognize carbohydrates in a specific way, in addition to interacting with molecules from other classes, such as hydrophobic compounds or secondary metabolites. Structural characterization of these molecules is crucial to understanding their function and activity in organisms and systems. An area with high potential of application for lectins is cancerology since most cancer cells exhibit alterations in glycosylation patterns and lectins may be able to recognize these alterations. In this work, the lectin isolated from the seed of *Dioclea lasiocarpa*, DLL, had its crystallographic structure determined and characterized, and it was also evaluated for the possibility of interaction with different carbohydrates by molecular docking. Lectin antiglioma potential was evaluated against C6 lineage glioma cells. The results obtained evidenced a high degree of similarity of DLL with other lectins isolated from legumes of the same subtribe, presenting a jellyroll-type binding motif (β -sandwich) and a metal binding site stabilizing the carbohydrate recognition domain. DLL demonstrated differential interactions with carbohydrates, varying according to the type of glycosidic bond present in the ligands. The elucidated molecule presented, as biological activity, a reduction in cell viability in cancer cells of the C6 lineage and showed strong antiglioma activity by mechanisms involving the activation of caspases 3. It was possible to conclude that the target molecule of this work recognizes carbohydrates present in cells of glioma and presents itself as a promising candidate to proceed in diagnostic tests and alternative therapy to mitigate resistance to glioma, a tumor well known to be resistant to cell death induction.

Keywords: Lectin; *Dioclea lasiocarpa*; crystal structure; molecular docking; glioma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Classificação estrutural de lectinas vegetais..... 27
- Figura 2 – (A) Família da lectina de *Agaricus bisporus* (PDB 1Y2T); (B) Família das lectinas com domínio de Amaranantina (lectina de *Amaranthus caudatus*, PDB 1JLY) (C) Família das lectinas relacionadas à quitinases classe V (lectina de *Robinia pseudocacia*, PDB 4URI); (D) Família das lectinas com domínio de Cianovirina (lectina de *Nostoc ellipsosporum*, PDB 3GXY); (E) Família da lectina de *Euonymus europaeus* (lectina modelada de *Euonymus europaeus*); (F) Família da lectina de *Galanthus nivalis* (lectina de *Galanthus nivalis*, PDB 1MSA); (G) Família das lectinas com domínio relacionado à Heveína (lectina de *Hevea brasiliensis*, PDB 1Q9B); (H) Família das lectinas relacionados à Jacalina (Jacalina, PDB 1UGW); (I) Família das lectinas de leguminosas (lectina de *Canavalia brasiliensis*, PDB 1AZD); (I) Família da lectina de *Nicotiana tabacum* (Nictaba modelada); (J) Família das lectinas com domínio B de Ricina (lectina de *Ricinus communis*, PDB 1RZO)..... 29
- Figura 3 – (A) Estrutura terciária do monômero da lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) (PDB: 6CJ9). A estrutura proteica está em representação *cartoon* em verde e as duas esferas correspondem aos metais, Ca²⁺ (verde) e Mn²⁺ (roxa). Superfície da molécula esta destacada em cinza claro; (B) Diagrama esquemático da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas; (CRD - *carbohydrate recognition domain*, MBS – *metal binding site*)..... 35
- Figura 4 – Representação do processo de permutação circular em lectinas de leguminosas..... 41
- Figura 5 – Representação da estrutura de glicanos..... 55
- Figura 6 – A) Estrutura geral do monômero de DLL complexada com X-man na representação em cartoon. As esferas representam o íon de cálcio em cinza e o íon de manganês em roxo. O ligante está representado em forma de bastão com carbonos coloridos em verde; B) Estrutura geral de DLL.

- Tetramero complexado com X-man. Monômeros representados em cartoon vermelho. As esferas representam íons de cálcio (em cinza) e íons de manganês (em roxo). A molécula X-man está em representação bastões com carbonos coloridos em verde..... 61
- Figura 7 – Sítio de ligação da DLL. A) Representação do sítio de ligação a metais da DLL na vizinhança do domínio de reconhecimento de carboidratos; B) sítio de ligação de metal DLL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) contornado em 3σ para Ca^{2+} e Mn^{2+} ; C) CRD do DLL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) e omite a representação do mapa de 3σ em torno de X-man. As esferas representam o íon de cálcio (em cinza) e o íon de manganês (em roxo), enquanto as pequenas esferas representam as moléculas de água (em vermelho). A molécula X-man está em uma representação em bastão com carbonos coloridos em amarelo e os traços azuis representam os contatos polares..... 62
- Figura 8 – Representação por LIGPLOT de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e coordenação em torno de A) Ca^{2+} , B) Mn^{2+} and C) X-man..... 63
- Figura 9 – Complexos de DLL com *N*-glicanos. A proteína está representada por carbonos vermelhos e superfície cinza e os glicanos estão em representados bastões com carbonos em cinza claro..... 65
- Figura 10 – O tratamento com DLL altera a viabilidade e morfologia das células de glioma C6. As células de glioma C6 foram expostas ao veículo (HEPES; controle) ou DLL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguido de análise de viabilidade e morfologia celular. A) é uma imagem representativa de quatro experimentos independentes realizados em triplicata e mostra a morfologia celular, avaliada por microscopia óptica, em resposta ao veículo (controle) ou exposição DLL (24 e 48 h). As células foram visualizadas por um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido (10X). B) e C) mostram a viabilidade celular medida pelo ensaio MTT 24 h e 48 h após o tratamento com DLL, respectivamente. Os dados são expressos como porcentagem do controle (célula tratada com veículo; considerada 100%), e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes

realizados em triplicata. **** p <0,0001 em comparação com o controle..... 66

Figura 11 – DLL aumenta a atividade da caspase 3 induzindo a apoptose celular. O gráfico demonstra a atividade Caspase 3 6 h após o tratamento com veículo (NC) ou DLL nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 µg / mL. O controle positivo (CP) foi realizado com estaurosporina (2 µg/mL). Os dados são expressos em porcentagem do controle e os valores são apresentados como média ± SEM de três experimentos independentes. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, em comparação com o controle..... 67

Figura 12 – DLL induz lesão da membrana celular do glioma C6. Células de glioma C6 foram incubadas com veículo (controle) ou DLL (10, 30, 50 e 100 µg / mL) por 24h ou 48h. As células foram coradas com Hoechst e iodeto de propídio (PI). Depois disso, as células foram visualizadas por um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido (ampliação de 20 x). A figura mostra uma imagem representativa e quantificação da coloração de PI 24 h (A) e 48 h (B) após o tratamento. As imagens são representativas de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação foi expressa como porcentagem de fluorescência de PI / Hoechst, e os valores são apresentados como média ± SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. *** p <0,001 ou **** p <0,0001, em comparação com o controle..... 68

Figura 13 – O DLL melhora a detecção de organelas vesiculares ácidas (AVO) em células de glioma C6. A figura mostra imagens representativas e quantificação da coloração com laranja de acridina de células de glioma C6 após incubação com veículo (controle) ou DLL (10, 30, 50 e 100µg / mL) por 24 h (A) e 48 h (B). Cromatina (CR) e organelas de vesículas ácidas (AVO) foram identificadas como coloração verde e vermelha, respectivamente. As células AVO- positivas (vermelhas) representam autofagia, e a sobreposição de AVO e CR é apresentada como CR + AVO. As células foram visualizadas por um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido (ampliação de 20x). As imagens são representativas de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação foi

expressa como uma porcentagem de AVO / CR, e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * p <0,1, *** p <0,001 e ***** p <0,0001, em comparação com o controle..... 70

Figura 14 – Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de DLL (Gondim et al., 2017) com lectinas de sementes de Diocleinae: *Dioclea virgata* (DvirL, 98% de similaridade), *Dioclea guianensis* (DguiL, 96%), *Dioclea rostrata* (DRL, 95%) , *Dioclea sclerocarpa* (DSL, 95%), *Dioclea wilsonii* (DWL, 94%) e *Dioclea reflexa* (DrfL, 93%). Os símbolos são os seguintes: hélices 310 (η), cadeias β (β), voltas β (TT), resíduos de ligação de açúcar (diamante) e resíduos de ligação de metal (quadrados)..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Interfaces conhecidas em estruturas de lectinas de leguminosas.....	36
Tabela 2 – Parâmetros da coleta de dados, refinamento e qualidade.....	59
Tabela 3 – Interações de Van der Waals e contatos polares entre DLL e X-man.....	62
Tabela 4 – Interações da DLL com carboidratos.....	64
Tabela 5 – Interações de DLL com <i>N</i> -glicanos.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína quinase
Asn	Aminoácido asparagina
CA125	Antígeno de carcinoma 125
CEA	Antígeno carcinoembrionário
ConA	Concanavalina A - lectina isolada das sementes <i>Canavalia ensiformis</i>
CRD	Domínio de reconhecimento à carboidrato (do inglês <i>carbohydrate recognition domain</i>)
DLL	Lectina isolada de sementes de <i>Dioclea lasiocarpa</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
GalNAc	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GALNT2	<i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferase 2
GBM	Glioblastoma multiforme (tipo de câncer cerebral)
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglucosamina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
Man	Manose
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MBS	Sítio de ligação à metal (do inglês <i>metal binding site</i>)
mTORC1	Alvo mecanístico do complexo 1 da rapamicina
MUC1	Mucina 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
P13K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PHA	Fitohemaglutinina - lectina isolada de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PI3K/Akt/mTOR	Via de sinalização intracelular importante na regulação do ciclo celular
Pro	Aminoácido prolina
PSA	Antígeno Prostático Específico (do inglês de <i>Prostate-Specific Antigens</i>)
PTEN	Gene supressor de tumor homólogo da fosfatase e tensina
RE	Retículo endoplasmático
Sephadex	Gel de dextrano reticulado usado para cromatografia de filtração em gel
Ser	Aminoácido serina
SLea	Antígeno sialil Lewis A
SLex	Antígeno sialil Lewis X

SNC	Sistema nervoso central
STn	Antígeno sialil-Tn
Thr	Aminoácido treonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Glicosilações e o câncer.....	18
1.2	Glioma.....	22
1.3	Lectinas.....	23
1.3.1	<i>Histórico de Lectinas.....</i>	23
1.3.2	<i>Classificação das lectinas vegetais.....</i>	26
1.3.2.1	<i>Com base na localização subcelular.....</i>	26
1.3.2.2	<i>Com base na estrutura molecular.....</i>	27
1.3.2.3	<i>Com base na sequência.....</i>	28
1.3.2.4	<i>Com base na abundância.....</i>	28
1.3.3	<i>Famílias de lectinas de plantas.....</i>	29
1.3.3.1	<i>Aglutinina de Agaricus bisporus.....</i>	30
1.3.3.2	<i>Domínio de lectina Euonymus europaeus.....</i>	30
1.3.3.3	<i>Aglutinina de Galanthus nivalis.....</i>	31
1.3.3.4	<i>Domínio relacionado à Heveína.....</i>	31
1.3.3.5	<i>Domínio relacionado à Jacalina.....</i>	32
1.3.3.6	<i>Domínio das lectinas das leguminosas.....</i>	32
1.3.3.7	<i>Domínio LysM.....</i>	33
1.3.3.8	<i>Aglutinina de Nicotiana tabacum.....</i>	33
1.3.3.9	<i>Domínio da ricina-B.....</i>	33
1.3.4	<i>Lectinas de leguminosas.....</i>	34
1.3.5	<i>Atividades biológicas de lectinas de leguminosas.....</i>	37
1.3.6	<i>Lectinas da subtribo Diocleinae.....</i>	39
1.3.7	<i>Atividades biológicas de lectinas da subtribo Diocleinae.....</i>	45
1.3.8	<i>Atividade citotóxica de lectinas da subtribo Diocleinae.....</i>	49
1.4	<i>Dioclea lasiocarpa Mart. e a lectina DLL.....</i>	50
2	OBJETIVOS	52
2.1	Objetivo geral.....	52
2.2	Objetivos específicos.....	52
3	METODOLOGIA	53
3.1	Purificação da lectina DLL.....	53

3.2	Ensaio de cristalização.....	53
3.3	Coleta de dados de raios X.....	54
3.4	Determinação e refinamento da estrutura.....	54
3.5	<i>Docking</i> molecular.....	54
3.6	Cultura de células e tratamento com lectina.....	56
3.7	Ensaio MTT.....	56
3.8	Microscopia de luz.....	57
3.9	Ensaio Caspase 3.....	57
3.10	Ensaio com laranja de acridina.....	57
3.11	Ensaio do iodeto de propídio.....	58
3.12	Análise estatística.....	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Análise estrutural geral.....	59
4.2	<i>Docking</i> molecular.....	63
4.3	Atividade antiglioma.....	66
5	DISCUSSÃO	71
5.1	Estrutura de DLL e <i>docking</i> molecular.....	71
5.2	Atividade antiglioma.....	74
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Nomeamos de glicoma o repertório completo de glicoconjugados compostos de cadeias de carboidratos ou glicanos que estão covalentemente ligados às moléculas de lipídios ou proteínas. Os glicoconjugados são formados por meio de um processo denominado glicosilação e podem diferir em suas sequências de glicanos, nas conexões entre eles e no comprimento (REILY et al., 2019).

A glicobiologia estuda a estrutura, biossíntese e biologia dos glicanos, que são amplamente distribuídos na natureza. A maioria dos glicanos são encontrados nas superfícies mais externas das macromoléculas celulares e secretadas e são notavelmente diversos. Glicanos simples e altamente dinâmicos ligados a proteínas também são abundantes no núcleo e no citoplasma das células, onde exercem efeitos regulatórios. De fato, além de formarem características estruturais importantes, os componentes dos açúcares dos glicoconjugados modulam ou mediam uma ampla variedade de funções em estados fisiológicos e fisiopatológicos (VARKI, 2017).

Uma característica universal das células cancerígenas é a alteração dos padrões de glicosilação. Isso afeta os processos angiogênicos, as propriedades adesivas e favorece a invasão tumoral, ajudando a distrair a resposta imune dos indivíduos (LI et al., 2011b; COMPAGNO et al., 2014).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é um grande grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células anormais que se iniciam em qualquer órgão ou tecido do corpo e atingem além de seus limites habituais, invadindo partes adjacentes ou propagando-se para outros órgãos. Esse último processo, dito metástase, é o que mantém o câncer na segunda posição como a causa de mortes no mundo.

Os casos de cânceres continuam a crescer globalmente exercendo uma enorme pressão física, psicológica e financeira sobre os indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde. Em países onde os sistemas de saúde são operantes, as taxas de sobrevivência são bem melhores graças à detecção precoce e ao tratamento de qualidade. Nos países subdesenvolvidos, os sistemas de saúde são menos preparados para lidar com essa realidade e um grande número de pacientes com câncer prosseguem sem acesso ao diagnóstico e tratamento em tempo hábil (CANCER - OMS, 2021).

Por isso, especialmente nesses países, o Brasil figura entre eles, são necessários estudos que envolvam a descoberta e aplicação de ferramentas capazes de detectar eficazmente esses tumores e gerar uma resposta rápida e acessível aos pacientes acometidos por essa

enfermidade, desafogando e/ou acelerando as demandas dos setores públicos e privados de saúde.

1.1 Glicosilações e o câncer

Os glicoconjugados são formados pela adição de açúcares à proteínas e lipídios (VARKI et al., 2015). Um grande número de açúcares naturais pode ser combinado para criar uma variedade de estruturas únicas de glicano em moléculas de lipídios e proteínas que modulam sua função.

Nas proteínas, as glicosilações ocorrem através da adição de glicanos ao átomo de nitrogênio (as *N*-glicosilações), ao átomo de oxigênio (as *O*-glicosilações), glicanos fosforilados, glicosaminoglicanos e âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) às estruturas de peptídeo, bem como C-manosilação do resíduo de triptofano (REILY et al., 2019). No presente trabalho, daremos atenção às glicosilações do tipo N e O (*N* e *O*-glicosilações).

Muitas proteínas são modificadas por *N*-glicosilação, que se refere à ligação de uma *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) ao átomo de nitrogênio da cadeia lateral da asparagina (Asn) por uma ligação β -1N. Estes glicoconjugados ligados a Asn contêm um núcleo GlcNAc₂-manose (Man)₃, ao qual um número variável de outros monossacarídeos podem ser adicionados ou removidos. Estas adições incluem, por exemplo, galactosilação, GlcNAcilação, sialilação e fucosilação e determinam se a estrutura final é classificada como um *N*-glicano *high* manose, um *N*-glicano híbrido ou um *N*-glicano complexo. *N*-glicanos são encontrados na maioria dos organismos vivos e têm um papel crucial na regulação de muitas funções intracelulares e extracelulares. As sequências de *N*-glicanos normalmente compartilham um núcleo comum, o Man α 1-6 (Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr, denominado MAN3, e podem ser classificados em três tipos: glicanos ricos em manose, glicanos complexos e híbridos. Para glicanos com alto teor de manose, apenas resíduos de manose são fixados ao núcleo para criar ramificações. *N*-glicanos do tipo complexo apresentam ramificações começando com GlcNAc seguido por resíduos de D-galactose em ligações β 1-4, caracterizando uma *N*-acetil-lactosamina (LacNAc) ligada ao núcleo MAN3. Várias glicoproteínas celulares apresentam cadeias poli-LacNAc em glicanos complexos, permitindo a inserção de porções glicosil específicas. Além disso, os ramos GalNAc β 1-4GlcNAc são comuns neste tipo de glicano. Os *N*-glicanos híbridos apresentam características dos de alto teor de manose e os glicanos complexos, que podem apresentar ramificações apenas com frações manosil e outras contendo GlcNAc ou LacNAc (PINHO & REIS, 2015; SUN et al., 2012).

A glicosilação também pode ocorrer em aminoácidos com grupos funcionais hidroxila, que são na maioria das vezes serina (Ser) e treonina (Thr). Em humanos, os açúcares mais comuns ligados a Ser ou Thr são GlcNAc e *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (VARKI et al., 2017). Os glicanos ligados a GalNAc, frequentemente chamados de *O*-glicanos do tipo mucina, são abundantes em muitas glicoproteínas extracelulares e secretadas ((BENNETT et al., 2012, VASUDEVAN; HALTIWANGER, 2014), incluindo as mucinas, que formam uma interface crucial entre as células epiteliais e as superfícies mucosas externas do corpo. As mucinas são caracterizadas por um número variável de repetições em repetição com alto teor de prolina (Pro), Ser e Thr, o que cria muitos locais para *O*-glicosilações. Além disso, esses sítios muitas vezes têm núcleos de *O*-glicano estendidos que criam um tipo de substância gelatinosa que protegem a superfície celular de estresses externos, infecções microbianas e autorreconhecimento pelo sistema imunológico. Essa classe de *O*-glicanos contém seis principais estruturas básicas e é crucial, junto com outros glicoconjugados ligados ao oxigênio, para a classificação de antígenos de grupo sanguíneo. (VARKI, 2017).

O glicoma de uma célula reflete a sua expressão gênica única, que controla os níveis das enzimas responsáveis pelas glicoconjugações. Ao contrário do genoma, exoma ou proteoma, o glicoma é produzido de uma forma não padronizada e é intrinsecamente controlada em vários níveis pelo retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, desempenhando portanto um papel-chave na manutenção da saúde dos indivíduos e nos distúrbios que ocasionam as doenças (REILY et al., 2019).

Mudanças na glicosilação associadas à transformação oncogênica foram descritas pela primeira vez há mais de seis décadas. Essas observações foram reforçadas com o advento da tecnologia dos anticorpos monoclonais, que mostrou que os anticorpos específicos para tumores eram direcionados aos epítomos de carboidratos e, na maioria dos casos, eram antígenos oncofetais presentes em glicoproteínas e glicoesfingolípídeos tumorais (PINHO e REIS, 2015).

As células tumorais exibem uma ampla gama de alterações em suas glicosilação comparadas às células saudáveis. A glicosilação de proteínas aumenta a heterogeneidade molecular, bem como a diversidade funcional dentro das populações de células. Essa heterogeneidade ocorre porque as modificações aberrantes dos glicanos são específicas, isto é, agem em sítios e porções bem específicas das proteínas, das células e dos tecidos, e dependem de vários fatores intrínsecos.

Dois mecanismos principais subjacentes às alterações tumorais das estruturas de carboidratos foram postulados pela primeira vez por Hakomori e Kannagi, nos processos chamados de síntese incompleta e neossíntese (HAKOMORI E KANNAGI, 1983). O processo

de síntese incompleta, que ocorre com mais frequência nos estágios iniciais do câncer, é consequência do comprometimento da síntese normal de glicanos complexos expressos em células epiteliais normais, o que leva à biossíntese de estruturas truncadas, como observado por exemplo com o antígeno sialil-Tn (STn), expresso em câncer gastrointestinal e de mama (REIS, 2011; JULIEN et al., 2006). Por outro lado, a neossíntese, comumente observada em estágios avançados de câncer, refere-se à indução de expressão associada ao câncer de genes envolvidos na síntese de carboidratos determinantes, como observado nos antígenos sialil Lewis A (SLe^a) e X (SLe^x), observados em muitos tipos de cânceres (KANNAGI et al., 2008).

Em geral, uma mudança da via normal de glicosilação ocorre nas células cancerosas, levando a uma expressão alterada de glicanos devido a um ou vários fatores. Em primeiro lugar, a expressão alterada de glicanos pode ser atribuída à sub ou superexpressão de glicosiltransferases (CABANNES; VIVES; BÉDARD, 1997; KAKUGAWA et al., 2002; SCHIETINGER et al., 2006; KANNAGI et al., 2008; ARYAL; JU; CUMMINGS, 2010; HATANO et al., 2011; PINHO et al., 2012). Em segundo lugar, a expressão alterada de glicanos pode ocorrer devido a mudanças na conformação terciária da estrutura do peptídeo e da cadeia de glicano nascente. Terceiro, as diferenças podem resultar da variabilidade de vários substratos aceptores, bem como da disponibilidade e abundância dos doadores e cofatores (KUMAMOTO et al., 2001). Por fim, as alterações na expressão do glicano podem ser devido à expressão e localização das glicosiltransferases relevantes no complexo de Golgi (KUMAMOTO et al., 2001; KELLOKUMPU; SORMUNEN; KELLOKUMPU, 2002; GILL et al., 2010). A má localização e/ou alterações na atividade das glicosiltransferases resultam na síntese de estruturas nucleares imaturas de glicanos (MARCOS et al., 2004; BROCKHAUSEN, 2006).

Descobriu-se que, nas células cancerosas, os glicanos participam de vários processos biológicos fundamentais envolvidos no câncer, como inflamação, vigilância imunológica, adesão célula-célula (ZHAO et al., 2008; PINHO et al., 2009; PINHO et al., 2013), interação célula-matriz (ZHAO et al., 2008), sinalização inter e intracelular (TAKEUCHI; HALTIWANGER, 2014; BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011; DE-FREITAS-JUNIOR et al., 2013; GOMES et al., 2013) e metabolismo celular (DENNIS; NABI; DEMETRIOU, 2009; BASSAGAÑAS et al., 2014). Além disso, os glicanos alteram a conformação e a estrutura da proteína, modulando assim a atividade funcional das proteínas (HELENIUS, 2001; BASSAGAÑAS et al., 2014). Desvendar os significados biológicos das glicosilações diferenciais presentes em células cancerígenas podem contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares subjacentes à biologia do câncer.

Novas abordagens para o diagnóstico precoce, previsão de risco e tratamento do câncer são urgentemente demandados, e os glicanos podem ser uma fonte para o desenvolvimento de novos biomarcadores não invasivos. Alguns dos biomarcadores sorológicos mais utilizados clinicamente para diagnóstico de câncer e monitoramento da progressão maligna, bem como biomarcadores prognósticos de recorrência da doença, são glicoproteínas (LOCKER et al., 2006; REIS et al., 2010). Esses incluem biomarcadores proeminentes que são amplamente utilizados no diagnóstico de pacientes com câncer de próstata, avaliando o antígeno específico da próstata (PSA) (GILGUNN et al., 2013), câncer de ovário, com o antígeno de carcinoma 125 (CA125) (ZURAWSKI et al., 1988), câncer de cólon (SLe^a, CA19-9) (REIS et al., 2010; LOCKER et al., 2006) com o antígeno carcinoembrionário (CEA) (GOLDSTEIN; MITCHELL, 2005), câncer de mama, com a MUC1 aberrantemente glicosilada (EBELING et al., 2002; KUMPULAINEN; KESKIKURU; JOHANSSON, 2002), câncer gástrico (SLe^a, CA19-9) (REIS et al., 2010; LOCKER et al., 2006) e câncer pancreático (SLe^a, CA19-9) (SAFI, 1997).

Embora todos esses biomarcadores sorológicos tenham demonstrado uma glicosilações aberrantes no câncer (FUKUSHIMA et al., 2010; JANKOVIC; MILUTINOVIC, 2008; SAELAND et al., 2012) eles têm aplicação limitada devido à sua relativa baixa especificidade, impedindo seu uso para estratégias de rastreamento e potencial diagnóstico. A reduzida especificidade e sensibilidade desses ensaios para a detecção precoce de câncer levou a uma busca por novos biomarcadores com base na detecção e medição de glicofomas específicas de uma determinada proteína que poderia contribuir para o estabelecimento de um biomarcador com maior especificidade para detecção precoce de câncer ou para diagnóstico em um estágio pré-canceroso (PINHO; REIS, 2015).

Com o advento de novas tecnologias e novos métodos para análise de glicanos, muitos exemplos de glicanos aberrantes associados ao câncer foram descobertos (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012). A recente aplicação de edição precisa e estável de glicogênio em linhagens celulares de mamíferos combinada com abordagens de espectrometria de massa de alto rendimento contribuiu para a caracterização do *O*-glicoproteoma de células cancerosas, revelando novas informações biológicas e gerando possíveis biomarcadores de doenças (STEENTOFT et al., 2011; CAMPOS et al., 2015). Além disso, as tecnologias de plataforma de alto rendimento recentemente desenvolvidas permitiram ainda mais a análise de grandes coortes de amostras de uma maneira eficiente (ADAMCZYK; THARMALINGAM; RUDD, 2012; LAUC et al., 2010). Portanto, é provável que o direcionamento aos glicanos em combinação com a estrutura da proteína proporcione maior

desempenho diagnóstico e prognóstico, com sensibilidade e especificidade suficientes para aplicações clínicas.

Em resumo, o progresso impressionante na compreensão do papel dos glicanos no câncer nos últimos anos contribuiu para a descoberta deles como biomarcadores promissores, destacando sua aplicação no ambiente clínico como alvos atraentes para a medicina personalizada (DALZIEL et al., 2014).

Proteínas glicosiladas e outros glicoconjugados são importantes componentes das células, definindo e modulando vários processos fisiológicos essenciais em tecidos normais. Mecanismos genéticos, epigenéticos, metabólicos, inflamatórios e ambientais podem levar a modificações da glicosilação que impulsionam diversos processos biológicos no câncer. A compreensão da base molecular subjacente a essas modificações de glicanos contribuirá ainda mais para explicar as interações das células cancerígenas, as comunicações extracelulares e imunologia do câncer. Além disso, a rápida expansão tecnológica, com o emprego de células glicoprojetadas e plataformas modelos, permitirá o desenvolvimento de um campo de drogas relativamente inexplorado, tendo como base inibidores, antagonistas e moduladores das funções dos glicanos.

A combinação de uma quantidade crescente de dados glicômicos e glicoproteômicos e os avanços recentes em genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica terão um grande impacto na revelação de novos alvos e estratégias para o diagnóstico precoce, prognóstico, estratificação do paciente e melhoria tratamento do câncer (PINHO; REIS, 2015).

