



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

FRANCISCO EDILCARLOS DE OLIVEIRA LIMA

**ANÁLISES ESTRUTURAIS DE DUAS LECTINAS DO GÊNERO *Centrolobium* POR
CRISTALOGRAFIA RAIOS X E BIOINFORMÁTICA**

FORTALEZA

2023

FRANCISCO EDILCARLOS DE OLIVEIRA LIMA

ANÁLISES ESTRUTURAIS DE DUAS LECTINAS DO GÊNERO *Centrolobium* POR
CRISTALOGRAFIA RAIO X E BIOINFORMÁTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Linha de pesquisa: Purificação e caracterização de biomoléculas.

Orientadora: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientador: Dr. Vanir Reis Pinto Junior.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L698a Lima, Francisco Edilcarlos de Oliveira.

Análises estruturais de duas lectinas do gênero *Centrolobium* por cristalografia raio X e bioinformática / Francisco Edilcarlos de Oliveira Lima. – 2023.

103 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Kyria Santiago do Nascimento.

Coorientação: Prof. Dr. Vanir Reis Pinto Junior.

1. CML. 2. CTL. 3. Estrutura tridimensional. 4. Glicanos. 5. Docking molecular. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO EDILCARLOS DE OLIVEIRA LIMA

ANÁLISES ESTRUTURAIS DE DUAS LECTINAS DO GÊNERO *Centrolobium* POR
CRISTALOGRAFIA RAO X E BIOINFORMÁTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Linha de pesquisa: Purificação e caracterização de biomoléculas.

Aprovada em 20 / 03 / 2023

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Vanir Reis Pinto Junior (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Profa. Dra. Maria Gleiciane de Queiroz Martins (Examinadora)
Centro Universitário Inta (UNINTA)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras (Examinador)
Centro Universitário Inta (UNINTA)

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

A Deus.

À família, Jéssica, Edgar, Mocinha e Edwilson.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP, pelo apoio financeiro com a bolsa de auxílio.

À Universidade Federal do Ceará, pelo espaço de pesquisa e estudo.

Aos professores Dr. Benildo Sousa Cavada e Dra. Kyria Santiago do Nascimento pela oportunidade, espaço e orientação.

Ao professor Dr. Vanir Reis Pinto Júnior, pela co-orientação, ensinamentos, apoio e ajuda de experimentos.

Ao grupo de pesquisa BioMol-Lab, composto por doutores, mestres e graduandos, pela ajuda e aprendizado.

À minha família, Jéssica Freire Moura, Edgar Pereira Lima, Maria Mocinha de Oliveira Lima e Francisco Edwilson Oliveira Lima, pelo apoio moral e emocional, sobretudo, pela crença em minha evolução pessoal.

“Não se preocupe quando não for reconhecido,
mas esforce-se para ser digno de
reconhecimento” (ABRAHAM LINCOLN).

RESUMO

As lectinas, um grupo heterogêneo de proteínas que podem se ligar especificamente a açúcares livres ou glicanos de maneira reversível, podendo exercer diversas funções. Elas estão distribuídas na natureza e são amplamente exploradas por sua especificidade a carboidratos específicos, os quais se relacionam à comunicação celular. Além disso, existe potencial biotecnológico graças às atividades biológicas observadas nessas proteínas. Dentre elas, é possível destacar as lectinas da tribo *Dalbergieae* (família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*), como as lectinas de *Centrolobium microchaete* (CML) e de *Centrolobium tomentosum* (CTL). No entanto, embora existam dados de biologia estrutural de ambas lectinas, a estrutura terciária de CML de forma experimental e a análise de comparação a interação entre CML e CTL com carboidratos por bioinformática ainda não foram relatados. Assim, o trabalho objetiva cristalizar e determinar a estrutura cristalográfica da CML, e analisar a interação da CTL e CML com carboidratos por bioinformática. Para isso, ambas lectinas foram purificadas por cromatografia de afinidade, concentradas e avaliadas quanto ao grau de pureza. Depois, foram realizados ensaios de cristalização, otimização das condições de cristalização e obtenção da estrutura terciária após o processamento dos dados de cristalografia de raios X provenientes do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas-SP. Posteriormente, após a integração, escalonamento e correção dos dados, além do refinamento com ligantes, essas estruturas foram objetos de experimentos *in silico* por dinâmica molecular. Como resultados, foi possível a obtenção da estrutura terciária de CML por dados experimentais, com caracterização do CRD com metil-manose-1,3- α -D-manose (MDM) e análise das interações dos resíduos de CML e CTL com MDM por dinâmica molecular numa trajetória de 200 ns. Por fim, os dados mostraram que essas lectinas, apesar de específicas à manose, possuem semelhanças estruturais e conservação de diversas regiões do monômero, como domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) e sítio de ligação à metais (MBS), comportam-se diferentes sem e com o ligante por dinâmica molecular, envolvendo variações de interações polares e apolares. Por esse viés, os resultados contribuirão para a área da lectinologia, especialmente com dados estruturais de CML e resultados instigantes sobre as simulações de dinâmica molecular das lectinas com e sem ligantes.

Palavras-chave: CML; CTL; Estrutura tridimensional; Glicanos; *Docking* molecular.

ABSTRACT

Lectins, a heterogeneous group of proteins that can bind specifically to free sugars or glycans in a reversible manner, may serve several functions. They are distributed in nature and are widely exploited for their specificity to specific carbohydrates, which are related to cell communication. Furthermore, there is biotechnological potential thanks to the biological activities observed in these proteins. Among them, it is possible to highlight the lectins of the Dalbergieae tribe (Leguminosae family, Papilionoideae subfamily), such as *Centrolobium microchaete* (CML) and *Centrolobium tomentosum* (CTL) lectins. However, although there are data on the structural biology of both lectins, the tertiary structure of CML experimentally and the comparison analysis of the interaction between CML and CTL with carbohydrates by bioinformatics have not yet been reported. Thus, the work aims to crystallize and determine the crystallographic structure of CML, and to analyze the interaction of CTM and CML with carbohydrates by bioinformatics. For this, both lectins were purified by affinity chromatography, concentrated and evaluated for purity. Afterwards, crystallization tests were carried out, optimization of the crystallization conditions and obtaining of the tertiary structure after processing the X-ray crystallography data from the National Synchrotron Light Laboratory (LNLS) in Campinas-SP. Subsequently, after data integration, scaling and correction, in addition to refinement with ligands, these structures were the object of *in silico* experiments using molecular dynamics. As a result, it was possible to obtain the tertiary structure of CML by experimental data, with characterization of the CRD with methyl-mannose-1,3- α -D-mannose (MDM) and analysis of the interactions of CML and CTL residues with MDM by molecular dynamics on a trajectory of 200 ns. Finally, the data showed that these lectins, although specific to mannose, have structural similarities and conservation of several regions of the monomer, such as carbohydrate recognition domain (CRD) and metal binding site (MBS), behave differently without and with the ligand by molecular dynamics, involving variations of polar and non-polar interactions. By this bias, the results will contribute to the field of lectinology, especially with CML structural data and intriguing results on molecular dynamics simulations of lectins with and without ligands. By this bias, the results will contribute to the field of lectinology, especially with CML structural data and intriguing results on molecular dynamics simulations of lectins with and without ligands.

Keywords: CML; CTL; Three-dimensional structure; Glycans; Molecular docking.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas..... 22
- Figura 2 - Estrutura geral do enovelamento do monômero de ABA. A figura mostra a folha- β maior com seis fitas, a folha- β menor com quatro fitas e duas α -hélices pequenas conectadas por as alças..... 24
- Figura 3 - Estrutura geral do enovelamento de um dímero de lectina com domínio Amarantina com os dois sítios de ligação interagindo com o antígeno T. Cada monômero com suas subunidades terminais rotuladas com C e N possui dois domínios β -trevo. As setas verdes representam as fitas- β formando um β -barril com seis fitas e as setas azuis representam as fitas- β formando os três β -hairpins de cada domínio. Uma curta 3_{10} -hélice vermelha conecta cada subunidade dos dois domínios..... 25
- Figura 4 - Figura 4. Visão geral da RobpsCRA mostrando o domínio central colorido de verde e o domínio ($\alpha + \beta$) colorido de amarelo. No centro, na cor rosa e vermelha, há uma representação da molécula 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) na região de CRD. Os loops $\beta 5$ - $\alpha 5$ e $\beta 3$ - αA estão representados na cor laranja. O loop βD , um β -hairpin, está representado em azul..... 27
- Figura 5 - Visão geral da estrutura da CV-N. a) Mostra os domínios A colorido de branco e o domínio B de azul. b) mostra a distância aproximada de 40 Å entre as cavidades dos dois domínios. Cada CRD possui um resíduo de manose complexada..... 28
- Figura 6 - Visão geral de um tetrâmero de lectina de *Agaranthus nivalis*. Cada subunidade está colorida (A = roxo, B = verde, C = laranja e D = rosa). A interface dimérica Me- α -Man é mostrada vinculada ao subdomínio A-D e B-C. A lectina complexada com resíduos de manoses ramificadas nos três sítios de reconhecimento a carboidratos de cada subunidade está representada de verde com três esferas e dois bastões para alfa-D-

- manopiranosse-(1,3)-[alfa-D-manopiranosse-(1,6)]alfa-manopiranosse e duas esferas e um bastão para alfa-D-manopiranosse-(1,6)-alfa-manopiranosse (Retirado do PDB, referência: 1JPC)..... 30
- Figura 7 - Domínio heveína de *Hevea brasiliensis* (PDB 1HEV) com as estruturas secundárias α -hélices de vermelho e folhas- β de verde e os loops de cinza. As ligações dissulfeto estão representadas por linhas finas..... 31
- Figura 8 - Visão geral do domínio de lectinas relacionadas à Jacalina. a) visão lateral; b) visão do topo. As folhas- β 1, 2 e 3 estão coloridas de amarela, ciano e vermelha, respectivamente. A fita 11 pertence à folha- β 3..... 32
- Figura 9 - Visão geral do domínio de Lys-M com uma folha- β antiparalela e duas α -hélices ao lado em a) e o domínio Lys-M mostrando as posições do C $^{\alpha}$ e C $^{\beta}$ dos resíduos de aminoácidos equivalentes aos resíduos de cisteína nos domínios Lys-M das quitinases de *Caenorhabditis elegans* e *Kluyveromyces lactis*. Os resíduos Asp1, Leu13, Thr34 e Thr44 estão no domínio Lys-M em *Escherichia coli*..... 33
- Figura 10 - Visão geral de um homodímero de uma lectina de *Nicotiana tabacum* (Nictaba), expressa em um sistema *Escherichia coli*, complexado com uma triacetilquitotriose. Os domínios estão representados pela cor verde e amarelo e o carboidrato por cubos azuis. O método utilizado foi a difração por raio X com resolução de 2 Å (PDB, 8AD2)..... 34
- Figura 11 - Visão geral de cadeia formada por dois domínios homólogos de lectina com domínio Ricina-B de *Clitocybe nebularis* coloridos de verde e amarelo, os quais apresentam a lactose, representada por duas esferas e bastão azul e amarelo, complexada no domínio colorido de verde e o domínio amarelo, sem carboidrato complexado, mas apresentando *cis*-peptídeo de cor verde. (PDB id: 3NBC)..... 35
- Figura 12 - (a) Diagrama de um monômero de lectina de leguminosa, *Concanavalin A*. O *cis*-aspartato 208 é representado por esferas e bastões, os íons de manganês e cálcio são representados por esferas cinza e preta,

- respectivamente. A folha traseira com seis fitas está colorida de preto, a folha frontal com 7 fitas está colorida de cinza claro e folha-S, de cinza escuro. (b) Diagrama de topologia de dobra de lectina de leguminosa, seguindo a mesma codificação de cores em (a), foi desenhado com MOLSCRIPT 156. É possível ver as extremidades da cadeias em N e C, como também, o sítio de clivagem entre a cadeia- β e cadeia- α indicado por asterisco..... 37
- Figura 13 - a - Representação geral do motivo *jellyroll* mostrando a folha- β frontal curvada, folha- β plana traseira e folha- β curta no topo da molécula; b - mostram dois núcleos hidrofóbicos na estabilização do enovelamento. O primeiro núcleo é formado pelo enovelamento das três folhas- β e o segundo, formado pela folha- β frontal e os loops que conectam a folha frontal- β 38
- Figura 14 - Estrutura geral de lectinas de leguminosas. (a) tetrâmero com CRD em vermelho; (b) imagem ampliada do monômero com folha- β (amarelo), α -turns (roxo); CRD (área ocupada pela molécula constituída de esferas cinzas e vermelhas) e sítios de ligação do metal (área com esfera verde e cinza)..... 39
- Figura 15 - Superposição do sítio de ligação ao metal das lectinas de *Dalbergieae*, representando os resíduos de aminoácidos de cada proteína em bastão com carbonos coloridos de vermelho (CTL; PDB id: 5EYY), verde (PELa; PDB id: 5U38), rosa claro (PAL; id: 2ARE), azul (VML; PDB id: 4U36) e cinza (PNA; PDB id: 2PEL) e íons de manganês em roxo, cálcio em verde e molécula de água, formada por esferas, em vermelho... 40
- Figura 16 - Superposição de monômeros de PAL (laranja; PDB id: 2ARE), PELa (verde; PDB id: 5U38), CTL (vermelho; PDB id: 5EYY), VML (azul; PDB id: 4U36), PNA (cinza; PDB id: 2PEL), todos de lectina de *Dalbergieae*..... 42
- Figura 17 - Arquitetura de cinco interfaces diméricas e o tipo de estrutura quaternária: interface tipo II (canônica), X1 (DB58), X2 (ConA), X3 (EcorL) e X4

	(GS4). A orientação das folhas- β com seis fitas antiparalelas de um monômero (preto) é idêntica nas quatro estruturas diméricas ou interfaces, vistas em uma linha perpendicular à folha- β preta.....	46
Figura 18 -	Esquema de oligomerização de lectinas da tribo <i>Dalbergieae</i> . a) Dímero canônico observadas em PAL, PELa e CTL; b) Tetrâmero e interfaces diméricas de VGL; c) Tetrâmero e interfaces diméricas de PNA. Enquanto interfaces são indicadas por círculos e setas as estruturas estão representadas por suas respectivas cores.....	47
Figura 19 -	Visão geral da purificação de CML e CTL. a) Perfil cromatográfico de CML. b) Perfil cromatográfico de CTL. c) Perfil eletroforético em SDS-PAGE de CML e CTL.....	61
Figura 20 -	Representação em <i>cartoon</i> de um dímero de CML complexada com MDM. As esferas representam os íons de cálcio (verde) e manganês (roxo). Os ligantes próximos dos metais divalentes estão coloridos de dourado e a glicosilação representada pelo NAG em cada cadeia do dímero estão coloridas de cinza.....	65
Figura 21 -	Representação de local de glicosilação (Asn119) de cada cadeia do dímero de CML com NAG. Representação do NAG no monômero 1 (a) e monômero 2 (b).....	66
Figura 22 -	Representação em <i>cartoon</i> da sobreposição de um monômero de CML (verde), CTL (PDB id: 5EYY, em vermelho) e PELa (PDB id: 5U38, em rosa).....	67
Figura 23 -	Representações dos sítios de ligação à metais de um dímero de CML com interações de coordenação em torno dos íons cálcio e manganês. Interações cálcio (a) e manganês (c) do monômero 1 e cálcio (b) e manganês (d) do monômero 2.....	69
Figura 24 -	Representações dos sítios de ligação a metais dos monômeros 1 (a) e 2 (b) com mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) em torno de 3σ do cálcio	

	(rosa), manganês (cinza) e duas moléculas de água (azul) interagindo em cada cátion.	70
Figura 25 -	Representações LIGPLOT dos sítios de ligação à metais de CML com interações de coordenação ao cátion de cálcio (rosa) do monômero 1 (a) e monômero 2 (b). Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio dos resíduos de aminoácidos estão representados por esferas pretas, azuis e vermelhas, respectivamente.....	71
Figura 26 -	Representações LIGPLOT dos sítios de ligação à metais de CML com interações de coordenação ao cátion de manganês (rosa) do monômero 1 (a) e monômero 2 (b). Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio dos resíduos de aminoácidos estão representados por esferas pretas, azuis e vermelhas, respectivamente.....	72
Figura 27 -	Representações dos sítios de ligação a carboidratos dos monômeros 1 (a) e 2 (b) com mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) em torno do MDM.....	73
Figura 28 -	Interações polares dos resíduos de aminoácidos de CML em stick e esferas de água (azul) no CRD do monômero 1 (a) e monômero 2 (c); representações 2D de LIGPLOT de interações polares de hidrogênio e hidrofóbicas entre resíduos de CML e os carboidratos de MDM no monômero 1 (b) e monômero 2 (d).....	74
Figura 29 -	Interações polares do resíduo Asn137 de CML em stick com o MDM de forma indireta intermediada por uma molécula de água estrutural representada por uma esfera azul no CRD do monômero 1 (a) e monômero 2 (b).....	76
Figura 30 -	Resultados de dinâmica molecular de CML e CTL sem ligante e complexada com MDM. Gráfico do desvio quadrático médio (RMSD).....	79
Figura 31 -	Resultados de dinâmica molecular de CML e CTL sem ligante e complexada com MDM. Gráfico da flutuação quadrática média	

(RMSF).....	81
Figura 32 - Resultados de compactação de CML e CTL sem ligante e complexada com MDM. Raio de giro (RoG).....	82
Figura 33 - Análise de pontes de hidrogênio de CML complexada com MDM.....	83
Figura 34 - Análise de pontes de hidrogênio de CTL complexada com MDM.....	83
Figura 35 - Decomposição de energia livre de ligação por resíduo de simulações por dinâmica molecular da CML complexada com MDM.....	87
Figura 36 - Decomposição de energia livre de ligação por resíduo de simulações por dinâmica molecular da CTL complexada com MDM.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Visão geral das 12 famílias de lectinas de plantas. Adaptado de Van Damme ((VAN DAMME, 2014; TSANEVA; VAN DAMME, 2020)).....	23
Tabela 2 - Visão geral das lectinas da tribo <i>Dalbergieae</i> baseado nos estudos em relação à especificidade ao carboidrato e oligomerização em cada espécie caracterizada. Adaptado de (NASCIMENTO et al., 2020).....	42
Tabela 3 - Dados coletados, refinados e parâmetros de qualidade dos dados.....	62
Tabela 4 - Interações de Van der Waals e dipolo-dipolo entre CML e MDM.....	75
Tabela 5 - Lista de interações de ponte de hidrogênio entre os resíduos da CML e os átomos do MDM.....	84
Tabela 6 - Lista de interações de ponte de hidrogênio entre os resíduos da CTL e os átomos do MDM.....	85
Tabela 7 - Resumos das contribuições energéticas para interação da CTL e CML com o ligante MDM em kcal mol ⁻¹	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL	Lectina de <i>Andira anthelmia</i>
ABA	Lectinas de <i>Agaricus bisporus agglutinin</i>
ADL	Lectinas de <i>Arachis duranensis</i>
AIL	Lectinas de <i>Arachis ipaensis</i>
AFL	Lectina de <i>Andira fraxinifolia</i>
APL	Lectina de <i>Andira pisonis</i>
ASL	Lectina de <i>Andira surinamensis</i>
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
EEA	aglutinina de <i>Euonymus europaeus</i>
α MM	α -metil-D-manosídeo
ASL	Lectina de <i>Andira surinamensis</i>
BC2L-C	Lectina bacteriana de <i>Burkholderia cenocepacia</i>
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
CID	Dissociação induzida por colisão
ConV	Lectina <i>Canavalia virosa</i>
CRA	Lectinas com especificidade à quitina classe V
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidrato
CRLI	Lectina de <i>Cymbosema roseum</i>
CML	Lectina de <i>Centrolobium microchaete</i>
CPBL	<i>Chinese pinto bean lectin</i>
CTL	Lectina de <i>Centrolobium tomentosum</i>
CV-N	<i>Cyanovirin-N</i>
DDA	Método de aquisição dependente de dados
DLL	Lectina <i>Dioclea lasiocarpa</i>
DlyL	Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i>
DrfL	lectina de <i>Dioclea reflexa</i>
DVL	Lectina <i>Dioclea violacea</i>
EUL	Lectinas de <i>Euonymus europeus</i>
gDNA	DNA genômico

Glc	Glicose
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GlcNAc	N-Acetil-D-glicosamina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GNA	Lectinas de <i>Galanthus nivalis agglutinin</i>
GNL	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i> de nódulos de amendoim
His	Histidina
JRLs	Lectina relacionada a <i>jacalin</i>
Leu	Leucina
LSL	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i>
LCaL	Lectina de <i>Lonchocarpus campestris</i>
LAL	Lectina de <i>Lonchocarpus araripensis</i>
LCL	Lectina de <i>Lonchocarpus capassa</i>
MaL	Lectina de <i>Machaerium acutifolium</i>
Man	D-manose
MAN3	N-glicano com três resíduos de manose
MAN5	N-glicano com cinco resíduos de manose
MAN9	N-glicano com nove resíduos de manose
MBS	Sítio de ligação a metais
MBL	Lectina de <i>Machaerium biovulatum</i>
MDM	Metil-manose-1,3- α -D-manose
MLL	Lectina de <i>Machaerium lunatus</i>
MMA	α -metil-D-manosídeo
MNL	Lectina específica à manose de nós de amendoim de <i>Arachis hypogaea</i>
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
NAG	2-acetoamido-2detox-beta-D-glicopiranoose
Nictaba	Lectinas de <i>Nicotiana tabacum agglutinin</i>
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
PAL	Lectina de <i>Pterocarpus angolensis</i>
PDB	Banco de dados de proteínas
PELa	Lectina de <i>Platypodium elegans</i>

PFL	Lectina de <i>Platymiscium floribundum</i>
Phe	Fenilalanina
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
PPL2	Lectina 2 de <i>Parkia platycephala</i>
PRA-II	Lectina II de raízes de <i>Arachis hypogaea</i>
PRL	Lectina de <i>Pterocarpus rhorii</i>
PSSL	Lectina de <i>Pterocarpus soyauxii</i>
QTAIM	<i>Quantum theory of atoms in molecule</i> (QTAIM)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RobpsCRA	Lectina relacionada a quitinase classe V de <i>Robinia pseudoacacia</i>
RoG	Raio de giro
rVML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i> recombinante
SAPT	<i>Symmetry-Adapted Perturbation Theory</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
TRPV1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1
Tyr	Tirosina
VaL	Lectina de <i>Vataireopsis araroba</i>
VGL	Lectina de <i>Vatairea guianensis</i>
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
X-man	Carboidrato derivado de manose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Lectinologia e seu potencial biotecnológico	21
1.2	Lectina e sua classificação quanto à quantidade e tipo de domínio	22
1.3	Famílias de lectinas de plantas	23
1.3.1	Família ABA	25
1.3.2	Família com domínio de Amarantinas	26
1.3.3	Lectina relacionada à quitinase classe V	27
1.3.4	Família com domínio de Cianovirinas	28
1.3.5	Lectinas da família EUL	29
1.3.6	Lectinas relacionadas à GNA	29
1.3.7	Lectina com domínio de Heveína	31
1.3.8	Lectina com domínio relacionado à Jacalina	32
1.3.9	Lectinas com domínio de Lys-M	33
1.3.10	Nictaba	34
1.3.11	Ricina-B	35
1.3.12	Lectinas de leguminosas e características gerais de suas estruturas	36
1.3.12.1	Estruturas de lectinas da tribo Dalbergieae	40
1.4	Classificação quanto à oligomerização de lectinas de leguminosas	43
1.4.1	Conformação dimérica e oligomerização de lectinas da tribo Dalbergieae	45
1.5	Glicobiologia e as lectinas de leguminosas	47
1.5.1	Especificidade de lectinas da tribo Dalbergieae	48
1.5.2	Atividades biológicas de lectinas da tribo Dalbergieae	49
1.5.3	Tribo Dalbergieae e as lectinas do gênero Centrolobium	50
2	OBJETIVOS	52
2.1	Objetivo geral	52
2.2	Objetivos específicos	52

3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1	Coleta de sementes de <i>Centrolobium microchaete</i>	53
3.2	Purificação da CML e CTL provenientes de sementes de <i>Centrolobium microchaete</i> e <i>Centrolobium tomentosum</i>	53
3.3	Verificação da massa molecular relativa por SDS-PAGE.....	53
3.4	Cristalização e obtenção de dados da CML e CTL	54
3.5	Coleta e processamento de dados de raios-X.....	55
3.6	Determinação e análise da estrutura da CML e CTL	55
3.8	Dinâmica molecular	55
3.9	MMPBSA.....	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1	Purificação da CML e CTL.....	58
4.2	Estrutura cristalográfica de CML e CTL	59
4.3	Sítios de ligação de CML	65
4.4	Dinâmica molecular	74
4.4.1	Raiz do desvio quadrático médio (RMSD) e análises dos desvios	75
4.4.2	Análise da energia livre MM/Pbsa	84
5.	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

O estudo de estruturas protéicas bem-sucedidas foi realizado por William Astbury, um dos pioneiros, que nos anos 20 do século XIX esclareceu a estrutura de proteínas fibrosas mostrando a formação dos arranjos simples e repetitivos da queratina (ASTBURY; STREET, 1931). Mas foi nos anos 50 que o conceito de simples passou a ser complexo, com Frederick Sanger, que, após o sequenciamento completo de aminoácidos da insulina em 1949, mostrou uma estrutura de aminoácidos arranjadas com uma sequência longa e irregular (SANGER, 1959). Porém, a estrutura tridimensional só foi possível anos depois (KENDREW et al., 1958), reconhecendo, além da complexidade estrutural, a especificidade química com substratos. Curiosamente, as lectinas foram descobertas em 1888, antes mesmo da descoberta dos arranjos de aminoácidos que as formam (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). E assim, muitos estudos foram surgindo e técnicas, como cristalografia de raio-X, ressonância magnética nuclear (RMN), criomicroscopia eletrônica, assim como técnicas de espectrometria de massa em tandem (MS/MS), biologia molecular e métodos de bioinformática, mais recentemente, contribuíram para o desenvolvimento da biologia estrutural, a qual pode ser instrumento na elucidação de estrutura e função protéica e/ou planejamento de novas moléculas baseadas no banco de dados de proteínas (PDB), por exemplo (LEAL et al., 2018).