1.2 Glioma

O glioblastoma multiforme (GBM) é considerado o tumor cerebral maligno primário mais agressivo do sistema nervoso central (SNC) em adultos, com sobrevida média de 14,2 meses, apesar de alguns avanços na terapia nas últimas décadas (LOUIS et al., 2016; GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2020). Numerosas alterações genéticas, como mutações gênicas, deleções e ampliações, bem como heterogeneidade intratumoral, estão associadas à proliferação rápida e fenótipos altamente invasivos que levam à rápida progressão do tumor e ao mau prognóstico em gliomas de alto grau (LOUIS et al., 2016). Os fenótipos celulares observados em GBM demonstram uma conexão entre o gene mutado e a modificação das vias de sobrevivência das células-chave, incluindo as vias PI3K/PTEN-Akt-mTORC1 e MAPK (GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2020; PAWLOWSKA et al., 2018).

Foi sugerido que a superexpressão de *N*-acetilgalactosaminiltransferase 2 (GALNT2), enzima que regula a etapa inicial da *O*-glicosilação da mucina, facilita a característica maligna do glioma pela influência da *O*-glicosilação e fosforilação de EGFR e a subsequente diminuição da via PI3K/Akt/mTOR *in vitro* e *in vivo* (SUN et al., 2019). Além disso, foi demonstrado que as células cancerosas resistentes a drogas expressam tipicamente antígenos glicosilados distintos (FURUKAWA et al., 2015).

De modo geral, já é bem estabelecido que a alteração do glicano pode levar ao comprometimento da adesão célula-célula, ativação de vias de sinalização oncogênica, desregulação nos mecanismos de proliferação e morte celular, indução de fenótipos pró-metastáticos e desencadear quimiorresistência adaptativa (WEI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018).

Em relação à importância da glicosilação na fisiopatologia do câncer, o uso de moléculas capazes de reconhecer essas estruturas diferenciadas só tem chamado mais atenção nos últimos anos, com a disponibilidade de um número crescente de estudos caracterizando a estrutura das lectinas animais e vegetais. Esses fatos requerem o desenvolvimento de novos compostos antiglioma capazes de inibir as respostas de sobrevivência usando moléculas glicosiladas como alvos moleculares (GUIDOTTI; BRAMBILLA; ROSSI, 2020; FURUKAWA et al., 2015).

1.3 Lectinas

Por definição, as lectinas são proteínas de múltiplos domínios capazes de reconhecerem e se ligar, de modo específico, à carboidratos e moléculas de outras classes, tais como compostos hidrofóbicos ou metabólitos secundários. Essa capacidade de reconhecer carboidratos de forma específica é o que torna as lectinas uma classe de moléculas promissoras em estudos de elucidação de processos que envolvam a participação de glicoconjugados.

Neste tópico, daremos atenção ao histórico, classificação, divisão, estrutura e atividades biológicas disponíveis na literatura para compreender o que as tornaram moléculas únicas e porque carregam potencial de se tornarem ferramentas biotecnológicas.

1.3.1 Histórico de Lectinas

É possível considerar que o estudo de lectinas se iniciou no fim do século XIX com os primeiros relatos de lectinas de plantas, apesar de não existir esta classificação na época.

Desde então, pesquisadores ficaram intrigados com esse grupo específico de proteínas com capacidade de ligação à carboidratos. Considerado o ano que marcou o início da lectinologia, em 1888, Stillmark relatou uma proteína altamente tóxica das sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). A proteína, conhecida como "ricina", revelou atividade de hemaglutinação e mais tarde revelou-se a primeira lectina (POLITO et al., 2019). Desde a descoberta da ricina, nossos conhecimentos e ideias relacionados às lectinas e suas atividades biológicas têm evoluído constantemente de acordo com novas descobertas e novas tecnologias que se tornaram disponíveis.

Dez anos após o primeiro relatório sobre ricina, Elfstrand introduziu o termo "aglutinina" para descrever todas as proteínas que causam hemaglutinação ou aglutinação de glóbulos vermelhos (ELFSTRAND, 1898). No mesmo ano, Ehrlich descobriu alguns dos princípios fundamentais da imunologia usando doses subletais de ricina e abrina em modelos de camundongos, nomeadamente a especificidade da resposta imunológica, a existência de uma memória imunológica contra antígenos distintos e a capacidade da mãe de transferir anticorpos durante gravidez e através do leite. Landsteiner e Raubitschek descobriram que nem todas as proteínas aglutinantes isoladas de sementes de leguminosas (por exemplo, *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha), *Lens culinaris* (lentilha) e *Vicia sativa* (ervilhaca) são tóxicas (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919 Sumner relatou a purificação da Concanavalina A (ConA) das sementes de feijão de porco (*Canavalia ensiformis*) e descreveu a capacidade da ConA de aglutinar sangue ou células de levedura e precipitar glicogênio, amilopectinas e dextranos em solução, uma reação que pode ser inibida pela adição de sacarose (SUMNER, 1919; SUMNER; HOWELL, 1936). Vários anos depois, dois grupos de pesquisa independentes descobriram que a atividade de hemaglutinação de proteínas vegetais pode diferir significativamente dependendo do tipo de células sanguíneas (BOYD; REGUERA, 1949; MAKELA, 1957). Essa descoberta é considerada um marco na lectinologia, uma vez que finalmente permitiu desvendar como a aglomeração de células pelas lectinas pode ser alcançada. Watkins e Morgan (WATKINS; MORGAN, 1952) fizeram outra descoberta importante que mudou fundamentalmente a lectinologia e a compreensão das propriedades de hemaglutinação das proteínas. Eles conseguiram mostrar que a adição de açúcares específicos para cada tipo de eritrócito pode bloquear a aglutinação causada pelas lectinas. Desta forma, foi descoberto e comprovado que a atividade de aglutinação das lectinas se baseia no reconhecimento e na ligação de estruturas de carboidratos na superfície celular dos glóbulos vermelhos. Este estudo também revelou a presença de carboidratos na superfície celular, seu papel no reconhecimento celular e seu

potencial para serem usados como marcadores celulares. Logo depois, o termo hemaglutinina foi substituído pelo termo ‘lectina’ derivado do verbo latino ‘*legere*’, que se refere à capacidade da proteína ‘selecionar’ ou ‘escolher’ (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Em 1960, Nowell descobriu a atividade mitogênica de uma lectina chamada fitohemaglutinina (PHA) isolada de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960), e poucos anos depois foi demonstrado que a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) reconhece e aglutina preferencialmente células malignas (AUB; TIESLAU; LANKESTER, 1963; AUB; SANFORD; COTE, 1965). Esses relatórios destacaram a importância das propriedades de ligação de açúcar das lectinas, mas também ilustraram que a atividade da lectina se estende além da hemaglutinação das células. Agrawal e Goldstein introduziram a cromatografia de afinidade para purificação de lectina usando a propriedade de ConA de se ligar a dextranos, o principal componente das matrizes Sephadex (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965).

Na década de 1970, a sequência primária e a estrutura tridimensional de ConA foram resolvidas independentemente por dois grupos de pesquisa (EDELMAN et al., 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1976). A dobra tridimensional da aglutinina do gérmen de trigo (WGA) em complexo com seus ligantes demonstrou a diversidade estrutural entre as lectinas (WRIGHT, 1977). Os protocolos de purificação aprimorados disponíveis desde a década de 1970 e a introdução de tecnologias de DNA recombinante impulsionaram a pesquisa de lectinas e mudaram o foco para a caracterização molecular de lectinas e sequências de lectinas, a estrutura tridimensional e o papel biológico das proteínas de ligação a carboidratos (VAN DAMME, 2014). Em 1983 foi clonada a primeira sequência de lectina, em particular a lectina de soja (VODKIN; RHODES; GOLDBERG, 1983). A compreensão e o conceito de lectinas evoluíram gradualmente com o desenvolvimento do campo da lectinologia e o acúmulo de novas descobertas. Em 1980, Goldstein publicou a primeira definição que descreve as lectinas como “proteínas de ligação a carboidratos (ou glicoproteínas) de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitar glicoconjugados” (GOLDSTEIN et al., 1980). Esta definição exclui as lectinas monovalentes, as lectinas não aglutinantes, bem como as lectinas quiméricas (DIXON, 1981). Em 1988, Barondes (BARONDES, 1988) descreveu as lectinas como "proteínas de ligação a carboidratos diferentes de anticorpos ou enzimas", o que é um tanto contraditório com as primeiras descobertas sobre as lectinas, uma vez que a ricina é composta de um domínio de inativação de ribossomo com atividade enzimática ligada a uma ligação de carboidratos domínio (POLITO et al., 2019). A definição amplamente aceita no mundo científico hoje em dia foi publicada em 1995 por Peumans e Van Damme, e define lectinas como “todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico, que se liga

reversivelmente a um mono- ou oligossacarídeo específico” (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). De acordo com essa definição, a atividade de aglutinação não é mais um critério para a classificação de proteínas como lectinas. A presença de pelo menos um domínio que pode reconhecer especificamente e se ligar reversivelmente às estruturas de carboidratos, mas não alterar a porção do carboidrato, é a característica mais importante das lectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Porém, é possível afirmar que as lectinas também podem interagir com moléculas de outra natureza, como compostos hidrofóbicos e hormônios vegetais (CAVADA et al., 2018)

1.3.2 Classificação das lectinas vegetais

Lectinas são um nome coletivo para a família heterogênea de proteínas de ligação a carboidratos com diferentes estruturas moleculares, propriedades bioquímicas e biofísicas, que podem apresentar funções biológicas diversas (VAN DAMME, 1998; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). Sua presença em todos os reinos da vida e a capacidade de lectinas estruturalmente distintas de reconhecer as mesmas estruturas de carboidratos ou semelhantes complicam a classificação delas. Algumas lectinas, como calnexinas, calreticulinas e malectinas, são chaperonas envolvidas no enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático (RE) e estão presentes em plantas, fungos e animais (OPAS et al., 1996; SCHALLUS et al., 2008; POWERS-FLETCHER et al., 2011; FRANCK; WESTERMANN; BOISSON-DERNIER, 2018). Apesar do fato de que a maioria dos motivos das lectinas em plantas e animais são muito diferentes, muitas lectinas em plantas, bem como em sistemas animais, estão envolvidas no reconhecimento de invasores e, portanto, fazem parte do sistema imunológico (DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015). Essa visão geral engloba a diversidade entre as lectinas de plantas.

1.3.2.1 Com base na localização subcelular

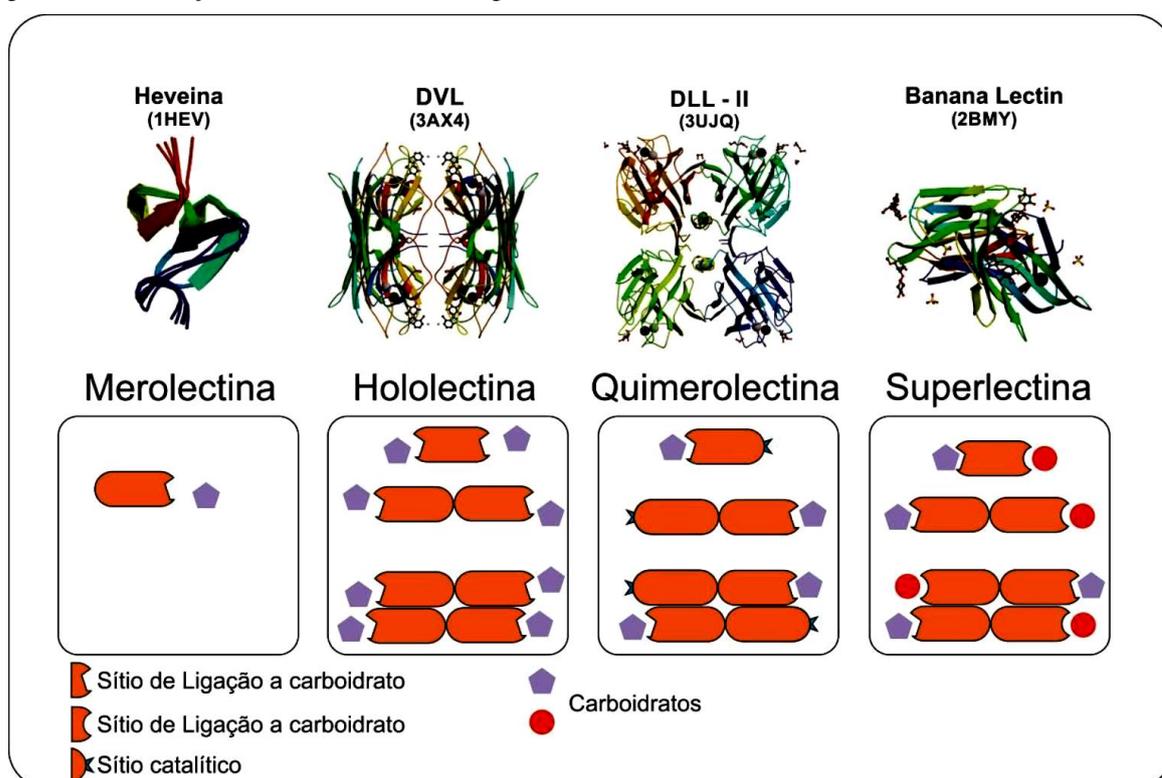
Com base em sua localização na célula vegetal, dois grupos de lectinas vegetais podem ser distinguidos. O primeiro grupo contém todas as lectinas que são sintetizadas nos ribossomos ligados ao RE. Consequentemente, essas lectinas são finalmente transportadas para os vacúolos, depositadas na parede celular ou exportadas para o espaço extracelular. O segundo grupo contém lectinas que são sintetizadas sem um peptídeo sinal e, portanto, as proteínas são

traduzidas nos ribossomos livres no citoplasma. Após a síntese, essas lectinas permanecem no citoplasma ou podem ser translocadas para o núcleo (LANNOO; VAN DAMME, 2010).

1.3.2.2 Com base na estrutura molecular

As lectinas vegetais representam um grande e heterogêneo grupo de proteínas com estruturas moleculares e enovelamentos tridimensionais diversificados. Uma lectina vegetal que contém em um domínio de reconhecimento à carboidrato (CRD, do inglês *carbohydrate recognition domain*) é referida como uma "merolectina". Quando a proteína compreende dois ou mais domínios, ela é designada como uma "hololectina", enquanto uma proteína que compreende uma combinação de um domínio de lectina ligado a pelo menos um outro domínio de proteína é referida como uma "quimerolectina". As lectinas vegetais também podem ser compostas por múltiplos domínios de lectinas com diferentes propriedades de ligação a carboidratos e, neste caso, são chamadas de "superlectinas" (Figura 1) (VAN DAMME, 1998). Para lectinas serem capazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar carboidratos é necessário ter pelo menos dois domínios capazes de se ligar a carboidratos, portanto, merolectinas e quimerolectinas que possuem apenas um domínio de ligação não podem realizar essas atividades.

Figura 1. Classificação estrutural de lectinas vegetais.



Fonte: Elaborada pelo autor. Adaptado de VAN DAMME, 1998.

1.3.2.3 Com base na sequência

Uma análise cuidadosa das sequências de lectinas disponíveis a partir de análises de genoma e transcriptoma mostra que todas as lectinas de plantas conhecidas hoje podem ser classificadas em diferentes famílias, com base na sequência dos motivos da lectina e na conformação de seu (s) domínio (s) de reconhecimento de carboidratos. Curiosamente, a especificidade de carboidratos das lectinas não está estritamente ligada à estrutura tridimensional do domínio de reconhecimento de carboidratos (VAN DAMME, 2014). Um exemplo disso, são as lectinas do gênero *Parkia*, que apesar de ser um gênero pertencente à família das leguminosas, as suas lectinas apresentam motivos e domínios proteicos característicos de lectinas relacionadas à Jacalina (família *Moraceae*) (BARI et al., 2016; CAVADA et al., 2020b).

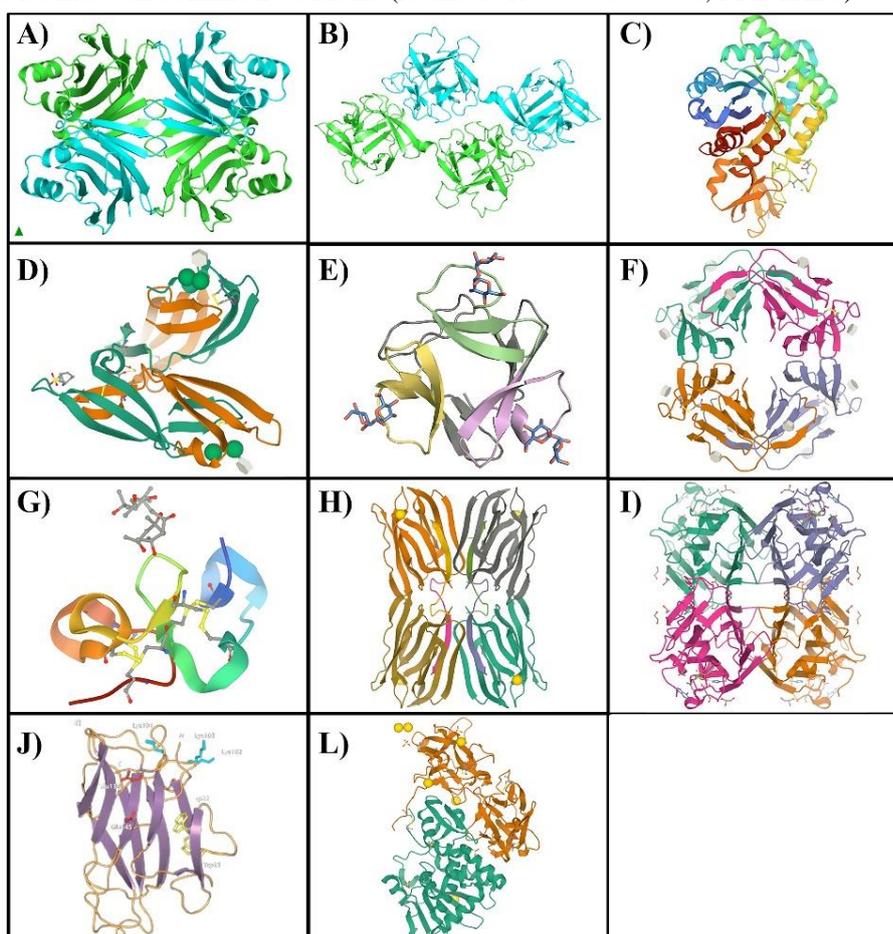
1.3.2.4 Com base na abundância

As lectinas estão presentes em todos os órgãos das plantas. Algumas em tecidos de armazenamento, como sementes, cascas, bulbos, rebentos, rizomas, etc., são fontes muito ricas de lectinas, mas as lectinas também foram detectadas em raízes, brotos, folhas e flores, embora em quantidades muito menores (VAN DAMME, 1998). Deve-se enfatizar que as lectinas apresentam diferenças consideráveis em seus níveis de expressão. As lectinas altamente abundantes são frequentemente sintetizadas seguindo a rota secretora e podem representar de 0,1% a 10% da proteína total em sementes ou tecidos vegetativos. As lectinas citoplasmáticas são geralmente expressas em níveis muito baixos, especialmente na ausência de estresse e, conseqüentemente, essas lectinas vegetais são dificilmente detectáveis em condições normais de crescimento. No entanto, a expressão do último grupo de lectinas é regulada positivamente quando a planta é exposta ao estresse. Portanto, essas lectinas são designadas como lectinas vegetais 'induzíveis' (LANNOO; VAN DAMME, 2010). Historicamente, as lectinas altamente expressas foram descobertas pela primeira vez por causa de sua alta abundância em sementes, especialmente de plantas leguminosas (LANNOO; VAN DAMME, 2010; VAN DAMME, 2014). Conseqüentemente, essas lectinas eram fáceis de purificar com as ferramentas disponíveis na época. Essas lectinas são chamadas de lectinas "clássicas" para distingui-las das novas lectinas induzíveis por estresse que só foram descobertas no final da década de 1990 (LANNOO; VAN DAMME, 2010; VAN DAMME, 2014).

1.3.3 Famílias de lectinas de plantas

Com base na sequência e na estrutura tridimensional das lectinas, as lectinas de plantas podem ser classificadas em 12 famílias (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008). Cada família recebe o nome da proteína mais bem estudada para este grupo de lectinas. No momento, a conformação tridimensional foi resolvida apenas para 10 motivos de lectina, ou seja, a aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA), o domínio Amarantina, a aglutinina relacionada à quitinase (CRA), o domínio Cianovirina, a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA), o domínio da Heveína, o domínio relacionado a Jacalina, o domínio das lectinas de leguminosas, o domínio Lys-M e o domínio da Ricina (Figura 2) (BONNARDEL et al., 2020).

Figura 2. (A) Família da lectina de *Agaricus bisporus* (PDB 1Y2T); (B) Família das lectinas com domínio de Amarantina (lectina de *Amaranthus caudatus*, PDB 1JLY) (C) Família das lectinas relacionadas à quitinasas classe V (lectina de *Robinia pseudocacia*, PDB 4URI); (D) Família das lectinas com domínio de Cianovirina (lectina de *Nostoc ellipsosporum*, PDB 3GXY); (E) Família da lectina de *Euonymus europaeus* (lectina modelada de *Euonymus europaeus*); (F) Família da lectina de *Galanthus nivalis* (lectina de *Galanthus nivalis*, PDB 1MSA); (G) Família das lectinas com domínio relacionado à Heveína (lectina de *Hevea brasiliensis*, PDB 1Q9B); (H) Família das lectinas relacionados à Jacalina (Jacalina, PDB 1UGW); (I) Família das lectinas de leguminosas (lectina de *Canavalia brasiliensis*, PDB 1AZD); (I) Família da lectina de *Nicotiana tabacum* (Nictaba modelada); (J) Família das lectinas com domínio B de Ricina (lectina de *Ricinus communis*, PDB 1RZO)



Fonte: Elaborada pelo autor.

1.5.3.1 Aglutinina de *Agaricus bisporus*

Aglutinina de *Agaricus bisporus* (ABA) foi isolada pela primeira vez do cogumelo comestível *A. bisporus*. Os homólogos desta lectina são comuns entre os fungos, mas apenas alguns homólogos ABA foram relatados em plantas inferiores, em particular em *Marchantia polymorpha*. Muito provavelmente, a presença de homólogos ABA em plantas inferiores resultou da transferência horizontal de um ancestral fúngico, muito provavelmente um endossimbionte (LANNOO; VAN DAMME, 2010; VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). ABA tem um enovelamento único com duas folhas- β conectadas por um motivo de hélice-loop-hélice. Cada monômero ABA possui dois locais de reconhecimento para GlcNAc e GalNAc (incluindo forte afinidade para o antígeno T), localizados em locais opostos do motivo hélice-alça-hélice, respectivamente (CARRIZO et al., 2005; NAKAMURA-TSURUTA et al., 2006). O ABA existe como um tetrâmero e seu reconhecimento do antígeno T leva à supressão da proliferação de algumas linhas de células epiteliais de câncer (YU et al., 1993).

1.5.3.2 Domínio de lectina *Euonymus europaeus*

O domínio da lectina *Euonymus europaeus* (EUL) tem uma longa história, mas foi classificado como uma família separada de lectinas há apenas 12 anos (FOUQUAERT et al., 2008). Em 1975, Pacak e Kocourek isolaram uma proteína hemaglutinante de *Euonymus europaeus*, uma lectina que era conhecida há muito tempo por aglutinar eritrócitos do sangue do tipo B (PACÁK; KOCOUREK, 1975). Petryniak e colaboradores (1977) purificaram a proteína usando cromatografia de afinidade usando substância do grupo sanguíneo A + H e eluição com lactose. Esta publicação confirmou a alta preferência da aglutinina *Euonymus europaeus* em relação aos oligossacarídeos do tipo B e, em menor grau, aos oligossacarídeos do tipo H (PETRYNIAK; PEREIRA; KABAT, 1977). A sequência EUL completa só se tornou disponível em 2008 após a clonagem molecular da lectina (FOUQUAERT et al., 2008). A análise de sequência revelou que EUL representou um novo motivo de lectina. Sequências relacionadas a EUL estão presentes no genoma de todas as plantas terrestres (FOUQUAERT et al., 2009). A estrutura cristalina para o domínio EUL ainda não foi resolvida, mas estudos de modelagem molecular sugerem uma dobra semelhante à ricina-B com um único sítio de ligação para o reconhecimento de várias estruturas de carboidratos (AGOSTINO et al., 2015).

1.5.3.3 Aglutinina de *Galanthus nivalis*

A aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) possui especificidade à D-manose e é composta de um homotetrâmero composto por monômeros de 12,5 kDa (VAN DAMME; ALLEN; PEUMANS, 1987). As lectinas relacionadas ao GNA tipicamente se ligam à manose e exibem alta afinidade para oligomanosídeos e *N*-glicanos com alto teor de manose. A cristalografia de raios-X mostrou que cada subunidade se dobra como um prisma- β composto por três folhas- β de quatro cadeias antiparalelas que formam três CRDs (HESTER et al., 1995). Este motivo de lectina foi originalmente descoberto em espécies de monocotiledôneas, mas também foi relatado em gimnospermas, hepatófitas (divisão de briófitas), dicotiledôneas, bem como em algumas bactérias, fungos, peixes e até mesmo em um vírus (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). Consequentemente, o antigo nome "lectina de ligação à D-manose de monocotiledônea" não é mais conveniente e foi substituído por lectinas relacionadas à GNA. Proteínas semelhantes a GNA foram estudadas extensivamente e demonstraram diversidade em sua localização celular e estruturas moleculares (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

1.5.3.4 Domínio relacionado à Heveína

O domínio da heveína leva o nome da lectina purificada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), é uma pequena proteína monomérica que se liga a oligômeros de GlcNAc e quitina, e exerce atividade antifúngica. O domínio heveína consiste em 43 aminoácidos e seu dobramento é suportado por 4 pontes dissulfeto entre 8 resíduos de cisteína conservados. A estrutura tridimensional do domínio da heveína foi resolvida por espectrometria de NMR, ela contém três fitas de folhas- β duas α -hélices curtas. O domínio heveína tem maior afinidade para oligômeros GlcNAc mais longos devido à presença de um sítio de ligação estendido (ASENSIO et al., 2000). O domínio da heveína pode ocorrer como um único domínio, como uma série de domínios agrupados em tandem (até 7) ou como parte de uma quimerolectina em combinação com um domínio quitinase C-terminal. Lectinas relacionadas à heveína foram relatadas em plantas e fungos (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008).

1.5.3.5 Domínio relacionado à Jacalina

A Jacalina foi isolada pela primeira vez das sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) e é a proteína modelo para a família estendida de lectinas relacionadas à jacalina (SASTRY et al., 1986). Esta família de lectinas pode ser dividida em dois grupos com base em sua especificidade de ligação a carboidratos. As lectinas de ligação à galactose localizam-se no vacúolo, enquanto as lectinas de ligação à manose residem no citoplasma e no núcleo (PEUMANS; HAUSE; VAN DAMME, 2000). A julgar pelos relatos disponíveis no momento, o grupo de lectinas citoplasmáticas relacionadas à jacalina é difundido no reino vegetal, enquanto as lectinas vacuolares estão confinadas a algumas famílias de plantas, como *Moraceae* (VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008). O domínio de Jacalina consiste em um prisma- β simétrico triplo feito de três folhas- β de quatro cadeias (SANKARANARAYANAN et al., 1996; BOURNE et al., 2002).