Para mais, o uso de seres vivos, ou parte deles, como insumo biotecnológico, além de ser realidade na contemporaneidade e agregar valor aos produtos, contribui para auxílio ou solução de diversos problemas na sociedade, relacionados à saúde, alimentação ou indústria. Exemplo disso, a biotecnologia aplicada à saúde tem sido usada na produção de kits diagnósticos de doenças e produção de vacinas usando animais ou plantas como biorreatores (RESENDE, 2015). Inclusive, as lectinas, um grupo heterogêneo de proteínas, possuem um leque de possibilidades de aplicações e propriedades biológicas que podem ser exploradas (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004). Portanto, o estudo dessas macromoléculas aplicadas às diversas áreas da ciência, aliadas ao recurso humano e ao avanço da ciência, potencializam projetos de pesquisas em diversas áreas.

Desse modo, buscando um melhor entendimento do trabalho e embasamento para justificar a caracterização estrutural de lectinas, como as lectinas de *Centrolobium microchaete* (CML) e *C. tomentosum* (CTL), as quais podem possibilitar a descoberta de novas propriedades funcionais, os seguintes tópicos: lectinologia e seu potencial biotecnológico, glicobiologia e as lectinas de leguminosas serão apresentados.

1.1 Lectinologia e seu potencial biotecnológico

Inicialmente, a área de estudo das lectinas conhecida como lectinologia pode fornecer bases para aplicação dessas proteínas em diversas áreas, como a agricultura, biomedicina, entre outras. Assim, a lectinologia auxilia no desenvolvimento de estudos, como os realizados na área da imunologia (TSANEVA; VAN DAMME, 2020), podendo participar da imunidade inata, por reconhecimento à manose na superfície de patógenos (MATSUSHITA; ENDO; FUJITA, 2013). Em aplicações biotecnológicas na agricultura, lectinas são usadas para a construção de proteínas de fusão pelo uso da transgenia no melhoramento genético de plantas, podendo agir como agentes inseticidas. Exemplo, o uso da transgenia no melhoramento genético de plantas com a construção de proteínas de fusão, usando lectina como agente inseticida (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Na microbiologia, as lectinas podem agir como agente antimicrobiano atuando na permeabilidade celular e alterar os componentes da parede celular, pela interação aos glicoconjugados (BREITENBACH BARROSO COELHO et al., 2018). Como agente antiparasitário, a interação lectina/parasita pode interferir na sobrevivência do parasita sem afetar o hospedeiro (IORDACHE et al., 2015), bem como, usada como imunoterapêutico, a lectina e a vacina com antígeno do parasita, pode induzir uma imunização mais eficiente (JANDÚ et al., 2017). Essa última estratégia foi, inclusive, verificada contra infecção de *Trypanosoma cruzi* (ALBUQUERQUE et al., 1999), *Leishmania ssp.* (PANUNTO-CASTELO et al., 2001) e *Neospora caninum* (CARDOSO et al., 2011), mostrando resultados promissores.

Fato é que as lectinas estão presentes em todos os seres vivos e desempenham papéis fundamentais no organismo ou na célula (NIZET; VARKI; AEBI, 2017) visto que, tanto em vertebrados quanto em invertebrados, fungos e plantas, estudos mostraram que muitas delas desempenham papel de sinalização celular e/ou reconhecimento nas interações patógenos-hospedeiro (VARROT; BASHEER; IMBERTY, 2013; NIKOLAKOPOULOU; WILLMENT; BROWN, 2020; WANG; VASTA; WANG, 2020; ZHU; YU; CHENG, 2020). Em geral, elas desempenham um papel importante no controle da homeostase, transporte de nutrientes e interações entre células e tecidos, estando envolvidas em muitas funções biológicas, tais como reconhecimento celular, sinalização, coagulação sanguínea, defesa contra patógenos, regulação imunológica, respostas ao estresse e desenvolvimento embrionário em humanos. Além disso, assim como as galectinas de humanos podem exercer efeito autócrino e parácrino nas células (DASH; MINZ; SENAPATI, 2018), as lectinas de vegetais também podem reconhecer glicanos e promover respostas dentro, próximo ou distante das células de origem. Quando necessário,

dependendo de sua função, elas podem ser endereçadas para meio extracelular, permanecer no citoplasma ou ser translocadas para o núcleo (LANNOO; VAN DAMME, 2010).

Outrossim, além dos estudos de caracterização físico-química, o estudo dos domínios de reconhecimento a carboidratos, a estrutura tridimensional e sua relação aos carboidratos mostram uma infinidade de propriedades biológicas que essas proteínas podem exercer. Segundo Sharon e Lis, dentre os sacarídeos, a glicose, manose, fucose, galactose, *N*-acetil-D-galactosamina e *N*-acetil-D-glicosamina, são frequentemente reconhecidos por essas proteínas (SHARON; LIS, 2004). Entretanto, geralmente possui afinidade altamente específicas, na qual uma lectina específica à manose, dificilmente seria específica à galactose, e vice-versa (LIS; SHARON, 1998), com exceção das superlectinas que podem possuir dois ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos diferentes. Assim, dentro das próprias famílias, as lectinas podem ser classificadas quanto a quantidade e tipo de domínio.

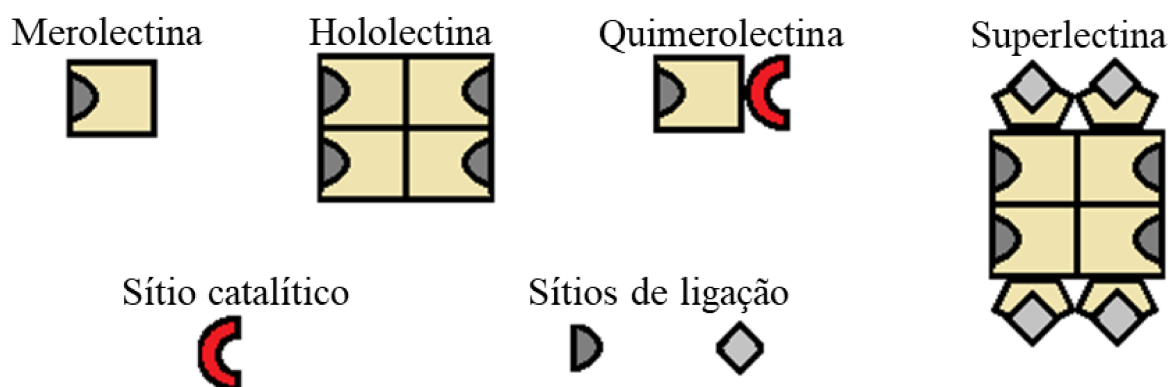
1.2 Lectina e sua classificação quanto à quantidade e tipo de domínio

As lectinas são proteínas de origem não imune, capazes de se ligar reversivelmente e de forma não covalente a monômeros de açúcares específicos ou estruturas maiores como glicoproteínas e glicolípídeos, devido ao domínio de reconhecimento à carboidrato (CRD) formado por uma cadeia polipeptídica específica dentro de sua estrutura (KENNEDY et al., 1995). Além disso, essas proteínas podem ser classificadas em merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas, dependendo da quantidade e tipos de domínios (VAN DAMME et al., 1998). À princípio, diferente das demais, as merolectinas por possuírem um único CRD, não são capazes de aglutinar eritrócitos, como a lectina de *Helianthus annuus*, lectina relacionada a *jacalina* (JRLs) específica à manose (PINEDO et al., 2015). Já as lectinas que possuem dois ou mais CRDs são hololectinas, as quais estão presentes em plantas leguminosas como em sementes de plantas da subtribo *Diocleinae* (CAVADA et al., 2001), entre outras tribos. As quimerolectinas, além de possuírem pelo menos um CRD, possuem um domínio catalítico, como a lectina 2 de *Parkia platycephala* (PPL2), que possui um sítio ligante à quitina e um sítio catalítico endoquitinásico (CAVADA et al., 2006). Por fim, as superlectinas, que possuem pelo menos dois CRDs diferentes na mesma lectina, porém com afinidades diferentes à carboidratos não relacionados estruturalmente, como a lectina bacteriana de *Burkholderia cenocepacia* (BC2L-C) que possui um domínio C-terminal se ligando a manosídeos bacterianos e um domínio *N*-terminal de ligação a epítomos fucosilados do grupo histó-sanguíneo humano (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; BERMEO; BERNARDI;

VARROT, 2020), ver Figura 1. Por fim, as lectinas que possuem pelo menos dois domínios de reconhecimento à carboidrato são capazes de aglutinar eritrócitos.

Além de tudo, conforme a Figura 1, embora mostre um esquema dos quatro tipos, a grande maioria das lectinas vegetais pertencem ao grupo das hololectinas, podendo ser definidas também como lectinas di ou multivalentes (VAN DAMME et al., 1998), nas quais podem levar a reticulação e agregação de glicoproteínas e receptores específicos de células, estando associadas a diversas atividades biológicas (LORIS et al., 1998), exemplo, as lectinas de leguminosas.

Figura 1 - Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: elaborado pelo autor.

1.3 Famílias de lectinas de plantas

Baseado nas sequências de aminoácidos, conformação de motivos e de CRD das lectinas de plantas foi possível classificar as lectinas em 12 famílias: lectinas de *Agaricus bisporus agglutinin* (ABA), lectinas com domínio de Amarantinas, lectinas relacionadas à quitina classe V (CRA), lectina com domínio de Cianovirina, lectinas de *Euonymus europaeus* (EUL), lectinas relacionadas ao domínio de *Galanthus nivalis agglutinin* (GNA), lectina com domínio relacionada à Hevein, lectinas com domínio relacionada à Jacalina, lectina com domínio Lys-M, lectinas de *Nicotiana tabacum agglutinin* (Nictaba), lectinas com Ricin-B e lectinas de leguminosas (VAN DAMME, 2014; TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Na Tabela 1 é possível ver, de forma geral, algumas características dessas famílias como: o ligante específico, a localização celular e a estrutura tridimensional de enovelamento.

Tabela 1 - Visão geral das 12 famílias de lectinas de plantas.

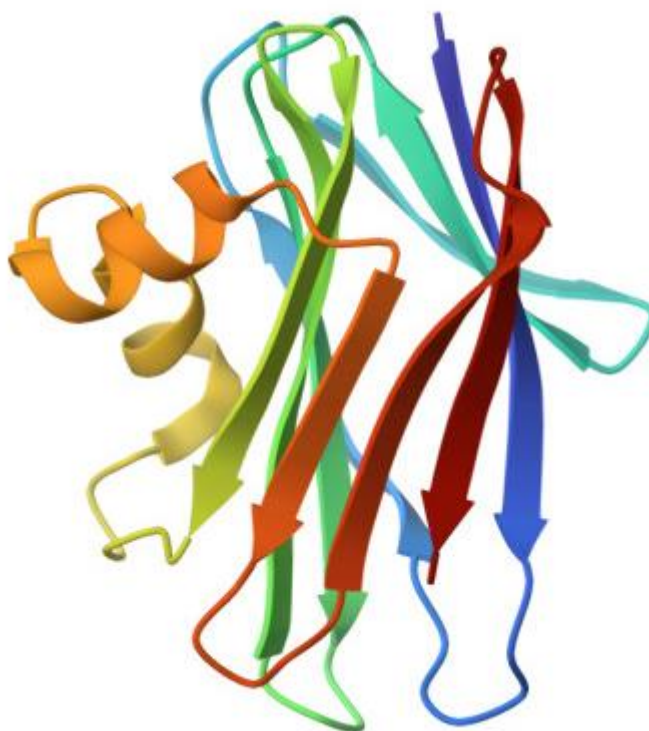
Domínio de lectina	Ligante	Localização celular	Estrutura tridimensional do domínio
ABA	GlcNAc/GalNAc, Gal, antígeno T	Núcleo e citoplasma	β -sanduíche
Amarantinas	GalNAc e antígeno T	Núcleo e citoplasma	β -trevo
CRA	N-glicanos ricos em man	Vacúolos e membrana	TIM barril
Cianovirina	Man e N-glicanos rico em man	Núcleo	Folha- β de fita tripla e β - <i>hairpin</i>
EUL	Galactosídeos e N-glicanos rico em man	Núcleo e citoplasma	Não identificada
GNA	Man, oligossacarídeos de man e N-glicanos ricos em man	Vacúolos, núcleo, citoplasma ou membrana	β -prisma
Heveína	Qui, (GlcNAc) _n e ácido siálico	Vacúolo	Motivo de 30-43 resíduos, rico em glicínias e cisteínas com posições conservadas
Jacalina	Man/N-glicanos rico em man ou gal/N-glicanos complexos	Núcleo, citoplasma e vacúolo	β -prisma
Lys-M	Qui, (GlcNAc) _n e peptideoglicano	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou membrana	Estrutura β - α - α - β
Nictaba	GlcNAc) _n , alto teor de man e N-glicanos complexos	Núcleo e citoplasma	Não identificada
Ricina-B	Gal/GalNAc, gal/GalNAc sialilado	Vacúolo, núcleo, citoplasma	β -trevo
Leguminosas	Man/glc, Gal/GalNAc, (GlcNAc) _n , fuc, ácido siálico, alto teor de man e N-glicanos complexos	Vacúolo, núcleo, citoplasma ou membrana	β -sanduíche

Fonte: VAN DAMME, (2014); TSANEVA; VAN DAMME, (2020). ABA, lectinas de *Agaricus bisporus agglutinin*; CRA, lectinas relacionadas à quitina classe V; EUL, lectinas de *Euonymus europeus*; GNA, lectinas de *Galanthus nivalis agglutinin*; Nictaba, lectinas de *Nicotiana tabacum agglutinin*; GlcNAc, N-acetil-glicosamina; GalNAc, N-acetil-galactosamina; Man, manose; Gal, galactose; Glc, glicose; Qui, quitina; Fuc, fucose.

1.3.1 Família ABA

Primeiramente, isolada de cogumelos *A. bisporus*, as lectinas da família ABA foram relatadas em briófitas, plantas hepáticas como *Marchantia polymorpha* e *Sphagnum fallax*, sugerindo uma transferência horizontal de um ancestral fúngico comum, apesar que existam poucas lectinas dessa família em plantas (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). Sua estrutura terciária é composta por duas folhas- β conectadas por um motivo hélice-alça-hélice, formando uma única dobra conhecida como β -sanduíche (CARRIZO et al., 2005). Seu monômero possui 142 resíduos de aminoácidos que formam uma folhas- β maior com seis fitas, outra menor com quatro fitas e duas pequenas α -hélices, Figura 2. Sobre aos carboidratos específicos, as lectinas de ABA possuem especificidade à GlcNAc/GalNAc, galactose e fortemente ao antígeno T. Inclusive, pode ser considerada uma superlectina, pois possui dois sítios de ligação a carboidratos distintos (NAKAMURA-TSURUTA et al., 2006).

Figura 2 - Estrutura geral colorido em *spectrum* do enovelamento do monômero de ABA. A figura mostra a folha- β maior com seis fitas, a folha- β menor com quatro fitas e duas α -hélices pequenas conectadas por as alças.

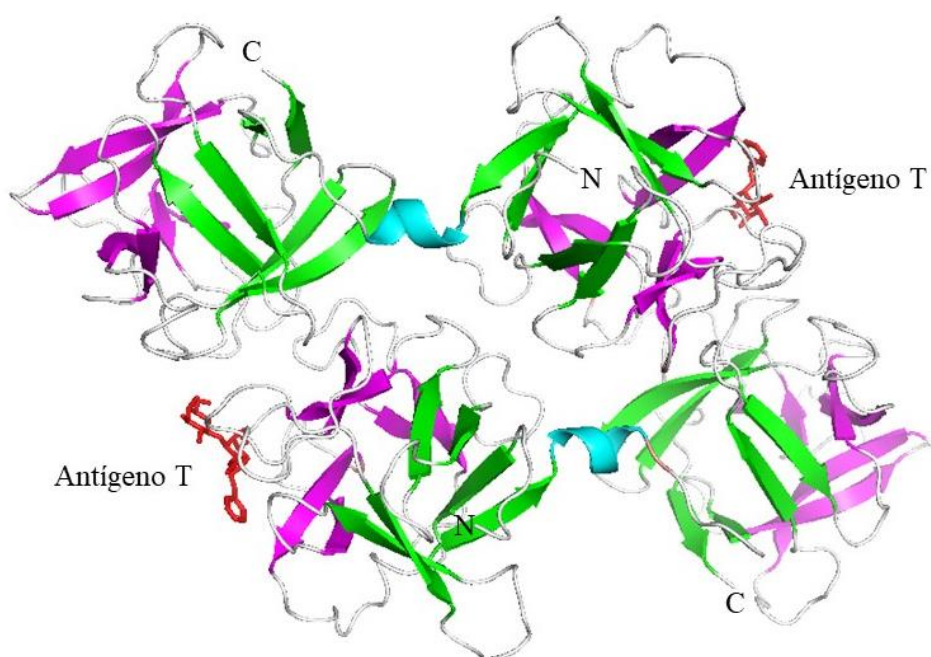


Fonte: PDB id: [1Y2W](https://www.rcsb.org/structure/1Y2W).

1.3.2 Família com domínio de Amarantinas

Da mesma forma, assim como as lectinas de ABA, as lectinas da família com domínio de Amarantinas são encontradas no núcleo e no citoplasma, Tabela 1. A respeito delas, exemplificando, sementes da espécie *Amaranthus caudatus*, uma gimnosperma pertencente à família *Amaranthaceae*, possuem lectinas desse domínio que podem ser purificadas em duas etapas cromatográficas, primeiramente, com matriz de troca iônica e, posteriormente, matriz de afinidade com antígenos T ancoradas na matriz (RINDERLE et al., 1989). Assim, essa lectina possui um domínio específico à Gal β 1-3GalNAc (antígeno T) que pode ser visualizada essa interação na Figura 3. Perceba também que a estrutura quaternária, conhecida como β -trevo, possui um enovelamento formado por um dímero com cada monômero possuindo dois subdomínios conectados por uma curta 3_{10} -hélice (TRANSUE et al., 1997).

Figura 3 - Estrutura geral do enovelamento de um dímero de lectina com domínio Amarantina com os dois sítios de ligação interagindo com o antígeno T em vermelho. Cada monômero com suas subunidades terminais rotuladas com C e N possui dois domínios β -trevo. As setas verdes representam as fitas- β formando um β -barril com seis fitas e as setas magentas representam as fitas- β formando os três β -hairpins de cada domínio. Uma curta 3_{10} -hélice em ciano conecta cada subunidade dos dois domínios.

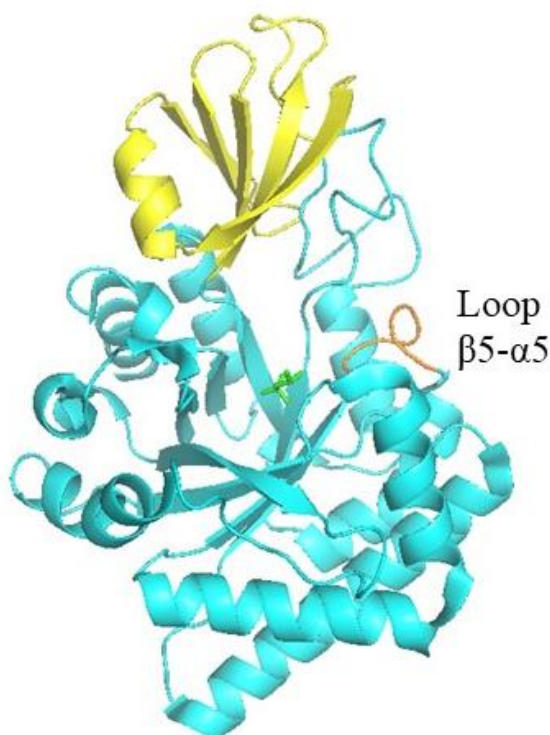


Fonte: PDB id: [1JLX](#).

1.3.3 Lectina relacionada à quitinase classe V

Diferentemente das famílias de lectinas anteriores, de acordo com Vam Damme e colaboradores, esta família é encontrada nos vacúolos e membrana, a saber: a família de lectinas classificadas como CRA, sigla provinda da expressão em inglês, *class V quitinase-related agglutinin*, são proteínas que possuem semelhança a um grupo de quitinases, que são enzimas catalíticas de quitina (um homopolímero com unidades de GlcNAc ligadas a β -1-4) (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Nesse contexto, a primeira lectina dessa família foi purificada de cascas da leguminosa *Robinia pseudoacacia*, apresentando 50% de identidade com as quitinases, porém, sem atividade de quitinase (SULZENBACHER et al., 2015). Nomeada de lectina relacionada a quitinase classe V de *Robinia pseudoacacia* (RobpsCRA) com 337 resíduos de aminoácidos, essa lectina está estruturalmente e evolutivamente relacionada com a família de quitinases GH18 (SULZENBACHER et al., 2015), Figura 4. Além disso, possui um motivo conhecido como *TIM-barrel*, baseado no domínio catalítico clássico (β - α)₈-*barrel* de exoquitinases (PERRAKIS et al., 1994). Para entender melhor, o motivo (β - α)₈-*barrel* consiste em oito fitas paralelas (β 1- β 8) em forma de barril cercado por oito α -hélices (α 1- α 8) (TERWISSCHA VAN SCHELTINGA et al., 1994). Na Figura 4, em RobpsCRA está representado o domínio central (*TIM-barrel*) na cor ciano ligada ao domínio ($\alpha + \beta$) em amarelo formado por uma folha- β constituída de cinco fitas antiparalelas e uma α -hélice que está conectado ao domínio central por meio da interação com os loops de β 7 e α 7 (SULZENBACHER et al., 2015). Em seguida, o loop β 5- α 5 e β 3- α A (não representado na figura) apesar da conservação dos resíduos que os formam serem os mesmos em quitinases, o loop β C- β D sofreu depleção de cinco resíduos formando β D nas RobpsCRA. Essas modificações justificam atividade catalítica prejudicada, diferentemente das quitinases as quais mostram esses loops relacionados a interação com grupos catalíticos ativos (VAN DAMME et al., 2007; SULZENBACHER et al., 2015). Assim, o loop β D-*hairpin* de RobpsCRA não interage com a quitina, diferente em quitinases classe V com o loop β C- β D, não representado na Figura 4. Para mais, estudos mostraram que RobpsCRA se comporta como monômero em solução (KRISSINEL; HENRICK, 2007), outros estudos mostraram uma mistura das duas formas em solução, monômeros e dímeros, justificando a atividade hemaglutinante quando em dímero (VAN DAMME et al., 2007). Na Figura 4, é possível observar o 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) na região de CRD.