1.5.3.6 Domínio das lectinas das leguminosas

A família das lectinas das leguminosas foi a mais extensivamente estudada (CAVADA et al., 2019). Uma característica particular do domínio das lectinas de leguminosas é o requerimento por íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para sua capacidade de ligar a carboidratos e exercer suas atividades biológicas. A estrutura quaternária das lectinas de leguminosas também pode ser muito variável como resultado de modificações como a glicosilação, embora as estruturas primária e secundária dos monômeros sejam muito semelhantes (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017; CAVADA et al., 2018b, 2021b; NASCIMENTO et al., 2020). O monômero das lectinas das leguminosas possui o enovelamento *jellyroll* ou também conhecido como β -sanduíche, consistindo em duas folhas- β principais: uma folha- β plana de sete fios e uma folha- β de seis fios curvada conectada por voltas e loops para formar uma estrutura em sanduíche em forma de cúpula achatada e por uma folha- β adicional de cinco fitas- β curtas (CAVADA et al., 2019). Embora o enovelamento tridimensional do domínio da lectina das leguminosas seja conservado, uma alça importante para a ligação de carboidratos é bastante variável, explicando por que o domínio da lectina da leguminosas pode interagir à uma gama de estruturas de carboidratos dependendo da posição desta alça (VAN DAMME, 1998).

1.5.3.7 Domínio LysM

O domínio LysM foi inicialmente identificado em bactérias, mas subsequentemente também foi relatado como parte de quinases semelhantes ao receptor LysM que participam da percepção de sinais rizobianos e da formação de micorriza arbuscular (CAROTENUTO et al., 2017). O domínio LysM consiste em duas hélices α empacotadas no mesmo lado de uma folha- β antiparalela formando um secundário β - α - α - β estrutura (BATEMAN; BYCROFT, 2000). As proteínas contendo LysM são bem conhecidas como receptores de ligação à quitina, mas também podem interagir com o peptidoglicano bacteriano e os lipopolissacarídeos (KAKU et al., 2006; DESAKI et al., 2018).

1.5.3.8 Aglutinina de *Nicotiana tabacum*

A Aglutinina de *Nicotiana tabacum*, conhecida como Nictaba, foi isolada pela primeira vez a partir de folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). É um homodímero composto por duas subunidades de 19 kDa e se liga fortemente a *N*-glicanos de alta teor de manose, *N*-glicanos complexos e, em menor extensão, a oligômeros GlcNAc (CHEN et al., 2002). A lectina é uma proteína induzível por estresse, é expressa após as plantas terem sido expostas ao tratamento com jasmonato, estresse pelo frio ou ataque de insetos herbívoros. As homólogas de Nictaba são comuns no reino vegetal (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). No momento, a estrutura tridimensional de Nictaba ainda não foi resolvida. A modelagem molecular sugere que Nictaba consiste essencialmente em uma estrutura β -sanduíche composta de duas folhas- β conectadas por loops estendidos (SCHOUPPE et al., 2010).

1.5.3.9 Domínio da ricina-B

A ricina consiste em uma cadeia A globular com 8 hélices- α e 8 cadeias- β , com atividade enzimática (BOLOGNESI et al., 2016) e uma cadeia B composta por dois domínios homólogos de ricina-B arranjados em uma dobra β -trevo (RUTENBER; ROBERTUS, 1991). A maioria dos domínios Ricin-B mostram ligação preferencial para galactose ou GalNAc contendo estruturas de glicano (VAN DAMME, 1998). O domínio Ricina-B está presente em procariotos e eucariotos, mas a combinação deste domínio de lectina com um domínio de RNA *N*-glicosidase, conhecido como proteínas de inativação de ribossomo tipo 2, está presente apenas em angiospermas (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019).

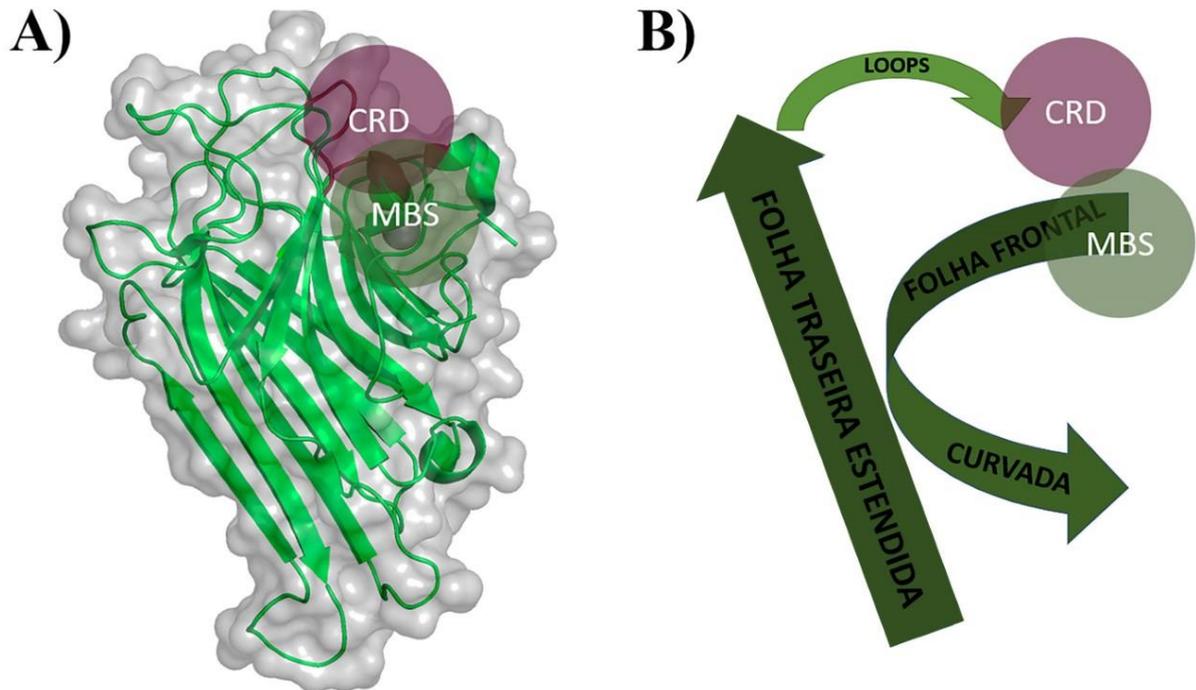
1.3.4 *Lectinas de leguminosas*

As lectinas de leguminosas são aquelas com maior diversidade de especificidades do que qualquer outro grupo de lectinas de plantas e correspondem às lectinas mais bem estudadas na literatura (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). A família *Leguminosae* compreende 727 gêneros e, antigamente, a taxonomia considerava que a família compreendia as subfamílias Papilionoideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae, enquanto uma classificação mais recente classifica Mimosoideae como um clado dentro da subfamília Caesalpinioideae. A maior parte das pesquisas com lectinas concentra-se na subfamília Papilionoideae, seguida por Caesalpinioideae e, por último, Mimosoideae (LEWIS et al., 2005; CAVADA et al., 2020c).

A maioria das lectinas leguminosas é constituída por protômeros de 25-30 kDa, entre 220 e 250 aminoácidos, e formada por uma ou mais cadeias polipeptídicas. Além disso, eles podem ser *N*-glicosilados e conter uma ou duas cadeias de glicanos. Com algumas exceções, a maioria dessas lectinas são metaloproteínas. Protômeros em lectinas vegetais contêm um sítio de ligação à metal (MBS) com íons de cálcio e manganês fortemente ligados, responsáveis por manter o CRD (Figura 3A). As lectinas podem formar dímeros e/ou tetrâmeros e ligar-se especificamente a resíduos de manose, galactose, glicose, fucose e seus derivados, bem como glicanos derivados destes carboidratos (LORIS et al., 1998; VAN DAMME, 2014; BARRE et al., 2021). Mais de 600 espécies de leguminosas foram testadas para detecção de atividade hemaglutinante, e muitas foram purificadas e caracterizadas com sucesso, bem como aplicadas em vários ensaios biológicos e aplicações biotecnológicas (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017; GAUTAM et al., 2018). Vários estudos mostram a purificação de lectinas de diferentes órgãos da planta, que podem ter ou não a mesma lectina. No entanto, as sementes são o principal alvo para a purificação dessas proteínas, onde elas podem corresponder a até 10% do conteúdo proteico total (GAUTAM et al., 2018).

O protômero dessas proteínas é caracterizado pela presença de dobramento em β -sanduíche, também conhecido como motivo *jellyroll*, que é conservado em todas elas. Esse motivo é observado em muitas lectinas de leguminosas, mas também pode ser visto nas proteínas do capsídeo viral. Esta dobra consiste em duas folhas- β anti-paralelas conectadas por *loops*. Uma contém seis fitas e é parcialmente estendida, e a outra é curva e tem sete fitas. O dobramento é estabilizado por interações não covalentes entre as folhas- β e dois núcleos hidrofóbicos (Figura 3B) (ARGOS; TSUKIHARA; ROSSMANN, 1980; CHELVANAYAGAM; HERINGA; ARGOS, 1992; LORIS et al., 1998).

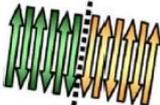
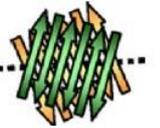
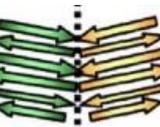
Figura 3. (A) Estrutura terciária do monômero da lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) (PDB: 6CJ9). A estrutura proteica está em representação cartoon em verde e as duas esferas correspondem aos metais, Ca²⁺ (verde) e Mn²⁺ (roxa). Superfície da molécula esta destacada em cinza claro; (B) Diagrama esquemático da estrutura terciária de um monômero típico de lectinas de leguminosas; (CRD - carbohydrate recognition domain, MBS – metal binding site).



Fonte: Elaborada pelo autor

Este enovelamento garante uma estabilidade estrutural a essas lectinas mantendo essas proteínas funcionais mesmo em altas temperaturas (> 60 °C) (LOSSIO et al., 2017; CAVADA et al., 2020a, 2021b; NASCIMENTO et al., 2020). Os protômeros podem se oligomerizar de sete formas diferentes, que podem ser: de interface canônica (ou tipo II), X1, X2, X3, X4, X5, e a chamada interface não usual de PNA (lectina de *Arachis hypogaea*) (SINHA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2020). Os tipos de oligomerizações estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Interfaces conhecidas em estruturas de lectinas de leguminosas.

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

Fonte: Adaptado de SINHA et al., 2007.

Lectinas desta família podem formar dímeros ou tetrâmeros em solução, que podem ser formados por protômeros iguais ou diferentes. O estado oligomérico influencia na conformação dos resíduos do CRD de cada protômero e assim afetar a interação com ligantes (BRINDA et al., 2004; CAVADA et al., 2020d). Em sua forma dimérica, os monômeros estão associados, na maioria dos casos, na forma de dímero canônico. O dímero canônico consiste na formação de uma folha- β de 12 filamentos formada pelo arranjo de duas folhas- β estendidas (6

+ 6) de dois monômeros adjacentes. Esta associação é muito comum em lectinas de leguminosas e geralmente chamada de “dímero canônico de lectinas de leguminosas” (MANOJ; SUGUNA, 2001; SRINIVAS et al., 2001). Os tetrâmeros padrões de lectinas de leguminosas são constituídos por dois dímeros canônicos e não dependentes de pH do meio para ocorrerem (HAMELRYCK et al., 1996). Lectinas da subtribo Diocleinae apresentam tetrâmeros que podem ser formados dependendo do pH meio, mas isso será discutido mais adiante (CAVADA et al., 2018b). O PNA também forma um tetrâmero, mas de forma assimétrica apenas observada nesta lectina (BANERJEE et al., 1994, 1996). O homotetrâmero de PNA consiste em dois dímeros do tipo X4 organizados para formar uma interface canônica (ou tipo II) e uma interface incomum, que não foi vista em nenhuma outra lectina leguminosa (BRINDA et al., 2004). Como essa lectina não é glicosilada, supõe-se que a formação desse tetrâmero atípico se deve somente às propriedades intrínsecas da molécula (BANERJEE et al., 1996).

1.3.5 Atividades biológicas de lectinas de leguminosas

Esta família de lectinas apresenta inúmeras atividades biológicas relatadas na literatura, podendo ser aplicadas em diversas áreas da biotecnologia e da medicina, incluindo efeitos inflamatório e nociceptivo, antibacteriano/antifúngico, inseticida, antiviral, antiproliferativo e anticâncer, marcadores celulares, entre outros. A maioria dos trabalhos demonstram a participação do CRD devido a reversão do efeito através da pré-incubação da lectina com seu carboidrato específico antes do teste, bem como a participação de outros mediadores que fazem parte do mecanismo de ação da lectina.

Uma das atividades mais relatadas das lectinas de leguminosas é o seu efeito no processo inflamatório. A lectina de *Platypodium elegans* (PELa) é um bom exemplo de lectina que possui efeito inflamatório agudo e é capaz de induzir edema de pata em camundongos 30 min após a aplicação em doses variando de 0,1 a 1 mg/kg. Sugere-se que PELa pode ativar macrófagos para liberar mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, gerando sintomas inflamatórios (ARARIPE et al., 2017). Já a lectina de *Lonchocarpus araripensis* (LAL) apresentou efeito antiinflamatório, reduzindo o edema da pata induzido por carragenina em camundongos em cerca de 77%. A lectina também reduziu ligeiramente a permeabilidade vascular. A LAL também foi antiinflamatória em edemas induzidos por outros agentes, como serotonina, bradicinina e nitroprussiato de sódio, entre outros (PIRES et al., 2016). Outra lectina avaliada foi a de *Bauhinia monandra* (BmoLL) que inibiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina numa faixa entre 47%-60,5%, dependendo da concentração de lectina,

com redução significativa da migração de leucócitos. Quando avaliado seu efeito nociceptivo, usando o modelo da placa quente, BmoLL reduziu significativamente o número de contorções dos animais em 43,1, 50,1 e 71,3% nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg, respectivamente (CAMPOS et al., 2016).

Lectinas de leguminosas também apresentam atividade antibacteriana devido a interação com carboidratos presentes na parede celular bacteriana, como os ácidos teicóico e teichurônico, peptidoglicanos, lipopolissacarídeos, ácido murâmico, ácido *N*-acetilmurâmico e dipeptídeos muramil (AYOUBA et al., 1994). A lectina de *Apuleia leiocarpa* (ApulSL) possui esse efeito em espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, tendo maior eficácia contra três variedades de *Xanthomonas campestris* (CARVALHO et al., 2015). Já a lectina *Bauhinia variegata* (BVL) apresentou efeito antiadesivo sobre *Streptococcus mutans* e *S. sanguinis* no modelo experimental *in vitro*, o que inibiu a formação de biofilmes (KLAFKE et al., 2016).

Em relação a ação antifúngica, a lectina de *Caesalpinia ferrea* foi capaz de inibir completamente o crescimento celular de *Candida albicans*. Além disso, a lectina de *Bauhinia variegata* afetou o consumo de oxigênio dos fungos em até 90%, indicando uma forte atividade antifúngica para esta lectina (CAVADA et al., 2020d). As lectinas de *Bauhinia unguolata* e *B. monandra* foram capazes de reduzir o crescimento radial de diversos fitopatógenos fúngicos, verificando a redução do crescimento radial, embora relativamente fraca (cerca de 30%) (SOUZA et al., 2011; SILVA et al., 2014).

Além de bactérias e fungos, lectinas também possuem atividade sobre vírus. Duas lectinas de *Machaerium* foram capazes de inibir a infecção do HIV em células hospedeiras. A pré-incubação dessas lectinas com o vírus antes da infecção protegeu completamente contra a infecção, mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 µg/mL. Os autores observaram que essas lectinas poderiam se ligar à gp120, uma proteína essencial para a infectividade do HIV (ANIMASHAUN et al., 1993). PNA, a lectina de *Arachis hypogaea*, causou a inibição da infecção pelo Vírus da Parainfluenza Humana Tipo 2 por um efeito inibitório parcial na síntese de RNA do vírus, inibição da síntese de proteínas e prevenção da entrada do vírus nas células (UEMATSU et al., 2012). Outro trabalho publicado por Ludstron e colegas (1987) relataram a capacidade do PNA de interagir com o vírus *Herpes simplex* através das frações galactosil encontradas em seus glicanos (LUNDSTRÖM et al., 1987). Outro exemplo, é a lectina de *Bauhinia variegata* que foi capaz de inibir a atividade da transcriptase reversa do HIV. Supõe-se que a inibição da transcriptase reversa seja causada por interações proteína-proteína. Isso está de acordo com um estudo que demonstrou o efeito antiviral da lectina de *Bauhinia*

purpurea em relação ao *Herpes simplex* e ao vírus da raiva *in vitro* (MARCHETTI et al., 1995; LIN; NG, 2008).

Além dessas atividades já citadas, a atividade inseticida das lectinas de leguminosas as tornam boas candidatas para o controle de pragas de insetos. Sua interação específica com o epitélio intestinal do inseto pode ter um potencial mais amplo para a biotecnologia pois pode atuar como um fator antinutricional (GATEHOUSE et al., 1989). Por ser composta de quitina, proteoglicanos e proteínas, a matriz peritrófica do inseto serve como uma barreira para proteger o epitélio intestinal de partículas alimentares abrasivas e também regular a passagem de moléculas entre os diferentes compartimentos intestinais (LEHANE, 1997). Por exemplo, a lectina 2 de *Griffonia simplicifolia* poderia se ligar à matriz peritrófica de *Callosobruchus maculatus* (F.) e diminuir a absorção de nutrientes (ZHU et al., 1996; ZHU-SALZMAN et al., 1998). A lectina de folhas de *B. monandra* (BmoLL) foi testada contra larvas de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. kuehniella* e produzida resultou em uma taxa de mortalidade de 50% para *Z. subfasciatus* e *C. maculatus* (MACEDO et al., 2007).

1.3.6 *Lectinas da subtribo Diocleinae*

Como dito no tópico anterior as lectinas de leguminosas representam o grupo mais bem estudado entre as lectinas de planta e é possível afirmar que a maioria dos estudos são relacionados à lectinas da subfamília Papilionoideae, principalmente da tribo Phaseoleae (MANN et al., 2001). Dentro desta tribo, podemos destacar a subtribo Diocleinae que apresenta 13 táxons em nível de gênero: *Canavalia*, *Camptosema*, *Cratylia*, *Collaea*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Dioclea*, *Galactia*, *Lackeya*, *Luzonia*, *Macropsychanthus*, *Neorudolphia* e *Rhodopis* (VARELA et al., 2004). As lectinas desta subtribo apresentam alta similaridade estrutural, mas, apesar das pequenas diferenças, essas lectinas ainda apresentam efeitos distintos quando aplicadas em diversas atividades biológicas (CAVADA et al., 2018b). Dentro deste grupo de lectinas encontra-se a Concanavalina A (ConA), uma lectina específica à manose e glicose. ConA é purificada a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* e é a lectina mais amplamente estudada, por isso, as lectinas Diocleinae intimamente relacionadas com ConA são comumente chamadas de lectinas do tipo ConA. A especificidade das lectinas à monossacarídeos é bem definida com a maioria das lectinas apresentando ligação preferencial à manose, glicose e derivados (CAVADA et al., 2019). As que se distanciam deste padrão são as lectinas que possuem especificidade à *N*-acetil-D-galactosamina e α -lactose, como as de *Camptosema*

ellipticum e uma das lectinas de *Dioclea lasiophylla*, que não são lectinas relacionadas à ConA (BATISTA et al., 2010; CAVADA et al., 2020a).

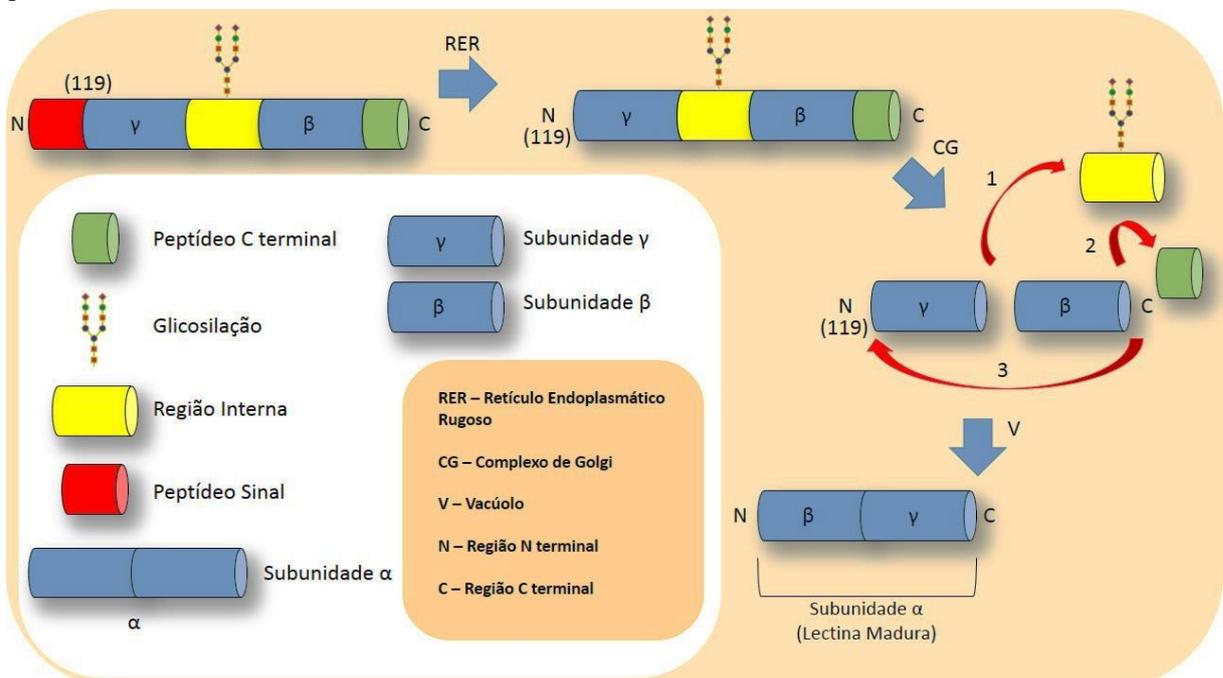
Devido ao conhecimento desta especificidade, foi possível a purificação de muitas lectinas desta subtribo. Muitas lectinas semelhantes a ConA já foram purificadas, principalmente de sementes, indicando, na maioria dos casos, um protocolo amplamente padronizado. Geralmente, a purificação de uma lectina Diocleinae envolve as seguintes etapas. Primeiro, as sementes são descascadas e moídas até a obtenção de um pó fino. Em segundo, as proteínas solúveis são extraídas, em tampão ou solução salina. O extrato bruto pode então ser submetido a uma etapa de fracionamento com precipitação de sulfato de amônio ou aplicado diretamente em uma cromatografia de afinidade pré-equilibrada com solução de extração adicionada de CaCl_2 e MnCl_2 . Matrizes com manose ou dextrana imobilizada, como a Sephadex G-50, são as mais utilizadas. O pico não retido é eluído com a solução de equilíbrio e a proteína ligada é eluída por competição com manose ou glicose na solução/tampão de equilíbrio, ou por desnaturação reversível com um tampão ácido suave, como glicina-HCl, pH 2,6 (DO NASCIMENTO et al., 2012; PINTO-JÚNIOR et al., 2013; OSTERNE et al., 2014; SANTIAGO et al., 2014; LOSSIO et al., 2017). Este protocolo geralmente resulta em um alto grau de pureza, mas outras etapas de purificação por filtração em gel e/ou cromatografia de troca iônica podem ser empregadas.

As lectinas do tipo ConA têm propriedades físico-químicas bastante semelhantes e podem ser consideradas estáveis, uma vez que suportam uma ampla faixa de pH e temperaturas sem perda de suas atividades. A maioria dessas lectinas mantém sua atividade na faixa de pH 5–8, com atividade máxima na faixa de pH 7–8. Essas proteínas normalmente mantêm sua atividade máxima até 60 °C, mas acima dessa temperatura, a atividade é perdida por desnaturação até aproximadamente 70-80 °C, quando ocorre a perda total da atividade hemaglutinante (PINTO-JÚNIOR et al., 2013; OSTERNE et al., 2014; SANTIAGO et al., 2014; LOSSIO et al., 2017). As atividades dessas proteínas geralmente são dependentes de íons divalentes como Ca^{2+} e Mn^{2+} . Altas perdas na atividade após o tratamento com EDTA podem ser observadas para a maioria das lectinas do tipo ConA caracterizadas; assim, cátions divalentes parecem ser um requisito para sua atividade. As lectinas de *Canavalia oxyphylla*, *C. virosa*, *C. cathartica* são exceções, uma vez que o tratamento dessas lectinas com o agente quelante não afeta sua atividade hemaglutinante (CAVADA et al., 2018b).

Em relação à dados estruturais destas lectinas, desde a determinação da estrutura primária de ConA em 1975 por Cunningham e colegas (CUNNINGHAM et al., 1975) através de degradação de Edman, outras 22 lectinas semelhantes a ConA da subtribo Diocleinae tiveram

suas estruturas primárias determinadas usando degradação de Edman, bem como espectrometria de massas e sequenciamento de DNA (CAVADA et al., 2018b). As lectinas do tipo ConA são compostas por 237 resíduos de aminoácidos com poucas exceções, como as lectinas de *Camptosema pedicaellatum*, *Cratylia mollis* e *Cratylia floribunda* que possuem 236 resíduos apresentando uma deleção na posição 161 em relação às outras lectinas. Essas lectinas alcançam sua forma madura através de um processamento pós-traducional, a partir de seus precursores glicoproteicos de 290 aminoácidos (aa). A pré-pró-lectina (peptídeo sinal + cadeia- γ + peptídeo central + cadeia- β + peptídeo C-terminal) é sintetizada nos cotilédones da semente e acumulada nas células parenquimatosas de reserva. Este é dirigido ao retículo endoplasmático onde o peptídeo sinal é removido, e o peptídeo central é *N*-glicosilado, formando a pró-lectina. No complexo de Golgi, ocorrem mudanças estruturais em seu glicano e, em seguida, ele é transportado para os vacúolos. Nos vacúolos, a pró-lectina é processada por asparaginil endopeptidases e carboxipeptidases que clivam o glicopeptídeo central contendo 15 aa e a região Cterm, resultando na perda de 9 aa. As cadeias γ e β são religadas na ordem reversa formando uma cadeia α ($\beta + \gamma$), que consiste na cadeia madura de lectina de ~ 237 aa com uma massa molecular média de 25 kDa. Este processamento foi inicialmente descrito para a ConA como permutação circular (Figura 4) (HERMAN; SHANNON; CHRISPEELS, 1985; BOWLES et al., 1986; CHRISPEELS et al., 1986; FAYE; CHRISPEELS, 1987; BOWLES; PAPPIN, 1988; CAVADA et al., 2001, 2018b).

Figura 4. Representação do processo de permutação circular em lectinas de Diocleinae a nível de estrutura primária.



Fonte: SANTIAGO, M.Q. 2013.

Quando aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, as lectinas do tipo ConA apresentaram três bandas correspondentes às cadeias polipeptídicas α , β e γ com massas moleculares relativas de aproximadamente 25, 14 e 12 kDa, respectivamente. Essas cadeias resultam do processamento de permutação circular descrito, porém a enzima que catalisa o processo não é 100% eficiente e alguns fragmentos não são religados (CAVADA et al., 2018b). Um recente estudo mostrou dados interessantes sobre esse processamento pós-traducional. A análise estrutural por cristalografia de raios-X mostrou que nenhuma mudança de fato ocorreu a nível de estrutura terciária e a análise por calorimetria por titulação isotérmica também mostrou que a ligação à monossacarídeos não foi afetada. Porém houve diferenças a nível quaternário entre pró-ConA e ConA, em que a interface dímero-dímero foi afetada havendo diferenças de estabilidade da proteína em análises de dicroísmo circular. A conformação tetramérica adotada pela pró-ConA é menos estável que a adotada pela ConA madura, o que facilita a desestabilização do tetrâmero em dois dímeros (NONIS et al., 2021).