Figura 4 - Visão geral da RobpsCRA mostrando o domínio central colorido de ciano e o domínio ($\alpha + \beta$) colorido de amarelo. No centro, na cor verde em sticks, há uma representação da molécula 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) na região de CRD. O loop $\beta 5-\alpha 5$ está representado na cor laranja.



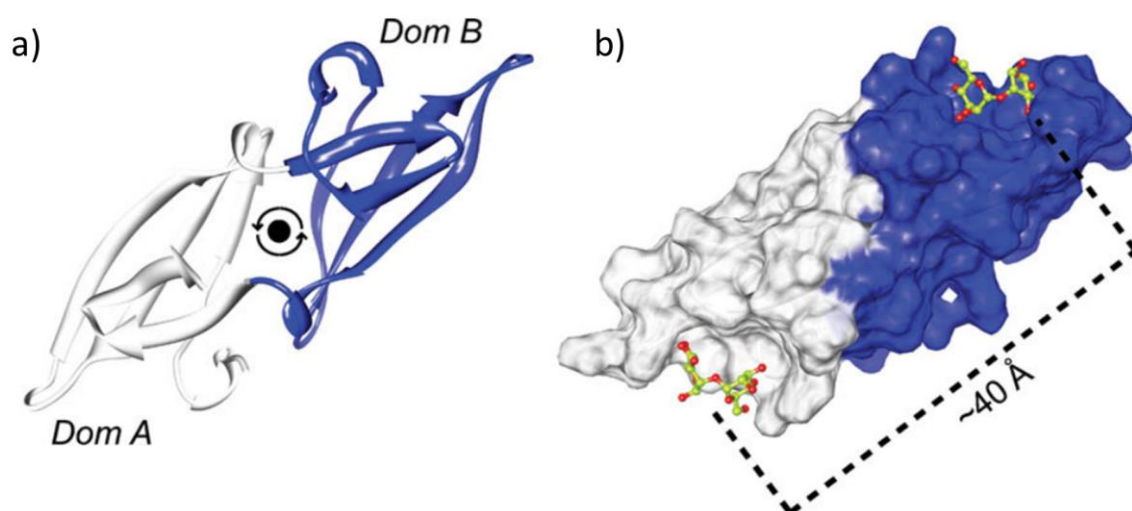
Fonte: PDB id: [4URI](#).

1.3.4 Família com domínio de Cianovirinas

Ausentes em gimnospermas e angiospermas, até o momento, as lectinas com domínio de Cianovirinas possui distribuição limitadas em: pteridófitas (classe das samambaias e liliopsidas), fungos, bactérias e algas verdes (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). A *Cyanovirin-N* (CV-N), uma lectina viricida de cianobactérias com massa aproximadamente 11 kDa, foi originalmente identificada de *Nostoc ellipsosporum*, pertencente ao filo *Cyanobacteria* (KOHARUDIN; GRONENBORN, 2013). Em relação a sua estrutura terciária, a CV-N contém duas repetições em tandem de aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos (BEWLEY et al., 1998). Contudo, mesmo apresentando semelhança entre os domínios e cavidade com CRD, Figura 5a, o domínio B mostra maior profundidade da sua cavidade em relação ao domínio A (KOHARUDIN; GRONENBORN, 2013). Além disso, com distância aproximada de 40 Å entre as cavidades, Figura 5b, as lectinas com esse domínio possuem uma estrutura tridimensional

composta por uma folha- β de fita tripla e um β -*hairpin*. Por fim, específica à manose e *N*-glicanos ricos em manose, na Figura 5b, mostra um resíduo de manose interagindo em cada CRD.

Figura 5 - Visão geral da estrutura da CV-N. a) Mostra os domínios A colorido de branco e o domínio B de azul. b) mostra a distância aproximada de 40 Å entre as cavidades dos dois domínios. Cada CRD possui um resíduo de manose complexada.



Fonte: KOHARUDIN; GRONENBORN, (2013).

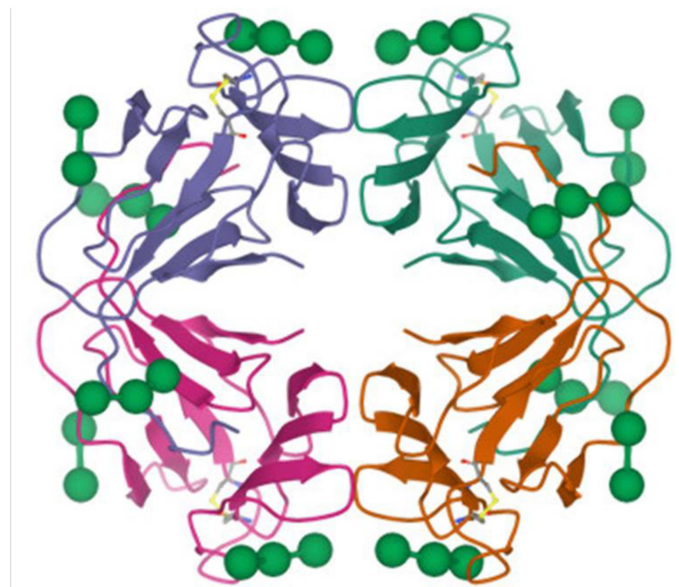
1.3.5 Lectinas da família EUL

Proveniente da espécie *Euonymus europaeus*, uma angiosperma pertencente à família *Celastraceae*, foi purificada a aglutinina de *Euonymus europaeus* (EEA) que, posteriormente, deu nome a essa família. Experimentalmente, sua estrutura terciária ainda não foi resolvida, mas mostrou semelhança com a ricina-B baseada em modelagem molecular (AGOSTINO et al., 2015). Fundamentalmente, tudo isso foi possível graças ao uso da biologia molecular com a resolução da sequência de aminoácidos da EEA, que apresentou uma proteína homodimétrica, cerca de 152 resíduos e massa molecular relativa de 17 kDa (FOUQUAERT et al., 2008). Por sinal, a sequência de aminoácidos dessa família foi encontrada no genoma de todas as plantas terrestres (FOUQUAERT et al., 2009). Sobre a afinidade a carboidratos, essa família apresenta espécies específicas a galactosídeos e *N*-glicanos ricos em manose, Tabela 1.

1.3.6 Lectinas relacionadas à GNA

A GNA, uma lectina isolada de uma espécie de monocotiledônea de angiosperma, apresenta um tetrâmero de 50 kDa composta por subunidades de 12,5 kDa ligadas de forma não covalente (HIRABAYASHI, 2020). A subunidade, com aproximadamente 110 resíduos de aminoácidos, enovela-se em forma típica de β -prisma composta por três folhas β antiparalelas com quatro fitas (HESTER et al., 1995). Apesar de ser isolada, primeiramente, em espécies de monocotiledôneas, seu motivo β -prisma é observado em outros grupos, como gimnosperma, dicotiledôneas, hepáticas, entre outros, passando a ser chamada de lectinas relacionadas á GNA (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2019). Na Figura 6, é possível visualizar a GNA complexada com resíduos de manose nos três sítios de ligação disponíveis em cada subunidade.

Figura 6 - Visão geral de um tetrâmero de lectina de *Galanthus nivalis*. Cada subunidade está colorida (A = roxo, B = verde, C = laranja e D = rosa). A interface dimérica Me- α -Man é mostrada vinculada ao subdomínio A-D e B-C. A lectina complexada com resíduos de manoses ramificadas nos três sítios de reconhecimento a carboidratos de cada subunidade está representada de verde com três esferas e dois bastões para alfa-D-manopiranoose-(1,3)-[alfa-D-manopiranoose-(1,6)]alfa-manopiranoose e duas esferas e um bastão para alfa-D-manopiranoose-(1,6)-alfa-manopiranoose.

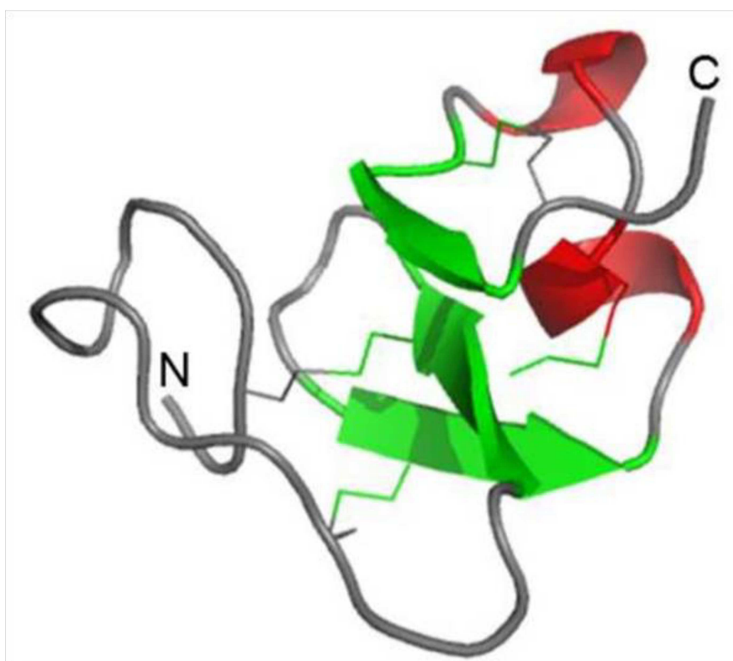


Fonte: PDB id: [1JPC](https://www.rcsb.org/structure/1JPC)

1.3.7 Lectina com domínio de Heveína

Conhecida como lectinas com domínio de Heveína porque foi purificada do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), este pequeno monômero de lectina contém entre 30-43 resíduos ricos em glicina e cisteínas com posições conservadas ((VAN DAMME, 2014; TSANEVA; VAN DAMME, 2020)). Como regra geral, sua estrutura terciária é composta por uma folha- β com três fitas e duas α -hélices curtas (ANDERSEN et al., 1993). Na Figura 7 é possível observar o domínio heveína de *Hevea brasiliensis* com duas α -hélices, uma folha- β , os loops e em destaque as ligações dissulfeto (BERTHELOT; PERUCH; LECOMTE, 2016). Nessa estrutura, nota-se a estabilidade graças às ligações dissulfeto entre os resíduos conservados de cisteína (VAN DAMME et al., 1998). Além disso, essa proteína pode apresentar como um único domínio, em tandem de dois a sete ou como parte de uma quimerolectina, apresentando um domínio quitinase no C-terminal ((VAN DAMME, 2014; TSANEVA; VAN DAMME, 2020)). A propósito, a lectina de *Hevea brasiliensis* possui afinidade a quitina, GlcNAc e apresenta atividade antifúngica (ASENSIO et al., 2000).

Figura 7 - Domínio heveína de *Hevea brasiliensis* (PDB id: [1HEV](#)) com as estruturas secundárias α -hélices de vermelho, folhas- β de verde e os loops de cinza. As ligações dissulfeto estão representadas por linhas finas.

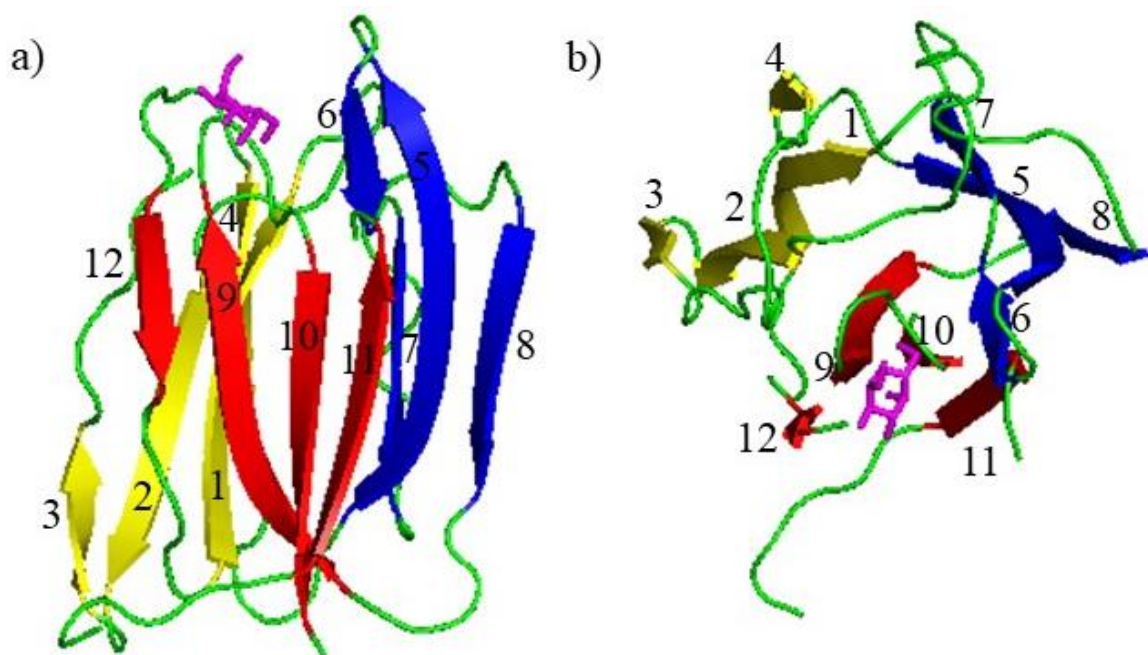


Fonte: BERTHELOT; PERUCH; LECOMTE, (2016).

1.3.8 Lectina com domínio relacionado à Jacalina

A lectina com domínio relacionado à Jacalina, primeiramente, isolada de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*), pertencente à família *Moraceae*, dentro do grupo das angiospermas, tornou-se um domínio modelo para essa família de lectinas de plantas (SASTRY et al., 1986). Esse domínio é composto por triplo β -prisma simétrico formado por três folhas- β com quatro fitas (SANKARANARAYANAN et al., 1996), Figura 8. Além disso, de acordo com a Tabela 1, elas podem estar presentes no núcleo, citoplasma e vacúolos. A respeito disso, estudos mostraram que as lectinas dessa família de lectinas com afinidade à manose estão presentes no núcleo e citoplasma, diferentemente das lectinas específicas a galactose, que estão nos vacúolos (PEUMANS; HAUSE; VAN DAMME, 2000). Na Figura 8 mostra visão geral do domínio de lectina relacionadas à Jacalina da espécie *Artocarpus heterophyllus* com 153 resíduos, incluindo a fita 11 com 20 resíduos que pertence à folha- β 3.

Figura 8 - Visão geral do domínio de lectinas relacionadas à Jacalina. a) visão lateral com metil-alfa-D-galactose (cor magenta) no CRD; b) visão do topo. As folhas- β 1, 2 e 3 estão coloridas de amarela, azul e vermelha, respectivamente. A fita 11 pertence à folha- β 3.

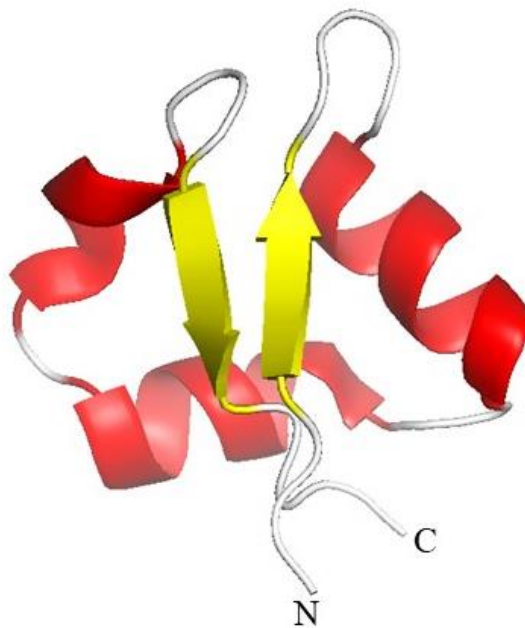


Fonte: id: [IJAC](#).

1.3.9 Lectinas com domínio de Lys-M

É importante mencionar que, mesmo com a identificação do domínio Lys-M (motivo lisina de arroz) primeiramente em bactérias (Figura 9), também foi relatado como parte de quitinases semelhantes a receptores Lys-M, posteriormente (CAROTENUTO et al., 2017). Esses receptores fazem parte tanto da participação dos rizóbios quanto da formação de micorrizas arbusculares - relação harmônica simbiótica em que o fungo penetra as células corticais de raízes de planta vascular. Sobre esse domínio, é conhecido como β - α - α - β , formado por duas α -hélices do lado de uma folha- β antiparalela (BATEMAN; BYCROFT, 2000). No entanto, na Figura 9 é possível observar esse domínio de bactérias com três α -hélices, o qual não é encontrado apenas em bactérias, mas pode ser encontrado como uma única cópia em várias proteínas não caracterizadas de *Caenorhabditis elegans* (espécie de nematódeo pertencente a família *Rhabditidae*) (PONTING et al., 1999), assim como em fungos da espécie *Kluyveromyces lactis*.

Figura 9 - Visão geral do domínio de Lys-M de *Escherichia coli* com uma folha- β antiparalela colorida de amarelo e três α -hélices ao lado coloridas de vermelho.



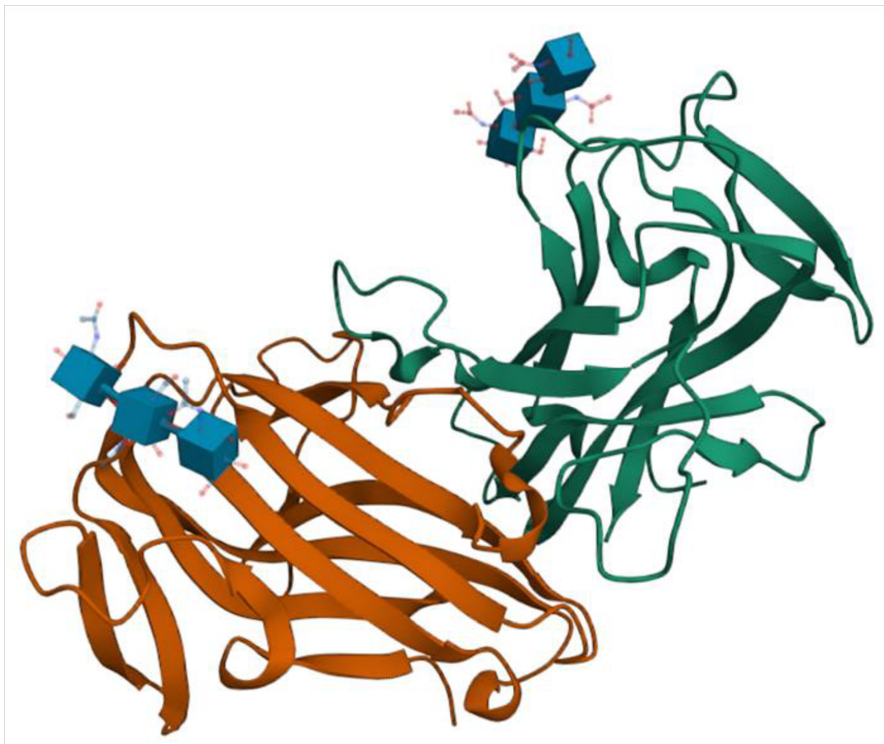
Fonte: id: [1EOG](#).

1.3.10 *Nictaba*

Isolada primeiramente de folhas da espécie *Nicotiana tabacum*, família *Solanaceae*, essa lectina, específica a *N*-glicanos de alto teor de manose, *N*-glicanos complexos e, em menor grau, à GlcNAc, é um homodímero formado por duas subunidades de 19 kDa (CHEN et al., 2002). Sua estrutura terciária, proposta por modelagem, sugere um β -sanduíche formado por duas folhas- β conectadas por loops (SCHOUPE et al., 2010). Na figura 10, é possível visualizar um homodímero de lectina *Nicotiana tabacum* recombinante, expressa em *Escherichia coli*, complexada com triacetilquitotriose.

Figura 10 - Visão geral de um homodímero de uma lectina de *Nicotiana tabacum* (Nictaba), expressa em um sistema *Escherichia coli*, complexado com uma triacetilquitotriose. Os domínios estão representados pela cor verde e amarelo e o carboidrato por cubos azuis. O método utilizado foi a difração por raio X com resolução de 2 Å.

Fonte: PDB id: [8AD2](#).



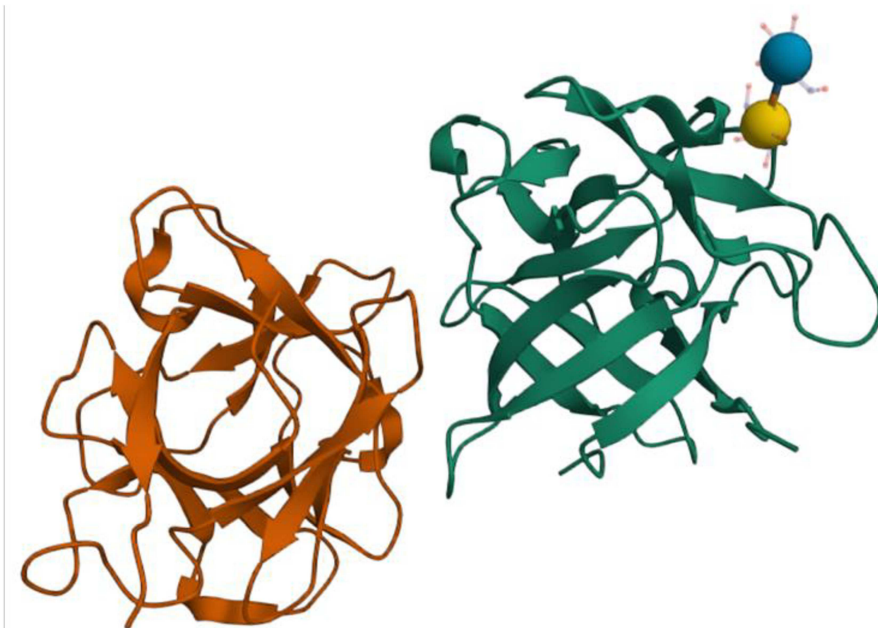
Entre as regiões de atuação, sua localização subcelular, tanto no citoplasma quanto no núcleo, indica que possa estar envolvida na regulação da expressão gênica em plantas com flores, tendo em vista que sua sequência de aminoácidos no banco de dados mostrou possível

codificação de proteínas homólogas, tornando o termo Nictaba a representação dessa família de lectinas (CHEN et al., 2002). Além do mais, sua expressão é induzida por estresse, seja por frio ou ataque de insetos herbívoros (TSANEVA; VAN DAMME, 2020).

1.3.11 Ricina-B

Apesar do domínio ricina-B estar presente em procariotos e eucariotos, o domínio de lectina com RNA *N*-glicosidase, conhecidas como proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2, está presente apenas em angiospermas (RUTENBER; ROBERTUS, 1991). Na figura 11, mostra uma cadeia formada por dois domínios ricina-B homólogos de *Clitocybe nebularis*, uma espécie de fungo pertencente à família *Tricholomataceae*. Além disso, de acordo com a Tabela 1, esse domínio tem afinidade à galactose e GalNac, como também, estruturas de glicano contendo esses carboidratos.

Figura 11 - Visão geral de cadeia formada por dois domínios homólogos de lectina com domínio Ricina-B de *Clitocybe nebularis* coloridos de verde e amarelo, os quais apresentam a lactose, representada por duas esferas e bastão azul e amarelo, complexada no domínio colorido de verde e o domínio amarelo, sem carboidrato complexado, mas apresentando *cis*-peptídeo de cor verde.



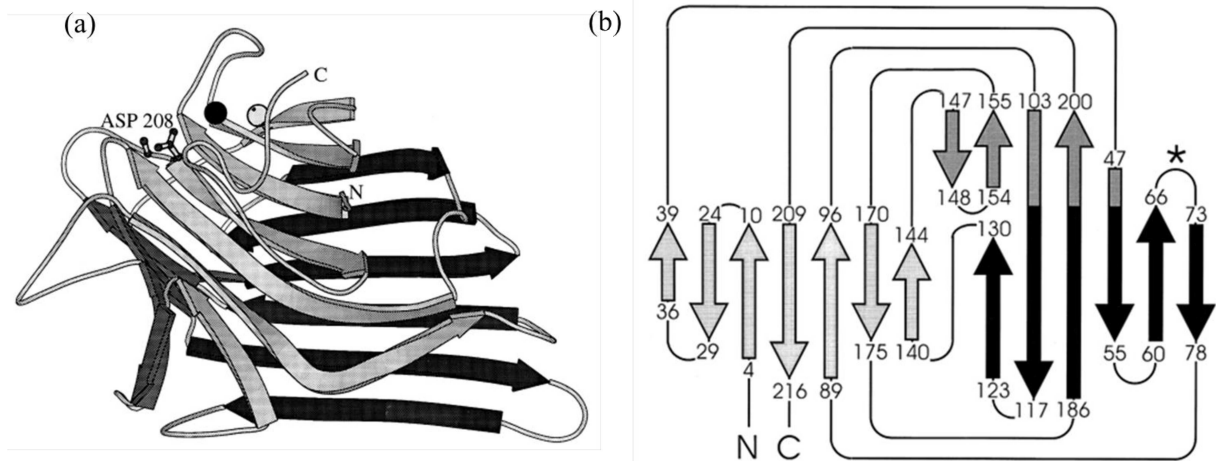
Fonte: PDB id: [3NBC](#).