Em relação à estrutura terciária, o monômero dessas proteínas é caracterizado pela presença de dobramento em β -sanduíche, também conhecido como motivo *jellyroll*, que é observado em muitas lectinas de leguminosas. Três tipos de domínios foram identificados nessas lectinas, o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD), o sítio de ligação aa metais (MBS) e o sítio hidrofóbico (HS). O CRD é composto por quatro segmentos descontínuos presentes na folha- β curva do *jellyroll*, que consiste dos resíduos 12–16, 98–100, 207–208 e 227–229. Os resíduos de aminoácidos que participam diretamente na interação com carboidratos são Tyr12, Asn14, Gly98, Leu99 (Val99, no caso de CPL), Tyr100, Ala207, Asp208 e Arg228. Análises de dinâmica molecular da lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) com *N*-glicanos, revelaram que os resíduos Pro13, Thr15, Asp16 e Ser168 também são importantes para a interação do CRD com oligossacarídeos através de interações polares e não-polares (CAVADA et al., 2021a). O MBS também está presente na folha- β curva e tem dois cátions divalentes coordenados, cálcio e manganês. Seis resíduos de aminoácidos e quatro moléculas de água participam da coordenação do tipo octaédrica. O cálcio é coordenado pelos resíduos Asp10, Tyr12, Asn14 e Asp19, enquanto o manganês é coordenado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19 e His24, com duas moléculas coordenando cada íon. O MBS estabiliza um *cis*-peptídeo nos resíduos Ala207–Asp208, que é crucial para a formação do CRD. Através de uma ponte de água, o íon cálcio pode interagir com os átomos da cadeia principal do *cis*-peptídeo, que está na base do CRD e é responsável por estabilizar os carboidratos dentro da cavidade local (LORIS et al., 1998). A importância deste *cis*-peptídeo foi demonstrada através de estudos estruturais por cristalografia e modelagem molecular, bem como *docking* molecular

e dinâmica envolvendo CaBo, DlyL e DrfL (PINTO-JUNIOR et al., 2017a; CAVADA et al., 2018b, 2021a). Em relação aos carboidratos que interagem com o CRD dessas lectinas, é relatado que o grupo hidroxila do C-2 da manose não é essencial para a ligação, enquanto as hidroxilas de C-3, C-4 e C-6 são. Para dissacarídeos, lectinas do tipo ConA têm preferência por diglicosídeos e dimanosídeos, especialmente manosil- α 1,2-manose e manosil- α 1,6-manose. Todas as lectinas que tiveram suas interações avaliadas experimentalmente reconheceram o trimanosídeo central de glicanos *N*-ligados. Estas lectinas poderiam reconhecer grupos 3-, 4- e 6-hidroxil de α (1-6)-manose, grupos 3- e 4-hidroxil em α (1-3)-manose, e grupos 3- e 4- hidroxil do resíduo de manose central de trimanosídeos (DAM et al., 1998). Além disso, em relação a interações com glicanos, essas lectinas possuem maior afinidade com glicanos contendo α -manose na posição terminal ou subterminal, seguidos por glicanos com α -glicose na posição terminal (MAUPIN; LIDEN; HAAB, 2012).

O sítio hidrofóbico (SH) foi descrito pela primeira vez para a lectina de *Canavalia gladiata* (CGL) por Bezerra e colegas (2007) que co-purificou a lectina com alfa-aminobutírico (Abu), um aminoácido não-proteico (BEZERRA et al., 2007). Após a difração dos cristais de CGL, foi possível observar a densidade de elétrons de Abu em um bolsão hidrofóbico formado pelos resíduos Leu115, Leu126 e Val179. Abu também forma interações de hidrogênio com Ala125 e His180. O SH está presente na região interdimérica; assim, Abu também poderia formar interações de hidrogênio com resíduos do monômero adjacente, envolvendo os resíduos Met129 e Asp139. Resultados semelhantes foram observados com o ConBr no estudo de Bezerra e colaboradores (2011) (BEZERRA et al., 2011). Uma vez que a maioria dos resíduos do SH são conservados em outras lectinas de Diocleinae, eles também podem, provavelmente, ser carreadores de moléculas hidrofóbicas.

Os monômeros das lectinas Diocleinae podem interagir entre si por meio de resíduos presentes na folha- β parcialmente estendida, formando dímeros e tetrâmeros. Os dímeros dessas proteínas são canônicos; ou seja, os monômeros se associam adjacientemente, formando uma longa folha- β de 12 fitas (seis por monômero). O tetrâmero é formado pela associação de dois dímeros canônicos; em outras palavras, é um dímero de dímeros, gerando um tetrâmero com interface do tipo X2 (BRINDA et al., 2004; SINHA et al., 2007). Essa oligomerização pode ser afetada pelo pH do meio, que, por sua vez, determina se a lectina estará em sua forma dimérica ou tetramérica, uma propriedade denominada oligomerização dependente do pH. Todas as lectinas do gênero *Canavalia* têm oligomerização dependente do pH, enquanto, para outras lectinas do tipo ConA vai depender de características estruturais particulares (ZAMORA-CABALLERO et al., 2015).

O primeiro relato sobre a divergência de oligomerização dependente do pH entre lectinas do tipo ConA foi de Calvete e colegas (1999) (CALVETE et al., 1999) que analisaram a sedimentação por ultracentrifugação dessas proteínas em diferentes valores de pH e observaram resultados heterogêneos com algumas lectinas, como DGL e DVL, que não apresentaram um padrão de sedimentação semelhante ao da ConA (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1968; KALB; JOSEPH KALB; LUSTIG, 1968), indicando oligomerização independente do pH.

O primeiro estudo a explicar essa propriedade no nível estrutural foi publicado por Wah et al. (2001), que estudou a lectina de *Dioclea guianensis* (DguiL), uma lectina com oligomerização dependente do pH. Com base na estrutura cristalográfica de DguiL, foi observado que o resíduo Asn131 de um monômero não interage com a alça 114-125 do monômero oposto localizado na cavidade central quando a lectina está em sua forma tetramérica.

Uma redução dramática nos contatos interdiméricos ocorre na ausência dessa interação em DguiL, mas não na lectina de *Dioclea grandiflora* (DGL), uma lectina com oligomerização independente do pH. Nesse caso, uma histidina na região 131 estabelece interações na cavidade central para aumentar os contatos interdiméricos. Uma análise da estrutura primária demonstrou que as lectinas com His131 são independentes do pH e as que possuem outros resíduos nesta posição são dependentes do pH (WAH et al., 2001). Outros estudos de Gallego del Sol et al. (2007) com CFL, Nagano et al. (2008) e Zamora-Caballero et al. (2015), com formas mutantes nativas e recombinantes de DguiL e DGL, demonstraram a importância das interações entre resíduos que ocorrem na cavidade central e em regiões periféricas para a formação de tetrâmeros estáveis pela combinação de técnicas envolvendo cristalografia de raios-X, mutação sítio-dirigida e sedimentação por ultracentrifugação. Eles concluíram que o resíduo His51 contribui para a estabilização do loop 114-125 na cavidade central, fornecendo uma orientação espacial favorável para a interação com His131, o que aumenta os contatos interdiméricos que estabilizam o tetrâmero.

As substituições em um desses dois resíduos não afetaram o efeito independente do pH da oligomerização de DGL, mas a mutação em ambos aboliu efetivamente a formação tetramérica. Nas regiões periféricas, os resíduos Arg60 e Asp78 também são responsáveis pela estabilização da forma quaternária. Mutações nesta região, junto com His51, foram capazes de abolir a formação tetramérica de DGL. Isso demonstra uma maior complexidade das bases moleculares que influenciam a oligomerização. Além disso, o pH define os estados de protonação de todos os resíduos citados, que também incluem o fator eletrostático que

influencia os contatos interdiméricos (DEL SOL; CAVADA; CALVETE, 2007; NAGANO et al., 2008; ZAMORA-CABALLERO et al., 2015).

1.3.7 *Atividades biológicas de lectinas da subtribo Diocleinae*

Sabe-se que essas proteínas possuem atividades inflamatória, nociceptiva, vasoativa, antimicrobiana, imunomoduladora, antidepressiva, entre outras (CAVADA et al., 2001; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). A maioria dessas atividades biológicas está diretamente relacionada à capacidade dessas proteínas de interagir com os carboidratos por meio do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (MARQUES et al., 2017). Essa interação pode ser influenciada pela conformação do CRD, que é definida pela composição dos aminoácidos, bem como pelo estado de oligomerização dessas moléculas, que pode ser dependente do pH do meio. A alta similaridade, junto com a variabilidade dos efeitos biológicos, torna este grupo de lectinas útil para o estudo das relações estrutura/atividade biológica, uma vez que o impacto de até mesmo pequenas mudanças estruturais pode ser correlacionado com o tipo e/ou intensidade da resposta biológica (CAVADA et al., 2018b).

Os resíduos do CRD destas proteínas são conservados, mas eles têm diferentes padrões e intensidades de interação dependendo do ligante. Essas diferenças podem estar relacionadas aos diferentes efeitos promovidos por essas lectinas em ensaios de atividade biológica, mesmo aqueles com alta homologia de estrutura primária (CAVADA et al., 2018b). O volume do CRD pode influenciar essa interação, bem como a área de entrada de sua cavidade, que, apesar dessas lectinas serem bastante semelhantes estruturalmente, os valores destes dois elementos não são uniformes entre elas (BEZERRA et al., 2011, 2013; BARROSO-NETO et al., 2016; LEAL et al., 2018).

Isso foi melhor evidenciado em estudos de dinâmica molecular comparando a lectina de *Dioclea reflexa* (DrfL) e de *Dioclea sclerocarpa* (DSL), nos quais o volume do CRD foi monitorado durante a simulação e demonstrou comportamentos bem diferenciados entre as duas proteínas, mesmo possuindo uma similaridade acima de 97% (PINTO-JUNIOR et al., 2017b). Além disso, simulações de *docking* molecular com as lectinas CaBo, DrfL e DlyL sugeriram a capacidade dessas lectinas de interagir com *N*-glicanos de alta manose, complexos e híbridos (PINTO-JUNIOR et al., 2017b; CAVADA et al., 2018a; LEAL et al., 2018).

Muitos desses carboidratos testados são ancorados covalentemente a um resíduo de asparagina em glicoproteínas e glicoconjugados presentes na superfície de células e estão

envolvidos em muitos processos de reconhecimento célula-célula e sinalização molecular. Eles também podem ser ancorados a glicoproteínas envolvidas em alguns processos do sistema imunológico (RUDD et al., 2001; SCHWARZ; AEBI, 2011; GU et al., 2012). Dados de interação experimental, bem como resultados de *docking*, sugerem que as lectinas de Diocleinae podem interagir com esses glicanos, o que pode explicar muitos de seus efeitos biológicos citados mais adiante (DAM et al., 1998; CAVADA et al., 2018b).

O efeito de oligomerização dependente do pH também pode ser considerado um dos fatores que podem influenciar os efeitos biológicos eliciados por essas lectinas, uma vez que o equilíbrio dímero-tetrâmero tem impacto na conformação do CRD e pode afetar a interação dessas proteínas com carboidratos/receptores glicosilados (MANDAL; BREWER, 1993; DAM et al., 2000). Resultados experimentais do estudo de Mandal e Brewer (1993) (MANDAL; BREWER, 1993) demonstraram que as formas dimérica e tetramérica podem ter afinidades diferenciadas para glicanos. Os autores observaram que os glicopeptídeos do tipo oligomanose Man7, Man8 e Man9 têm afinidades reduzidas para a forma dimérica em comparação com a forma tetramérica. Por outro lado, tanto a ConA dimérica quanto a tetramérica apresentaram a mesma afinidade para manose, dimanosídeos e glicopeptídeo Man3. Em conjunto, isto indica fortemente que aquele estado de oligomerização parece conferir a estas lectinas uma variabilidade na especificidade para oligossacáridos ou glicoconjugados que podem ser moléculas chave para uma atividade biológica (CAVADA et al., 2018b).

Muitas lectinas de Diocleinae demonstraram efeitos anti ou pró-inflamatórios em modelos murinos, dependendo da via de administração usada no ensaio. Quando a via de administração era local, essas lectinas provocavam edema de pata e migração de neutrófilos, acompanhada por hipernocicepção. Por outro lado, quando administrados sistemicamente, exibiam atividade anti-inflamatória com aumento da permeabilidade celular, estimulando a migração de neutrófilos (ALENCAR et al., 1999; ASSREUY et al., 2009). Foi proposto que os mecanismos desencadeadores do efeito inflamatório de lectinas do tipo ConA incluem a ligação aos glicanos presentes na superfície das células endoteliais e a captura de neutrófilos para iniciar o processo de migração (BENTO et al., 1993; ASSREUY et al., 1997, 1999; ALENCAR et al., 1999; CAVADA et al., 2018b).

O efeito anti-inflamatório pode ser explicado pela competição de lectinas exógenas com selectinas (L-, P- e E-selectina) por sítios glicosilados em leucócitos e/ou membranas de células endoteliais (ALENCAR et al., 1999; TVAROŠKA; SELVARAJ; KOČA, 2020). Apesar de vários relatos de hipernocicepção causada por essas lectinas, elas também apresentaram atividade antinociceptivo em outros tipos de ensaios, por exemplo, Pinto et al. (2013)

demonstraram o efeito antinociceptivo de CGL, ConM e ConBr. Os efeitos ocorreram predominantemente via nocicepção periférica e apresentaram resultados diferentes de acordo com a potência do efeito eliciado (PINTO et al., 2013).

Outra atividade bem relatada na literatura é a de vasorelaxamento, conforme demonstrado em ensaios *in vivo* e *in vitro*. Essas lectinas demonstraram que podem relaxar anéis de aorta de coelhos pré-contraídos com fenilefrina, tendo um efeito mais potente quando o endotélio é preservado (KLEHA; DEVESLY; JOHNS, 1991; CAVADA et al., 2018b). Os efeitos vasorelaxantes das lectinas de *Canavalia gladiata* (CGL) (ASSREUY et al., 2009), ConBr (ASSREUY et al., 2009), *Canavalia virosa* (ConV) (OSTERNE et al., 2014), *Cymbosema roseum* (CRL1) (ROCHA et al., 2015), DrfL (PINTO-JUNIOR et al., 2017b), DSL (BARROSO-NETO et al., 2016), *Dioclea violacea* (DVL) and *Dioclea rostrata* (DRL) (BEZERRA et al., 2013), foram relatados, por exemplo, e apresentam diferentes intensidades de efeito.

Na maioria desses estudos, o uso de lectinas pré-incubadas com seus carboidratos específicos inibiu parcialmente o efeito promovido por estas proteínas, demonstrando a participação do CRD em suas atividades. Indometacina e L-NAME, inibidores da ciclooxigenase e do óxido nítrico sintase (NOS), respectivamente, duas enzimas envolvidas no metabolismo do óxido nítrico, também poderiam inibir os efeitos dessas lectinas, demonstrando a participação do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação da lectina. Como essas lectinas ativam a eNOS ainda não está claro, mas sabe-se que tal atividade pode ser revertida pela pré-incubação dessas lectinas com seus carboidratos específicos, o que permitiu deduzir que a ativação da eNOS provavelmente deriva da interação entre as lectinas e um receptor glicosilado presente na superfície das células endoteliais. A forma e/ou intensidade da interação de cada lectina com aquele receptor pode ser responsável pela diferença de intensidade entre uma lectina e outra (CAVADA et al., 2018b).

Lectinas dessa subtribo também podem atuar como agentes antibacterianos e/ou antifúngicos. Cavalcante e colaboradores (2011) testaram o efeito de várias lectinas do gênero *Canavalia* contra estreptococos orais. Para *Streptococcus mutans*, as lectinas de *Canavalia boliviana* (CboL), ConBr e *Canavalia maritima* (ConM) apresentaram efeito antibacteriano, enquanto CGL e ConA estimularam o crescimento bacteriano. Para *S. oralis*, CboL, ConBr, CGL e ConM estimularam o crescimento bacteriano, enquanto ConA não teve efeito. CboL, ConA e ConM inibiram a formação de biofilme de *S. mutans*, enquanto nenhuma das outras lectinas testadas afetou a formação de biofilme de *S. oralis* (CAVALCANTE et al., 2011). Em relação aos seus efeitos antifúngicos, Gomes e colegas (2012) relataram o efeito antifúngico de

DRL, ConBr e DVL em leveduras isoladas de secreções vaginais (*Candida*, *Kloeckera*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*). Os autores sugeriram que o efeito inibitório foi provavelmente causado pela inibição da germinação de esporos e do crescimento de micélio por algum mecanismo que alterou a síntese de quitina e a resultante deficiência na deposição da parede celular. Os autores concluíram que essas três lectinas são promissoras para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra essas leveduras (GOMES et al., 2012).

Por interação com glicanos na superfície das células do sistema imunológico, lectinas do tipo ConA podem atuar como agentes imunomoduladores que podem desencadear a produção de citocinas e induzir respostas imunológicas otimizadas contra algumas condições patológicas, como tumores e infecções microbianas, possibilitando sua aplicação em pesquisas biomédicas e terapêutica (SOUZA et al., 2013; DA SILVA; CORREIA, 2014). Dentro desse grupo de lectinas, as lectinas de *Cratylia mollis* (Cramoll), *Dioclea virgata* (DvirL), ConA, ConBr, DRL e DVL estão alguns exemplos de lectinas com atividade imunomodulatória relatada (MURAILLE et al., 1999; REIS et al., 2008; DE MELO et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

As lectinas de Diocleinae também foram aplicadas em estudos relacionados ao sistema nervoso central (SNC) de mamíferos para entender melhor sua função em relação à neuroplasticidade (LIN; LEVITAN, 1991; SCHERER; UDIN, 1994; KIRNER et al., 2003) e para purificar proteínas sinápticas (SUZUKI; OKAMURANOJI, 1995; CLARK et al., 2002).

Nesse contexto, lectinas como ConBr e ConA, foram testadas quanto ao seu efeito antidepressivo empregando o teste de natação forçada em ratos, um procedimento experimental utilizado para a triagem de compostos com efeito antidepressivo (YANKELEVITCH-YAHAV et al., 2015), conforme realizado no trabalho de Barauna e colegas (2006) (BARAUNA et al., 2006). Ao contrário do ConA, a ConBr apresentou efeito antidepressivo com mecanismo envolvendo receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT₂), receptor adrenérgico (ou adrenoceptor) (α ₂-adrenoceptores), dopaminérgicos (D₂) e receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (RIEGER et al., 2014). A ConBr induziu um efeito protetor contra as convulsões induzidas pelo ácido quinolínico. Este efeito era dependente da estrutura nativa da lectina, e o mecanismo de ação parecia estar relacionado ao bloqueio da ligação do ácido quinolínico ao receptor NMDA e/ou à estabilização do receptor em uma conformação inativa. ConA também foi testada, mas diferente de ConBr, não teve efeito protetor (RUSSI et al., 2012).

1.3.8 Atividade citotóxica de lectinas da subtribo Diocleinae

Estudos relataram a aplicação de lectinas vegetais como agentes anticâncer devido aos seus potentes efeitos inibitórios, citotoxicidade e capacidade de induzir apoptose e autofagia em várias linhagens de células tumorais (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005; YAU et al., 2015). Essas lectinas podem inibir a tumorigênese ligando-se a proteínas glicosiladas na membrana das células cancerosas. É bem conhecido que os glicoconjugados desempenham papéis importantes em muitos processos biológicos, incluindo o câncer, com células malignas geralmente apresentando padrões de glicosilação alterados (MARQUES et al., 2017). Essas mudanças nos glicanos permitem a ligação preferencial da lectina nas células cancerosas para induzir os efeitos acima.

Estudos recentes demonstraram que as lectinas Diocleinae, como as lectinas de *C. bonariensis* (CaBo), ConV, ConA, DVL e ConBr podem induzir a morte celular em células de glioma, especialmente a cepa de glioma de rato C6 (OSTERNE et al., 2017; CAVADA et al., 2018a; NASCIMENTO et al., 2018; WOLIN et al., 2021). Todas essas lectinas induziram uma redução significativa na viabilidade celular variando de 30% a 60% com concentrações variando entre 30-100 µg/mL e exposição de 12-48 h, com níveis de efeitos diferentes dependendo da lectina.

Algumas dessas lectinas afetaram o potencial de membrana mitocondrial ou a migração celular, e todas elas induziram alterações morfológicas nas células de uma forma poligonal para uma esférica, seguidas de redução da adesão celular. Métodos de coloração indicaram que o mecanismo de ação dessas lectinas envolve morte celular por processos autofágicos, necróticos e apoptóticos induzidos por vias mitocondriais e modulação de metaloproteinases (OSTERNE et al., 2017; CAVADA et al., 2018a; NASCIMENTO et al., 2018; WOLIN et al., 2021). O estudo mais recente envolvendo ConBr e três linhagens de células de glioma aprofundou mais o entendimento deste mecanismo de ação. ConBr apresentou efeito previsto nas células de glioma C6 e GBM1, mas não em U87MG. Vale ressaltar que ConBr demonstrou potencial de efeito comparável à Temozolomida (TMZ) que é o agente de quimioterapia padrão usado para o tratamento de glioblastoma multiforme, quando testada em células de glioma do tipo C6. O mecanismo da atividade de ConBr parece envolver processos dependentes de caspase-8 e da sinalização autofágica para induzir a morte celular. Além disso, com interações via CRD em moléculas-alvo ainda não identificadas, ConBr desencadeia a ativação de vias envolvendo p38MAPK e JNK (p46/54) e inibição de ERK1/2, Akt e mTORC1 (WOLIN et al., 2021).

Essas vias estão associadas a processos de migração celular, morte e sobrevivência celular, apoptose e modulação da autofagia (ZARUBIN; HAN, 2005; ERSAHIN; TUNCBAG; CETIN-ATALAY, 2015; SONG et al., 2016; LI; ZHANG, 2017). A diminuição das vias Akt/mTORC1 pela ConBr pode estar envolvida na indução da autofagia, levando à morte celular (WOLIN et al., 2021).

Liu e colegas (2009) testaram o efeito antiproliferativo de ConA contra células de melanoma humano A375 (LIU et al., 2009). Os resultados mostram que ConA apresentou efeito citotóxico dependente de CRD contra as células testadas de forma dose-dependente do tempo com IC50 de 25 µg/mL em 24 h. Alterações morfológicas, incluindo bolhas na membrana e condensação nuclear, foram observadas. O número de células apoptóticas também foi regulado positivamente com uma contagem mais baixa de células necróticas, sugerindo que a morte celular foi causada por apoptose. Os autores verificaram que o tratamento com lectina induziu o colapso do potencial da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c que causou a ativação da caspase, levando à conclusão de que a morte celular induzida por ConA ocorreu por via apoptótica mitocondrial.

1.4 *Dioclea lasiocarpa* Mart. e a lectina DLL

Dioclea lasiocarpa Mart. (TaxonID: 83101) é uma espécie trepadeira pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae* e subtribo *Diocleinae* (ZAPPI et al., 2015). É uma espécie não endêmica do Brasil, mas está presente em todas as regiões do país. *D. lasiocarpa* é conhecida popularmente como mucuna, mucunã e catinga de macaco. Extratos de folhas e sementes desta espécie tem ação analgésica e é muito utilizada pelas populações locais para tratamento de cálculo renal e reumatismo, além de ter ação como calmante, tônico, parasiticida e formicida.

A lectina da semente de *Dioclea lasiocarpa* Mart., molécula objeto desse estudo, é uma lectina do tipo ConA denominada DLL, que possui especificidade à manose/glicose. Essa lectina foi purificada a partir de sementes coletadas na costa nordeste do Brasil. A purificação consiste em extração salina seguido de uma única etapa por cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-50. DLL foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho mostrando estabilidade mesmo após 1 h em uma faixa de pH entre 6-8 e em temperaturas maiores que 60 °C. A proteína pura possui massa aparente de 30 kDa determinada por SDS-PAGE e peso molecular de 25.410 Da determinado por espectrometria de massa.

A estrutura da lectina segue o padrão das lectinas de Diocleinae, com estruturas secundárias do tipo folha- β sendo predominantes (aproximadamente 40,2% de folha- β antiparalela, 4,6% de folha- β paralela, 7,2% de hélices α , 17,3% de loops e 28,7% de estruturas não ordenadas). Já teve sua estrutura primária determinada por combinação de espectrometria de massas e sequenciamento de DNA, sendo possível obter uma sequência de aminoácidos de 237 aa (DO NASCIMENTO et al., 2012). A estrutura tridimensional de DLL obtida por modelagem por homologia sugeriu forte conservação do MBS e CRD, além de apresentar o mesmo motivo *jellyroll* semelhante às outras lectinas de leguminosas (GONDIM et al., 2017).

Em relação às atividades biológicas, a lectina apresentou efeito vasodilatador em aorta de ratos com participação do CRD e dependente da presença de endotélio nos anéis aórticos (DO NASCIMENTO et al., 2012). Além disso demonstrou atividade antiproliferativa altamente potente (em concentração nanomolar) contra várias linhas de células de carcinoma humano, incluindo A2780 (ovário), A549 (pulmão), MCF-7 (mama) e PC3 (próstata), e era tão ou mais potente que as lectinas ConBr, ConM e DSL contra células A2780 e PC3. Curiosamente, DLL causou uma parada no ciclo G2/M em células A2780 após 24 h de exposição, ativando a caspase 9 e atrasando o início da apoptose.

A microscopia confocal mostrou que DLL marcada com fluorescência estava localizada em torno dos núcleos das células A2780 e deu origem a núcleos aumentados e disseminação das células em altas doses. Estes dados revelam a interessante atividade antiproliferativa da DLL e sugerem que são necessárias mais investigações para explorar o potencial de DLL como um novo agente anticâncer (GONDIM et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Cristalizar e elucidar a estrutura cristalográfica da lectina de *Dioclea lasiocarpa* (DLL), bem como analisar a sua interação com *N*-glicanos e investigar o efeito da lectina em modelos de citotoxicidade em células de glioma da linhagem C6 correlacionando a ligação com carboidratos com o efeito biológico apresentado.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina de *Dioclea lasiocarpa*;
- Cristalizar a lectina utilizando a técnica de difusão de vapor;
- Obter cristais difratáveis da lectina complexada com carboidratos
- Obter os dados de difração de raios X;
- Caracterizar tridimensionalmente a estrutura da lectina por cristalografia de raios X;
- Avaliar o perfil de interação de DLL com mono e dissacarídeos por *docking molecular* através do software *CLC Drug discovery*;
- Avaliar o perfil de interação com *N*-glicanos por meio de *docking molecular* através do software GOLD;
- Averiguar a citotoxicidade da proteína frente às células de glioma da linhagem C6;
- Investigar o mecanismo do possível efeito citotóxico da lectina.

3 METODOLOGIA

3.1 Purificação da lectina DLL

A lectina de *Dioclea lasiocarpa* foi purificada de acordo com o procedimento descrito por (DO NASCIMENTO et al., 2012). As sementes foram moídas em um pó fino usando um moinho de café, e as proteínas solúveis foram extraídas à temperatura ambiente em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M [1:10 (p:v)] sob agitação contínua durante 4 horas, seguido de filtração em papel de filtro e centrifugação a 10.000 x g a 4 °C por 20 min. O sobrenadante obtido foi aplicado em uma matriz de Sephadex G-50 (30 mL) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M, CaCl₂ 5 mM e MnCl₂ 5 mM. A fração não retida (PI) foi eluída com o mesmo tampão a uma taxa de fluxo constante e a fração retida (PII) foi eluída com glicose 0,2 M em NaCl 0,15 M. As frações foram monitoradas por absorbância do efluente a 280 nm. Posteriormente, o material retido (proteína pura) foi dialisado exaustivamente por 12 h contra água ultrapura. A lectina DLL foi então liofilizada para experimentos posteriores.