1.3.12 Lectinas de leguminosas e características gerais de suas estruturas

Pela diversidade de aplicações biológicas encontradas em várias lectinas de subfamílias, tribos, gêneros e espécies diferentes, a especificidade das lectinas de leguminosas a certos carboidratos, como os encontrados em células cancerígenas (DAMODARAN et al., 2008), faz dessa família uma ferramenta com potencial biotecnológico, sendo amplamente explorada. Curiosamente, observa-se conservação de domínios característicos na maioria dessas proteínas, no entanto, a estrutura quaternária apresenta variações que diferem nas interações monômero-monômero, o qual dita a especificidade de ligação ao glicano (BRINDA et al., 2004), podendo formar homodímero ou homotetrâmero (dímeros de dímeros) (MANOJ; SUGUNA, 2001), os quais são formados por duas ou quatro subunidades (25-30 kDa), cada uma com um CRD, com alto teor de folhas β conectadas por loops com cadeias antiparalelas desprovidas de α -hélice (SHARON; LIS, 1990).

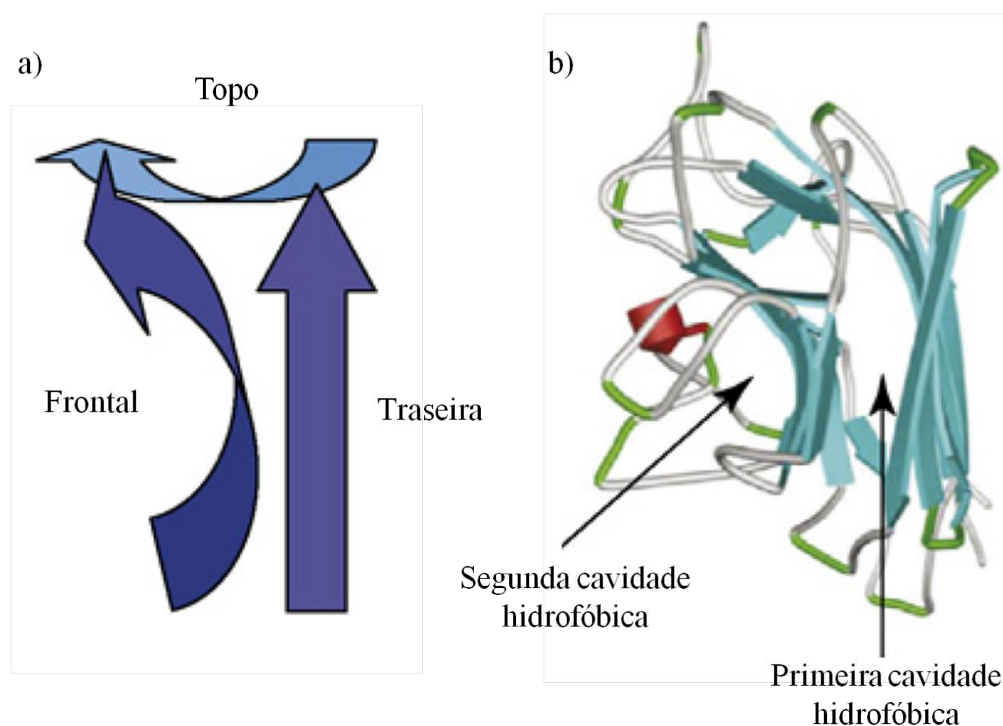
Como exemplo, na Figura 12, mostra um monômero de Concanavalina A (ConA), uma espécie pertencente a subfamília *Papilionoideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Diocleinae*, mostrando o diagrama da lectina na Figura 12a, com o resíduo *cis*-aspartato 208 pertencente ao *cis*-peptídeo, os cátions divalentes, a disposição das folhas- β e as extremidades das cadeias C e N terminal, e o diagrama de topologia de dobra na Figura 12b. Esse enovelamento, mostra duas grandes folhas- β antiparalelas, uma mais estendida com seis fitas (traseira) e outra curvada com sete fitas (frente), e uma folha- β menor (topo), com cinco fitas (chamada de folha-S), a qual desempenha um papel fundamental na junção das duas maiores (LORIS et al., 1998), como também, dois núcleos hidrofóbicos estabilizando essa dobra, dos quais, o primeiro é formado na regiões de junção das três folhas- β e o segundo, formado entre folha- β frontal e o laço que conectam as fitas da folha- β frontal (SINHA et al., 2007), Figura 13.

Figura 12 - a) Diagrama de um monômero de lectina de leguminosa, Concanavalina A. O cis-aspartato 208 é representado por esferas e bastões, os íons de manganês e cálcio são representados por esfera cinza e preta, respectivamente. A folha traseira com seis fitas está colorida de preto, a folha frontal com 7 fitas está colorida de cinza claro e folha-S, de cinza escuro. b) Diagrama de topologia de dobra de lectina de leguminosa, seguindo a mesma codificação de cores em a), foi desenhado com MOLSCRIPT 156. É possível ver as extremidades da cadeias em N e C, como também, o sítio de clivagem entre a cadeia- β e cadeia- α indicado por asterisco.



Fonte: LORIS et al., (1998).

Figura 13 - a - Representação geral do motivo *jellyroll* mostrando a folha- β frontal curvada, folha- β plana traseira e folha- β curta no topo da molécula; b - mostram dois núcleos hidrofóbicos na estabilização do enovelamento. O primeiro núcleo é formado pelo enovelamento das três folhas- β e o segundo, formado pela folha- β frontal e os loops que conectam a folha frontal- β .

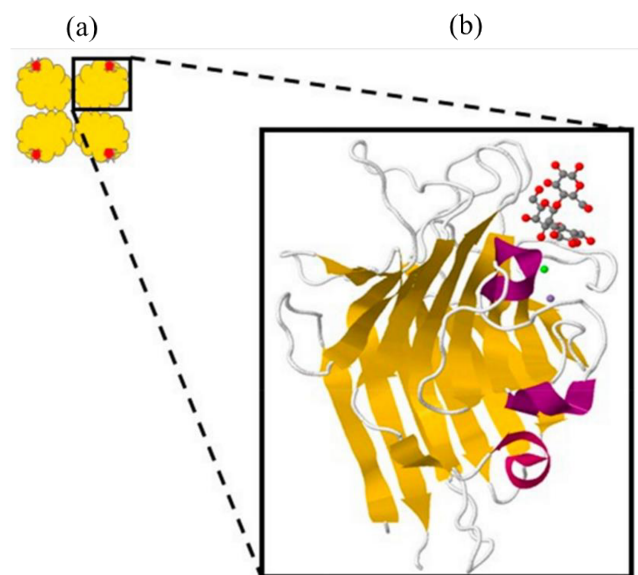


Fonte: SINHA et al., (2007).

Por conseguinte, esse monômero exibe um motivo *jellyroll* padrão contendo CRD, geralmente com sítio de ligação a metal para cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), Figura 14, o qual mostra um tetrâmero da lectina galactose-específica de *Erythrina cristagalli* (1GZ9), Figura 14a, e seu motivo *jellyroll* na Figura 14b com um carboidrato complexado (2-alfa-L-fucoselactose) no CRD, estabilizado com os cátions divalentes. Inclusive, o sítio de ligação à metais, além de ser conservada em diversas lectinas dessa família, principalmente na tribo *Dalbergieae*, podendo ser composto por resíduos presentes em diferentes regiões em relação a estrutura primária, são formadas por 6 resíduos e 4 moléculas de água, coordenando um átomo de Ca^{2+} e um de Mn^{2+} (NASCIMENTO et al., 2020). E, de fato, em lectinas da tribo *Dalbergieae*, dentre os resíduos conservados, estudos mostraram que a histidina, glutamina e dois resíduos de ácido aspártico coordenam a interação do íon manganês, já o íon de cálcio é coordenado pelos resíduos fenilalanina, asparagina e os mesmos resíduos de ácido aspártico, com exceção da lectina de

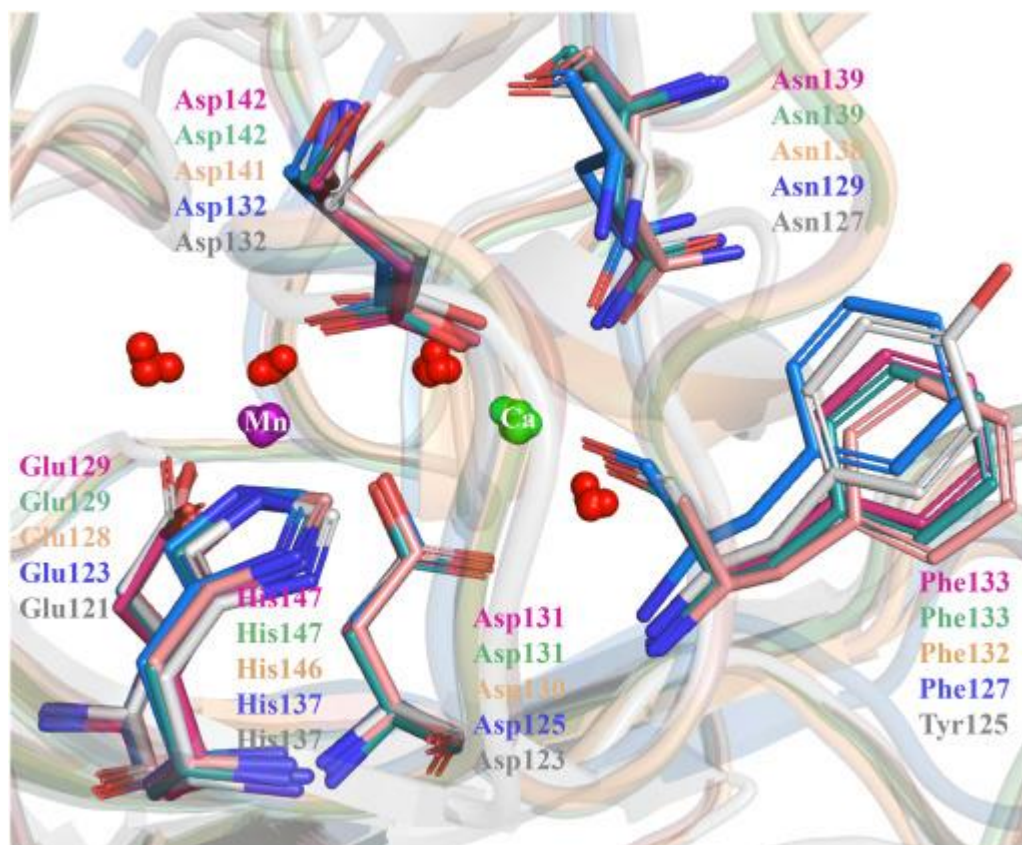
Arachis hypogaea (PNA), a qual observa-se uma substituição do resíduo de fenilalanina por tirosina, Figura 15 (BANERJEE et al., 1996). Contudo, é importante mais estudos para confirmar esses resíduos com muitas outras lectinas dessa tribo que ainda não possuem estrutura primária e terciária elucidada.

Figura 14 - Estrutura geral de lectinas de leguminosas. a) tetrâmero com CRD em vermelho; b) imagem ampliada do monômero com folha- β (amarelo), α -turns (roxo); CRD (área ocupada pela molécula constituída de esferas cinzas e vermelhas) e sítios de ligação do metal (área com esfera verde e cinza).



Fonte: LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, (2017).

Figura 15 - Superposição do sítio de ligação ao metal das lectinas de Dalbergieae, representando os resíduos de aminoácidos de cada proteína em bastão com carbonos coloridos de vermelho (CTL; PDB id: [5EYY](#)), verde (PELa; PDB id: [5U38](#)), rosa claro (PAL; id: [2ARE](#)), azul (VML; PDB id: [4U36](#)) e cinza (PNA; PDB id: [2PEL](#)) e íons de manganês em roxo, cálcio em verde e molécula de água, formada por esferas, em vermelho.



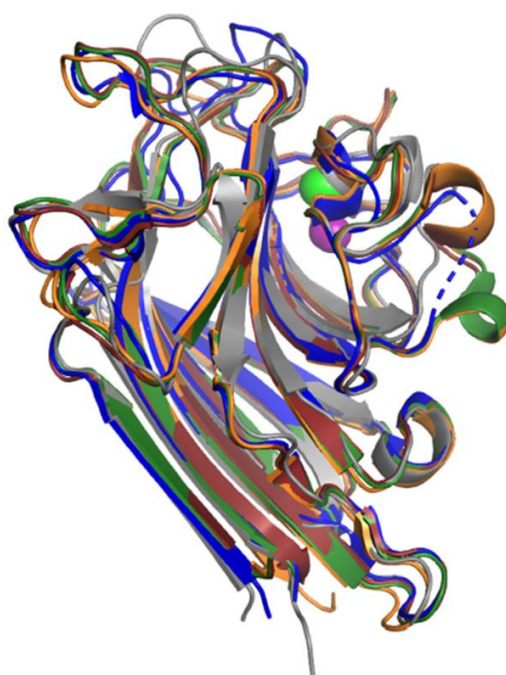
Fonte: NASCIMENTO et al., (2020).

1.3.12.1 Estruturas de lectinas da tribo Dalbergieae

Como mencionado, a respeito da conservação da estrutura terciária de lectinas de leguminosas, mesmo com diferenças encontradas nas alças, na Figura 16 é observada a superposição de monômeros de lectinas da tribo *Dalbergieae*: lectina de *Pterocarpus angolensis* (PAL), lectina de *Platypodium elegans* (PELa), lectina de *Centrolobium tomentosum* (CTL), lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) e PNA, mostrando alta conservação do motivo *jellyroll*, embora apresentem em geral padrões de oligomerização diferenciados de acordo com os carboidratos específicos, Tabela 2. Exemplo, enquanto as lectinas específicas de Man/GlcNAc formam dímeros, as específicas à Gal/GalNAc

oligomerizam como tetrâmeros, embora existam relatos que as lectinas de *Lonchocarpus capassa* (LCL) (NASCIMENTO et al., 2020) e de LSL formam dímeros e tetrâmeros em solução, respectivamente (NAPIMOGA et al., 2007). Contudo, é importante destacar que parâmetros como: pH, assim como solubilidade, composição do meio de ligação, temperatura, concentração de lectinas, a presença de outros componentes, podem estar envolvidos nesse processo de oligomerização, podendo ficar como monômero ou formar dímeros, trímeros e tetrâmeros. Adicionalmente, esses dados de oligomerização da Tabela 2, geralmente, são sugeridos baseados na massa relativa em condição desnaturante e não-desnaturante, confirmados com outras técnicas como cromatografia de exclusão de tamanho e cristalografia de raio-X. A respeito disso, VGL, LSL, PFL, PSSL, em condição não desnaturante, mostrou aproximadamente 120, 100, 65 e 64,6 kDa, sugerindo dois tetrâmeros e dois dímeros, respectivamente (NAPIMOGA et al., 2007; PEREIRA-JUNIOR et al., 2012; SILVA et al., 2012; ODEKANYIN; KAYODE; ADEWUYI, 2019). Enquanto, a VML cristalizada em pH 7,6 confirmou a oligomerização em forma de tetrâmero (SOUSA et al., 2015).

Figura 16 - Superposição de monômeros de PAL (laranja; PDB id: [2ARE](#)), PELa (verde; PDB id: [5U38](#)), CTL (vermelho; PDB id: [5EYY](#)), VML (azul; PDB id: [4U36](#)), PNA (cinza; PDB id: [2PEL](#)), todos de lectina de *Dalbergiæae*. Adaptado de Nascimento (NASCIMENTO et al., 2020).



Fonte: NASCIMENTO et al., (2020).

Tabela 2 - Visão geral das lectinas da tribo *Dalbergieae* baseado nos estudos em relação à especificidade ao carboidrato e oligomerização em cada espécie caracterizada.

Gênero	Lectina	Tecido alvo	Carboidrato	Oligomerização
<i>Andira</i>	AFL	Sementes	Man/Glc	b
	APL	Sementes	Man/Glc	b
	ASL	Sementes	Man/Glc	b
	AAL	Sementes	Man/Glc	b
<i>Arachis</i>	PNA	Amendoim	Gal/GalNAc	Tetrâmero ^c
	SL-I	Tecidos do caule	α MM	Dímero ^{ad}
	SL-II	Tecidos do caule	Lac/Cel	b
	PRA-II	Raiz	Man/Glc	b
	GNL	Nódulos de amendoim	Lac/Gal	Tetrâmero ^a
	MNL	Nódulos de amendoim	Man/Glc	Dímero ^a
<i>Centrolobium</i>	CML	Sementes	Man/ α MM	Dímero ^{ac}
	CTL	Sementes	Man/ α MM	Dímero ^c
<i>Lonchocarpus</i>	LAL	Sementes	GlcNAc	Dímero ^a
	LCL	Sementes	Gal/GalNAc	Dímero ^a
	LCaL	Sementes	Man	Dímero ^a
	LSL	Sementes	GlcNAc	Tetrâmero ^a
<i>Machaerium</i>	MaL	Sementes	Man/GlcNAc/ α MM	Dímero ^a
	MBL	Sementes	Man/Glc	b
	MLL	Sementes	Man/Glc	b
<i>Platymiscium</i>	PFL	Sementes	Man/Glc	Dímero ^a
<i>Platypodium</i>	PELa	Sementes	Man/ α MM	Dímero ^c
Continua				

Continuação

Gênero	Lectina	Tecido alvo	Carboidrato	Oligomerização
<i>Pterocarpus</i>	PAL	Sementes	Man/Glc	Dímero ^c
	PRL	Sementes	Man/Glc	^b
	PSSL	Sementes	Gal/Lac	Dímero ^a
<i>Vatairea</i>	VGL	Sementes	Gal/GalNAc	Tetrâmero ^a
	VML	Sementes	Gal/GalNAc	Tetrâmero ^{ac}
<i>Vataireopsis</i>	VaL	Sementes	GalNAc/Gal	Dímero ^a

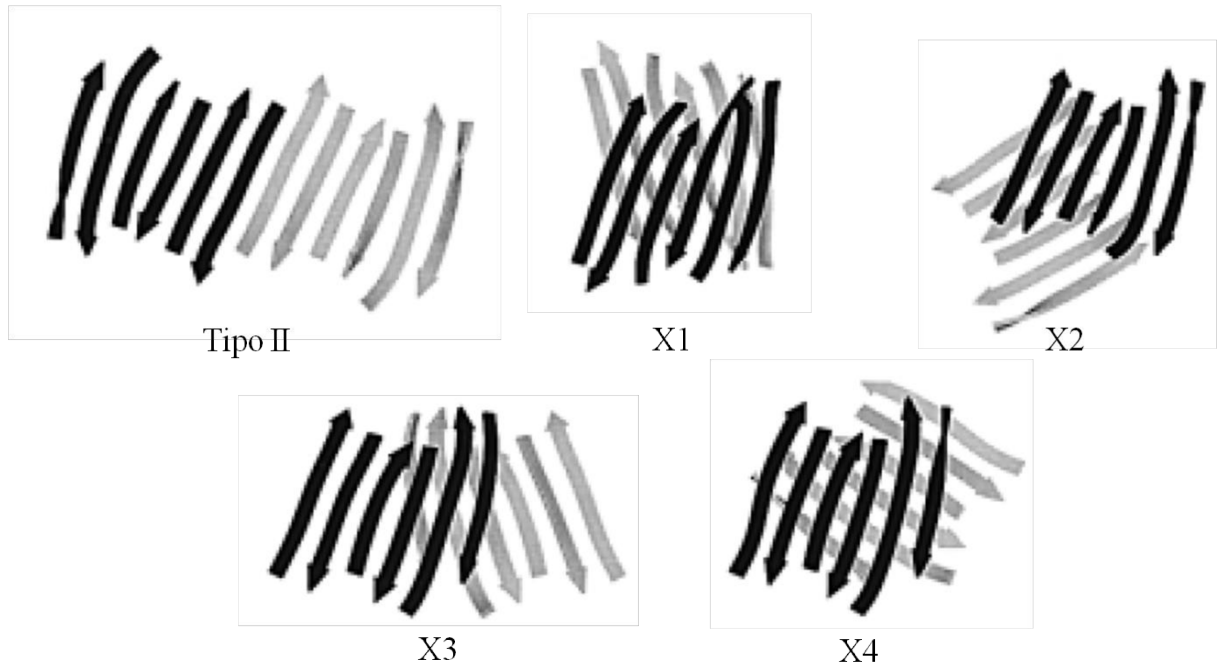
Fonte: Adaptado de NASCIMENTO et al., (2020) e OSTERNE et al., (2023). Lectinas: AFL - lectina de *Andira fraxinifolia*; APL - lectina de *A. pisonis*; ASL - lectina de *A. surinamensis*; AAL - *A. anthelmia*; PNA - lectina de *Arachis hypogaea*; SL-I - lectina de *A. hypogaea* SL-I; SL-II - lectina de *A. hypogaea* SL-II; PRA-II - lectina de *A. hypogaea* PRA-II; GNL - lectina de *A. hypogaea* GNL; MNL - lectina de *A. hypogaea* MNL; CML - lectina de *C. microchaete*; CTL - lectina de *C. tomentosum*; LAL - lectina de *Lonchocarpus araripensis*; LCL - lectina de *L. capassa*; LCaL - lectina de *L. campestris*; LSL - lectina de *L. sericeus*; MaL - lectina de *Machaerium acutifolium*; MBL - lectina de *M. biovulatum*; MLL - lectina de *M. lunatus*; PFL - lectina de *Platymiscium floribundum*; PELa - lectina de *Platypodium elegans*; PAL - lectina de *Pterocarpus angolensis*; PRL - lectina de *P. rhorii*; PSSL - lectina de *P. soyauxii*; VGL - lectina de *Vatairea guianensis*; VML - lectina de *V. macrocarpa*; VaL - lectina de *Vataireopsis araroba*. a - indica oligomerização baseada na massa relativa em condições não desnaturante e/ou espectrometria de massas; b - não possui dados de estrutura terciária na literatura; c - estrutura terciária obtida por método de cristalografia; d - estrutura terciária obtida por modelagem molecular.