3.2 Ensaios de cristalização

Para os ensaios iniciais de cristalização, a proteína (DLL) foi preparada a 12,5 mg/mL em solução de Tris-HCl 25 mM pH 7,6 previamente incubada por 30 min e a 37 °C com X-man (5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-manose), na concentração de 5 mM. Os ensaios foram realizados utilizando os kits de cristalização JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience), Crystal Screen I, II e Index (Hampton Research) em sistema automatizado Mosquito TTP Labtech.

A fim de se obter cristais maiores e, potencialmente melhor difratáveis, as condições iniciais de obtenção dos cristais de DLL foram otimizadas. O processo de otimização foi conduzido por meio de testes intervalos menores de pH da solução tampão, concentração de agente precipitante e agente estabilizante, próximas da solução inicial de obtenção do cristal e, para tal fim, os experimentos foram realizadas em placas de MRC Maxi Placa (Swissci) de 48 poços, à temperatura ambiente (37 °C), através do método de difusão de vapor em gota sentada (JANCARIK; KIM, 1991). As gotas foram preparadas misturando-se a solução de proteína com as soluções de cristalização em uma proporção de volume 1:1. Cristais adequados para difração de raios-X foram crescidos no período de 1 semana com dimensões máximas de aproximadamente 0,1 mm x 0,3 mm x 0,1 mm.

3.3 Coleta de dados de raios X

Os dados de difração de raios-X foram coletados por radiação síncrotron na estação MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS-Campinas, Brasil) em um comprimento de onda de 1,46 Å. Toda difração experimentos foram conduzidos a -173 °C com um detector PILATUS 2M™ (Dectris, Suíça). Antes da difração, os cristais foram embebidos em uma solução aquosa crioprotetora de glicerol a 30% para evitar a formação de gelo. Um total de 360 imagens foram coletadas com um ângulo de oscilação de 0,5°. As imagens experimentais foram processadas usando o programa iMosflm com o escalonamento subsequente das intensidades das reflexões usando SCALA presente pacote de programas do CCP4 (Collaborative Computational Project, number 4) (EVANS, 2011; WINN et al., 2011).

3.4 Determinação e refinamento da estrutura

A substituição molecular foi realizada para resolver o problema da fase, usando métodos de máxima verossimilhança implementados no MOLREP (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997), e a estrutura anteriormente publicada da lectina de *Dioclea virgata* complexada com X-man (PDB id: 3RS6, monômero A) foi usada como modelo. Foi encontrada uma cópia por unidade assimétrica. Refinamento cristalográfico e adição de moléculas de água e ligantes foram realizados com a suíte de programas PHENIX (ADAMS et al., 2012). Os procedimentos automáticos foram assistidos por modificações manuais do modelo auxiliadas pelo programa WinCoot (EMSLEY et al., 2010). A qualidade do modelo foi avaliada pela ferramenta de validação do PDB (READ et al., 2011). PyMOL v1.7.4.5 foi usado para gerar as figuras e LigPlot+ v. 1.4.5 (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995) foi usado para gerar representações bidimensionais das interações. As coordenadas atômicas da DLL complexada com X-man foram depositados no *Protein Data Bank* e rotulados como PDB ID: 5UUY.

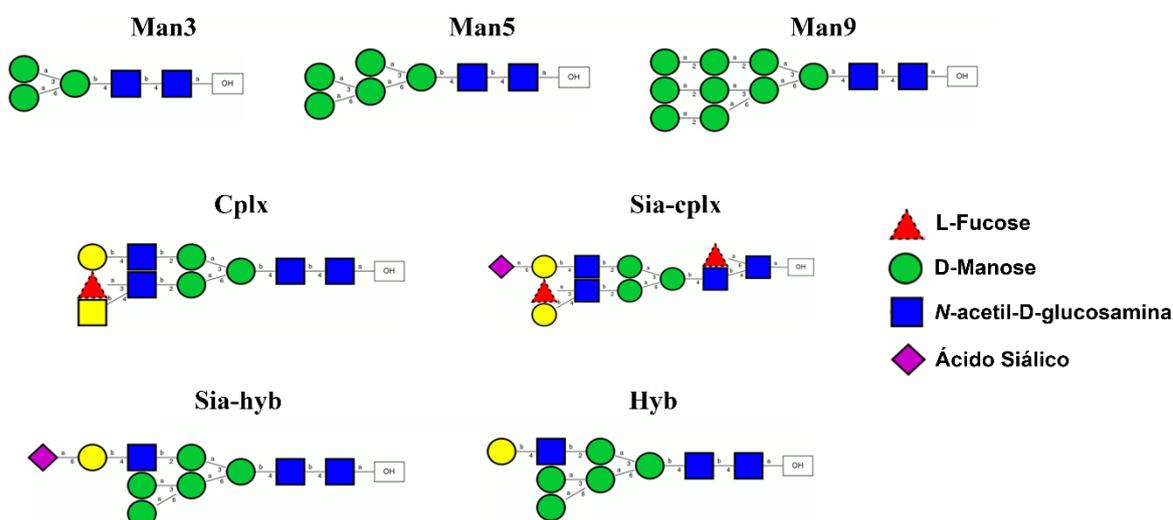
3.5 Docking molecular

A ancoragem de carboidratos com a estrutura de DLL foi realizada através do programa CLC Software Drug Discovery Workbench (Versão 3.1, CLCbio®, Boston, MA, EUA). A cavidade correspondente ao CRD de DLL foi selecionada como o centro da ligação com um raio de 11 Å para monossacarídeos e 13 Å para dissacarídeos. A conformação de menor

energia para cada ligante foi obtida a partir da biblioteca de ligantes do PDB ou modelada no servidor Carbohydrate Builder (Woods Group, Glycan Web, Universidade da Geórgia, Athens, GA). O número de iterações para cada ligante foi definido em 5000 e o algoritmo PLANTSPLP foi utilizado pelo software para calcular *score* de ligação na qual uma pontuação mais negativa indica interações mais favoráveis (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009). As melhores conformações dos ligantes foram selecionadas com base na pontuação de encaixe e na coerência das interações.

Simulações de *docking* também foram realizadas para avaliar a capacidade de DLL de interagir com *N*-glicanos comumente presente nas glicoproteínas celulares (PARKER et al., 2013). Estruturas de glicanos minimizadas energeticamente foram geradas com o servidor Carbohydrate Builder (Woods Glycan Web, Universidade da Geórgia, Atenas, GA). Representações de glicanos são mostrados na (Figura 5). Essas simulações foram realizadas com o programa GOLD v5.5 (CDCC, Cambridge, Inglaterra). Este programa aplica um algoritmo que testa várias poses dos ligantes, permitindo flexibilização parcial dos resíduos da proteína (JONES et al., 1997). A estrutura de DLL foi preparada para simulações adicionando átomos de hidrogênio e removendo ligantes e moléculas de solvente. O local de ligação foi determinado como o centro do CRD com todos os átomos em um raio de 10 Å. Os parâmetros escolhidos foram os seguintes: função de pontuação PLANTSPLP, tamanho populacional de 100, pressão de seleção de 1.1, número de operações de 10.000, número de ilhas de 5, tamanho de nicho de 2, frequência de cruzamento de 95 e número de poses de 20. As melhores poses foram escolhidas combinando a pontuação de encaixe, violações da geometria do ligante, ligações de hidrogênio esperadas e interações hidrofóbicas.

Figura 5. Representação da estrutura de glicanos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 Cultura de células e tratamento com lectina

A linhagem celular C6 de glioma de rato (ATCC-CCL-107) foi fornecida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (RJ, Brasil). Isolamento e cultivo de Glioblastoma Multiforme (GBM1) e culturas de astrócitos corticais primários foram realizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) conforme descrito abaixo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local apropriado. A linha celular de glioma C6 de rato (BENDA et al., 1968) foi mantida em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (Gibco®), 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Gibco®). As células foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de 96, 48 ou 6 poços com densidade de 5×10^3 , 5×10^4 ou 5×10^5 de células por poço, respectivamente, e incubadas por 24 h a 37 °C em uma incubadora (5% de CO₂). Após esse período, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por 6, 24 ou 48 h em DMEM isento de soro, porém contendo veículo ou lectina DLL (GROBBEN; DE DEYN; SLEGGERS, 2002). A lectina DLL foi diluída com tampão HEPES-salino sem glicose composto (mM) de NaCl 124, KCl 4, MgSO₄ 1,2, HEPES 25, CaCl₂ 1, pH 7,4. Para todos os ensaios, as culturas de células de controle foram incubadas com tampão HEPES-soro fisiológico sem glicose (veículo).

3.7 Ensaio MTT

A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de redução colorimétrico MTT (Sigma®) [(Brometo de (3-4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5difeniltetrazólio] (MOSMANN, 1983). As células C6 foram semeadas em uma placa de 96 poços em uma concentração de 5×10^3 células por poço e incubadas por 24 horas a 37 °C em uma incubadora (5% de CO₂). Após esse período, o meio de cultura foi trocado, e as células foram incubadas por 24 ou 48 h no mesmo meio, porém contendo veículo (controle) ou lectina DLL na concentração final de 10, 30, 50 e 100 µg/mL. O meio foi então removido e as células foram incubadas durante 1 h (37 °C) com 0,1 mL de 0,5 mg/mL de MTT diluído em tampão PBS. As desidrogenases mitocondriais em células viáveis reduziram o MTT a cristais de formazan, que foram dissolvidos em 0,1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, as placas foram incubadas por 30 min a 37 °C. A absorbância foi medida espectrofotometricamente usando o equipamento Infinite M200 Tecan

Microplate Reader ($k = 540 \text{ nm}$). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (veículo) que foi considerado 100%.

3.8 Microscopia de luz

A fim de abordar as alterações morfológicas em resposta ao tratamento com lectina, as células foram visualizadas em microscopia óptica usando um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido. As células C6 foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células por poço por 24 h nas mesmas condições descritas antes. Após esse período, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por 48 h em DMEM sem soro contendo veículo (controle) ou lectina DLL. Em seguida, as células foram visualizadas e imagens representativas foram capturadas em momentos de 24 e 48 h.

3.9 Ensaio Caspase 3

A fim de determinar a capacidade do DLL de induzir a morte celular por apoptose, a atividade da Caspase 3 foi analisada usando o kit EnzChek[®] Caspase-3 (Invitrogen). As células de glioma C6 foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração de 10^6 células por poço por 24 h em DMEM suplementado com 10% de SFB. Após esse procedimento, o meio foi trocado por DMEM sem soro, e as células foram incubadas por 6 h na presença de veículo (controle) ou DLL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). O ensaio da Caspase-3 foi realizado de acordo com as especificações do fabricante.

3.10 Ensaio com laranja de acridina

A coloração das células com laranja de acridina (AO) foi realizada para estudar o padrão de morte celular e indução de organelas vesiculares ácidas pela lectina após 24 e 48 h de incubação. As células C6 foram semeadas em placas de 48 poços na concentração de 5×10^4 células por poço por 24 h em DMEM suplementado com 10% de SFB. Posteriormente, o meio foi trocado por DMEM sem soro contendo veículo (controle) ou lectina DLL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$). Após 24 e 48 h, AO foi adicionado diretamente ao meio de cultura (10 $\mu\text{g/mL}$; Sigma Chemicals, EUA) e mantido no escuro por 20 min. Todos os procedimentos foram realizados a 37 °C. As células foram visualizadas pelo microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido usando conjuntos de filtros, excitação de 470 nm e emissão de 525 nm para detecção de

cromatina (CR) e excitação de 350 nm e emissão de 615 nm para detecção de vesículas ácidas (AVO).

3.11 Ensaio do iodeto de propídio

Para o ensaio de iodeto de propídio (IP), as células C6 foram semeadas em uma placa de 48 poços nas mesmas condições descritas para o ensaio de laranja de acridina (5×10^4 células por poço) e tratadas com veículo ou DLL em concentrações e intervalos de tempo de 24 e 48 h. Após a incubação, Hoechst (1 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Chemicals, EUA) e iodeto de propídio (IP, 14 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Chemicals, EUA) foram adicionados diretamente à cultura e mantidos no escuro por 15 min (SINGH et al., 2016). As células foram visualizadas sob um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido usando conjuntos de filtros, excitação de 488 nm e 560 nm para IP e excitação de 353 nm e 483 nm para detecção de Hoechst.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism, versão 5.0 (La Jolla, Califórnia, EUA). Os dados apresentaram distribuição normal, segundo o teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) e foram avaliados pela análise de variância (ANOVA one-way), seguida do teste post-hoc de Bonferroni. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise estrutural geral

Cristais de DLL foram obtidos na condição inicial nº 59 do kit JCSG ++ (Jena Bioscience) composto por 14,4% p/v de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000), 20% v/v de glicerol, 80 mM de ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico (MES), pH 6,5 e acetato de cálcio 0,16 M. O cristal foi obtido por otimização desta condição (tampão MES 0,1 M, pH 6,5, PEG 8000 10%, acetato de cálcio 0,16 M). Os dados de difração mostraram que o cristal de DLL pertence ao grupo espacial ortorrômbico I222. Os parâmetros de dados, refinamento e qualidade descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da coleta de dados, refinamento e qualidade.

Parâmetro	Valor
Coleta de dados	
Grupo espacial	I222
Parâmetros da célula unitária	
a. b. c	64.66 Å, 85.98 Å, 93.25 Å
α . β . γ	90°, 90°, 90°
Reflexões totais	107,202 (9459)
Número de reflexões únicas	21,274 (3019) ^d
Moléculas por unidade assimétrica	1
Limites de resolução (Å)	33.421 – 1.880 (1.980 – 1.880) ^d
R _{merge} ^a (%)	0.090 (0.345) ^d
Completeza	98.80 (97.2) ^d
Multiplicidade	5.0 (3.1) ^d
I/ σ (I) médio	9.1 (2.2) ^d
CC(1/2)	99.4 (79.2) ^d
Wilson <i>B</i> -fator (Å ²)	21.890
Substituição Molecular	
wRfactor	0.392
Score	0.800
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	33.421 – 1.880 (1.980 – 1.880)
R _{factor} ^b (%)	22.50 (36.33) ^d
R _{free} ^c (%)	26.22 (41.84) ^d
Número de reflexões	21126 (2746) ^d
Reflexões usadas para R-free	976 (98)
Número de resíduos por unidade assimétrica	231
Número de moléculas de água	141

RMS desvios dos valores ideais	
Comprimento das ligações (Å)	0.009
Ângulos das ligações (°)	1.30
Fator de Temperatura	
Valor médio de B para toda a cadeia proteica (Å ²)	28.38
Ligante	31.80
Solvente	31.80
Rotâmeros e Gráfico de Ramachandran	
Rotâmeros com desvios (%)	0
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	96.04
Resíduos em regiões permitidas (%)	3.96
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0

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

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

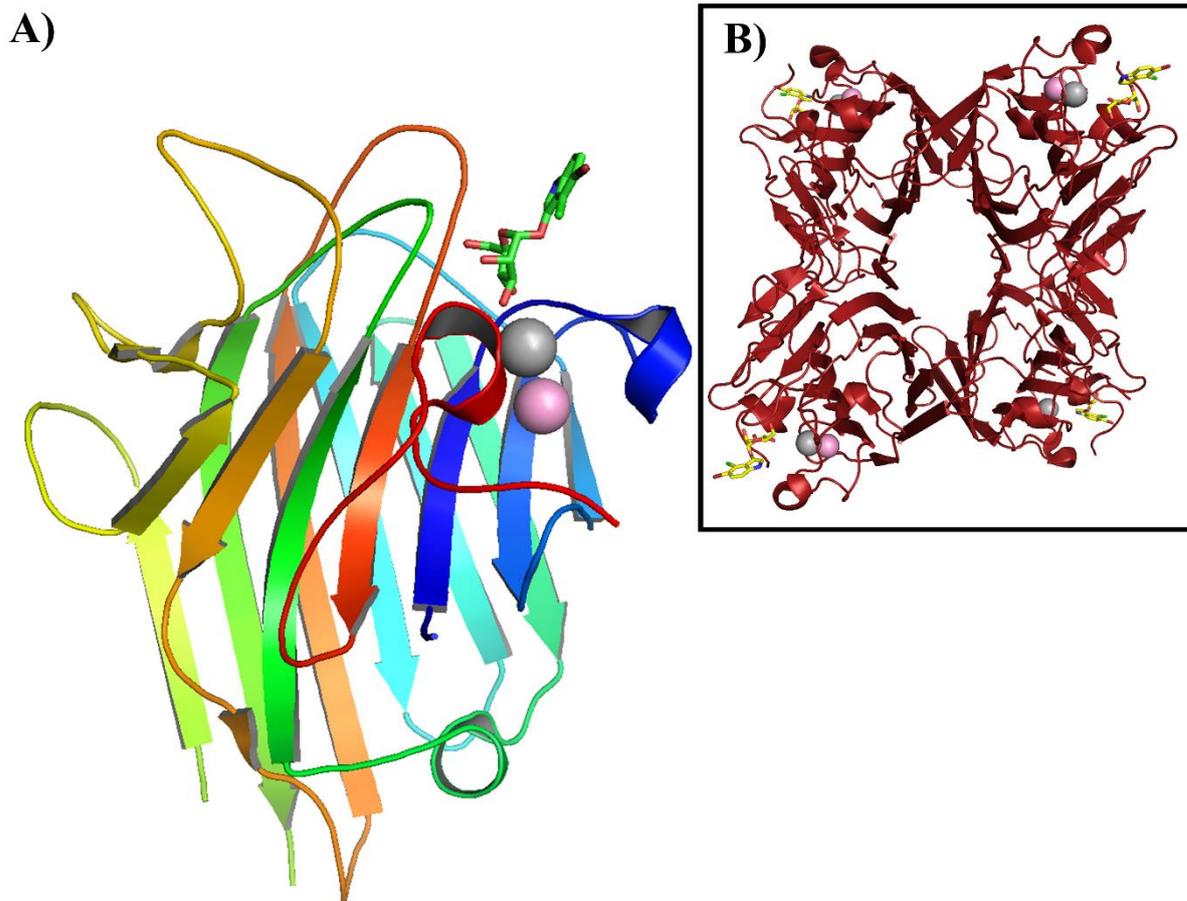
^c R_{free} = R-fator calculado para um subconjunto de 5% de reflexões selecionado aleatoriamente e excluído do refinamento.

^d Os valores entre parênteses representam a camada mais alta.

A estrutura geral complexada com X-man apresentou uma molécula por unidade assimétrica (Figura 6A) que foi refinada para uma resolução de até 1,88 Å e apresentou 141 moléculas de água (Tabela 2). A DLL apresentou íons de cálcio e manganês no sítio de ligação à metais (MBS), bem como a molécula de X-man modelada no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (Figura 6A). O modelo de difração de DLL não mostrou densidade na região 118NSIADA123, um evento recorrente em modelos de lectina de *Dioclea*, resultante da instabilidade desta região de loop (ZAMORA-CABALLERO et al., 2015; BARROSO-NETO et al., 2016; PINTO-JUNIOR et al., 2017b).

Os resíduos responsáveis pela estabilização da estrutura tetramérica de lectinas de *Dioclea* são His51/His131. His131 desempenha um papel crucial em um loop de rede que consiste em 114-125 resíduos de todas as quatro subunidades na cavidade central de lectina tetramérica (Figura 6B) e His51 mantém os loops da cavidade central em uma orientação espacial adequada para fazer contatos interdímeros mediados por His131. Essas interações são importantes para o equilíbrio dímero-tetrâmero (ZAMORA-CABALLERO et al., 2015).

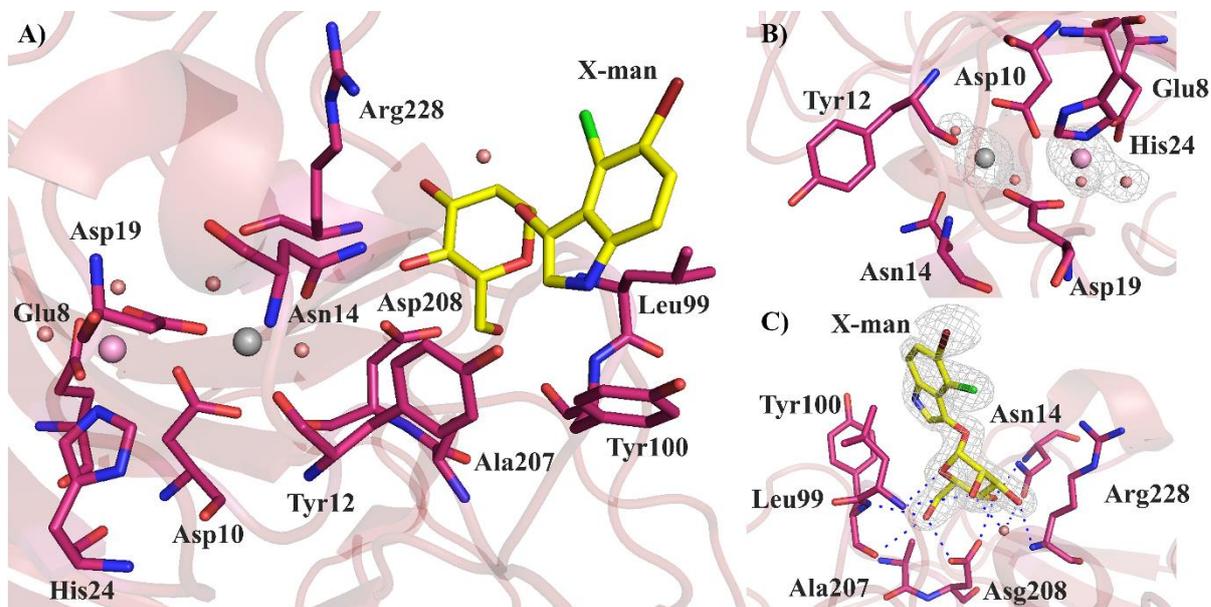
Figura 6. A) Estrutura geral do monômero de DLL complexada com X-man na representação em cartoon. As esferas representam o íon de cálcio em cinza e o íon de manganês em roxo. O ligante está representado em forma de bastão com carbonos coloridos em verde; B) Estrutura geral de DLL. Tetramero complexado com X-man. Monômeros representados em cartoon vermelho. As esferas representam íons de cálcio (em cinza) e íons de manganês (em roxo). A molécula X-man está em representação bastões com carbonos coloridos em verde.



Fonte: Elaborada pela autora.

No MBS, o manganês (Mn^{2+}) é coordenado por Glu8, Asp10, Asp19 e His24, e o cálcio (Ca^{2+}) é coordenado por Asp10, Tyr12, Asp19 e Asn14. Ambos os metais são estabilizados por duas moléculas de água (Figuras 7B e 8A-B). O CRD de DLL é composto pelos resíduos Tyr12, Asn14, Gly98, Leu99, Tyr100, Ala207, Asp208, Gly227 e Arg228 que interagem com a molécula X-man (Figuras 7C e 8C; Tabela 3). A cavidade hidrofóbica também é conservada com a participação de Tyr54, Leu81, Leu85, Val89, Val91, Phe111, Ser113, Val179, Ile181, Phe191, Phe212 e Ile214 (CAVADA et al., 2018b).

Figura 7. Sítio de ligação da DLL. A) Representação do sítio de ligação a metais da DLL na vizinhança do domínio de reconhecimento de carboidratos; B) sítio de ligação de metal DLL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) contornado em 3σ para Ca^{2+} e Mn^{2+} ; C) CRD do DLL com o mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) e omite a representação do mapa de 3σ em torno de X-man. As esferas representam o íon de cálcio (em cinza) e o íon de manganês (em roxo), enquanto as pequenas esferas representam as moléculas de água (em vermelho). A molécula X-man está em uma representação em bastão com carbonos coloridos em amarelo e os traços azuis representam os contatos polares.

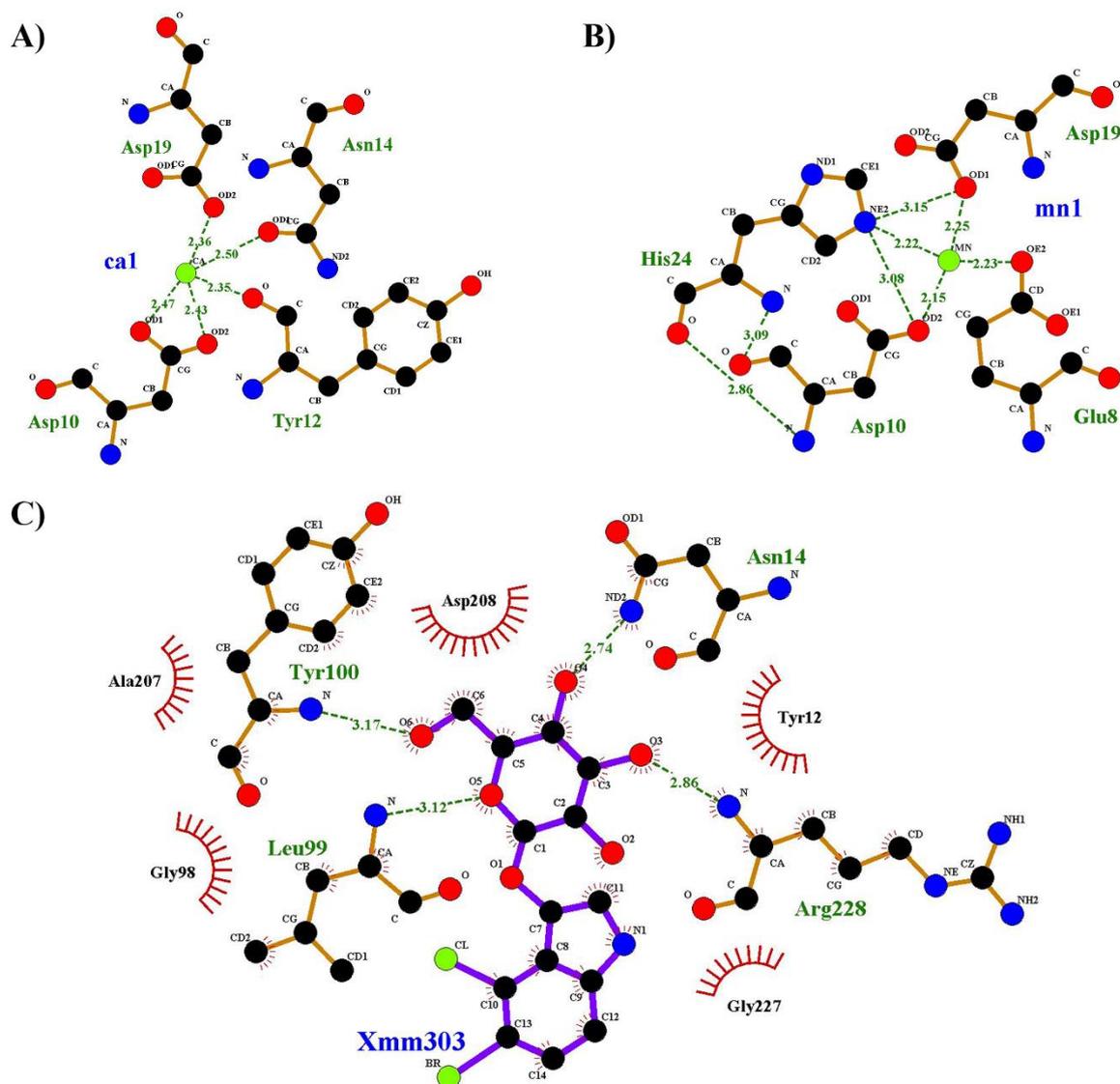


Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3. Interações de Van der Waals e contatos polares entre DLL e X-man

Aminoácido	X-Man	Distância (Å)
Interações de Van der Waals		
CRD-A		
Arg228 CB	O4	3.23
Asp208 OD1	C4	3.25
Asp208 OD2	C6	3.38
Asp208 OD1	C6	3.34
Asp208 CG	O6	3.40
Leu99 CB	O5	3.17
Gly98 CA	O6	3.37
Ala207 CB	O6	3.23
Tyr100 CE2	N1	3.23
Tyr12 OH	C11	2.94
Contatos polares		
Arg228 N	O3	2.86
Asn14 ND2	O4	2.74
Asp208 OD1	O4	2.66
Asp208 OD2	O6	2.65
Leu99 N	O5	3.12
Leu99 N	O6	3.27
Tyr100 O	O6	3.29
Tyr100 N	O6	3.17
Tyr12 OH	N1	3.22

Figura 8. Representação por LIGPLOT de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e coordenação em torno de A) Ca^{2+} , B) Mn^{2+} and C) X-man.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Docking molecular

Pontuações de *docking* de DLL com monossacarídeos e dissacarídeos são mostrados na Tabela 4. Para monossacarídeos, a lectina demonstrou forte interação com α -metil-D-manosídeo, seguido por D-manose e D-glicose. As interações formadas entre DLL e os glicanos complexos cplx e sia-cplx apresentaram pontuações de *docking* bastante próximas ($-59,81$ e $-61,54$), indicando que a lectina pode teoricamente interagir com esses glicanos e o capeamento por ácido siálico parece não afetar a ligação da lectina com este tipo de glicano. Para glicanos do tipo híbrido, o DLL interagiu fortemente com hyb (pontuação: $-75,03$) e

comparativamente mais fraco com sia-hyb (pontuação: -61,51), mas apesar da pontuação mais baixa para glicano sialilado, os dados ainda sugerem uma forte interação. A DLL interagiu favoravelmente com os glicanos de oligomanose, especialmente com o Man5, que contém cinco frações manosil, com uma pontuação de -62,42. Os complexos DLL-Man3 e DLL-Man9 apresentaram escores de -58,21 e -58,10, valores mais baixos em comparação com os outros glicanos testados. Estes resultados foram inesperados devido à especificidade do DLL para a manose. As representações e pontuações de complexos são mostradas na Figura 9 e na Tabela 5.

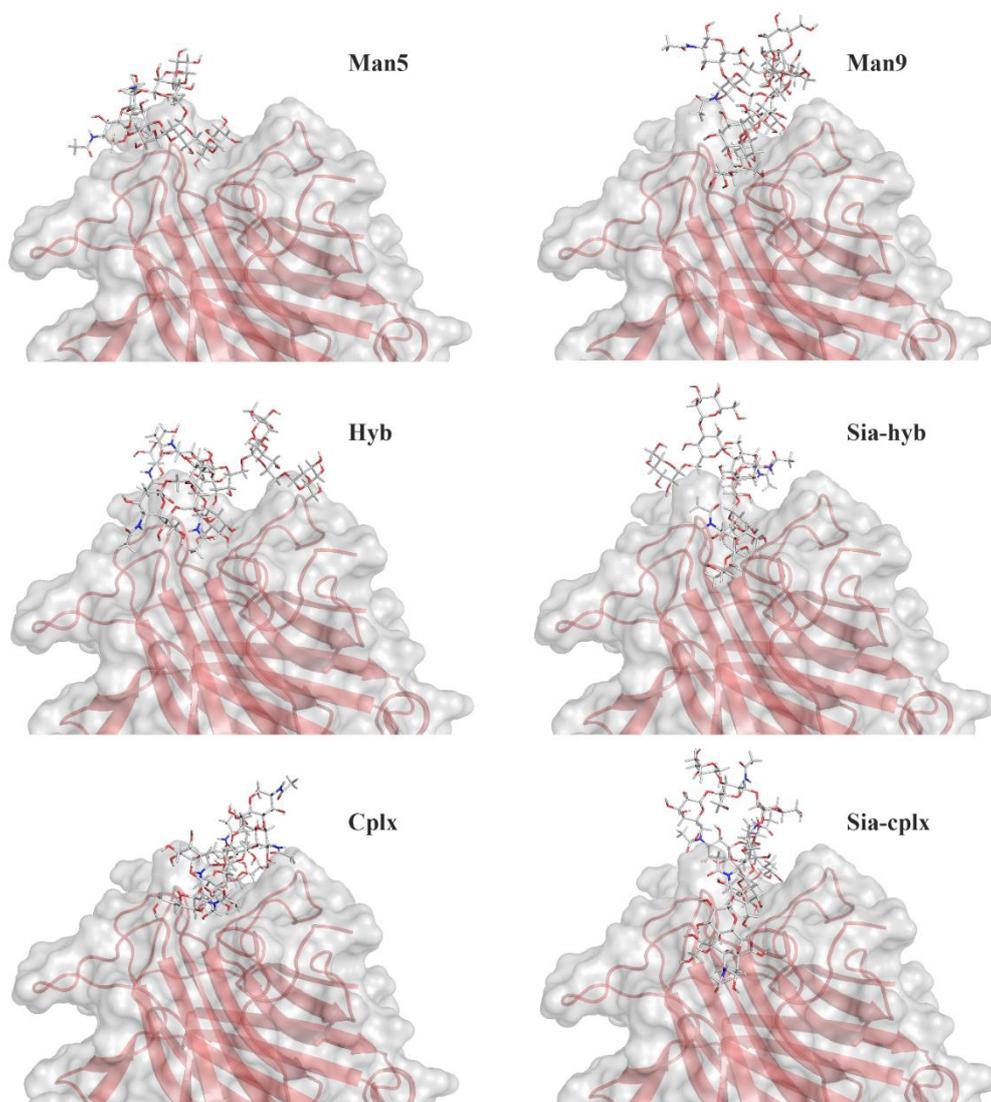
Tabela 4. Interações da DLL com carboidratos.

Carboidratos	Pontuação^a
D-glicose	-36.69
D-manose	-38.28
α -metil-D-manosideo	-40.80
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	-36.18
Manose-1,2- α -D-manose	-55.00
Manose-1,3- α -D-manose	-50.51
Manose-1,4- α -D-manose	-47.06
Manose-1,6- α -D-manose	-51.86
Manose-1,2- β -D-manose	-48.54
Manose-1,3- β -D-manose	-50.80
Manose-1,4- β -D-manose	-47.29
Manose-1,6- β -D-manose	-50.17
Metil manose-1,2- α -D-manose	-54.05
Metil manose-1,3- α -D-manose	-50.50
Metil manose-1,4- α -D-manose	-47.10
Metil manose-1,6- α -D-manose	-50.09
Metil manose-1,2- β -D-manose	-50.77
Metil manose-1,3- β -D-manose	-52.57
Metil manose-1,4- β -D-manose	-44.35
Metil manose-1,6- β -D-manose	-46.68
Manose-1,2- α -D-manose-1,2- α -D-manose	-54.55
Manose-1,2- α -D-manose-1,6- α -D-manose	-55.24
Manose-1,2- α -D-manose-1,3- α -D-manose	-54.80
Manose-1,3- α -D-manose-1,6- α -D-manose	-54.13
Manose-1,6- α -D-manose-1,6- α -D-manose	-57.14

^a Pontuação = $E_{inter} + E_{intra}$, onde E_{inter} é a energia de interação da proteína com o ligante:

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

Figura 9. Complexos de DLL com *N*-glicanos. A proteína está representada por carbonos vermelhos e superfície cinza e os glicanos estão em representados bastões com carbonos em cinza claro.



Fonte: Elaborada pela autora.

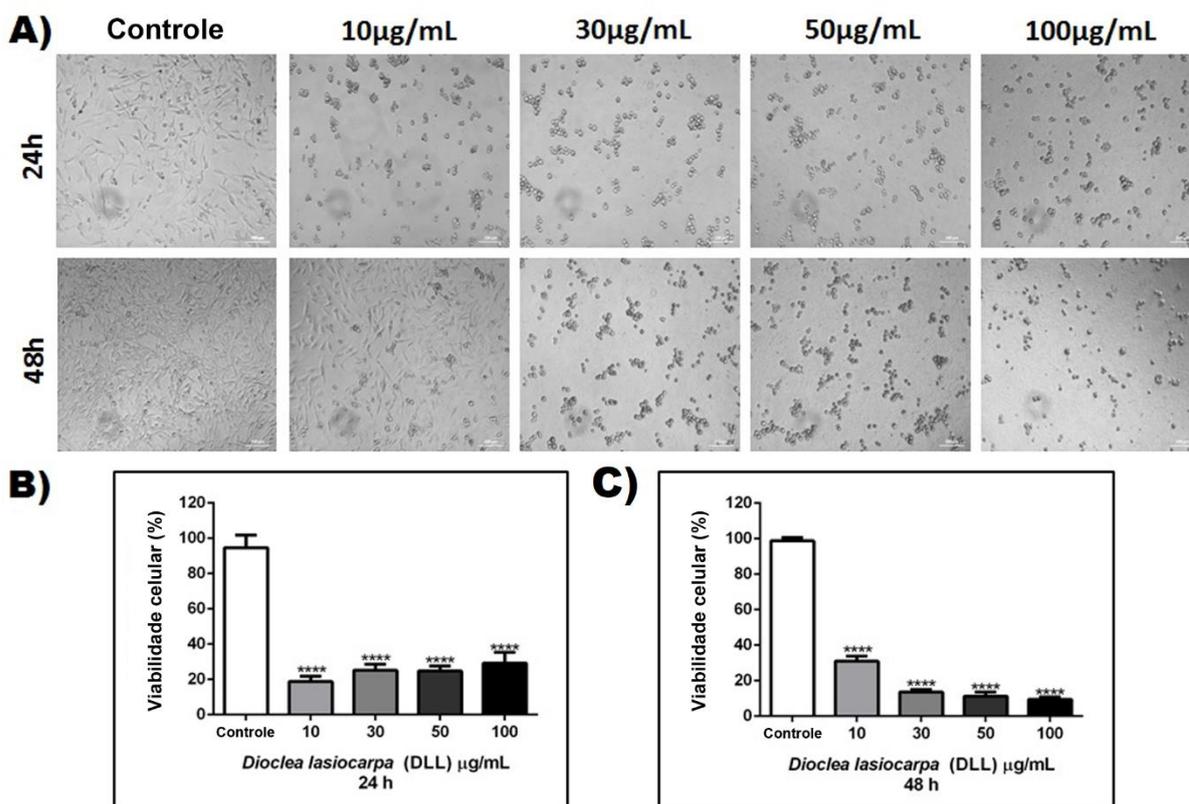
Tabela 5. Pontuações do *docking* de DLL com *N*-glicanos.

<i>N</i> -glicanos	Pontuação
Man3	-58,51
Man5	-62,42
Man9	-58,10
Cplx	-61,54
Sia-cplx	-59,81
Sia-hyb	-61,51
Hyb	-75,03

4.3 Atividade antiglioma

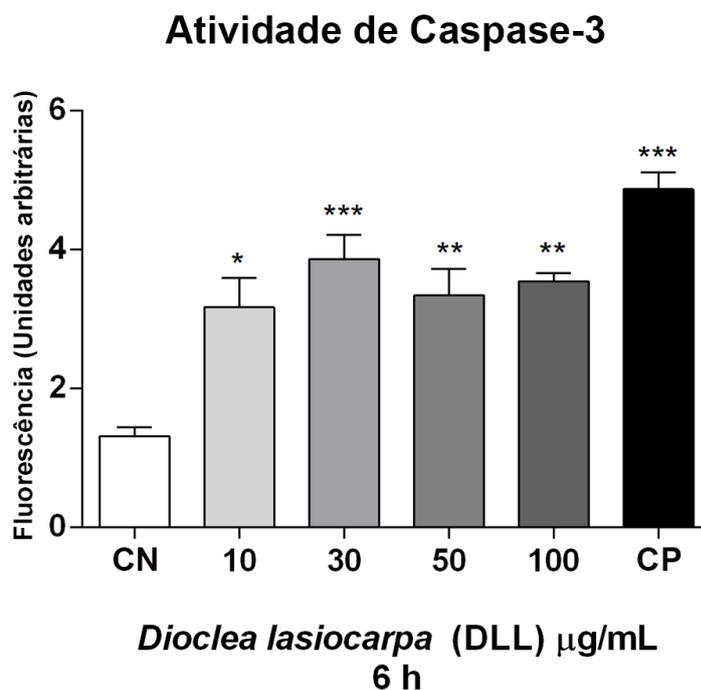
Os resultados mostrados na Figura 10 indicaram que o tratamento com DLL 10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 ou 48 h foi capaz de diminuir drasticamente a viabilidade celular, conforme medido pelo ensaio MTT (Figuras 10B e C). A morfologia celular também sofreu alterações (Figura 10A). Essencialmente, a forma aderente foi alterada para uma forma esférica em resposta ao DLL. Além disso, foram observados detritos, que caracterizam a degradação da matriz extracelular e a indução da morte celular, principalmente nas concentrações mais elevadas de lectina (Figura 10A). Ao avaliar a atividade da caspase 3, concluímos que DLL pode induzir a morte celular por apoptose. Os resultados mostram que DLL 10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou uma ativação significativa da caspase 3 após 6 h de incubação (Figura 11).

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



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11. DLL aumenta a atividade da caspase 3 induzindo a apoptose celular. O gráfico demonstra a atividade Caspase 3 6 h após o tratamento com veículo (NC) ou DLL nas concentrações de 10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O controle positivo (CP) foi realizado com estaurosporina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os dados são expressos em porcentagem do controle e os valores são apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, em comparação com o controle.



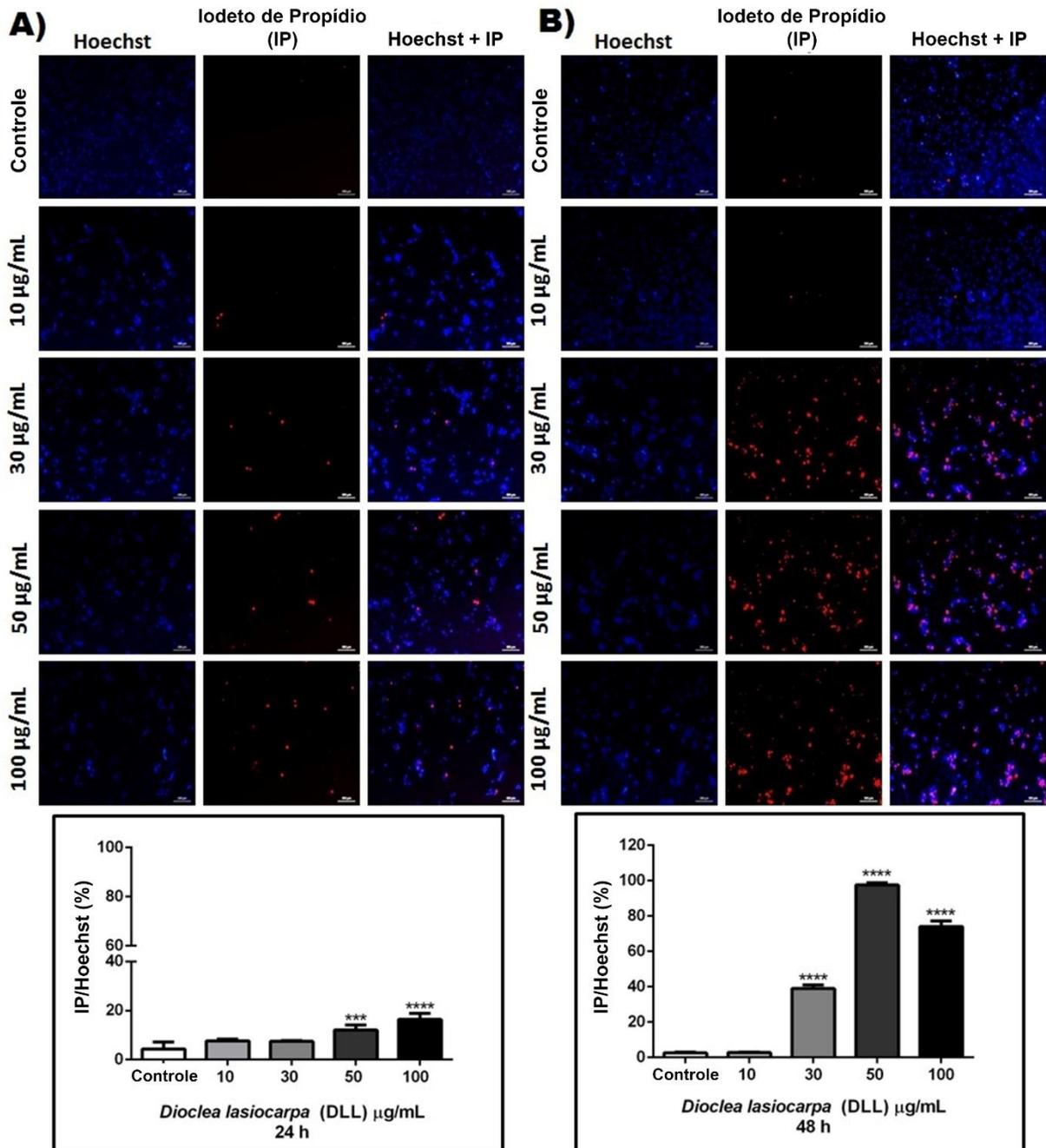
Fonte: Elaborada pela autora.

O ensaio usando iodeto de propício (IP) e Hoechst, é baseado na coloração diferencial das células com esses dois corantes fluorescentes, um deles é permeável à membrana celular (Hoechst) e o outro não é (PI). Desse modo, a diferença na coloração permite que células vivas e mortas sejam discriminadas. Quando o ensaio foi usado para detectar a morte celular, observou-se um aumento discreto, mas significativo da marcação de IP em comparação com o controle, por DLL 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ após 24 h de incubação (Figura 12A). Porém, no período de incubação de 48 h (Figura 12B), um notável incremento da marcação de IP foi detectado de 30 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, indicando uma intensa indução de morte celular com lesão de membrana neste período. Portanto, DLL exibe um perfil de atividade contra as células de glioma C6, que inclui: (1) uma ativação precoce da caspase 3 após 6 h (DLL 10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (2) diminuição da viabilidade celular com alterações morfológicas, conforme observado em 24 e 48 h (DLL 10–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); e (3) morte celular com ruptura da membrana claramente observada após 48 h (DLL 30–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Apesar de ativar a caspase 3 (Figura 11) e diminuir a capacidade celular de reduzir o MTT (Figura 10B e C), é digno de nota que DLL a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não aumentou a marcação de

IP (Figura 12A e B). Além disso, a morfologia celular parece ter se recuperado parcialmente após 48 h de tratamento com DLL a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 10A).

Figura 12. DLL induz lesão da membrana celular do glioma C6. Células de glioma C6 foram incubadas com veículo (controle) ou DLL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24h ou 48h. As células foram coradas com Hoechst e iodeto de propídio (IP). Depois disso, as células foram visualizadas por um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido (ampliação de 20 x). A figura mostra uma imagem representativa e quantificação da coloração de PI 24 h (A) e 48 h (B) após o tratamento. As imagens são representativas de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação foi expressa como porcentagem de fluorescência de PI / Hoechst, e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ ou **** $p < 0,0001$, em comparação com o controle.

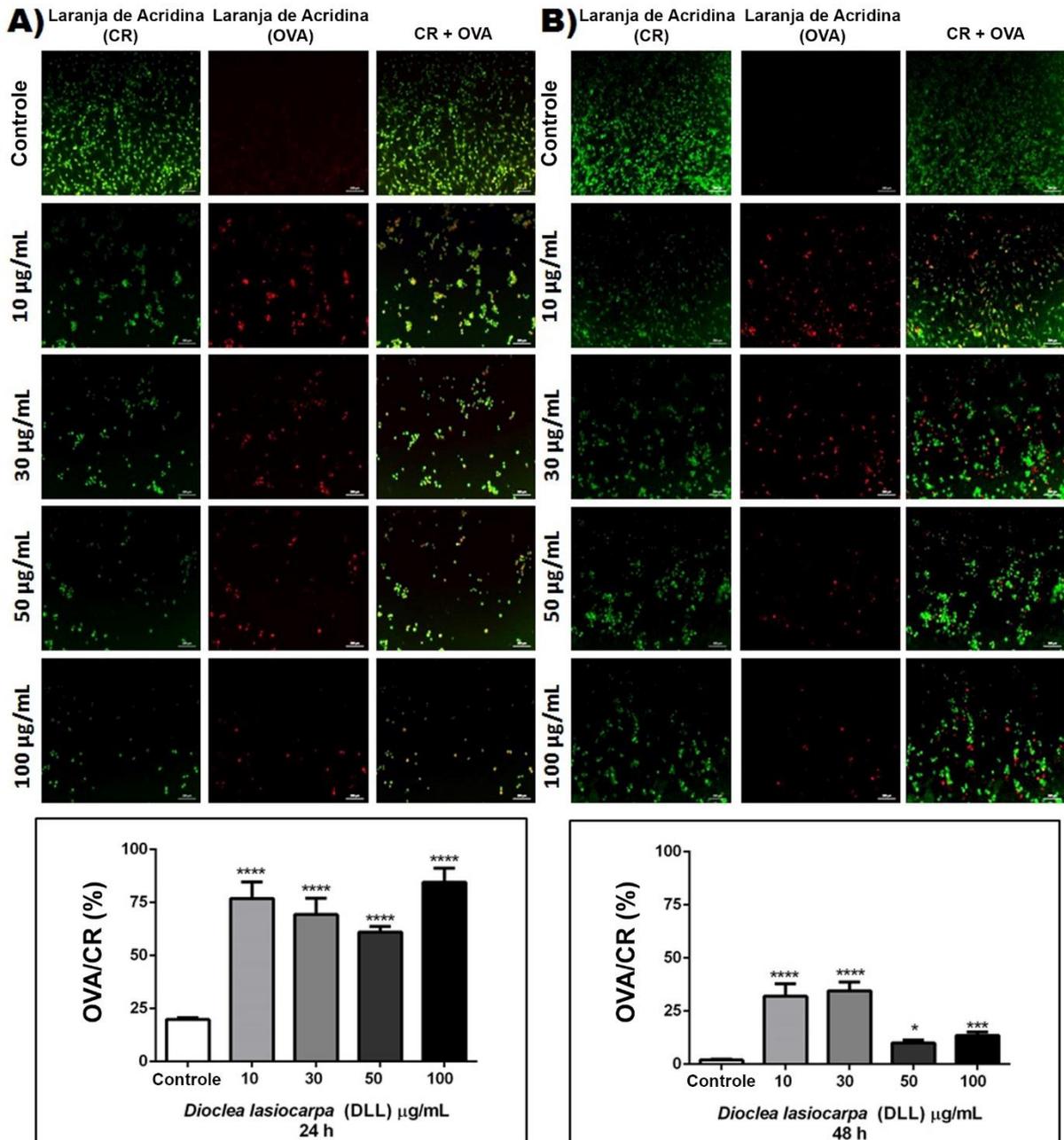


Fonte: Elaborada pela autora.

A laranja de acridina é um fluoróforo verde permeável às células que pode ser protonado e aprisionado em organelas vesiculares ácidas (AVOs). Este ensaio foi aplicado como um método inicial acessível e confiável para avaliar a autofagia (PRATT; ROY; ANNABI, 2012; THOMÉ et al., 2016; OSTERNE et al., 2017). Um incremento robusto de organelas vesiculares ácidas (AVOs) foi detectado durante a incubação de 24 h em resposta a DLL em concentrações de 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 13A). No entanto, após 48 horas de tratamento, esse efeito foi menos perceptível, com detecção mais relevante de AVO apenas em resposta ao DLL em 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 13B).

É importante destacar que o tratamento com DLL a 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 48 h resultou em um alto grau de morte celular com ruptura da membrana, enquanto o tratamento com DLL a 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resultou em nenhuma ou mínima membrana interrupção, respectivamente (Figura 13B). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que o DLL pode induzir autofagia, o que é claramente detectado 24 horas após o tratamento durante o período inicial de incubação.

Figura 13. O DLL melhora a detecção de organelas vesiculares ácidas (AVO) em células de glioma C6. A figura mostra imagens representativas e quantificação da coloração com laranja de acridina de células de glioma C6 após incubação com veículo (controle) ou DLL (10, 30, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 h (A) e 48 h (B). Cromatina (CR) e organelas de vesículas ácidas (AVO) foram identificadas como coloração verde e vermelha, respectivamente. As células AVO-positivas (vermelhas) representam autofagia, e a sobreposição de AVO e CR é apresentada como CR + AVO. As células foram visualizadas por um microscópio NIKON eclipse T2000-U invertido (ampliação de 20x). As imagens são representativas de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. A quantificação foi expressa como uma porcentagem de AVO / CR, e os valores são apresentados como média \pm SEM de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,1$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$,



Fonte: Elaborada pela autora.

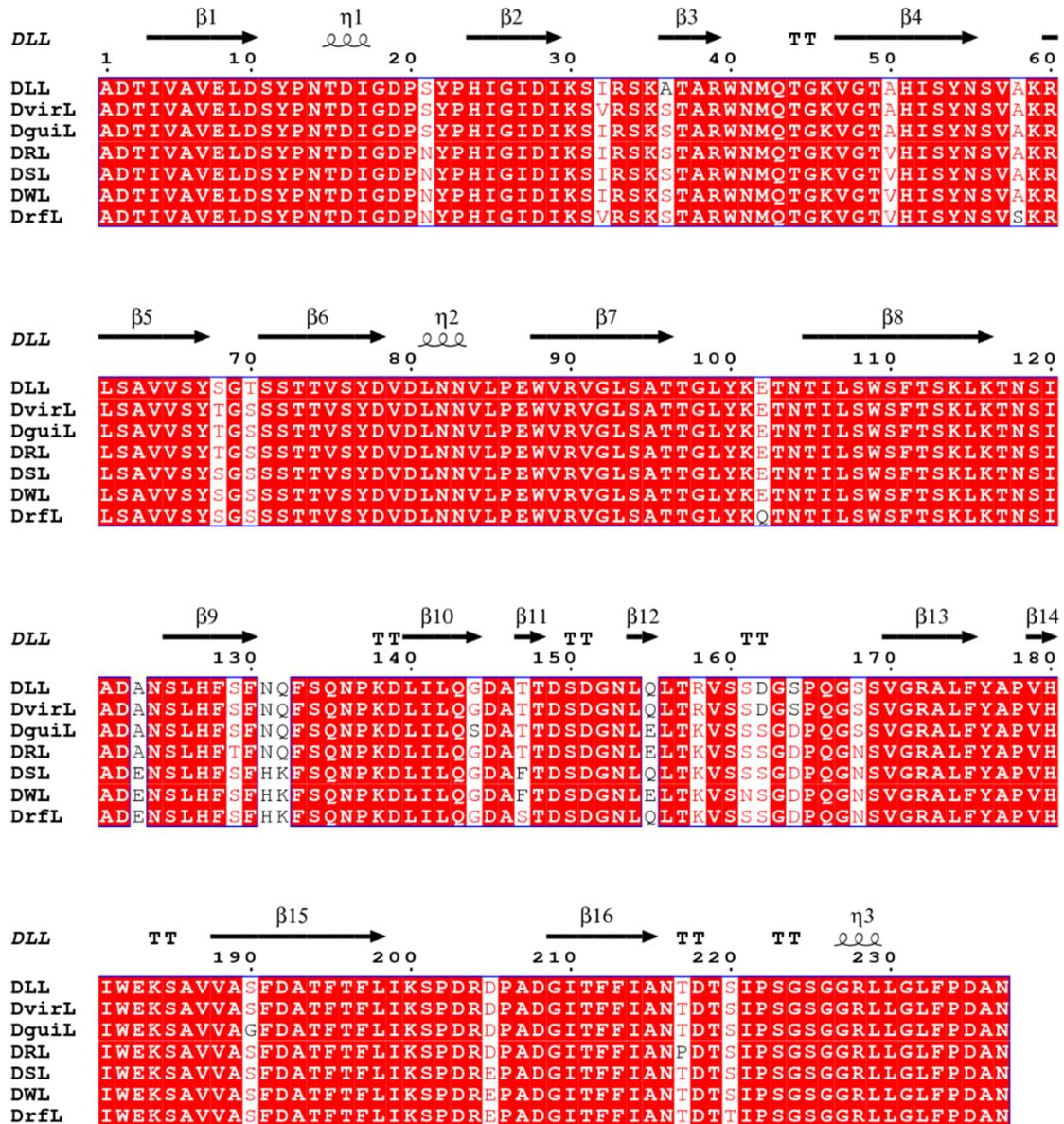
5 DISCUSSÃO

5.1 Estrutura de DLL e *docking* molecular

A caracterização estrutural da DLL revelou que o monômero apresentava um motivo *jellyroll* ou β -sanduíche, semelhante ao observado em outras lectinas de leguminosas (CAVADA et al., 2018b), que consiste em uma folha- β antiparalela de seis fitas parcialmente estendida e outra folha- β antiparalela curva de sete fitas, ambas conectadas por loops. Os monômeros estão associados em um tetrâmero (Figura 6B) formado por dois dímeros canônicos, ambos estabilizados por interações não covalentes, um conjunto comum de lectinas em solução (LORIS et al., 1998; ZAMORA-CABALLERO et al., 2015). O dímero canônico é caracterizado pela associação lado a lado de duas folhas- β , uma em cada monômero, formando uma folha β contínua de doze fitas (BRINDA et al., 2004; SINHA et al., 2007). Esses dímeros se associam consecutivamente para formar o tetrâmero (SINHA et al., 2005), conforme sugerido pela análise PISA (KRISSINEL; HENRICK, 2007). O tetrâmero é composto por quatro cadeias, cada uma com um sítio de ligação de metal e domínios de reconhecimento de carboidratos com a mesma especificidade.