1.4 Classificação quanto à oligomerização de lectinas de leguminosas

Sob essa perspectiva, a estrutura quaternária é constituída por um agregado de monômeros, podendo formar dímeros, trímeros, tetrâmeros, pentâmeros, hexâmeros, etc. Essas estruturas podem ser classificadas quanto ao tipo de estruturas quaternárias e à interface dimérica. No caso das lectinas de leguminosas, existem nove diferentes tipos de estruturas quaternárias, das quais podem vir em forma de monômero, conhecida como tipo Arcelin-5 - Em relação ao tipo Arcelin-5 (Arc-5), uma proteína de defesa semelhante a lectina de *Phaseolus vulgaris*, diferencia das lectinas dessa planta e das demais leguminosas por não possuir o loop de ligação aos metais, os quais são necessários para capacidade de ligação ao carboidrato (HAMELRYCK et al., 1996). Adicionalmente, Arc-5 foi cristalizada como monômero (2,7 Å) - em forma de dímeros: canônico, EcorL, GS4 e DB58 (Figura 17). Em relação aos dímeros, vale mencionar que, também por cristalografia de raio-X, a estrutura canônica foi observada primeiramente na ConA (EDELMAN et al., 1972), a EcorL na lectina de *Erythrina corallodendron* (ELGAVISH; SHAANAN, 1998), a GS4 na lectina IV de *Griffonia simplicifolia* (DELBAERE et al., 1993) e a DB58 na lectina de *Dolichos biflorus* (HAMELRYCK et al.,

1999) - e em forma de tetrâmeros: DBL, ConA, PNA e GS1 (BRINDA et al., 2004). Vale destacar que apesar de darem nome aos tipos de estruturas quaternárias, como monômero e dímeros, e pertencer a tribos diferentes, essas estruturas podem ser observadas em todas as lectinas de leguminosas, inclusive na tribo *Dalbergieae*. Por essa razão, em virtude da diversidade de estudos quanto às lectinas que possuem os mesmos tipos de estruturas quaternárias, essas interações covalentes entres os monômeros, podem ser classificadas em interfaces. Sobre isso, existem sete interfaces diméricas que compõem as estruturas quaternárias, como: tipo II, X1, X2, X3, X4 e duas interfaces incomuns de PNA e GS1. Essas duas últimas interfaces, podem ocorrer em combinação das interfaces (X1, X2, X3, X4) com tipo II, devido à região de resíduos específicos que determina o tipo II (resíduos do 1 ao 60 do N terminal e 210 a 240 do C terminal) ser totalmente diferente da região que determinam as interfaces X1, X2, X3 e X4 (resíduos 70-80 e 160-200) (BRINDA et al., 2004). Dessa forma, a interface incomum de PNA, o qual envolve a região de resíduos 70-80 e 150-160, e a interface incomum de GS1, o qual envolve a região 10-40 e 220-230 é diferente das regiões do tipo II. Portanto, as interfaces X1, X2, X3 e X4 não podem co-existir por ser determinado pelas mesmas regiões. Todavia, as estruturas quaternárias das diversas lectinas de leguminosas são classificadas segundo as sete interfaces, as quais, na Figura 17, é possível ver o tipo de estrutura quaternária (dímero) e sua respectiva interface. Perceba, ainda na Figura 17, a orientação das folhas- β com seis fitas antiparalelas de um monômero idêntica nas quatro estruturas diméricas ou interfaces, vistas em uma linha perpendicular à folha- β preta (ELGAVISH; SHAANAN, 2001; MANOJ; SUGUNA, 2001). Nesse sentido, enquanto os dímeros seguem apenas uma interface, os tetrâmeros, DBL, ConA, PNA e GS1, são formados pelas interfaces tipo II + X1, tipo II + X2, tipo II + X4 + interface incomum de PNA e X4 + interface incomum de GS1, respectivamente (BRINDA et al., 2004).

Figura 17 - Arquitetura de cinco interfaces diméricas e o tipo de estrutura quaternária: interface tipo II (canônica), X1 (DB58), X2 (ConA), X3 (EcorL) e X4 (GS4). A orientação das folhas- β com seis fitas antiparalelas de um monômero (preto) é idêntica nas quatro estruturas diméricas ou interfaces, vistas em uma linha perpendicular à folha- β preta.



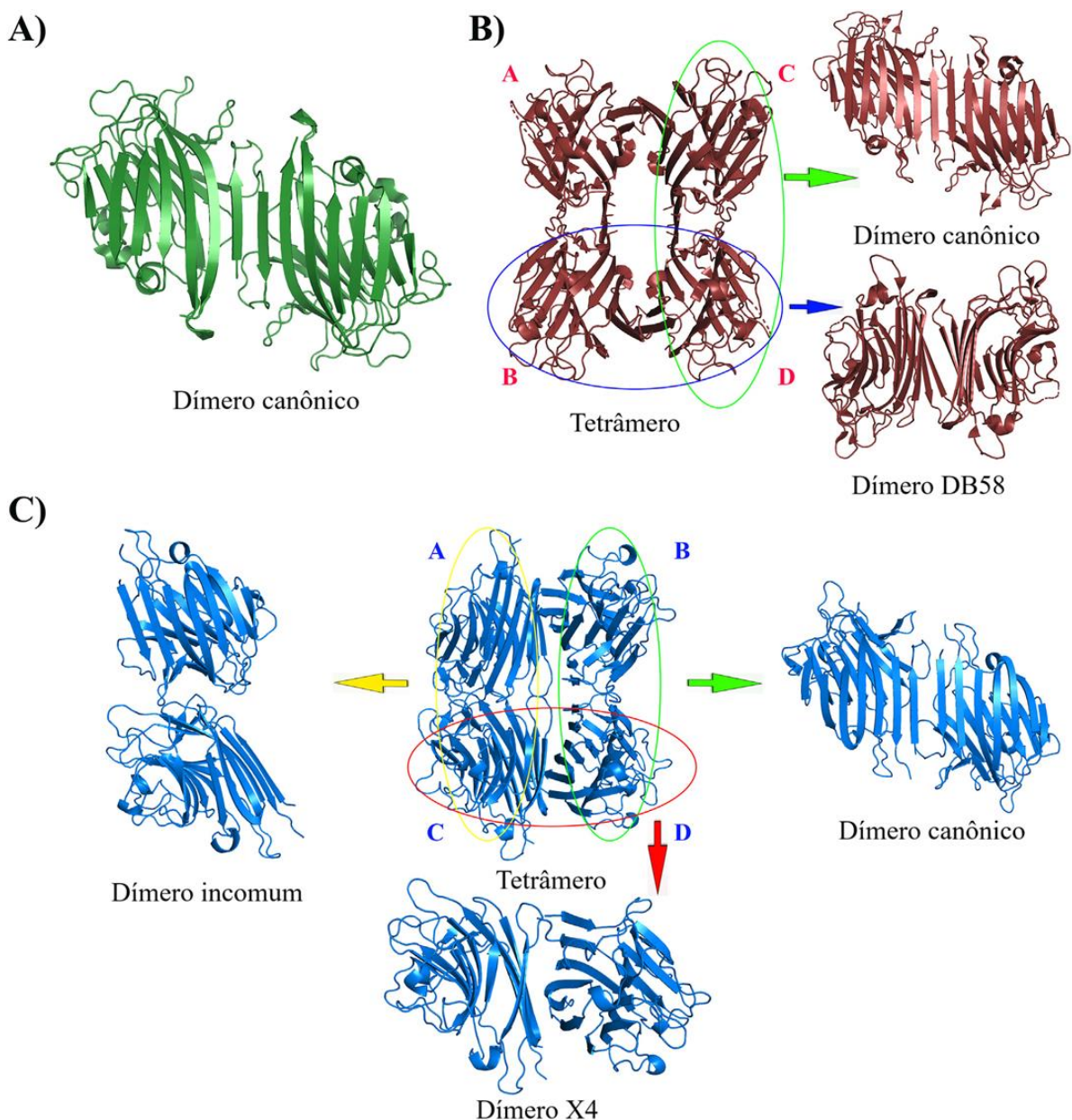
Fonte: ELGAVISH; SHAANAM, (2001); MANOJ; SUGUNA, (2001).

1.4.1 Conformação dimérica e oligomerização de lectinas da tribo *Dalbergieae*

Em leguminosas da tribo *Dalbergieae*, usualmente, é observada interfaces tipo II (dímero canônico), X1 (dímero DB58), X4 (dímero GS4) e interface incomum de PNA. O dímero canônico é composto por 12 fitas contínuas pela disposição de 2 folhas- β traseiras lado a lado. O DB58 é composto pela sobreposição de duas folha- β traseiras entre si. Já a interface X4 é composta pela interação das folhas- β traseiras, uma perpendicular à outra (DELBAERE et al., 1993), apesar que pode observar uma pequena diferença de ângulo entre as estruturas quaternárias das espécies. Na figura 18, é possível observar um esquema de oligomerização dos monômeros em dímeros e tetrâmeros, em que, PAL, PELa e CTL possuem forma de dímero canônico, não formando um tetrâmero (Figura 18a), diferentemente, da lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML), a qual forma um tetrâmero (ABCD), formado por dois dímeros: forma de dímero canônico (AB/CD) e forma DB58 (AC/BD) (BUTS et al., 2001) (Figura 18b). Já a PNA, composta pelas interfaces tipo II, X4 e incomum de PNA, Figura 18c, forma um homotetrâmero

(ABCD), a qual observa-se uma associação de dois dímeros X4 (AB/CD), organizado na forma de interface canônico (BD) e interface não canônico (AC), apenas observada nesse exemplo, até o momento (NATCHIAR et al., 2006), que pode ser chamada, também, de interface incomum de PNA.

Figura 18 - Esquema de oligomerização de lectinas da tribo *Dalbergieae*. a) Dímero canônico observadas em PAL, PELa e CTL; b) Tetrâmero e interfaces diméricas de VML; c) Tetrâmero e interfaces diméricas de PNA. Enquanto interfaces são indicadas por círculos e setas as estruturas estão representadas por suas respectivas cores.



Fonte: NASCIMENTO et al., (2020).

1.5 Glicobiologia e as lectinas de leguminosas

A glicobiologia, através dos glico-códigos, mostram diversidade de conhecimentos sobre microrganismos, insetos, peixes, camundongos e humanos, demonstrando interações do núcleo ao meio extracelular e vice-versa, do DNA às proteínas, às células, aos tecidos, aos órgãos e às populações, podendo contextualizar as funções dos glicanos na área da saúde e doenças humanas (BOONS; WU, 2016). Essa área investiga a estrutura, biossíntese, degradação, metabolismo, especificidade de compostos que contém carboidratos bem como o papel dos glicanos como moléculas-chaves nos sistemas biológicos (WIEDERSCHAIN, 2013). Por meio da glicosilação de algum resíduo de aminoácido é possível não somente alterar a estrutura terciária, mas a flexibilidade, função ou propriedade físico-química da proteína. Exemplo disso, são as cadeias de açúcares (*N*-glicanos) ligadas ao aminoácido asparagina presentes nas proteínas recém sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) que está envolvido no processo de qualidade de glicoproteínas (FUJIKAWA et al., 2016). Assim, um erro no enovelamento protéico pode ser sinalizado por glicosilação e a proteína pode ser endereçada para degradação no citoplasma ou constituir o glicocálice, perpetuando o erro. À vista disso, assim como é observado padrões de expressão e glicosilação característicos em células normais, nos diferentes seres vivos, padrões de anormalidades também são observados, inclusive, em células cancerígenas (DUBE; BERTOZZI, 2005).

Ademais, dentre as lectinas de plantas, as quais existem 12 famílias (VAN DAMME, 2014), as de leguminosas são amplamente exploradas e estudadas devido suas interações específicas a certos carboidratos (DAMODARAN et al., 2008). Elas, além de estar presente em todas as partes da planta, principalmente nas sementes, nas quais estão suas fontes primárias (FREIRE et al., 2002), reconhecem os glico-códigos e exercem diversas propriedades biológicas por reconhecimento de glicoconjugados na superfície celular (DAM et al., 2005), podendo estar envolvidas em diversos processos associados à interação célula-célula, sínteses e transporte de proteínas, fotossíntese, regulação da divisão celular, fertilização e imunização (DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015; FEIZI; HALTIWANGER, 2015). Assim, à medida que mais estudos surgem a respeito dos glicanos relacionados à biologia celular, mais importante torna-se o estudo das lectinas, as quais, exemplo, as lectinas da tribo *Dalbergieae*, possuem resultados promissores em diversas áreas.

1.5.1 Especificidade de lectinas da tribo *Dalbergieae*

As diferenças entre as lectinas não se restringe somente a sequência ou número de aminoácidos, estrutura terciária e quaternária, pH ou temperatura ideal, mas também pela sua especificidade aos carboidratos. Obviamente, os fatores anteriores também influenciam no comportamento dessas lectinas em seu ambiente natural, por isso, mesmo duas lectinas possuindo a mesma especificidade específica de carboidrato, não significa dizer que a ação é igual, embora seja uma pista para elucidação de seu papel biológico. Inclusive, estudos mostraram que lectinas específicas a glicose, manose, galactose, *N*-acetil-D-galactosamina, podem oligomerizar tanto em dímeros quanto em tetrâmeros, no entanto, as específicas aos açúcares *N*-acetil-D-glicosamina e fucose formam apenas dímeros (BRINDA et al., 2004).

Conceitualmente, baseado na afinidade de ligação a carboidrato, as lectinas de plantas podem ser distribuídas em quatro grupos: específicas a glicose, galactose e *N*-acetil-D-galactosamina, *L*-fucose e ácido siálico (MISHRA et al., 2019). Entretanto, a diversidade de afinidade pode ocorrer entre carboidratos correlacionados. Sob essa perspectiva, ver Tabela 2, a maioria das lectinas da tribo *Dalbergieae* são específicas à glicose/manose e seus derivados, como também, em análises de experimentos *in silico*, aos resíduos de oligomanose e *N*-glicanos complexos (LORIS et al., 2003; ALMEIDA et al., 2016). Exemplo, três lectinas purificadas do gênero *Machaerium* dessa tribo, a saber: lectina de *Machaerium biovulatum* (MBL), lectina de *Machaerium lunatus* (MLL) e MaL, até o momento, todas são específicas à manose (ANIMASHAUN et al., 1993; SANTOS et al., 2019). Possivelmente, a especificidade a esse carboidrato direcionou aos estudos: atividade antiviral das MBL e MLL, as quais preveniram o efeito citopático do vírus HIV tipo 1 (ANIMASHAUN et al., 1993); e atividade antinociceptiva da MaL, a qual possivelmente agiu como um antagonista ao *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1) que está envolvido na sinalização da dor nociceptiva (SANTOS et al., 2019). Outro exemplo, a lectina de *Centrolobium microchaete* (CML), que possui afinidade, além de manose e glicose, à α -metil-D-manosídeo, *N*-acetil-D-glicosamina (GlcNAc) e sacarose (VASCONCELOS et al., 2015).

Neste caminho, outros carboidratos podem fazer parte da especificidade, exemplo, existem espécies dessa tribo com lectinas específicas à galactose, lactose e melibiose (LAW; HAYLETT; STRIJDOM, 1988; SINGH; DAS, 1994), das quais, a galactose, especificamente Gal(β 1-3)GalNAc, demonstra uma relação com antígenos Tn, relacionados ao câncer, demonstrados por *docking* molecular (SOUSA et al., 2015, 2016), como a VML, VGL e PNA. Vale ressaltar que os dissacarídeos lactose e melibiose, compostos por galactose e glicose,

podem ser diferenciados pela junção entre os monossacarídeos com ligações α -1,4 e α -1,6, respectivamente.

Já as lectinas específicas a GlcNAc/Man, pode-se citar as lectinas: lectina específica à manose de nós de amendoim de *Arachis hypogaea* (MNL), PELa, MaL, LCL, lectina de *Lonchocarpus araripensis* (LAL), CTL, CML e Lectina de *Andira surinamensis* (ASL), pertencentes aos gêneros *Platypodium*, *Machaerium*, *Lonchocarpus*, *Centrolobium* e *Andira* (NASCIMENTO et al., 2020), das quais, PELa, MaL, LAL e LSL, também mostraram atividade nociceptiva, mesmo de gêneros diferentes.

1.5.2 Atividades biológicas de lectinas da tribo Dalbergieae

Tendo em vista que a especificidade aos carboidratos estão diretamente relacionadas a função biológica, as lectinas de plantas, além de sua afinidade a carboidratos simples, como glicose, manose e galactose, que são comumente encontrados em plantas, podem possuir alta afinidade a oligossacarídeos ou polissacarídeos que não estão presentes em plantas, como a quitina, um carboidrato típico de parede celular de fungos e exoesqueletos de invertebrados, constituído de resíduos de *N*-acetilglicosamina (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Para mais, existem lectinas de leguminosas com afinidade a carboidratos que estão presentes também, além de insetos e plantas, em mamíferos, como a fucose, ampliando a possibilidade de estudos a glicanos presentes em animais e humanos (NASCIMENTO et al., 2020). Por isso, muitos estudos, baseados na interação proteína/glicocondugado pelo CRD aos diversos carboidratos, mostraram atividades biológicas significantes dessa família, especialmente, as que possuem afinidade à manose.

Evidentemente, devido à aplicabilidade das lectinas da tribo *Dalbergieae*, a relação CRD aos carboidratos específicos, as lectinas dessa tribo merecem atenção tanto na estrutura quanto na sua função biológica, sendo necessário novos estudos, os quais contribuirão com a ciência básica e aplicada, considerando que já existem vários estudos mostrando seu potencial em processos inflamatórios (ALMEIDA et al., 2016), nociceptivo (DE FREITAS PIRES et al., 2019), vasodilatador (PIRES et al., 2017), anti-câncer (LI et al., 2015), antimicrobiano (ALENCAR et al., 2005), antiviral (LUNDSTRÖM et al., 1987), inseticida (LAW; KFIR, 1997), imunoregulador (GUPTA et al., 2006; WOULDWYK et al., 2013), entre outros.

Outro aspecto importante, dentre as lectinas relacionadas às atividades biológicas, destacam-se as específicas à manose e derivados, que apresentaram potencial em processos inflamatório, nociceptivo e inseticida, efeito promovido pela CTL, lectina de *Lonchocarpus*

campestris (LCaL) e MNL, respectivamente. Entretanto, apesar da semelhança de especificidade a carboidratos entre as lectinas, sua atividade pode ser diferente. Para entender melhor, duas lectinas específicas à manose, MNL e lectina de *Pisum sativum* de ervilha, foram testadas quanto à citotoxicidade em larvas de *Chilo partellus*, no entanto, apenas MNL foi eficiente (LAW; KFIR, 1997). A partir destas informações, também é possível encontrar lectinas na mesma espécie, mas com especificidade a carboidratos não relacionados, como as lectinas purificadas de *A. hypogaea*. A saber, apesar de haver a MNL e PRA-II específica à manose, foi encontrada, anteriormente, a PNA específica à galactose, que mostrou envolvimento em atividades anticâncer e imunoregulador e pode ser utilizada como biossensor (WOUDWYK et al., 2013; LI et al., 2015; SILVA, 2018). Isso corrobora com diversidade entre essas lectinas, as quais, em seu ambiente natural, na mesma espécie, em partes diferentes do organismo, podem exercer função específica e serem expressas em níveis diferentes devido aos diferentes estímulos externos e/ou internos às plantas.

1.5.3 Tribo Dalbergieae e as lectinas do gênero *Centrolobium*

A tribo *Dalbergieae*, pertencente à família das leguminosas e subfamília *Papilionoideae*, apesar da escassez de estudos relacionados às lectinas na literatura (SANTOS et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020), compreende 1300 espécies em 49 gêneros (LEWIS et al., 2005), nos quais 28 lectinas em 10 gêneros: *Andira*, *Arachis*, *Centrolobium*, *Lonchocarpus*, *Machaerium*, *Platypodium*, *Platymiscium*, *Pterocarpus*, *Vatairea* e *Vataireopsis*, já foram purificadas, até o momento, sendo a mais recente a lectina de *Vataireopsis araroba* (VaL) proveniente de sementes de *Vataireopsis araroba* (OSTERNE et al., 2023). Buscando estreitar sobre gênero, o gênero *Centrolobium*, distribuído do Panamá até o sul do Brasil, é composto por sete espécies, das quais apenas três lectinas foram purificadas, a saber: duas isolectinas de *Centrolobium microchaete* (CML-1 com 246 resíduos e CML-2 com 247 resíduos) e uma lectina de *Centrolobium tomentosum* (CTL com 245 resíduos) (VASCONCELOS et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016).

A CML que tem um monômero próximo de 28 kDa é uma lectina específica à D-manose, D-glicose e seus derivados, como α -metil-D-manosídeo, *N*-acetil-D-glicosamina e sacarose (VASCONCELOS et al., 2015). Além da dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para sua atividade, a qual foi certificada em eritrócitos nativo de coelho e tratados com papaína e tripsina, sua estrutura mostrou 1,5% de glicosilação ((SANTOS et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020)). Por *docking* molecular, foi possível analisar interações com

outros monossacarídeos, dissacarídeos e *N*-glicanos, além de demonstrar respostas inflamatórias em um modelo de edema de pata e estimular a migração de leucócitos (NECO et al., 2018). Em outro estudo, além de não mostrar citotoxicidade em linhagens de células L929 de fibroblastos de rato, induz cicatrização de ferimentos, podendo ser uma ferramenta terapêutica (DO NASCIMENTO NETO et al., 2022).

A CTL, específica a D-manose e D-glicose, foi cristalizada com metil manose-1,3-alfa-D-manose (MDM) obtendo duas formas cristalinas, monocíclica e tetragonal, como também, mostrou respostas inflamatórias em modelo de edema de pata (ALMEIDA et al., 2016). Sua estrutura com 1,7% de glicosilação apresentou massa relativa de 27 kDa e apresentou atividade hemaglutinante com sangue nativo de coelho e tratado com papaína e tripsina, contudo, diferente da CML, a CTL não apresentou dependência a cátions divalentes ((SANTOS et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020)). Comparando essas duas espécies quanto ao pH ótimo e termoestabilidade, enquanto a CML apresentou 100% de atividade hemaglutinante em pH 7 e 8 e perda de 50% em pH 6 e 9, a CTL apresentou 100% em pH 6 e 7 e 50% em pH 8. Surpreendentemente, a termoestabilidade da CML manteve-se com 60 °C, diferentemente da CTL, que apresentou até 70 °C ((SANTOS et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020)). Além disso, a CTL possui 93% de identidade com a sequência de aminoácidos da CML e possui similaridade com outras lectinas da tribo *Dalbergieae* como *Platypodium elegans* (89% de identidade, ID AEK69351), *Pterocarpus rotundifolius* (84%, ID AAT57665), *Pterocarpos angolensis* (77% de identidade, ID CAD19804) e *Arachis hypogaea* (71% de identidade, ID AAA74572) (ALMEIDA et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Teve como objetivo cristalizar e determinar a estrutura cristalográfica da lectina de *Centrolobium microchaete*, e analisar a interação da lectina de *Centrolobium microchaete* e lectina de *Centrolobium tomentosum* com carboidratos por bioinformática.

2.2 Objetivos específicos

1. Purificar a lectina de sementes de *Centrolobium microchaete* e lectina de *Centrolobium tomentosum*;
2. Avaliar a atividade das duas lectinas por ensaios de hemaglutinação;
3. Avaliar pureza das duas lectinas por eletroforese;
4. Obter solução de ambas lectinas com maior nível de saturação;
5. Co-cristalizar a lectina de *Centrolobium microchaete* complexada com MDM e X-man e lectina de *Centrolobium tomentosum* com X-man utilizando a técnica de difusão de vapor;
6. Obter dados de difração de raios X dos cristais de lectina de *Centrolobium microchaete* e lectina de *Centrolobium tomentosum*;
7. Determinar a estrutura tridimensional da lectina de *Centrolobium microchaete* por substituição molecular complexada com metil-manose-1,3- α -D-manose;
8. Analisar a interação da lectina de *Centrolobium microchaete* e lectina de *Centrolobium tomentosum* com metil-manose-1,3- α -D-manose;
9. Avaliar os desvios e comportamento molecular da lectina de *Centrolobium microchaete* e lectina de *Centrolobium tomentosum* sem e com metil-manose-1,3- α -D-manose por dinâmica molecular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de sementes de *Centrolobium microchaete*

Sementes de *C. microchaete* foram disponibilizadas do banco de sementes do BioMol-Lab da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Purificação da CML e CTL provenientes de sementes de *Centrolobium microchaete* e *Centrolobium tomentosum*

Com protocolos adaptados, a purificação da CML (VASCONCELOS et al., 2015) e CTL (ALMEIDA et al., 2016) ocorreu após o seguinte processo: cada farinha obtida a partir da moagem de sementes descascadas de *C. microchaete* e *C. tomentosum* obtidas por um triturador de café, delipidadas na presença de n-hexano em proporção 1:5 e extraída em proporção 1:10 em 100 mM de tampão Tris-HCl pH 7,6 com 150 mM de NaCl, sob agitação por 4 horas. Posteriormente, o extrato foi centrifugado a 9000 x g por 20 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi coletado e filtrado em papel filtro. Depois, foi aplicado em coluna (1,0 x 3,5 cm) com matriz de agarose-manose equilibrada com tampão de extração. Assim, a fração eluída com tampão de equilíbrio foi descartada e fração contendo a solução com CML foi eluída com 100 mM de dextrose e a fração contendo a solução com CTL foi eluída com 500 mM de NaCl, coletadas manualmente em sistemas separados de cromatografia de afinidade em tubos de ensaio em fração de 1,5 ml monitorados em 280 nm. Um sistema AMICON Ultra 15 mL foi utilizado para concentrar e dialisar a fração ativa de amostra de cada lectina. Para isso, na etapa de concentração foram realizadas repetidas centrifugações para diminuir o volume de 200 mL para aproximadamente 10 mL da amostra. Na etapa de diálise, foi realizada quatro centrifugações a 5000 rpm por 20 minutos, primeiramente, adicionando 100 mM de tampão acetato de sódio pH 4,0 até completar o volume máximo do Amicon^R Ultra 15 mL (com membrana NMWL 10 kDa) e, depois, quatro centrifugações com água ultra-pura. Depois, a amostra de cada lectina foi centrifugada até atingir a concentração de 10 mg/ml. O método de Bradford foi usado para avaliar a concentração.

3.3 Verificação da massa molecular relativa por SDS-PAGE

A massa molecular relativa da lectina foi estimada por eletroforese em gel de

poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli (LAEMMLI, 1970) em gel de separação a 12,5% e gel de empilhamento a 7% de poliacrilamida em condições desnaturantes e reduzidas com β -mercaptoetanol acoplado à um kit de eletroforese com corrida vertical em um campo elétrico com corrente elétrica de 150 mA, DDP de 150 volts e potência de 10 W. O marcador molecular LMW-SDS (GE Health-care, Buckinghamshire, UK) constituído de fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa), foi usado para identificar o grau de pureza da CML e CTL, tendo em vista a determinação da massa relativa da CML próxima de 28 kDa (VASCONCELOS et al., 2015) e massa relativa de CTL próxima de 27 kDa (ALMEIDA et al., 2016). Após eletroforese, o gel foi corado com Coomassie brilliant blue (R-350) para fotodocumentação.

3.4 Cristalização e obtenção de dados da CML e CTL

O ensaio de cristalização foi realizado pelo método de difusão de vapor em gota suspensa à 25 °C de acordo com Jancarik (JANCARIK; KIM, 1991). Para tanto, a amostra foi dissolvida em Tris-HCl 25 mM em pH 7,6 numa concentração igual ou acima de 10 mg/mL e incubada com 5 mM de MDM ou X-man por 1 h à 37 °C. Após a centrifugação a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi coletado e utilizado para montar as placas de triagem de condições de cristalização utilizando os kits de cristalização JBScreen JCSG++ (Jena Bioscience), Crystal Screen I, II e Index (Hertfordshire, Reino Unido) para verificar em qual condição ocorrerá o processo de cristalização. Vale ressaltar que a montagem das triagens iniciais foram realizadas com auxílio do robô de cristalização Mosquito Crystal robot (TPP Labtech, Hertfordshire, UK), utilizando placas de 96 poços (SWISSCI) à 298 K, pela metodologia de gota suspensa. Depois, na condição esperada, foi realizada a otimização dessa condição com ajustes de concentração do agente precipitante e pH. As placas de cristalização MRC de 48 poços (SWISSCI AG) foram preparadas com gotas de 4 μ L em uma proporção de 1:1 com solução saturada de lectina e solução de condição de cristalização ajustada para cada poço em um sistema fechado com 200 μ L de cada solução de condição nos poços. Em seguida, pelo método de gota sentada, as placas foram incubadas em estufa por tempo indeterminado à 298 K. Após a cristalização, cristais adequados com dimensões aproximadas de 0,1 mm x 0,3 mm x 0,1 mm foram difratados pelo método de difração de raio X.

3.5 Coleta e processamento de dados de raios-X

Os cristais obtidos da otimização foram lavados em solução mãe, contendo glicerol como crioprotetor na concentração de 20%. Com feixes de radiação síncrotron na estação MANACA no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (SIRIUS, LNLS-Campinas, Brasil) com detector PILATUS 2M (Dectris, Suíça), foram coletadas 3600 imagens com um ângulo de oscilação de 0,1°. Após isso, os dados foram processados e escalonados utilizando o software XDS e número de moléculas por unidade assimétrica foi determinado pelo software Matthews_Coef (EVANS, 2011; WINN et al., 2011).

3.6 Determinação e análise da estrutura da CML e CTL

Com o programa Molrep (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997), a estrutura cristalina de CML foi determinada por substituição molecular usando uma lectina homóloga, a CTL (PDB id: 5EYY) do banco de dados de proteínas (PDB) com devidos ajustes referentes à sequência de aminoácidos da CML. Com o programa PHENIX (ADAMS et al., 2010), foi realizado o refinamento, adição de moléculas de água e ligantes, e a geração de mapas de omissões. Na necessidade de modificar procedimentos automáticos por manuais, o WinCoot foi usado (EMSLEY et al., 2010). Para validação da qualidade do modelo, a ferramenta do PDB *Validation* foi utilizada (READ et al., 2011). Com o CONTACT, as interações polares e de van der Waals foram avaliadas. Para geração de figuras 3D e 2D, os programas UCSF Chimera, v. 1.12 e Pymol e LigPlot, v. 1.4.5, foram utilizados, respectivamente (WALLACE; LASKOWSKI; THORNTON, 1995; PETTERSEN et al., 2004).

3.8 Dinâmica molecular

Simulações de dinâmica molecular foram realizadas para as formas de CML e CTL sem e com MDM para observar o comportamento molecular de cada lectina na sua forma nativa e interagindo com MDM, bem como para avaliar o comportamento, estabilidade dos resíduos e a sua compactação molecular. O modelo de CML foi adquirido via refinamento de dados cristalográficos e o modelo de CTL via PDB id: 5EYY. As duas moléculas foram usadas para avaliar as interações com MDM. Nesse estudo, simulações de dinâmica molecular de 200 ns (40.000 frames) foram preparadas usando o CHARMM-GUI (JO et al., 2008; LEE et al., 2020) realizadas no pacote AMBER22 (CASE et al., 2005) usando o parâmetro de campo de força

ff19SB para proteínas (TIAN et al., 2020) e GLYCAN_06 para carboidratos (KIRSCHNER et al., 2008). O sistema com cada lectina foi formado com cátions de Ca^{2+} e Mn^{2+} , com e sem ligante MDM, solvatado com modelo de moléculas de água TIP3P (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2016), neutralizada com adição de moléculas de Na^+ e Cl^- com função de contra-íons. Para criar os sistemas solvatados, 21392, 26541, 19341 e 19325, moléculas de água, juntamente com 64 Na^+ e 60 Cl^- , 78 Na^+ e 74 Cl^- , 57 Na^+ e 54 Cl^- e 57 Na^+ e 54 Cl^- íons adicionados aos sistemas CTL, CTL + MDM, CML e CML + MDM, respectivamente.

Para minimização de energia foi usado os métodos *steepest descent* com 10.000 passos e *conjugate gradient* com 2.000 passos, com 10 kJ/mol como critério de convergência. A minimização seguiu 250 mil passos de equilíbrio de NVT seguidos e NPT com acoplamento de temperatura de 300K (NOSÉ, 1984; HOOVER, 1985) e pressão isotrópica a 1 bar (PARRINELLO; RAHMAN, 1981). Temperatura de 37 °C foi mantida usando um termostato Langevin com coeficiente de atrito de 1 ps^{-1} . Além disso, um barostato isotrópico de Monte-Carlo foi usado para controle de pressão. O passo de tempo da simulação foi definido para 2 fs em conjunto com o algoritmo SHAKE (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977) para restringir as ligações covalentes envolvendo átomos de hidrogênio. O método *Particle Mesh Ewald* (PME) foi utilizado para calcular as interações eletrostáticas de longa distância (DARDEN; YORK; PEDERSEN, 1993), limites de 10 Å. A restrição das ligações antes da execução, foi aplicado o *Linear Constraint Solver* (LINCS). A análise da trajetória da dinâmica molecular consistiu em analisar raiz quadrada do desvio médio (RMSD), *root mean square fluctuations* (RMSF), *radius of gyration* (RoG), energia do sistema, ligações de hidrogênio intermoleculares (HB), frequência de contato (CF). Os softwares: Xmgrace, foi usado para plotar os gráficos e o VMD para visualizar a trajetória da DM (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

3.9 MMPBSA

A técnica de análise de trajetória de pós-processamento, estimativa de energia livre de ligação, foi realizada nos sistemas de CTL e CML com e sem MDM simulados usando MMPBSA.py (CASE et al., 2005; MILLER et al., 2012). O modelo generalizado de Born (GB) ($\text{igb} = 2$ e $\text{Salton} = 0,15$) foi usado para calcular a energia livre de ligação para todos os sistemas de CTL e CML com e sem MDM usando o modelo de mecânica molecular generalizada de Born (MM/PBSA) (GOHLKE; CASE, 2004; CASE et al., 2005; MILLER et al., 2012). Para todos os sistemas foi realizado os cálculos baseados na seguinte fórmula: $\Delta G_{\text{ligação}} = G_{\text{complexo}}$

- $[G_{\text{proteína}} + G_{\text{ligante}}]$ (1), a qual é formada pelo ΔG que é a energia livre de ligação, G_{complexo} que é a energia livre do complexo, $G_{\text{proteína}}$ que é energia livre da proteína e G_{ligante} que é a energia livre do ligante.

Para o calcula da energia livre os cálculos foram baseados na seguinte fórmula: $\Delta G_{\text{TOTAL}} = \Delta E_{\text{MM}} + \Delta G_{\text{GB}} + \Delta G_{\text{NP}} - T\Delta S$ (2), a qual é formada pelo ΔE_{MM} que é a energia de interação da fase gasosa estimada pelo programa SANDER dos sistemas de CTL e CML com e sem ligantes, ΔG_{GB} que é a contribuição de energia dos componentes polares, ΔG_{NP} que é a contribuição de energia dos componentes apolares e $- T\Delta S$ que corresponde a conformação da variação entrópica do ligante. Assim, a estratégia é obter comparações relativas de energia livre de ligação sem calcular o valor absoluto; ΔG_{GB} corresponde à energia livre de solvatação polar calculada pelas equações GB presentes no AMBERTOOLS22, enquanto o ΔG_{NP} corresponde à contribuição apolar. Para o cálculo dos componentes apolares a fórmula: $\Delta G_{\text{NP}} = \gamma \text{SASA} + \beta$ (3), a qual γ representa a tensão superficial definido como $0,0072 \text{ kcal (mol \AA}^2)^{-1}$, β é definido como $0,92 \text{ kcal/mol}$ e SASA é a área de superfície acessível ao solvente. Os parâmetros dielétricos padrão foram definidos como 1 e 80 para soluto interno e solvente externo, respectivamente.

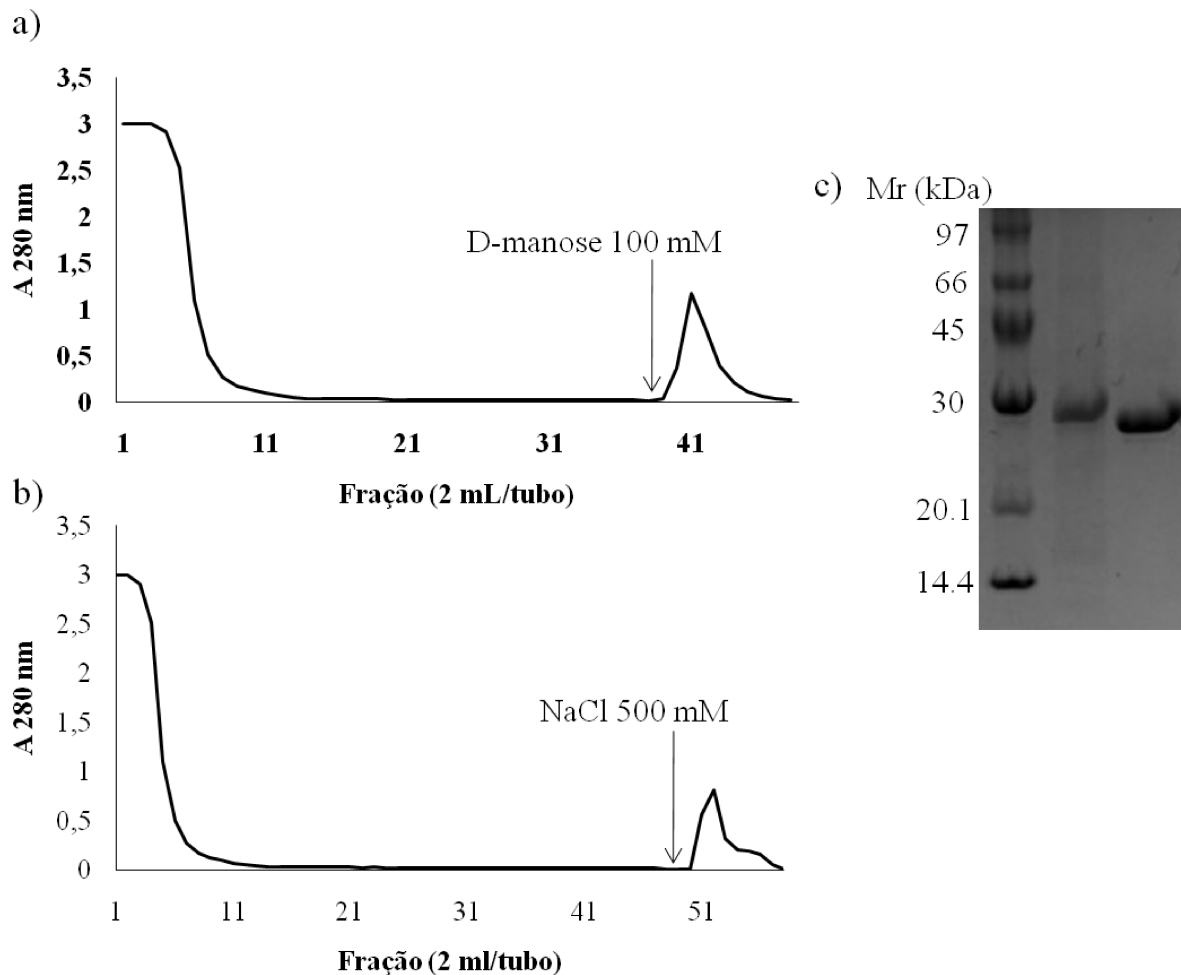
A partir dos dados MM/PBSA é calculada a decomposição de energia (FED) dos sistemas de CTL e CML com e sem MDM. Desse modo, foi possível avaliar quais resíduos contribuem energeticamente para a ligação de energia livre na formação de cada sistema (CASE et al., 2005; MILLER et al., 2012). O módulo de decomposição de energia no AMBER22 foi usado para essa finalidade. Além disso, também foi considerado a contribuição de quatro componentes energéticos para cada resíduo, como, componentes eletrostáticos (ΔG_{ELE}), van der Waals (ΔG_{VDW}), solvatação polar (ΔG_{P}) e solvatação apolar (ΔG_{NP}). Os resíduos potenciais de contribuição de energia foram selecionados baseados no tipo de resíduo e contribuição acima de -1 kcal mol^{-1} . $\Delta G_{\text{carboidrato - resíduo}} = \Delta G_{\text{ELE}} + \Delta G_{\text{VDW}} + \Delta G_{\text{P}} + \Delta G_{\text{NP}}$ (4).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação da CML e CTL

O protocolo de purificação da CML é realizado por um único passo cromatográfico com matriz de afinidade Sepharose-4B-manose (VASCONCELOS et al., 2015). Assim, seguindo o protocolo adaptado, a CML foi purificada com matriz de agarose/manose. Na Figura 19a é possível ver o cromatograma de purificação da CML, a qual foi eluída com 100 mM de Tris-HCl com 150 mM de NaCl e 100 mM de D-dextrose. Em geral, foi usado em média 110 mL para o processo completo, no entanto, cerca de 10 mL foi o suficiente para eluir a lectina. Na Figura 19b mostra o cromatograma de purificação da CTL, nas mesmas condições cromatográficas, mostrando um perfil semelhante ao da CML. Vale ressaltar que a purificação seguiu o protocolo de Almeida et al., (2016), o qual usou matriz de Sepharose-4B-manose. Na Figura 19c mostra o perfil eletroforético da CTL (coluna 2) e CML (coluna 3) com massa molecular relativa abaixo de 30 kDa, estando em concordância com o perfil eletroforético da CML (VASCONCELOS et al., 2015) e CTL (ALMEIDA et al., 2016), embora exista uma pequena divergência entre a massa relativa das lectinas (Figura 19c), comparados aos trabalhos anteriores, os quais, segundo ALMEIDA et al. (2016), a massa relativa da CTL foi próximo de 27 kDa e a massa relativa da CML, segundo VASCONCELOS et al., (2015), próximo de 28 kDa. Essa diferença de resultados e a literatura pode ser devido ao nível de glicosilação ou diferença de cargas entre elas durante a corrida. Contudo, em relação a massa intacta da CTL (27.257 Da) e as duas isoformas da CML (27.224 Da e 27.338 Da) mostraram uma melhor concordância com os resultados (VASCONCELOS et al., 2015; ALMEIDA et al., 2016).

Figura 19 - Visão geral da purificação de CML e CTL. a) Perfil cromatográfico de CML. b) Perfil cromatográfico de CTL. c) Perfil eletroforético em SDS-PAGE de CML e CTL.



Fonte: Elaborado pelo autor. Volume de 3ml de extrato total aplicado em uma matriz de cromatografia de afinidade agarose/manose (1 ml) para purificação de CML e CTL. a) CML - A fração não retida (P1) foi eluída com o tampão Tris-HCl a 100 mM com NaCl 150 mM. A fração retida (P2) foi eluída com Tris-HCl a 100 mM com NaCl 150 mM e D-manose a 100 mM, coletadas alíquotas de 2 ml/min. b) CTL - A fração não retida (P1) foi eluída com o tampão Tris-HCl a 100 mM com NaCl 150 mM. A fração retida (P2) foi eluída com Tris-HCl a 100 mM com NaCl a 500 mM, coletadas alíquotas de 2 ml/min. c) Gel SDS-PAGE - coluna 1: marcadores moleculares - fosforilase b (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e α -lactalbumina (14.4 kDa). Coluna 2: CTL (40 μ g). Coluna 3: CML (48 μ g).

4.2 Estrutura cristalográfica de CML e CTL

Cada amostra de CML e CTL numa concentração de 10 mg/ml condicionada com tampão Tris-HCl a 25 mM pH 7,6 e NaCl a 100 mM foi incubada por 1 hora, separadamente, com 5 mM de MDM ou X-man (para CML) e 5 mM X-man (para CTL) e centrifugada a 9000

rpm por 15 minutos. Depois, após incubação nas condições dos kits de cristalização, foi possível obter cristais a partir de 7 dias. Os cristais de CML foram cultivados na condição nº 68 do kit Index (200 mM de sulfato de amônio, 100 mM HEPES pH 7,5 e PEG 3350 25%). Os dados de difração do cristal, Tabela 3, mostraram o grupo espacial monoclinico C121. Cristais de CTL foram cultivados na condição nº 71 do kit Cristal Screen (1,6 M de sulfato de amônio, 100 mM de M-MES pH 6,5 e 10% de 1,4-Dioxano). Todavia, os dados de difração de CTL com X-man ainda não foram analisados. Para mais, a estabilização da estrutura cristalina com o ligante específico já foi demonstrado em lectinas da tribo *Dalbergieae*, como PAL (LORIS et al., 2004), tribo *Phaseoleae*, como lectina de *Cymbosema roseum* (CRLI) (ROCHA et al., 2015) e tribo *Vicieae*, como lectina de *Pisum arvense* (PINTO-JUNIOR et al., 2017d).

Tabela 3 - Dados coletados, refinados e parâmetros de qualidade dos dados.

Parâmetros	Valores
Grupo espacial	C121
Parâmetros de célula unitária	
a. b. c. (Å)	146.649, 41.989, 94.768
α . β . γ (°)	90, 102.73, 90
Reflexões totais	670860 (67831)
Número de reflexões únicas	100174 (9945)
Moléculas por unidade assimétrica	2
Limites de resoluções (Å)	43.43 - 1.45
Rmerge ^a (%)	0.04399 (0.2949)
Completeza	99.83 (99.84)
Multiplicidade	6.7 (6.8)
I/ σ (I) médio	24.23 (5.80)
Wilson B-fator (Å ²)	9.30
CC1/2	0.999 (0.982)
Continua	

Continuação

Parâmetros	Valores
Substituição Molecular	
wRfactor	0.48
Score	0.69
Refinamento	
Faixa de resolução (Å)	43.43 - 1.45
Rfactor ^b (%)	0.1497 (0.1468)
Rfree ^c (%)	0.1710 (0.1905)
Número de reflexões	100121 (9945)
Reflexões usada para o R-free	2000 (199)
Número de resíduos por unidade assimétrica	481
Número de moléculas de água	511
RMS desvios dos valores ideais	
Comprimentos de ligação (Å)	0.007
Ângulos de ligação (°)	0.94
Fator de temperatura	
Valor médio de B para toda a cadeia proteica (Å ²)	13.02
Ligantes (Å ²)	19.25
Solvente (Å ²)	21.93
Rotâmeros e gráfico de Ramachandran	
Rotâmeros com desvio (%)	0
Resíduos em regiões mais favoráveis (%)	97.47
Resíduos em regiões permitidas (%)	2.53
Resíduos em regiões não permitidas (%)	0.00

Fonte: elaborado pelo autor.

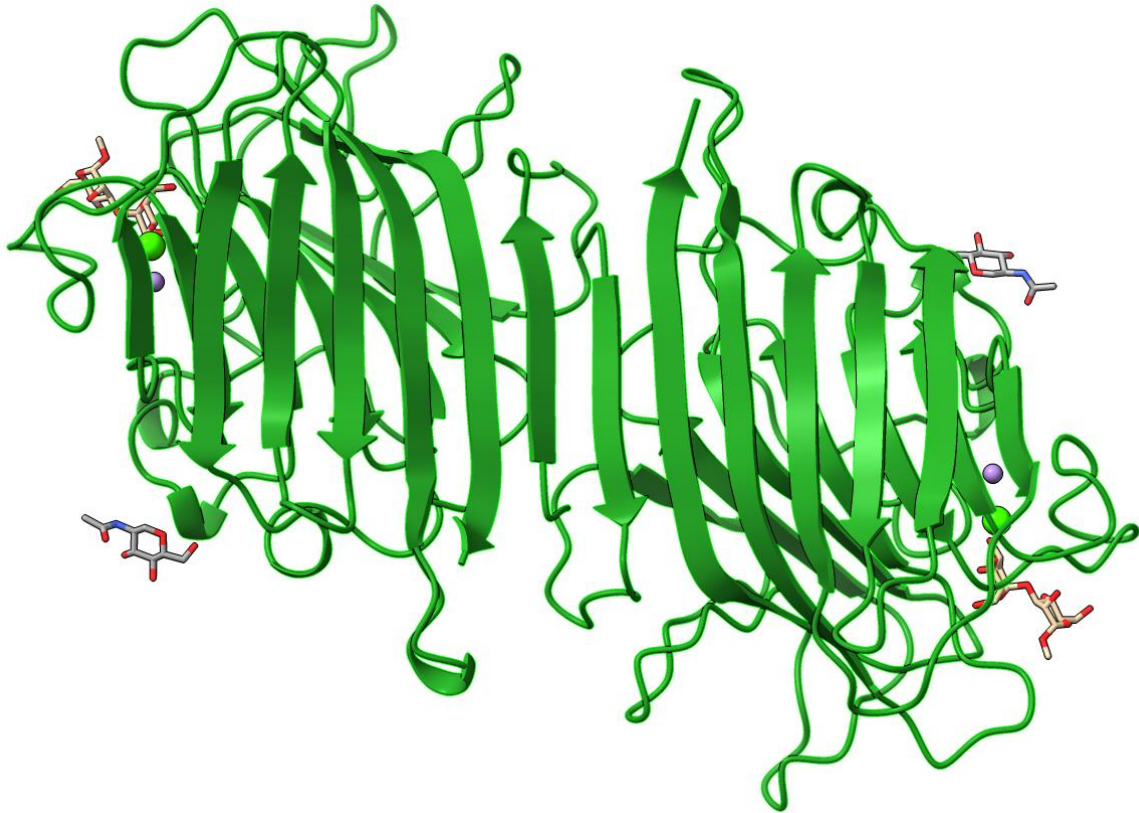
Com base em uma massa de 28 kDa (VASCONCELOS et al., 2015) e nos 246 resíduos, o coeficiente de Matthew foi calculado como $2,85 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$, indicando a presença de

um dímero por unidade assimétrica e um teor de solvente de 56,81%. O monômero CTL (PDB id: 5EYY) foi escolhido para substituição molecular (score 0,69) com RMSD de 0,224 Å para 194 átomos de C α quando comparado às coordenadas do monômero CML. O gráfico de Ramachandran mostrou 97,47% de resíduos em regiões favoráveis e 2,53% em regiões permitidas, demonstrando ser um modelo com estereoquímica aceitável.