A molécula de X-man complexada no CRD foi estabilizada por ligações interações de hidrogênio, Van der Waals e interações hidrofóbicas (Figura 7C). Ligações de hidrogênio são formadas entre os resíduos de aminoácidos Tyr12, Asn14, Gly98, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228 e os átomos de oxigênio N1, O3, O4, O5 e O6 presentes na molécula de X-man. As interações de Van der Waals e as hidrofóbicas envolvendo Tyr12, Gly98, Leu99, Tyr100, Ala207, Asp208 e Arg228 também contribuem para a ligação da lectina com este ligante (Figura 8C, Tabela 3). O íon cálcio presente no MBS interage diretamente com os resíduos Asn14 e Tyr12. O íon cálcio também é responsável pela estabilização de um *cis*-peptídeo entre Ala207 e Asp208 através de uma ponte formada com uma molécula de água. Essas interações atuam para estabilizar substancialmente resíduos importantes do CRD, especialmente o resíduo Asp208, que está localizado na base do CRD e é responsável pela estabilização do ligante. Todos esses resíduos são conservados em lectinas Diocleinae (Figura 14) (CAVADA et al., 2018b), como DvirL (*Dioclea virgata*) (BATISTA DA NÓBREGA et al., 2012), DSL (*Dioclea sclerocarpa*) (BARROSO-NETO et al., 2016) e DrfL (*Dioclea reflexa*) (PINTO-JUNIOR et al., 2017b). O *cis*-peptídeo Ala-Asp é altamente conservado em lectinas de leguminosas e é crucial para a formação de CRD nessas proteínas (LORIS et al., 1998).

Figura 14. Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de DLL (Gondim et al., 2017) com lectinas de sementes de Diocleinae: *Dioclea virgata* (DvirL, 98% de similaridade), *Dioclea guianensis* (DguiL, 96%), *Dioclea rostrata* (DRL, 95%), *Dioclea sclerocarpa* (DSL, 95%), *Dioclea wilsonii* (DWL, 94%) e *Dioclea reflexa* (DrfL, 93%). Os símbolos são os seguintes: hélices 310 (η), cadeias β (β), voltas β (TT), resíduos de ligação de açúcar (diamante) e resíduos de ligação de metal (quadrados).



Os escores de *docking* molecular do DLL com os carboidratos testados foram diferentes (Tabela 4). O *docking* sugere que a lectina interage mais favoravelmente aos monossacarídeos que apresentam um grupo hidroxila na posição axial do átomo C2, como α -metil-D-manosídeo e D-manose, quando comparada à D-glicose. Além disso, o α -metil-D-manosídeo tem um grupo metil no átomo O1 que aumenta a contribuição das interações não polares aumentando o valor da pontuação quando comparado com a D-manose. Esses resultados estão de acordo com os ensaios anteriores de inibição da hemaglutinação de DLL, indicando que é específica para manose/glicose (DO NASCIMENTO et al., 2012). Além disso, o redocking com X-man apresentou interações semelhantes às da estrutura cristalográfica, validando assim os resultados. Os valores tornaram-se mais negativos à medida que a complexidade dos carboidratos aumentava. Além disso, a lectina demonstrou diferentes valores de pontuação quando testada com dimanosídeos apresentando ligações glicosídicas com diferentes orientações, esses valores, para os mesmos carboidratos, foram diferentes entre lectinas do mesmo gênero (PINTO-JUNIOR et al., 2017b), comprovando que essas lectinas, mesmo com grande similaridade de sequência e estrutura tridimensional, apresentam diferenças estruturais que as tornam bastante distintas.

Em várias glicoproteínas, os glicanos estão ligados a proteínas por ligações *N*- ou *O*-glicosídicas. Para os *N*-glicanos, os carboidratos estão covalentemente ligados à amida da asparagina. As estruturas de *N*-glicanos normalmente compartilham um núcleo comum, $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$ (PINHO; REIS, 2015). Ao comparar as pontuações de *docking* para monossacarídeos e *N*-glicanos, a DLL pode interagir com todos os tipos de *N*-glicanos (Tabela 5). Para aqueles glicanos com alto teor de manose apresentando apenas frações de manosil nos ramos, Man5 apresentou a pontuação mais alta. Isso está de acordo com dados anteriores sobre a especificidade das lectinas Diocleinae (CAVADA et al., 2018b). Man5 e Man9 podem ser encontrados em várias glicoproteínas relevantes, como GP120 do HIV e o receptor de insulina (SIROIS et al., 2007; SPARROW et al., 2008).

N-glicanos do tipo complexo são aqueles que apresentam uma *N*-acetil-lactosamina (LacNAc) ligada ao núcleo principal. LacNAc é caracterizado por *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) e D-galactose ligados por uma ligação $\beta 1-4$ (STANLEY, 2016). Neste trabalho, cplx representa um glicano biantenário apresentando ramos LacNAc com um ramo apresentando um grupo fucosil, enquanto sia-cplx é semelhante a cplx com ácido siálico em cada terminal galactosil. A DLL interagiu com ambos, com pontuações próximas (Tabela 5) sugerindo que o ácido siálico não afeta significativamente as interações neste tipo de glicano. Os *N*-glicanos

híbridos apresentam características de alto teor de manose e glicanos complexos, apresentando ramificação(s) com frações manosil exclusivas e ramificação(s) com resíduos LacNAc (SUN et al., 2012). O Sia-hyb é composto por dois manosil acoplados a um ramo do núcleo e um LacNAc sialilado acoplado ao outro, enquanto o híbrido possui estrutura semelhante sem o ácido siálico. As pontuações de *docking* indicaram que a lectina pode interagir favoravelmente com este tipo de glicano e que o capeamento de ácido siálico pode afetar a ligação devido ao impedimento estérico. O *docking* molecular com *N*-glicanos sugere que DLL pode se ligar a qualquer tipo de glicano testado (SWANSON et al., 2010; MARQUES et al., 2017). Portanto, é possível concluir que os efeitos de DLL estão relacionados à sua capacidade de ligação a *N*-glicanos.

5.2 Atividade antiglioma

As lectinas vegetais foram sugeridas como moléculas anticâncer potenciais capazes de induzir a morte celular por diversos mecanismos, incluindo apoptose e autofagia (FU et al., 2011; LIU et al., 2013; JIANG et al., 2015). A Concanavalina A (ConA) é uma lectina de leguminosa que se liga a manose/glicose, purificada de sementes de *Canavalia ensiformis*, que demonstrou induzir a morte celular de glioblastoma, principalmente por autofagia (LI et al., 2011a; PRATT; ROY; ANNABI, 2012; PRATT; ANNABI, 2014). Um segundo trabalho demonstrou que a lectina de leguminosa específica à glicose/manose, purificada de *Canavalia virosa* (ConV), pode diminuir a viabilidade das células de glioma C6 (após 24 e 48 h de incubação) e o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) após 12 h de incubação. Além disso, o ConV induz autofagia (24 h) e morte celular com rompimento da membrana (48 h). No entanto, esses efeitos foram observados em um nível moderado e detectados principalmente em alta (100 $\mu\text{g/mL}$) concentração de ConV (OSTERNE et al., 2017).

Depois desses dois primeiros estudos, outros demonstraram o potencial antiglioma de lectinas de Diocleinae, como CaBo, DVL e DlyL, que podem induzir a morte celular em células de glioma, especialmente a cepa C6 de glioma, que foi a mesma utilizada neste trabalho. Todas essas lectinas induziram uma redução significativa na viabilidade celular variando de 30% a 60% com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e exposição de 48 h. Essas proteínas foram capazes de afetar o potencial de membrana mitocondrial ou a migração celular, e todas elas induziram alterações morfológicas nas células de uma forma poligonal para uma esférica, seguidas de redução da adesão celular. Métodos de coloração indicaram morte celular por processos autofágicos, necróticos e apoptóticos induzidos por vias mitocondriais e modulação de

metaloproteinases (CAVADA et al., 2018a; LEAL et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2018). Provavelmente DLL tem capacidade de demonstrar os mesmos efeitos promovidos por estas lectinas. Além disso, um estudo anterior envolvendo DLL demonstrou que esta lectina possui uma atividade antiproliferativa potente (na faixa de baixa concentração nanomolar) contra várias linhas de células de carcinoma humano, incluindo A2780 (ovário), A549 (pulmão), MCF-7 (mama) e PC3 (próstata) (GONDIM et al., 2017).

No presente estudo, mostrou-se que a DLL provocou uma redução notável da viabilidade celular após 24 e 48 h, mas esse efeito começou a partir de uma baixa concentração de 10 µg/mL (Figura 10). Além disso, a DLL 10–100 µg/mL (6 h) induziu ativação significativa da caspase 3 (Figura 11), sugerindo que a DLL é uma lectina eficaz na indução da apoptose de glioma em uma faixa de baixa concentração.

Observou-se que a lesão da membrana ocorreu em grande parte após 48 horas de incubação com DLL no intervalo de concentração de 30–100 µg/mL, conforme medido por coloração com IP (Figura 12B). Este efeito foi desprezível no período de incubação de 24 horas (Figura 12A). Em contraste, a indução de autofagia por DLL ocorre em alto grau após 24 h de incubação e na faixa de concentração de 10–100 µg/mL (Figura 10A), mas após 48 h de incubação, os efeitos da autofagia diminuem (Figura 13B) No geral, podemos estabelecer dois perfis principais de dependência de concentração para a DLL contra células de glioma C6. DLL em baixa concentração (10 µg/mL) ativa a Caspase 3, diminui a viabilidade celular e induz autofagia, mas não causa o rompimento da membrana celular posterior (após 48 h de incubação). Por outro lado, o DLL em alta concentração (30–100 µg/mL) produz os mesmos efeitos, mas leva a uma lesão da membrana celular robusta e posterior (48 h). Portanto, o destino final da célula de glioma C6 depende da concentração de DLL.

No entanto, não foram abordados os mecanismos moleculares subjacentes que explicariam os diferentes equilíbrios encontrados entre apoptose, autofagia e necroptose (GALI-MUHTASIB et al., 2015; CHEN; YU; ZHANG, 2016; GALLUZZI et al., 2017).

A autofagia, por exemplo, é um mecanismo complexo que pode produzir morte celular ou sobrevivência celular, dependendo do nível de atividade (PRATT; ROY; ANNABI, 2012; PRATT; ANNABI, 2014; REDMANN; DARLEY-USMAR; ZHANG, 2016). Da mesma forma, a apoptose pode exibir permeabilidade das células da membrana em períodos posteriores. No entanto, o nível de produção de AVO e ativação de Caspase 3 por DLL foi semelhante de 10 a 100 µg/mL. Portanto, as vias específicas de morte celular desencadeadas pelo DLL em cada concentração merecem um estudo futuro mais aprofundado.

Os gliomas são bem conhecidos por serem resistentes à indução da morte celular (PRATT; ROY; ANNABI, 2012; PRATT; ANNABI, 2014). Os resultados mostraram que a DLL aparenta promover a ativação da Caspase 3, a autofagia e a morte celular, sugerindo que a DLL poderia, portanto, ser uma terapia alternativa para mitigar a resistência ao glioma. Embora mais estudos com DLL sejam necessários, os resultados deste trabalho indicam o potencial do DLL como agente antitumoral, levantando a possibilidade dessa lectina como uma futura ferramenta para estudar a morte de células de glioma ou como estratégia terapêutica. Portanto, nossos achados apóiam ainda mais o consenso de lectinas da subtribo Diocleinae como tendo potencial antitumoral e antiglioma. Nosso trabalho indica ainda que mesmo pequenas diferenças estruturais entre as lectinas de leguminosas podem resultar em uma enorme variação na promoção da autofagia e morte celular. No entanto, é importante em estudos futuros avaliar a atividade antiglioma de DLL contra outras linhagens de células de glioma, incluindo a linha de células de glioma humano U87. Foi possível concluir que a molécula alvo deste trabalho reconhece carboidratos presentes em células de glioma e se apresenta como uma candidata promissora a prosseguir nos testes de diagnóstico e terapia alternativa para mitigar a resistência ao glioma.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho relatou a estrutura tridimensional da lectina de *Dioclea lasiocarpa*, DLL, bem como detalhou a interação da lectina com diferentes carboidratos e glicanos. DLL apresentou uma forte atividade citotóxica frente às células de glioma da linhagem C6, por mecanismos de ativação da caspase do tipo 3, o que está diretamente relacionado com a capacidade da lectina de interagir com *N*-glicanos. Esta proteína mostrou-se ser uma molécula muito eficaz contra gliomas, especialmente pelo efeito citotóxico observado na mais baixa concentração dentre as lectinas com dados publicados na literatura. Por fim, este trabalho representa um avanço promissor no entendimento da estrutura-função de lectinas, especialmente as que reconhecem carboidratos e exerçam efeitos em células cancerosas, pois aqui foi demonstrado que a DLL, além de reconhecer os carboidratos presentes em células de glioma, se apresenta como uma candidata promissora a prosseguir nos testes de diagnóstico e terapia alternativa para mitigar a resistência de tumores malignos mais persistentes, além de ser uma potencial ferramenta biotecnológica. Estudos posteriores utilizando células de glioma humano, células U87, serão realizados para obtenção de mais dados para aplicação em humanos.

REFERÊNCIAS

- ADAMCZYK, B.; THARMALINGAM, T.; RUDD, P. M. Glycans as cancer biomarkers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p 1347-53, 2012.
- ADAMS, P. D.; AFONINE, P. V.; BUNKÓCZI, G.; et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **International Tables for Crystallography**, v. 66, Pt 2, p. 213-21, 2012.
- AGOSTINO, M.; VELKOV, T.; DINGJAN, T.; et al. The carbohydrate-binding promiscuity of *Euonymus europaeus* lectin is predicted to involve a single binding site. **Glycobiology**, v. 25, n. 1, p. 101–114, 2015.
- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal**, v. 96, n. 3, p. 23contd–5c, 1965.
- AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. VII. Physical and chemical studies on concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 124, n. 1, p. 218–229, 1968.
- ALENCAR, N. M.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M.; et al. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of inflammation**, v. 8, n. 2, p. 107–113, 1999.
- ANIMASHAUN, T.; MAHMOOD, N.; HAY, A. J.; HUGHES, R. C. Inhibitory Effects of Novel Mannose-Binding Lectins on HIV-Infectivity and Syncytium Formation. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 145-153, 1993.
- ARARIPE, D. A.; PINTO-JUNIOR, V. R.; NECO, A. H. B.; et al. Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 323–330, 2017.
- ARGOS, P.; TSUKIHARA, T.; ROSSMANN, M. G. A structural comparison of concanavalin A and tomato bushy stunt virus protein. **Journal of molecular evolution**, v. 15, n. 3, p. 169–179, 1980.
- ARYAL, R. P.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. The Endoplasmic Reticulum Chaperone Cosmc Directly Promotes *in Vitro* Folding of T-synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 4, p. 2456-2462, 2010.
- ASENSIO, J. L.; CAÑADA, F. J.; SIEBERT, H.-C.; et al. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 7, p. 529-43, 2000.
- ASSREUY, A. M.; MARTINS, G. J.; MOREIRA, M. E.; et al. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of urology**, v. 161, n. 6, p. 1988–1993, 1999.

ASSREUY, A. M. S.; FONTENELE, S. R.; PIRES, A. DE F.; et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009.

ASSREUY, A. M.; SHIBUYA, M. D.; MARTINS, G. J.; et al. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of inflammation**, v. 6, n. 3, p. 201–210, 1997.

AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 54, n. 2, p. 396–399, 1965.

AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. REACTIONS OF NORMAL AND TUMOR CELL SURFACES TO ENZYMES. I. WHEAT-GERM LIPASE AND ASSOCIATED MUCOPOLYSACCHARIDES. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 50, p. 613–619, 1963.

AYOUBA, A.; CAUSSE, H.; VAN DAMME, E. J. M.; et al. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. **Biochemical systematics and ecology**, v. 22, n. 2, p. 153–159, 1994. Elsevier BV.

BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; et al. Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. **Journal of Molecular Biology**, 1996.

BANERJEE, R.; MANDE, S. C.; GANESH, V.; et al. Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 1, p. 227–231, 1994.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; et al. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 85, n. 1, p. 160–169, 2006.

BARI, A. U.; SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. S.; et al. Lectins from *Parkia biglobosa* and *Parkia platycephala*: A comparative study of structure and biological effects. **International journal of biological macromolecules**, v. 92, p. 194–201, 2016.

BARONDES, S. H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in biochemical sciences**, v. 13, n. 12, p. 480–482, 1988.

BARRE, A.; VAN DAMME, E. J. M.; SIMPLICIEN, M.; et al. Man-Specific Lectins from Plants, Fungi, Algae and Cyanobacteria, as Potential Blockers for SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronaviruses: Biomedical Perspectives. **Cells**, v. 10, n. 7, 2021.

BARROSO-NETO, I. L.; DELATORRE, P.; TEIXEIRA, C. S.; et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2016.

BASSAGAÑAS, S.; CARVALHO, S.; DIAS, A. M.; et al. Pancreatic Cancer Cell Glycosylation Regulates Cell Adhesion and Invasion through the Modulation of $\alpha 2\beta 1$ Integrin and E-Cadherin Function. **PLoS ONE**, 2014.

BATEMAN, A.; BYCROFT, M. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD) 1 Edited by P. E. Wight. **Journal of Molecular Biology**, 2000.

BATISTA DA NÓBREGA, R.; ROCHA, B. A. M.; GADELHA, C. A. A.; et al. Structure of Dioclea virgata lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 900–906, 2012.

BATISTA, F. A. H.; GOTO, L. S.; GARCIA, W.; et al. Camptosemin, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. **European biophysics journal: EBJ**, v. 39, n. 8, p. 1193–1205, 2010.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**, v. 161, n. 3839, p. 370–371, 1968.

BENNETT, E. P.; MANDEL, U.; CLAUSEN, H.; et al. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. **Glycobiology**, 2012.

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**, v. 38, n. 1-2, p. 48–54, 1993.

BEZERRA, E. H. S.; ROCHA, B. A. M.; NAGANO, C. S.; et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2011.

BEZERRA, G. A.; OLIVEIRA, T. M.; MORENO, F. B. M. B.; et al. Structural analysis of *Canavalia maritima* and *Canavalia gladiata* lectins complexed with different dimannosides: new insights into the understanding of the structure-biological activity relationship in legume lectins. **Journal of structural biology**, v. 160, n. 2, p. 168–176, 2007.

BEZERRA, M. J. B.; RODRIGUES, N. V. F.; DE FREITAS PIRES, A.; et al. Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2013.

BOLOGNESI, A.; BORTOLOTTI, M.; MAIELLO, S.; BATTELLI, M.; POLITO, L. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. **Molecules**, 2016.

BONNARDEL, F.; PEREZ, S.; LISACEK, F.; IMBERTY, A. Structural Database for Lectins and the UniLectin Web Platform. **Methods in molecular biology**, v. 2132, p. 1–14, 2020.

BOSCHER, C.; DENNIS, J. W.; NABI, I. R. Glycosylation, galectins and cellular signaling. **Current Opinion in Cell Biology**, 2011.

BOURNE, Y.; ASTOUL, C. H.; ZAMBONI, V.; et al. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. **Biochemical Journal**, v. 364, n. Pt 1, p. 173–180, 2002.

BOWLES, D. J.; MARCUS, S. E.; PAPPIN, D. J.; et al. Posttranslational processing of concanavalin A precursors in jackbean cotyledons. **The Journal of cell biology**, v. 102, n. 4, p. 1284–1297, 1986.

BOWLES, D. J.; PAPPIN, D. J. Traffic and assembly of concanavalin A. **Trends in biochemical sciences**, v. 13, n. 2, p. 60–64, 1988.

BOYD, W. C.; REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. **Journal of immunology**, v. 62, n. 3, p. 333–339, 1949.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

BRINDA, K. V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 7, p. 1735–1749, 2004.

BROCKHAUSEN, I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. **EMBO reports**, 2006.

CABANNES, E.; VIVES, M.-F.; BÉDARD, P.-A. Transcriptional and post-transcriptional regulation of κ B-controlled genes by pp60v-src. **Oncogene**, 1997.

CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDA, M.; et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1430, n. 2, p. 367–375, 1999.

CAMPOS, D.; FREITAS, D.; GOMES, J.; et al. Probing the O-glycoproteome of gastric cancer cell lines for biomarker discovery. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 14, n. 6, p. 1616–1629, 2015.

CAMPOS, J. K. L.; ARAÚJO, C. S. F.; ARAÚJO, T. F. S.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of leaf lectin. **Biochimie open**, v. 2, p. 62–68, 2016.

Cancer. <https://www.who.int/health-topics/cancer>. Acesso em: 1/9/2021.

CAROTENUTO, G.; CHABAUD, M.; MIYATA, K.; et al. The rice LysM receptor-like kinase Os CERK 1 is required for the perception of short-chain chitin oligomers in arbuscular mycorrhizal signaling. **New Phytologist**, 2017.

CARRIZO, M. E.; CAPALDI, S.; PERDUCA, M.; et al. The Antineoplastic Lectin of the Common Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*) Has Two Binding Sites, Each Specific for a Different Configuration at a Single Epimeric Hydroxyl. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.

CARVALHO, A. DE S.; DA SILVA, M. V.; GOMES, F. S.; et al. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 75, p. 402–408, 2015.

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**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.

CAVADA, B. S.; BARI, A. U.; PINTO-JUNIOR, V. R.; LOSSIO, C. F.; SILVA, M. T. L.; et al. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H.C. Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects. **International journal of biological macromolecules**, v. 145, p. 845–855, 2020.

CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; LOSSIO, C. F.; et al. One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019.

CAVADA, B. S.; OSTERNE, V. J. S.; OLIVEIRA, M. V.; PINTO-JUNIOR, V. R.; SILVA, M. T. L.; et al. Reviewing Mimosoideae lectins: A group of under explored legume lectins. **International journal of biological macromolecules**, v. 154, p. 159–165, 2020.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OLIVEIRA, M. V.; et al. A review of Vicieae lectins studies: End of the book or a story in the writing? **International journal of biological macromolecules**, v. 181, p. 1104–1123, 2021.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; LOSSIO, C. F.; et al. A Diocleinae type II lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds specific to α -lactose/GalNAc. **Process Biochemistry**, 2020.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; OLIVEIRA, M. V.; et al. Comprehensive review on Caelsalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 162, p. 333–348, 2020.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; et al. In depth analysis on the carbohydrate-binding properties of a vasorelaxant lectin from *Mart* Ex. Benth seeds. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, p. 1–14, 2021.

CAVADA, B. S.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; NASCIMENTO, K. S. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 1, 2018.

CAVADA, B. S.; SILVA, M. T. L.; OSTERNE, V. J. S.; et al. *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 369–378, 2018.

CAVALCANTE, T. T. A.; ANDERSON MATIAS DA ROCHA, B.; ALVES CARNEIRO, V.; et al. Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral *Streptococci*. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530–3543, 2011.

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

CHEN, D.; YU, J.; ZHANG, L. Necroptosis: an alternative cell death program defending against cancer. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1865, n. 2, p. 228–236, 2016.

CHEN, Y.; PEUMANS, W. J.; HAUSE, B.; et al. Jasmonic acid methyl ester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chito-oligosaccharide binding lectin in tobacco leaves. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 8, p. 905–907, 2002.

CHRISPEELS, M. J.; HARTL, P. M.; STURM, A.; FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulum-associated precursor of concanavalin A. Partial amino acid sequence and lectin activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 22, p. 10021–10024, 1986.

CLARK, R. A. C.; GURD, J. W.; BISSOON, N.; et al. Identification of Lectin-Purified Neural Glycoproteins, GPs 180, 116, and 110, with NMDA and AMPA Receptor Subunits: Conservation of Glycosylation at the Synapse. **Journal of Neurochemistry**, 2002.

COMPAGNO, D.; GENTILINI, L. D.; JAWORSKI, F. M.; et al. Glycans and galectins in prostate cancer biology, angiogenesis and metastasis. **Glycobiology**, v. 24, n. 10, p. 899–906, 2014.

CUNNINGHAM, B. A.; WANG, J. L.; WAXDAL, M. J.; EDELMAN, G. M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. II. Amino acid sequence of cyanogen bromide fragment F3. **Journal of Biological Chemistry**, 1975.

DALZIEL, M.; CRISPIN, M.; SCANLAN, C. N.; ZITZMANN, N.; DWEK, R. A. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. **Science**, v. 343, n. 6166, p. 1235681, 2014.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; et al. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 20, p. 12082–12088, 1998.

DAM, T. K.; ROY, R.; DAS, S. K.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Binding of multivalent carbohydrates to concanavalin A and Dioclea grandiflora lectin. Thermodynamic analysis of the “multivalency effect”. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14223–14230, 2000.

DEL SOL, F. G.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J. Crystal structures of Cratylia floribunda seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of structural biology**, v. 158, n. 1, p. 1–9, 2007.

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

DENNIS, J. W.; NABI, I. R.; DEMETRIOU, M. Metabolism, Cell Surface Organization, and Disease. **Cell**, 2009.

DESAKI, Y.; KOUZAI, Y.; NINOMIYA, Y.; et al. OsCERK1 plays a crucial role in the lipopolysaccharide-induced immune response of rice. **New Phytologist**, 2018.

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

DIXON, H. B. F. Defining a lectin. **Nature**, 1981.

EBELING, F. G.; STIEBER, P.; UNTCH, M.; et al. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer. **British Journal of Cancer**, 2002.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE, G. N., Jr; et al. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 9, p. 2580–2584, 1972.

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

EMSLEY, P.; LOHKAMP, B.; SCOTT, W. G.; COWTAN, K. Features and development of Coot. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 4, p. 486–501, 2010.

ERSAHIN, T.; TUNCBAG, N.; CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular bioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1946–1954, 2015.

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

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

FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W. J.; SMITH, D. F.; et al. The “Old” *Euonymus europaeus* Agglutinin Represents a Novel Family of Ubiquitous Plant Proteins. **Plant Physiology**, 2008.

FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W. J.; VANDEKERCKHOVE, T. T.; ONGENAERT, M.; VAN DAMME, E. J. Proteins with an *Euonymus* lectin-like domain are ubiquitous in Embryophyta. **BMC plant biology**, v. 9, p. 136, 2009.

FRANCK, C. M.; WESTERMANN, J.; BOISSON-DERNIER, A. Plant Malectin-Like Receptor Kinases: From Cell Wall Integrity to Immunity and Beyond. **Annual review of plant biology**, v. 69, p. 301–328, 2018.

FUKUSHIMA, K.; SATOH, T.; BABA, S.; YAMASHITA, K. 1,2-Fucosylated and -N-acetylgalactosaminylated prostate-specific antigen as an efficient marker of prostatic cancer. **Glycobiology**, 2010.

FU, L.-L.; ZHOU, C.-C.; YAO, S.; et al. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 43, n. 10, p. 1442–1449, 2011.

FURUKAWA, J.-I.; TSUDA, M.; OKADA, K.; et al. Comprehensive Glycomics of a Multistep Human Brain Tumor Model Reveals Specific Glycosylation Patterns Related to Malignancy. **PLoS one**, v. 10, n. 7, p. e0128300, 2015.

GALI-MUHTASIB, H.; HMADI, R.; KAREH, M.; TOHME, R.; DARWICHE, N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 20, n. 12, p. 1531–1562, 2015.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; CHAN, F. K.-M.; KROEMER, G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. **Annual review of pathology**, v. 12, p. 103–130, 2017.

GATEHOUSE, A. M. R.; SHACKLEY, S. J.; FENTON, K. A.; BRYDEN, J.; PUSZTAI, A. Mechanism of seed lectin tolerance by a major insect storage pest of *Phaseolus vulgaris*, *acanthoscelides obtectus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 1989.

GAUTAM, A. K.; SHRIVASTAVA, N.; SHARMA, B.; BHAGYAWANT, S. S. Current Scenario of Legume Lectins and Their Practical Applications. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 2018.

GILGUNN, S.; CONROY, P. J.; SALDOVA, R.; RUDD, P. M.; O’KENNEDY, R. J. Aberrant PSA glycosylation—a sweet predictor of prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, 2013.

GILL, D. J.; CHIA, J.; SENEWIRATNE, J.; BARD, F. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. **Journal of Cell Biology**, 2010.

Glycosphingolipids as Tumor-Associated and Differentiation Markers⁵⁶. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 1983.

GOLDSTEIN, I. J.; COLIN HUGHES, R.; MONSIGNY, M.; OSAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, 1980.

GOLDSTEIN, M. J.; MITCHELL, E. P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. **Cancer investigation**, v. 23, n. 4, p. 338–351, 2005.

GOMES, B. S.; SIQUEIRA, A. B. S.; DE CÁSSIA CARVALHO MAIA, R.; et al. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2012.

GOMES, C.; OSÓRIO, H.; PINTO, M. T.; et al. Expression of ST3GAL4 Leads to SLex Expression and Induces c-Met Activation and an Invasive Phenotype in Gastric Carcinoma Cells. **PLoS ONE**, 2013.

GONDIM, A. C. S.; ROMERO-CANELÓN, I.; SOUSA, E. H. S.; et al. The potent anti-cancer activity of Dioclea lasiocarpa lectin. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 175, p. 179–189, 2017.

GROBBEN, B.; DE DEYN, P.; SLEGGERS, H. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. **Cell and Tissue Research**, 2002.

GUIDOTTI, G.; BRAMBILLA, L.; ROSSI, D. Exploring Novel Molecular Targets for the Treatment of High-Grade Astrocytomas Using Peptide Therapeutics: An Overview. **Cells**, 2020.

GU, J.; ISAJI, T.; XU, Q.; et al. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion. **Glycoconjugate Journal**, 2012.

HAKOMORI, S. e KANNAGI, R. Glycosphingolipids as Tumor-Associated and Differentiation Markers56. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, 1983.

HAMELRYCK, T. W.; DAO-THI, M. H.; POORTMANS, F.; et al. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20479–20485, 1996.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. STRUCTURE OF CONCAVALIN A AT 2.4 ANGSTROMS RESOLUTION. , 1976.

HATANO, K.; MIYAMOTO, Y.; NONOMURA, N.; KANEDA, Y. Expression of gangliosides, GD1a, and sialyl paragloboside is regulated by NF- κ B-dependent transcriptional control of α 2,3-sialyltransferase I, II, and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. **International Journal of Cancer**, 2011.

HELENIUS, A. Intracellular Functions of N-Linked Glycans. **Science**, 2001.

HERMAN, E. M.; SHANNON, L. M.; CHRISPPEELS, M. J. Concanavalin A is synthesized as a glycoprotein precursor. **Planta**, 1985.

HESTER, G.; KAKU, H.; GOLDSTEIN, I. J.; WRIGHT, C. S. Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of a new plant lectin family. **Nature structural biology**, v. 2, n. 6, p. 472–479, 1995.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, 1991.

JANKOVIC, M. M.; MILUTINOVIC, B. S. Glycoforms of CA125 antigen as a possible cancer marker. **Cancer Biomarkers**, 2008.

JIANG, Q.-L.; ZHANG, S.; TIAN, M.; et al. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. **Cell proliferation**, v. 48, n. 1, p. 17–28, 2015.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, 1997.

JULIEN, S.; ADRIAENSSENS, E.; OTTENBERG, K.; et al. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. **Glycobiology**, 2006.

DE-FREITAS-JUNIOR, J. C. M.; CARVALHO, S.; DIAS, A. M.; et al. Insulin/IGF-I Signaling Pathways Enhances Tumor Cell Invasion through Bisecting GlcNAc N-glycans Modulation. An Interplay with E-Cadherin. **PLoS ONE**, 2013.

KAKUGAWA, Y.; WADA, T.; YAMAGUCHI, K.; et al. Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002.

KAKU, H.; NISHIZAWA, Y.; ISHII-MINAMI, N.; et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 11086–11091, 2006.

KALB, A. J.; JOSEPH KALB, A.; LUSTIG, A. The molecular weight of concanavalin A. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, 1968.

KANNAGI, R.; YIN, J.; MIYAZAKI, K.; IZAWA, M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants--Hakomori's concepts revisited. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 3, p. 525–531, 2008.

KELLOKUMPU, S.; SORMUNEN, R.; KELLOKUMPU, I. Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-Golgi pH. **FEBS Letters**, 2002.

KIRNER, A.; DEUTSCH, S.; WEILER, E.; POLAK, E. H.; APFELBACH, R. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair d- and l-carvone. **Behavioural Brain Research**, 2003.

KLAFKE, G. B.; MOREIRA, G. M. S. G.; PEREIRA, J. L.; et al. Lectin I from *Bauhinia variegata* (BVL-I) expressed by *Pichia pastoris* inhibits initial adhesion of oral bacteria in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 93, n. Pt A, p. 913–918, 2016.

KLEHA, J. F.; DEVESLY, P.; JOHNS, A. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. **British journal of pharmacology**, v. 104, n. 2, p. 287–288, 1991.

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

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

KUMAMOTO, K.; GOTO, Y.; SEKIKAWA, K.; et al. Increased expression of UDP-galactose transporter messenger RNA in human colon cancer tissues and its implication in synthesis of Thomsen-Friedenreich antigen and sialyl Lewis A/X determinants. **Cancer research**, v. 61, n. 11, p. 4620–4627, 2001.

KUMPULAINEN, E. J.; KESKIKURU, R. J.; JOHANSSON, R. T. Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 76, n. 2, p. 95–102, 2002.

LAGARDA-DIAZ, I.; GUZMAN-PARTIDA, A. M.; VAZQUEZ-MORENO, L. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1800, n. 2, p. 190–201, 2010.

LAUC, G.; ESSAFI, A.; HUFFMAN, J. E.; et al. Genomics Meets Glycomics—The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1 α as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation. **PLoS Genetics**, 2010.

LEAL, R. B.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; 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**, v. 114, p. 64–76, 2018.

LEHANE, M. J. PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. **Annual Review of Entomology**, 1997.

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens Kew, 2005.

LIN, P.; NG, T. B. Preparation and biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 22, p. 10481–10486, 2008.

LIN, S. S.; LEVITAN, I. B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 7, p. 273–277, 1991.

LIU, B.; LI, C.-Y.; BIAN, H.-J.; et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2009.

LIU, Z.; LUO, Y.; ZHOU, T.-T.; ZHANG, W.-Z. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell proliferation**, v. 46, n. 5, p. 509–515, 2013.

LI, W.-W.; YU, J.-Y.; XU, H.-L.; BAO, J.-K. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 414, n. 2, p. 282–286, 2011.

LI, Y.; TIAN, Y.; REZAI, T.; et al. Simultaneous analysis of glycosylated and sialylated prostate-specific antigen revealing differential distribution of glycosylated prostate-specific antigen isoforms in prostate cancer tissues. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 1, p. 240–245, 2011.

LI, Z.; ZHANG, X. Kinases Involved in Both Autophagy and Mitosis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2017.

LOCKER, G. Y.; HAMILTON, S.; HARRIS, J.; et al. ASCO 2006 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Gastrointestinal Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, 2006.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1998.

LOSSIO, C. F.; MOREIRA, C. G.; AMORIM, R. M. 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**, 2017.

LOUIS, D. N.; PERRY, A.; REIFENBERGER, G.; et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, 2016.

LUNDSTRÖM, M.; OLOFSSON, S.; JEANSSON, S.; et al. Host cell-induced differences in O-glycosylation of herpes simplex virus gC-1. I. Structures of nonsialylated HPA- and PNA-binding carbohydrates. **Virology**, v. 161, n. 2, p. 385–394, 1987.

MACEDO, M. L. R.; DAS GRAÇAS MACHADO FREIRE, M.; DA SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 146, n. 4, p. 486–498, 2007.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. **Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae**, v. 35, n. Suppl 11, p. 1–133, 1957.

MANDAL, D. K.; BREWER, C. F. Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides. **Biochemistry**, v. 32, n. 19, p. 5116–5120, 1993.

MANN, K.; FARIAS, C. M.; DEL SOL, F. G.; et al. The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated from *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-related domains. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 16, p. 4414–4422, 2001.

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

MARCHETTI, M.; MASTROMARINO, P.; RIETI, S.; SEGANTI, L.; ORSI, N. Inhibition of herpes simplex, rabies and rubella viruses by lectins with different specificities. **Research in virology**, v. 146, n. 3, p. 211–215, 1995.

MARCOS, N. T.; PINHO, S.; GRANDELA, C.; et al. Role of the Human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the Synthesis of the Cancer-Associated Sialyl-Tn Antigen. **Cancer Research**, 2004.

MARQUES, G. F. O.; OSTERNE, V. J. S.; ALMEIDA, L. M.; et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of Vatairea guianensis lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, v. 140, p. 58–65, 2017.

MAUPIN, K. A.; LIDEN, D.; HAAB, B. B. The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier motif analysis of glycan array data. **Glycobiology**, v. 22, n. 1, p. 160–169, 2012.

DE MELO, C. M. L.; DE CASTRO, M. C. A. B.; DE OLIVEIRA, A. P.; et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy research: PTR**, v. 24, n. 11, p. 1631–1636, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MURAILLE, E.; PAJAK, B.; URBAIN, J.; LEO, O. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cellular immunology**, v. 191, n. 1, p. 1–9, 1999.

NAGANO, C. S.; CALVETE, J. J.; BARETTINO, D.; et al. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant Diocleinae lectins. **Biochemical Journal**, v. 409, n. 2, p. 417–428, 2008.

NAKAMURA-TSURUTA, S.; KOMINAMI, J.; KUNO, A.; HIRABAYASHI, J. Evidence that Agaricus bisporus agglutinin (ABA) has dual sugar-binding specificity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2006.

NASCIMENTO, A. P. M.; KNAUT, J. L.; RIEGER, D. K.; et al. Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from Dioclea violacea. **International journal of biological macromolecules**, v. 120, n. Pt A, p. 566–577, 2018.

DO NASCIMENTO, A. S. F.; GONDIM, A. C. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; et al. Purification and partial characterization of a novel lectin from Dioclea lasiocarpa Mart seeds with vasodilator effects. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 25, n. 12, p. 657–664, 2012.

NASCIMENTO, K. S.; SILVA, M. T. L.; OLIVEIRA, M. V.; et al. Dalbergieae lectins: A review of lectins from species of a primitive Papilionoideae (leguminous) tribe. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

NONIS, S. G.; HAYWOOD, J.; SCHMIDBERGER, J. W.; et al. Structural and biochemical analyses of concanavalin A circular permutation by jack bean asparaginyl endopeptidase. **The Plant cell**, 2021.

NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, p. 462–466, 1960.

OPAS, M.; THARIN, S.; MILNER, R. E.; MICHALAK, M. Identification and localization of calreticulin in plant cells. **Protoplasma**, 1996.

OSTERNE, V. J. S.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; et al. Purification, partial characterization, and CNBr-sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342–3353, 2014.

OSTERNE, V. J. S.; SILVA-FILHO, J. C.; SANTIAGO, M. Q.; et al. Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, n. Pt A, p. 271–282, 2017.

PACÁK, F.; KOCOUREK, J. Studies on phytohemagglutinins. XXV. Isolation and characterization of hemagglutinins of the spindle tree seeds (*Evonymus europaea* L.). **Biochimica et biophysica acta**, v. 400, n. 2, p. 374–386, 1975.

PARKER, B. L.; THAYSEN-ANDERSEN, M.; SOLIS, N.; et al. Site-specific glycan-peptide analysis for determination of N-glycoproteome heterogeneity. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 12, p. 5791–5800, 2013.

PAWLOWSKA, E.; SZCZEPANSKA, J.; SZATKOWSKA, M.; BLASIAK, J. An Interplay between Senescence, Apoptosis and Autophagy in Glioblastoma Multiforme—Role in Pathogenesis and Therapeutic Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.

PETRYNIAK, J.; PEREIRA, M. E. A.; KABAT, E. A. The lectin of *Euonymus europeus*: Purification, characterization, and an immunochemical study of its combining site. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1977.

PEUMANS, W. J.; HAUSE, B.; VAN DAMME, E. J. The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. **FEBS letters**, v. 477, n. 3, p. 186–192, 2000.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, 1995.

PINHO, S. S.; FIGUEIREDO, J.; CABRAL, J.; et al. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: Functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, 2013.

PINHO, S. S.; OLIVEIRA, P.; CABRAL, J.; et al. Loss and Recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation Is a Mechanism Involved in Epithelial-Mesenchymal-Epithelial Transitions. **PLoS ONE**, 2012.

PINHO, S. S.; REIS, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. **Nature reviews. Cancer**, v. 15, n. 9, p. 540–555, 2015.

PINHO, S. S.; REIS, C. A.; PAREDES, J.; et al. The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-transcriptional modifications of E-cadherin. **Human Molecular Genetics**, 2009.

PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; SANTIAGO, M. Q.; et al. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the Dioclea lasiophylla Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. **Biochimie**, v. 135, p. 126–136, 2017.

PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; SANTIAGO, M. Q.; et al. Structural studies of a vasorelaxant lectin from Dioclea reflexa Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 12–23, 2017.

PINTO-JÚNIOR, V. R.; DE SANTIAGO, M. Q.; OSTERNE, V. J. DA S.; et al. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of Dioclea lasiophylla mart. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 10857–10869, 2013.

PINTO, N. V.; SANTOS, C. F.; CAVADA, B. S.; et al. Homologous Canavalia lectins elicit different patterns of antinociceptive responses. **Natural product communications**, v. 8, n. 11, p. 1621–1624, 2013.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SOARES, P. M. G.; et al. A novel N-acetylglucosamine lectin of Lonchocarpus araripensis attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 65, n. 1, p. 43–52, 2016.

POLITO, L.; BORTOLOTTI, M.; BATTELLI, M. G.; CALAFATO, G.; BOLOGNESI, A. Ricin: An Ancient Story for a Timeless Plant Toxin. **Toxins**, v. 11, n. 6, 2019.

POWERS-FLETCHER, M. V.; JAMBUNATHAN, K.; BREWER, J. L.; et al. Impact of the lectin chaperone calnexin on the stress response, virulence and proteolytic secretome of the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e28865, 2011.

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

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

READ, R. J.; ADAMS, P. D.; ARENDALL, W. B., 3rd; et al. A new generation of crystallographic validation tools for the protein data bank. **Structure**, v. 19, n. 10, p. 1395–1412, 2011.

- REDMANN, M.; DARLEY-USMAR, V.; ZHANG, J. The Role of Autophagy, Mitophagy and Lysosomal Functions in Modulating Bioenergetics and Survival in the Context of Redox and Proteotoxic Damage: Implications for Neurodegenerative Diseases. **Ageing and disease**, v. 7, n. 2, p. 150–162, 2016.
- REILY, C.; STEWART, T. J.; RENFROW, M. B.; NOVAK, J. Glycosylation in health and disease. **Nature reviews. Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 346–366, 2019.
- REIS, C. A. ST6GalNAc-I controls expression of sialyl-Tn antigen in gastrointestinal tissues. **Frontiers in Bioscience**, 2011.
- REIS, C. A.; OSORIO, H.; SILVA, L.; GOMES, C.; DAVID, L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. **Journal of clinical pathology**, v. 63, n. 4, p. 322–329, 2010.
- REIS, E. A. G.; ATHANAZIO, D. A.; CAVADA, B. S.; et al. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. **Acta tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 160–165, 2008.
- RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; BUDNI, J.; et al. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2014.
- ROCHA, B. A. M.; BARROSO-NETO, I. L.; TEIXEIRA, C. S.; et al. CRLI induces vascular smooth muscle relaxation and suggests a dual mechanism of eNOS activation by legume lectins via muscarinic receptors and shear stress. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 565, p. 32–39, 2015.
- RODRIGUES, J. G.; BALMAÑA, M.; MACEDO, J. A.; et al. Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. **Cellular Immunology**, 2018.
- RUDD, P. M.; ELLIOTT, T.; CRESSWELL, P.; WILSON, I. A.; DWEK, R. A. Glycosylation and the immune system. **Science**, v. 291, n. 5512, p. 2370–2376, 2001.
- RUSSI, M. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D. K.; et al. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical research**, v. 37, n. 2, p. 288–297, 2012.
- RUTENBER, E.; ROBERTUS, J. D. Structure of ricin B-chain at 2.5 Å resolution. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, 1991.
- SAELAND, E.; BELO, A. I.; MONGERA, S.; et al. Differential glycosylation of MUC1 and CEACAM5 between normal mucosa and tumour tissue of colon cancer patients. **International Journal of Cancer**, 2012.
- SAFI, F. Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, 1997.

SANKARANARAYANAN, R.; SEKAR, K.; BANERJEE, R.; et al. A novel mode of carbohydrate recognition in jacalin, a Moraceae plant lectin with a beta-prism fold. **Nature structural biology**, v. 3, n. 7, p. 596–603, 1996.

SANTIAGO, M. Q.; LEITÃO, C. C. F.; PEREIRA-JUNIOR, F. N.; et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectin from seeds of *Canavalia oxyphylla* Standl. & L. O. Williams. **Journal of Molecular Recognition**, 2014.

SASTRY, M. V.; BANARJEE, P.; PATANJALI, S. R.; et al. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (beta-D-Gal(1----3)D-GalNAc). **The Journal of biological chemistry**, v. 261, n. 25, p. 11726–11733, 1986.

SCHALLUS, T.; JAECKH, C.; FEHÉR, K.; et al. Malectin: A Novel Carbohydrate-binding Protein of the Endoplasmic Reticulum and a Candidate Player in the Early Steps of Protein N-Glycosylation. **Molecular Biology of the Cell**, 2008.

SCHERER, W. J.; UDIN, S. B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. **Brain Research**, 1994.

SCHIETINGER, A.; PHILIP, M.; YOSHIDA, B. A.; et al. A mutant chaperone converts a wild-type protein into a tumor-specific antigen. **Science**, v. 314, n. 5797, p. 304–308, 2006.

SCHOUPPE, D.; ROUGÉ, P.; LASANAJAK, Y.; et al. Mutational analysis of the carbohydrate binding activity of the tobacco lectin. **Glycoconjugate journal**, v. 27, n. 6, p. 613–623, 2010.

SCHWARZ, F.; AEBI, M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 5, p. 576–582, 2011.

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

SILVA, A.; LEITE, T.; TEIXEIRA, E.; PONTE, L.; PINTO, L. BUL: a novel lectin from *Bauhinia unguolata* L. seeds with fungistatic and antiproliferative activities. **BMC Proceedings**, 2014.

DA SILVA, L. C. N.; CORREIA, M. T. S. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 20, 2014.

SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti-Angiogenesis, Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146110, 2016.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. **Current opinion in structural biology**, v. 17, n. 5, p. 498–505, 2007.

SINHA, S.; MITRA, N.; KUMAR, G.; BAJAJ, K.; SUROLIA, A. Unfolding studies on soybean agglutinin and concanavalin a tetramers: a comparative account. **Biophysical journal**, v. 88, n. 2, p. 1300–1310, 2005.

SIROIS, S.; TOUAIBIA, M.; CHOU, K.-C.; ROY, R. Glycosylation of HIV-1 gp120 V3 loop: towards the rational design of a synthetic carbohydrate vaccine. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 30, p. 3232–3242, 2007.

SONG, F.; WANG, Y.; JIANG, D.; et al. Cyclic compressive stress regulates apoptosis in rat osteoblasts: Involvement of PI3K/Akt and JNK MAPK signaling pathways. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0165845, 2016.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; et al. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2011.

SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate journal**, v. 30, n. 7, p. 641–657, 2013.

SPARROW, L. G.; LAWRENCE, M. C.; GORMAN, J. J.; et al. N-linked glycans of the human insulin receptor and their distribution over the crystal structure. **Proteins**, v. 71, n. 1, p. 426–439, 2008.

SRINIVAS, V. R.; REDDY, G. B.; AHMAD, N.; et al. Legume lectin family, the “natural mutants of the quaternary state”, provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1527, n. 3, p. 102–111, 2001.

STANLEY, P. N-Linked Glycans (N-Glycans). **Encyclopedia of Cell Biology**, 2016.

STEENTOFT, C.; VAKHRUSHEV, S. Y.; VESTER-CHRISTENSEN, M. B.; et al. Mining the O-glycoproteome using zinc-finger nuclease–glycoengineered SimpleCell lines. **Nature Methods**, 2011.

SUMNER, J. B. THE GLOBULINS OF THE JACK BEAN, CANAVALIA ENSIFORMIS. **Journal of Biological Chemistry**, 1919.

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

SUN, Q.; ZHAO, L.; SONG, Q.; et al. Hybrid- and complex-type N-glycans are not essential for Newcastle disease virus infection and fusion of host cells. **Glycobiology**, 2012.

SUN, Z.; XUE, H.; WEI, Y.; et al. Mucin O-glycosylating enzyme GALNT2 facilitates the malignant character of glioma by activating the EGFR/PI3K/Akt/mTOR axis. **Clinical science**, v. 133, n. 10, p. 1167–1184, 2019.

SUZUKI, T.; OKAMURANOJI, K. NMDA Receptor Subunits $\epsilon 1$ (NR2A) and $\epsilon 2$ (NR2B) Are Substrates for Fyn in the Postsynaptic Density Fraction Isolated from the Rat Brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1995.

SWANSON, M. D.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J.; MARKOVITZ, D. M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 12, p. 8646–8655, 2010.

TAKEUCHI, H.; HALTIWANGER, R. S. Significance of glycosylation in Notch signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2014.

THOMÉ, M. P.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; VILLODRE, E. S.; et al. Ratiometric analysis of acridine orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, 2016.

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533–551, 2020.

TVAROŠKA, I.; SELVARAJ, C.; KOČA, J. Selectins—The Two Dr. Jekyll and Mr. Hyde Faces of Adhesion Molecules—A Review. **Molecules**, 2020.

UEMATSU, J.; KOYAMA, A.; TAKANO, S.; et al. Legume lectins inhibit human parainfluenza virus type 2 infection by interfering with the entry. **Viruses**, v. 4, n. 7, p. 1104–1115, 2012.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. **Journal of Applied Crystallography**, 1997.

VAN DAMME, E. J. M. **Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles**. 1998.

VAN DAMME, E. J. M. History of plant lectin research. **Methods in molecular biology**, v. 1200, p. 3–13, 2014.

VAN DAMME, E. J. M.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Letters**, 1987.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant Lectins. **Advances in Botanical Research**, 2008.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E. J. M. Messages From the Past: New Insights in Plant Lectin Evolution. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 36, 2019.

VARELA, E. S.; LIMA, J. P. M. S.; GALDINO, A. S.; et al. Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 59–69, 2004.

VARKI, A. Biological roles of glycans. **Glycobiology**, 2017.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; AEBI, M.; et al. Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. **Glycobiology**, 2015.

VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; et al. **Essentials of Glycobiology, Third Edition**. 2017.

VASUDEVAN, D.; HALTIWANGER, R. S. Novel roles for O-linked glycans in protein folding. **Glycoconjugate Journal**, 2014.

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

WAH, D. A.; ROMERO, A.; GALLEGU DEL SOL, F.; et al. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. **Journal of molecular biology**, v. 310, n. 4, p. 885–894, 2001.

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

WATKINS, W. M.; MORGAN, W. T. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825–826, 1952.

WEI; WEI, W.; SHIN, Y. S.; et al. Single-Cell Phosphoproteomics Resolves Adaptive Signaling Dynamics and Informs Targeted Combination Therapy in Glioblastoma. **Cancer Cell**, 2016.

WINN, M. D.; BALLARD, C. C.; COWTAN, K. D.; et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 67, n. Pt 4, p. 235–242, 2011.

WOLIN, I. A. V.; HEINRICH, I. A.; NASCIMENTO, A. P. M.; et al. ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. **Biochimie**, v. 180, p. 186–204, 2021.

WRIGHT, C. S. The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, 1977.

YANKELEVITCH-YAHAV, R.; FRANKO, M.; HULY, A.; DORON, R. The forced swim test as a model of depressive-like behavior. **Journal of visualized experiments: JoVE**, , n. 97, 2015.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C.; NG, T. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, 2015.

YU, L.; FERNIG, D.; SMITH, J.; MILTON, J. D.; RHODES, J. M. Non-Toxic Inhibition of Proliferation of a Human Colonic Carcinoma Cell Line (HT-29) by *Agaricus Bisporus* (Edible Mushroom) Lectin. **Clinical Science**, 1993.

ZAMORA-CABALLERO, S.; PÉREZ, A.; SANZ, L.; BRAVO, J.; CALVETE, J. J. Quaternary structure of *Dioclea grandiflora* lectin assessed by equilibrium sedimentation and crystallographic analysis of recombinant mutants. **FEBS letters**, v. 589, n. 18, p. 2290–2296, 2015.

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

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell research**, v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005. Springer Science and Business Media LLC.

ZHAO, Y.; SATO, Y.; ISAJI, T.; et al. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. **FEBS Journal**, 2008.

ZHU, K.; HUESING, J. E.; SHADE, R. E.; et al. An insecticidal N-acetylglucosamine-specific lectin gene from *Griffonia simplicifolia* (Leguminosae). **Plant physiology**, v. 110, n. 1, p. 195–202, 1996.

ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; et al. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 15123–15128, 1998.

ZURAWSKI, V. R.; ORJASETER, H.; ANDERSEN, A.; JELLUM, E. Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: Relevance for early detection of ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, 1988.