Complexada com MDM, a estrutura de CML foi refinada para resolução máxima de 1,45 Å, mínima de 43,43 Å e modelada com 511 moléculas de água. Essa estrutura adotou um motivo *jellyroll* característico de lectinas de leguminosas com sítio de ligação a metais divalentes (Ca²⁺ e Mn²⁺) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), como também, possuindo um enovelamento tipo β -sanduíche (LORIS et al., 1998), comuns em lectinas de espécies da tribo *Dalbergieae*, (NASCIMENTO et al., 2020) como CTL (ALMEIDA et al., 2016), PELa (CAVADA et al., 2018b), PAL (LORIS et al., 2004) e PNA (VIJAYAN, 2007), e outras tribos de leguminosas como *Phaseoleae*. Na Figura 20 é possível visualizar dois CRDs com ligante, dois MBS com cátions de Ca²⁺ e Mn²⁺ em um dímero de CML, formado por dois monômeros (monômero 1 a esquerda e monômero 2 a direita) disposta como interface tipo II, também conhecida como dímero canônico. Esse dímero, segundo DELBAERE e colaboradores, (1993), formam 12 fitas contínuas pela disposição de duas folhas- β traseiras lado a lado. Pontualmente, o dímero canônico foi observado em CTL, PAL, PELa, como, também, presente na estrutura de VML, contudo, fazendo parte de seu tetrâmero segundo estudos de oligomerização dessa lectina (SOUSA et al., 2016).

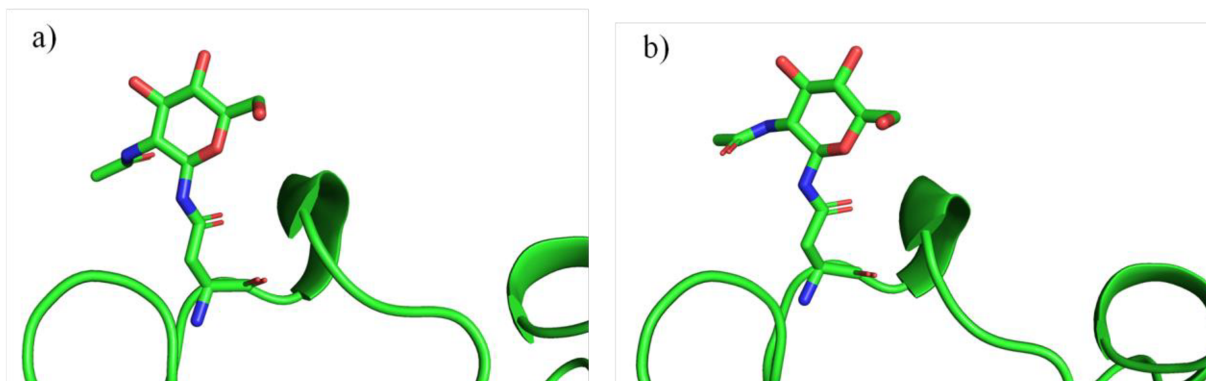
Ainda na Figura 20, é possível visualizar uma molécula de 2-acetoamido-2detox-beta-D-glicopiranosose (NAG) no local de glicosilação. Geralmente, cadeias de açúcares são glicosiladas ao aminoácido asparagina em proteínas recém sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso que pode estar envolvido no processo de qualidade da glicoproteína (FUJIKAWA et al., 2016). Muitas lectinas de leguminosas passam por processos de glicosilação, dentre as quais, CML possui 1,5% e a CTL 1,7% de teor de glicosilação (SANTOS et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020). Na figura 21 é possível visualizar uma molécula de NAG no resíduo Asn119 de cada monômero.

Figura 20 - Representação em *cartoon* de um dímero de CML complexada com MDM. As esferas representam os íons de cálcio (verde) e manganês (roxo). Os ligantes próximos dos metais divalentes estão coloridos de dourado e a glicosilação representada pelo NAG em cada cadeia do dímero estão coloridas de cinza.



Fonte: elaborado pelo autor.

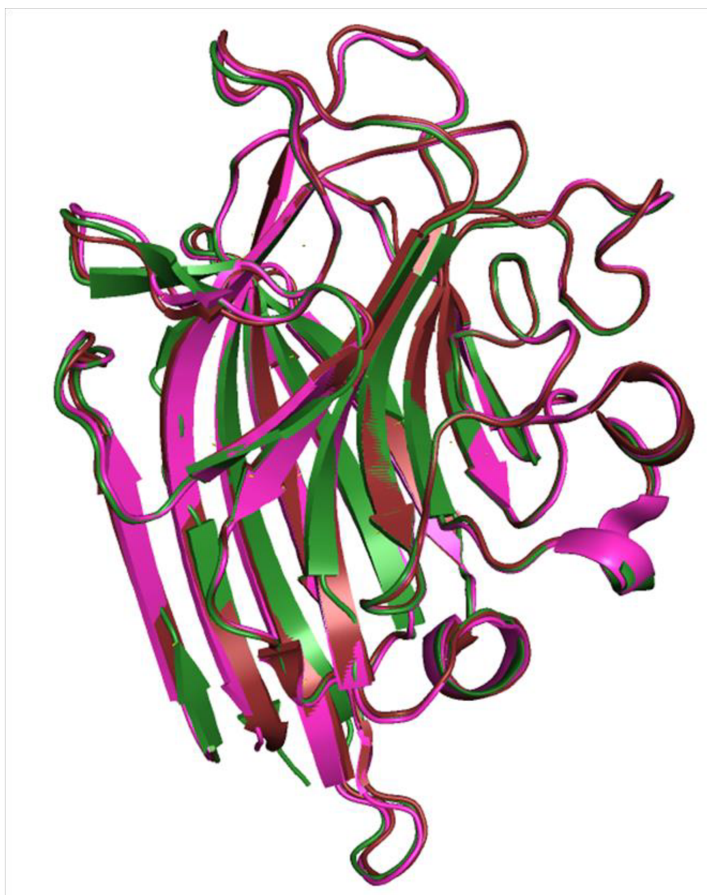
Figura 21 - Representação de local de glicosilação (Asn119) de cada cadeia do dímero de CML com NAG. Representação do NAG no monômero 1 (a) e monômero 2 (b).



Fonte: elaborada pelo autor.

Uma comparação estrutural entre CML e CTL ou PELa demonstrou um RMSD de 0,224 Å para 194 átomos de $C\alpha$ e 0,236 Å para 206 átomos de $C\alpha$, respectivamente. As diferenças encontradas entre as cadeias são observadas principalmente nas regiões mais flexíveis como loops. Na Figura 22 mostra uma sobreposição dos monômeros de CML, CTL e PELa, confirmando a conservação desse monômero na tribo *Dalbergieae*, o qual, demonstrado por LORIS e colaboradores (1998), é formado por duas grandes folhas- β antiparalelas, uma com seis fitas estendidas, outra curvada com sete fitas e uma pequena folhas- β com cinco fitas fazendo a junção das duas maiores. Minuciosamente, segundo SINHA e colaboradores (2007), é possível identificar um núcleo hidrofóbico na região de junção das três folhas- β e outro núcleo hidrofóbico formado entre a folha- β frontal de sete fitas e os loops que conectam as fitas desta folha- β . Além disso, o CRD das lectinas de leguminosas é composto de resíduos de quatro loops específicos que variam em sua conformação e especificidade entre as lectinas de leguminosas (SHARMA; SUROLIA, 1997). Não somente o CRD, mas o motivo *jellyroll* se mostrou bem conservado e semelhante entre as estruturas de CML, CTL e PELa, Figura 22.

Figura 22 - Representação em *cartoon* da sobreposição de um monômero de CML (verde), CTL (PDB id: 5EYY, em vermelho) e PELa (PDB id: 5U38, em rosa).



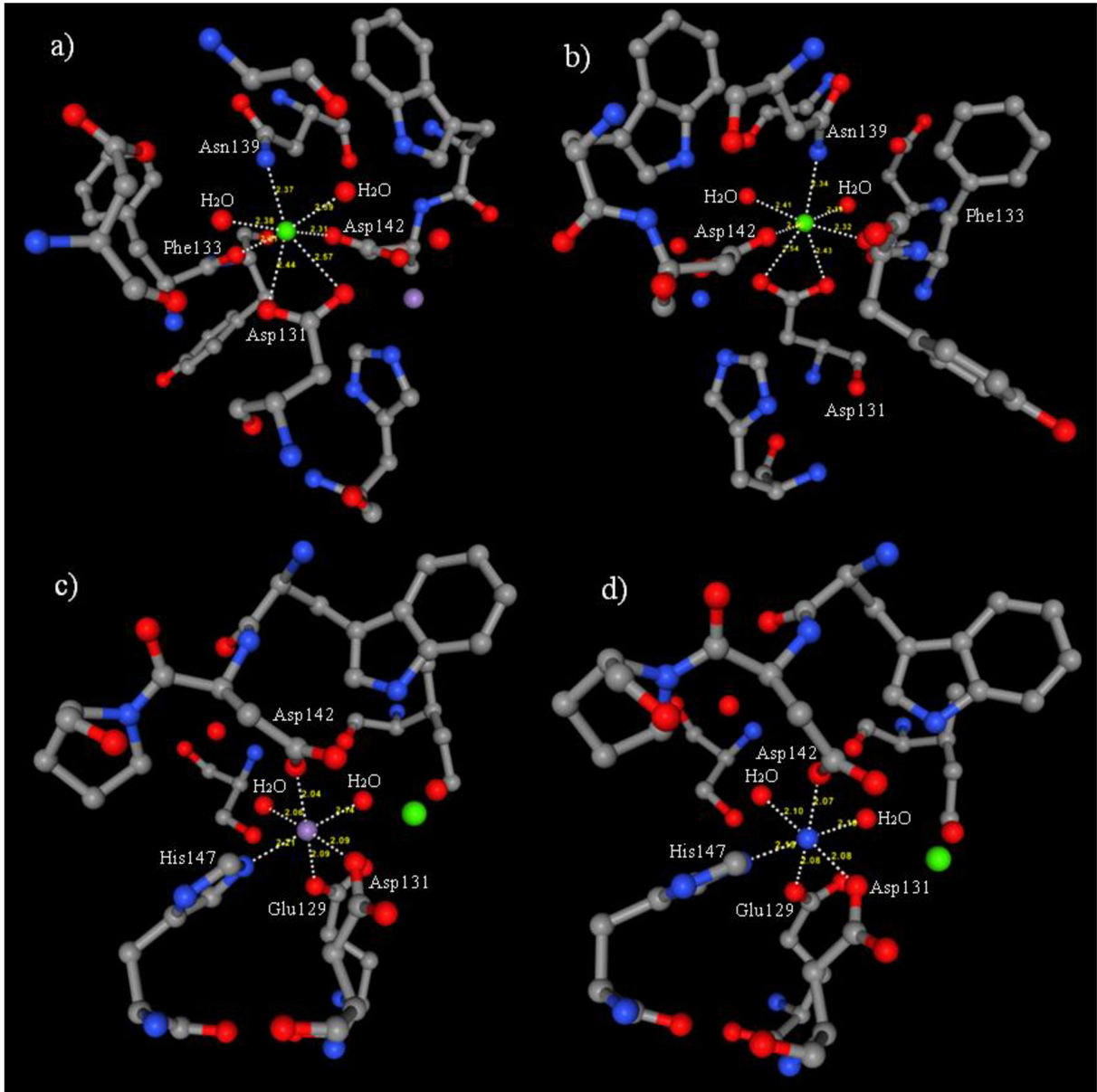
Fonte: elaborado pelo autor.

4.3 Sítios de ligação de CML

O dímero CML apresentou íons de cálcio e manganês no sítio de ligação a metais (MBS) e o MDM ligado ao CRD. É importante destacar que o MBS coordena algumas interações que estabilizam o sítio de ligação a carboidrato (LORIS et al., 1998). A propósito, as coordenações do MBS ao cálcio envolve os resíduos Asp131, Asp142, Asn139, Phe133 e duas moléculas de água, já as interações ao manganês, envolve os resíduos Asp131, Asp142, Glu129, His147 e duas moléculas de água, totalizando seis resíduos e quatro moléculas de água, formando uma coordenação octaédrica sob os íons em cada monômero, Figura 23a-d. Depois, na Figura 24a-b, observe o mapa de densidade de elétrons (mF0-dFc) em cada cátion interagindo com duas moléculas de água em torno de 3σ no MBS em cada monômero do dímero. Essas moléculas de água são importantes para a estabilidade do MBS, estando envolvida de forma indireta na estabilidade do CRDs.

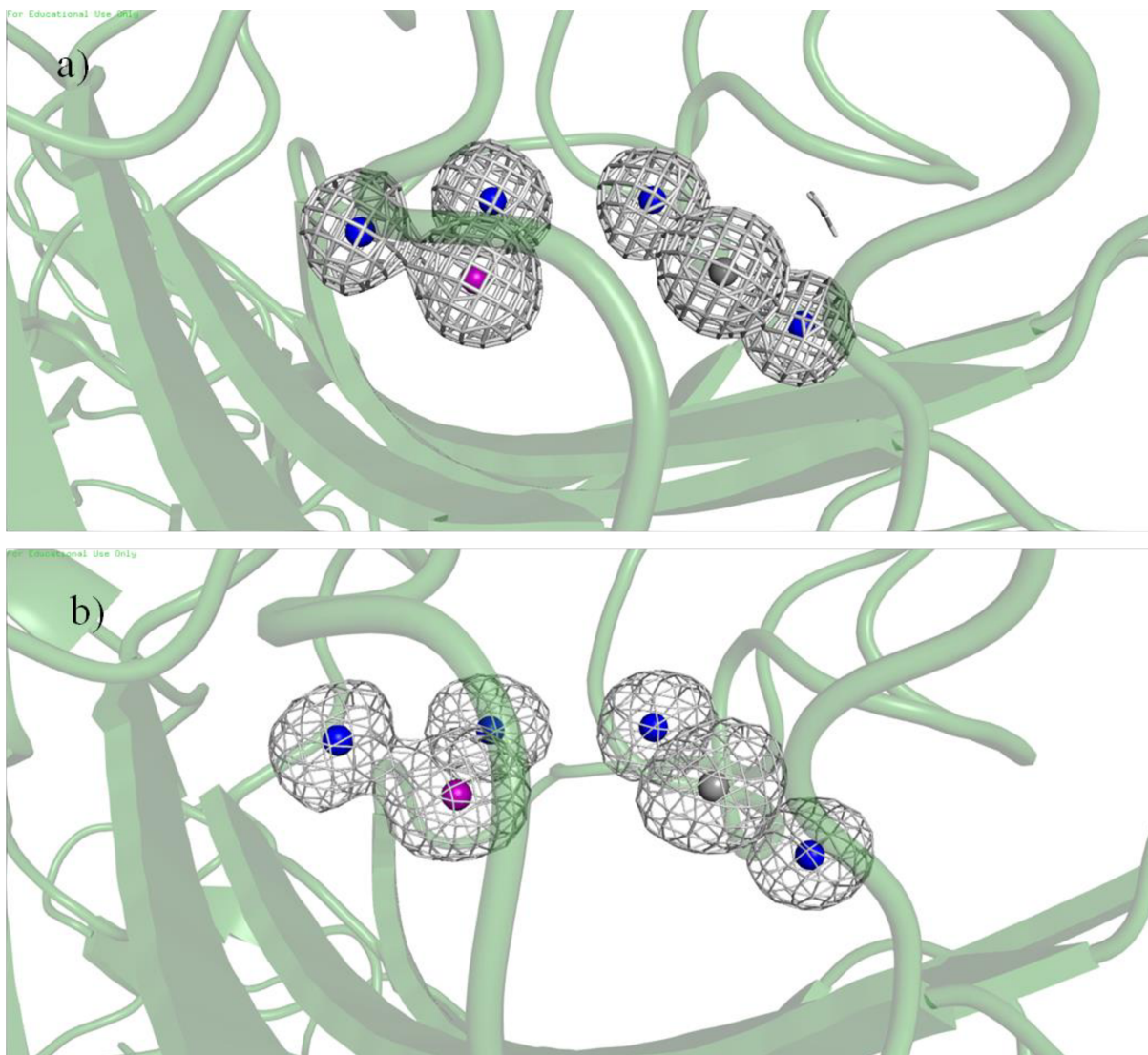
Esperadamente, os mesmos resíduos de aminoácidos nas mesmas posições com as quatro moléculas de água coordenando as interações com os íons divalentes Ca^{2+} e Mn^{2+} foram observados na CTL e PELa (ALMEIDA et al., 2016; CAVADA et al., 2018b). Isso mostra o quanto esses resíduos são conservados no MBS em lectinas da tribo *Dalbergieae*. Apesar disso, nas lectinas da tribo *Phaseoleae*, subtribo *Diocleinae*, como a lectina de *Dioclea lasiocarpa* (DLL) (NASCIMENTO et al., 2017), a lectina de *Dioclea lasiophylla* (DlyL) (PINTO-JUNIOR et al., 2017a), a lectina de *Dioclea reflexa* (DrfL) (PINTO-JUNIOR et al., 2017b), a lectina de *Dioclea sclerocarpa* (DSL) (BARROSO-NETO et al., 2016), a lectina de *Canavalia virosa* (ConV) (OSTERNE et al., 2017) e a lectina de *Canavalia bonariensis* (CaBo) (CAVADA et al., 2018a), mesmo com a conservação da maioria dos resíduos, mas em posições diferentes na estrutura primária, mostrou a interação da tirosina em vez da fenilalanina na coordenação do cálcio. Dentre as posições dos resíduos envolvidos nas interações do MBS das lectinas da tribo *Phaseoleae*, os resíduos Asp10, Asp19, Asn14, Tyr12 e duas moléculas de água interagem com o cálcio e os resíduos Asp10, Asp19, Glu8, His24 junto a duas moléculas de água interagem com o manganês. Essa diferença de aminoácido entre tirosina e fenilalanina, também foi observado em PNA, uma lectina da tribo *Dalbergieae*, com os resíduos Asp123, Asp132, Asn127 e Tyr125 coordenando o cálcio e os resíduos Asp123, Asp132, Glu121 e His137 coordenando o manganês (BANERJEE et al., 1996). Mas em outras duas lectinas desse gênero, a lectina de *Arachis duranensis* (ADL) e lectina de *Arachis ipaensis* (AIL), mostraram os mesmo resíduos, com exceção da tirosina, em posições diferentes dos resíduos Asp132, Asp143, Asn140 e Phe134 na coordenação do Ca^{2+} e Asp132, Asp143, Glu130 e His148 na coordenação do Mn^{2+} (NASCIMENTO et al., 2018).

Figura 23 - Representações dos sítios de ligação à metais de um dímero de CML com interações de coordenação em torno dos íons cálcio e manganês. Interações cálcio (a) e manganês (c) do monômero 1 e cálcio (b) e manganês (d) do monômero 2.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 24 - Representações dos sítios de ligação a metais dos monômeros 1 (a) e 2 (b) com mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) em torno de 3σ do cálcio (rosa), manganês (cinza) e duas moléculas de água (azul) interagindo em cada cátion.

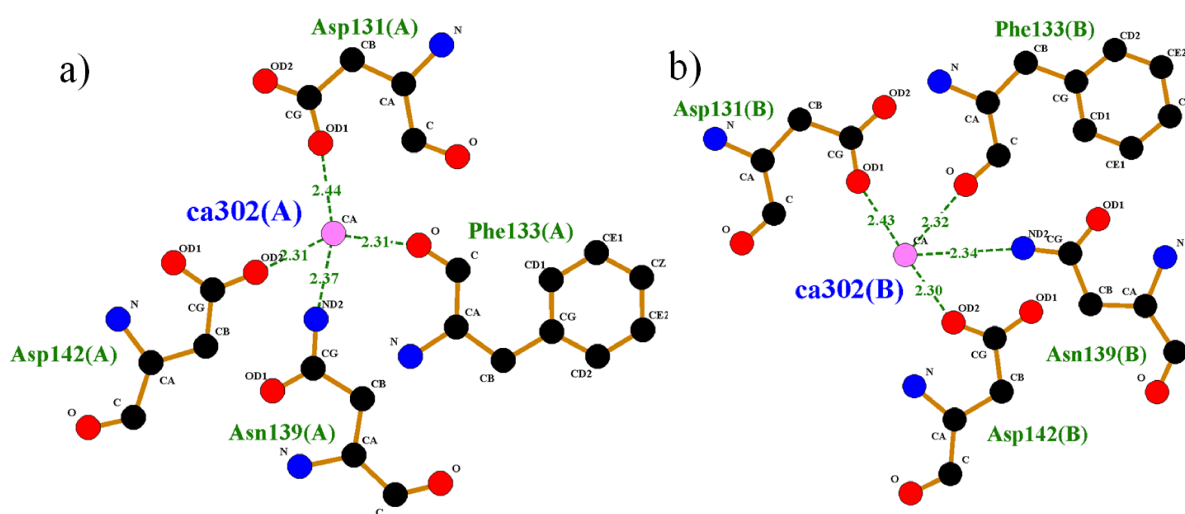


Fonte: elaborado pelo autor.

Outro aspecto importante são as interações intramoleculares as quais mostram as forças, seja polares, seja apolares. Dentre os diversos métodos de análise dessas interações existe o *Symmetry-Adapted Perturbation Theory* (SAPT), que analisa a natureza das ligações de hidrogênio e forças de van der Waals de acordo com termos eletrostáticos, transferências de cargas, repulsão de troca, polarização e dispersão (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2012), podendo ser considerado um método de decomposição de energia, uma vez que se baseia na produção de energias de interações totais e energias de dispersão (MASUMIAN; DANIEL BOESE, 2022). Além disso, existem outros métodos que apesar de suas limitações, complementam o estudo

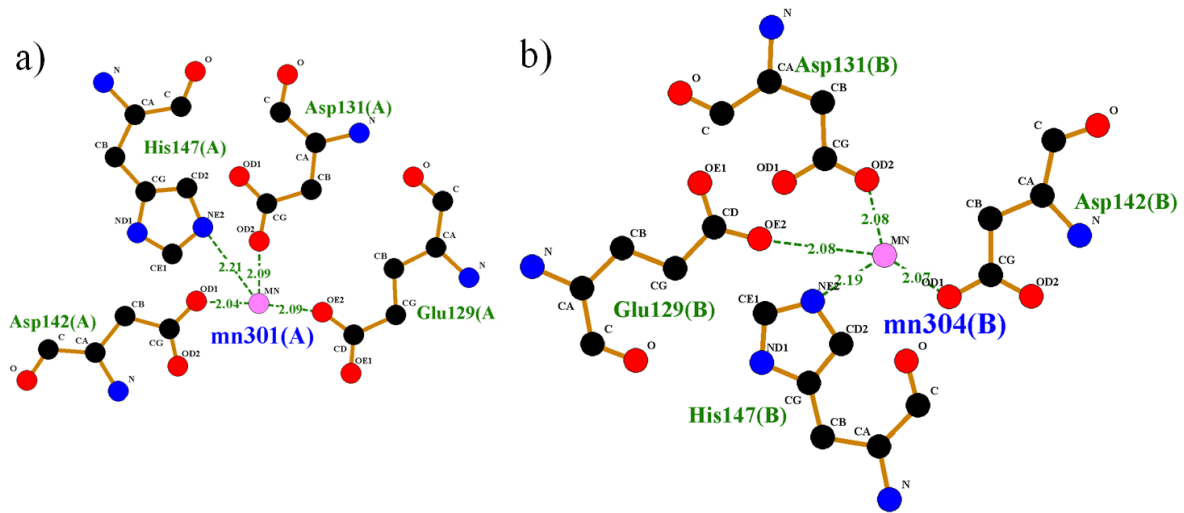
dessas interações, como: *quantum theory of atoms in molecule* (QTAIM), que é usado para estimar as ligações de hidrogênio; teorias de orbitais de ligação natural ou orbitais estritamente localizado para avaliar as transferências de cargas intramoleculares e forças estéricas (WEINHOLD; LANDIS; GLENDENING, 2016); método de orbitais moleculares de fragmento que calculam valores de energia significativos que tratam o efeito do solvente nos sistemas (FEDOROV; KITAURA, 2007), entre outros métodos. Para esse estudo, as ligações estão classificadas como ligações de hidrogênio numa faixa de 2,2 Å a 3,4 Å e Van der Waals entre 3,0 Å a 4,0 Å. Nesse contexto, é possível visualizar as distâncias interatômicas entre os resíduos de aminoácidos do MBS da CML e os cátions divalentes, pela representação 2D do LIGPLOT, mostrando a coordenação dos aminoácidos aos cátions de Ca^{2+} (Figura 25a-b) e Mn^{2+} (Figura 26a-b). É importante mencionar que para o monômero 1, o B-fator do cálcio foi 4,64 Å² e manganês 15,22 Å²; para o monômero 2, foram 7,43 Å² e 20 Å², respectivamente, apresentando ocupação de 100%. Curiosamente, o B-fator do manganês nos dois monômeros são maiores, indicando que a agitação molecular desse íon é maior em relação ao cálcio.

Figura 25 - Representações LIGPLOT dos sítios de ligação à metais de CML com interações de coordenação ao cátion de cálcio (rosa) do monômero 1 (a) e monômero 2 (b). Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio dos resíduos de aminoácidos estão representados por esferas pretas, azuis e vermelhas, respectivamente.



Fonte: elaborada pelo autor.

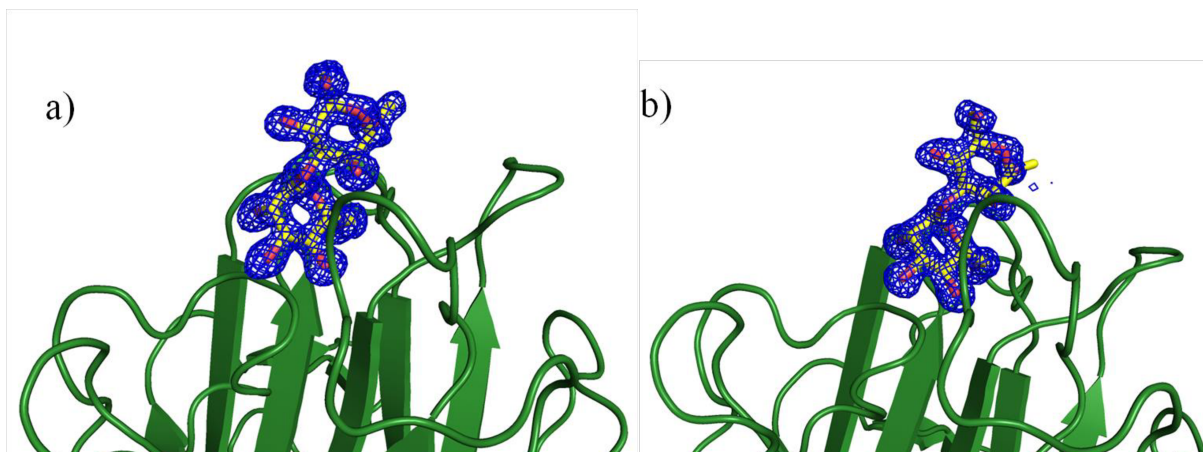
Figura 26 - Representações LIGPLOT dos sítios de ligação à metais de CML com interações de coordenação ao cátion de manganês (rosa) do monômero 1 (a) e monômero 2 (b). Os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio dos resíduos de aminoácidos estão representados por esferas pretas, azuis e vermelhas, respectivamente.



Fonte: elaborada pelo autor.

A CML foi co-cristalizada com MDM para identificação do CRD. O B-fator médio da molécula de MDM foi $19,25 \text{ \AA}^2$ com ocupação de 100%. Na figura 27 é possível observar o mapa de densidade de elétrons em torno de 3σ no MDM que está ligado ao CRD da CML no monômero 1 representado (Figura 27a) e monômero 2 (Figura 27b) em *cartoon*. Essa interação lectina/carboidrato ocorre devido à estabilidade do *cis*-peptídeo pela coordenação dos resíduos que compõe o MBS com os metais e contribuições das interações polares e apolares do CRD ao carboidrato. Segundo LORIS e colaboradores (1998), o peptídeo Ala-Asp é conservado em lectinas de leguminosas. Para mais, estudos mostraram que em PELa a coordenação dos metais estabilizam o *cis*-peptídeo Ala86-Asp87 que está relacionado a atividade do CRD (CAVADA et al., 2018b); em CaBo a alta frequência de interações na região do *cis*-peptídeo, Ala207-Asp208, é importante para estabilização dos ligantes no CRD (CAVADA et al., 2020), assim como em lectina de *Pisum arvense* no *cis*-peptídeo Ala80-Asp81 (PINTO-JUNIOR et al., 2017d), uma lectina da tribo *Vicieae*, também pertencente a subfamília *Papilionoideae*.

Figura 27 - Representações dos sítios de ligação a carboidratos dos monômeros 1 (a) e 2 (b) com mapa de densidade de elétrons (mFo-dFc) em torno do MDM.



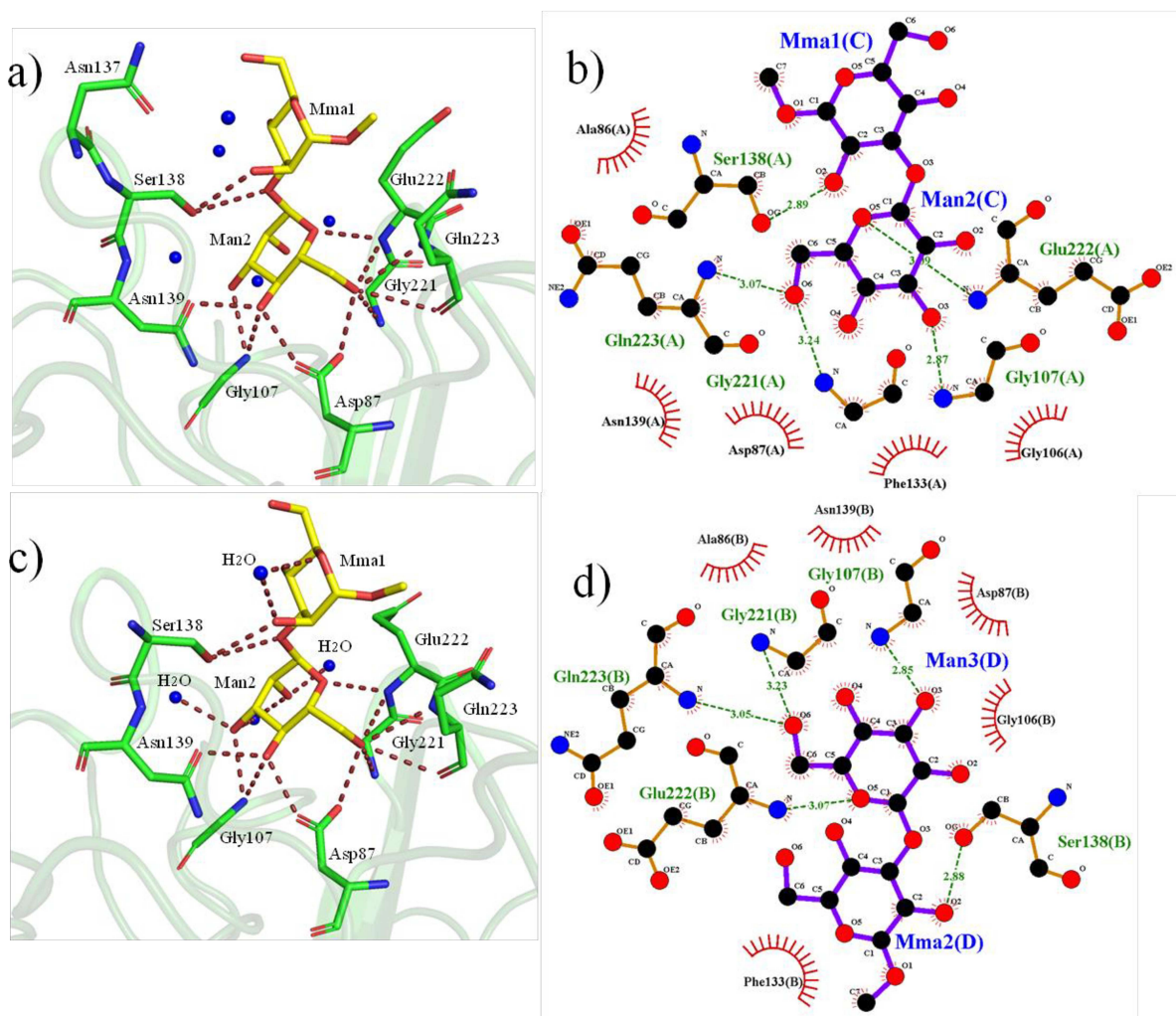
Fonte: elaborada pelo autor.

No geral, incluindo as interações polares e apolares, o CRD da CML é composta por quatro segmentos descontínuos - Ala86-Asp87, Gly106-Gly107, Gly221-Glu222-Gln223 e Asn137-Ser138-Asn139 - e um resíduo de Phe133 (Figura 28 e Tabela 4), que está em concordância com os quatro loops na formação do CRD de lectinas de leguminosas (SHARMA; SUROLIA, 1997). Entre os aminoácidos do CRD que estabilizaram a ligação com MDM pelas ligações de hidrogênio estão Asp87, Gly107, Gly221, Glu222, Gln223, Asn137, Ser138 e Asn139 (Figura 28a) com uma água estrutural entre a Asn137-H₂O-Mma1 (Figura 28c e Figura 29) formando uma ligação indireta do resíduo Asn137 com o carboidrato intermediada por uma molécula de água. Já foi mencionado na literatura que moléculas de água ligam indiretamente os resíduos de Asp208 e Arg228 ao cálcio e Ser34 ao manganês presentes na DSL (BARROSO-NETO et al., 2016). Em relação às interações hidrofóbicas, os mesmos resíduos nos dois monômeros foram observados: Ala86, Asp87, Gly106, Phe133 e Asn139 (Figura 28b e Figura 28d). Além disso, na Tabela 4 mostra pequenas diferenças em relação a Figura 28, como ausência de interação polar do resíduo Asn137 ao MDM em ambos monômeros e entre os monômeros ausência de interação apolar dos resíduos Glu222 e Gln223 no monômero 2. Provavelmente, essas mudanças podem ser devido às diferentes conformações entre os monômeros e às faixas de interações consideradas pelos softwares no cálculo das distâncias entre as interações.

Na CTL, o CRD estabilizou o complexo com MDM pelas interações dos resíduos Gly107, Ser138, Asn139, Gly221, Glu222 e Gln223 aos átomos de oxigênio O1', O2', O3', O4', O5' e O6' do MDM, como também, interações de van der Waals compostas pelos resíduos

Ala86, Asp87, Gly107, Phe133, Ser138 e Gly221 (ALMEIDA et al., 2016). Para PELa, além dos resíduos mencionados em CTL com MDM, também observou Asp87 com interação polar e os resíduos Gly106 e Glu222 com interações de van der Waals na estabilidade com o carboidrato (CAVADA et al., 2018b). Portanto, apesar da conservação da maioria dos resíduos envolvidos nas interações polares e apolares no CRD, bem como no MBS das lectinas da tribo *Dalbergieae*, é possível observar algumas modificações de interações intra e intermoleculares que são melhor visualizadas em simulações de dinâmica molecular.

Figura 28 - Interações polares dos resíduos de aminoácidos de CML em stick e esferas de água (azul) no CRD do monômero 1 (a) e monômero 2 (c); representações 2D de LIGPLOT de interações polares de hidrogênio e hidrofóbicas entre resíduos de CML e os carboidratos de MDM no monômero 1 (b) e monômero 2 (d).



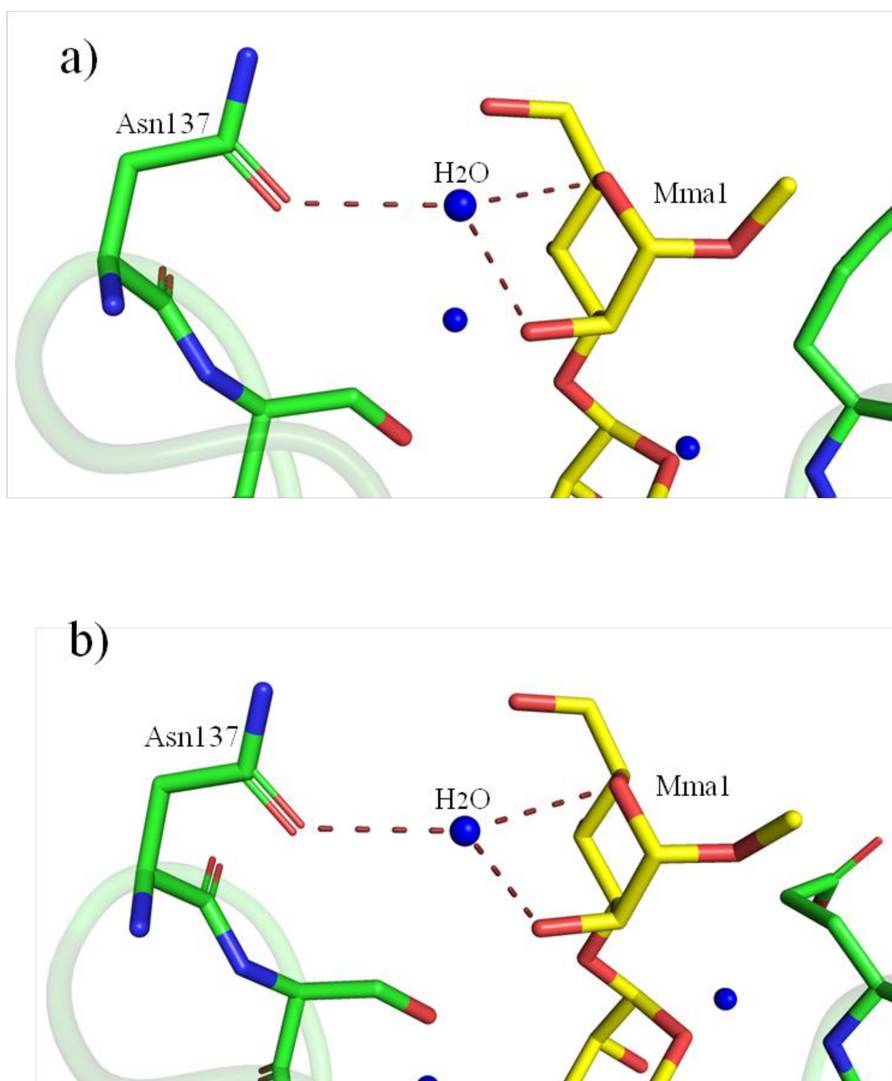
Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 4 - Interações de polares e apolares entre CML e MDM.

Aminoácidos	Átomo MDM	Monômero 1	Monômero 2
Contatos polares			
ASP 87 OD1	MAN O4	2.61 Å	2.60 Å
ASP 87 OD2	MAN O6	2.70 Å	2.72 Å
GLY 107 N	MAN O3	2.87 Å	2.85 Å
GLY 107 N	MAN O4	3.13 Å	3.14 Å
SER 138 OG	MMA O2	2.89 Å	2.88 Å
SER 138 OG	MMA O3	3.47 Å	3.44 Å
ASN 139 OD1	MAN O4	2.90 Å	2.93 Å
GLY 221 N	MAN O6	3.24 Å	3.23 Å
GLU 222 N	MAN O6	3.19 Å	3.18 Å
GLU 222 N	MAN O5	3.09 Å	3.07 Å
GLN 223 N	MAN O6	3.07 Å	3.05 Å
GLN 223 O	MAN O6	3.34 Å	3.30 Å
Apolares			
ALA 86 CB	MAN O6	3.39 Å	3.47 Å
ASP 87 CG	MAN O4	3.46 Å	3.43 Å
ASP 87 OD1	MAN C4	3.46 Å	3.49 Å
GLY 107 CA	MAN O4	3.44 Å	3.46 Å
SER 138 CB	MMA O2	3.12 Å	3.11 Å
GLY 221 CA	MAN O6	3.41 Å	3.35 Å
GLY 221 C	MAN O6	-	3.49 Å
GLU 222 CB	MAN O5	3.34 Å	-
GLU 222 CG	MMA O1	3.41 Å	-
GLN 223 OE1	MMA C7	3.49 Å	-

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 29 - Interações polares do resíduo Asn137 de CML em stick com o MDM de forma indireta intermediada por uma molécula de água estrutural representada por uma esfera azul no CRD do monômero 1 (a) e monômero 2 (b).



Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Dinâmica molecular

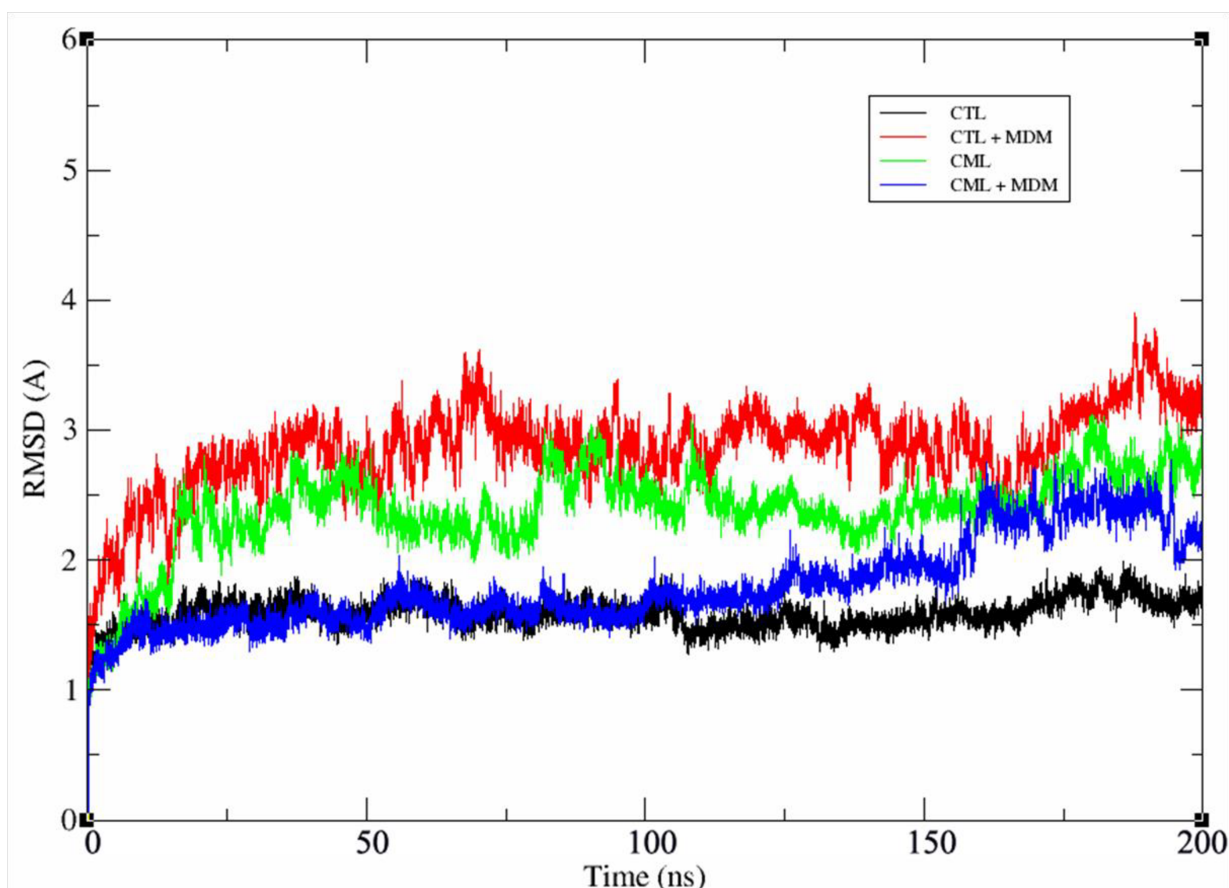
Para estudos *in silico* foi realizada a dinâmica molecular, a qual simulações de forma ligada e não ligada de CML e CTL com MDM foram preparadas no CHARMM-GUI e realizadas no AMBER22. Para minimização dos sistemas foram realizados 10.000 passos pelo método *steepest descent*, 2000 passos pelo método *conjugate gradient* para CML, CML + MDM, CTL e CTL + MDM e 250 mil passos para atingir o equilíbrio. Os valores mínimos de

energía atingidos para os sistemas CTL, CTL + MDM CML e CML + MDM, foram $-2.646e^{+05}$, $-3.286e^{+05}$, $-2.376e^{+05}$, $-2.3909e^{+05}$ kcal mol⁻¹, respectivamente. Em cada sistema, foram adicionados 64 Na⁺, 60 Cl⁻ e 21392 H₂O para CTL, 78 Na⁺, 74 Cl⁻ e 26541 H₂O para CTL + MDM, 57 Na⁺, 54 Cl⁻ e 19341 H₂O para CML e 57 Na⁺, 54 Cl⁻ e 19325 H₂O para CML + MDM, todas as águas tipo Tip3P. O tempo de simulações foi de 200 ns com 40.000 frames em uma pressão de 1 atm a uma temperatura de 37 °C, pH 7 com 150 mM de NaCl. Durante a trajetória dos sistemas, pode-se observar o processamento correto, completo e no caso dos sistemas com ligantes, observou a interação de MDM com a cavidade do CRD durante toda a trajetória. Os sistemas entraram em equilíbrio após 13,5 ns. Para entender o desvio estrutural de cada proteína (CML e CTL) com e sem ligantes, os desvios médios dos resíduos e o raio de giro em relação a compactação das moléculas foram gerados gráficos RMSD, RMSF e RoG. Depois, foi feita análise da frequência de contatos dos resíduos e o perfil de ligações de hidrogênio (HD).

4.4.1 Raiz do desvio quadrático médio (RMSD) e análises dos desvios

Mesmo considerando que todos os sistemas entraram em equilíbrio, o qual o gráfico RMSD mostrou que todas trajetórias dos sistemas atingiram esse equilíbrio a partir de 13,5 ns, com valores, aproximadamente, variando entre 1,3 e 1,9 Å para CTL, 2 e 4 Å para CTL + MDM, 1,8 e 3 Å para CML e 1,3 e 2,5 Å para CML+MDM, pode-se observar algumas variações íngremes próximas de 1 Å, com exceção da CTL. Antes de tudo, o gráfico mostrou menor desvio em CTL, seguido da CML + MDM (Figura 30). Agora, analisando as faixas de tempo: CTL + MDM na faixa 0-25 e 50-75 ns, CML na faixa 0-25, 50-75, 75-100 e 100-125 ns e CML + MDM na faixa 150-175 ns, pode ser verificado aumentos bruscos, embora não considerados instáveis. Sobre a comparação de desvios entre os sistemas das lectinas: CTL e CTL + MDM mostrou o maior desvio comparativo de RMSD seguido de CML e CML + MDM, apesar da diminuição desse desvio após 125 ns. No entanto, entre CTL e CML a diferença de desvio permaneceu “constante” durante toda a trajetória. Continuando, entre CTL + MDM e CML + MDM o desvio diminuiu na faixa 150-175 e voltou a aumentar logo em seguida até o final da dinâmica. Vale destacar que o perfil com menor desvio de RMSD foi entre CTL e CML + MDM até 100 ns. Por fim, nesse primeiro momento, observando os resultados de RMSD, o ligante MDM provocou impactos opostos em ambas lectinas, aumentando os desvios em CTL + MDM e diminuindo em CML + MDM.

Figura 30 - Resultados de dinâmica molecular de CML e CTL sem ligante e complexada com MDM. Gráfico do desvio quadrático médio (RMSD).



Fonte: elaborado pelo autor.

Paralelamente, com ADL e AIL, o equilíbrio dos sistemas atingiram mais rapidamente em torno de 5000 ps e 10.000 ps, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2018), salientando que nesses estudos as simulações de dinâmica molecular foram de 20 ns e 30 ns a depender dos sistemas. Comparando o RMSD com uma lectina da subtribo *Diocleinae*, os sistemas de DlyL tanto sem quanto com ligantes (X-man, MAN3, MAN5 e MAN9) demonstraram pequenos desvios não significativos (CAVADA et al., 2022), mostrando menor desvio nas simulações. Além do mais, o gráfico RMSD nas simulações com DlyL se assemelhou ao estudo de simulação com CML + MDM e CTL nos primeiros 100 ns de dinâmica molecular. De modo a acrescentar ao resultados de RMSD, é pertinente realçar que o sistema CML mostrou desvios intermediários entre os sistemas CTL e CTL + MDM, como também, CML + MDM demonstrou maior estabilidade dos desvios em comparação a CTL + MDM durante toda trajetória. Mais dois aspectos importantes são relevantes destacar, primeiro, a influência do ligante à CTL no impacto significativo em sua conformação protéica, segundo,

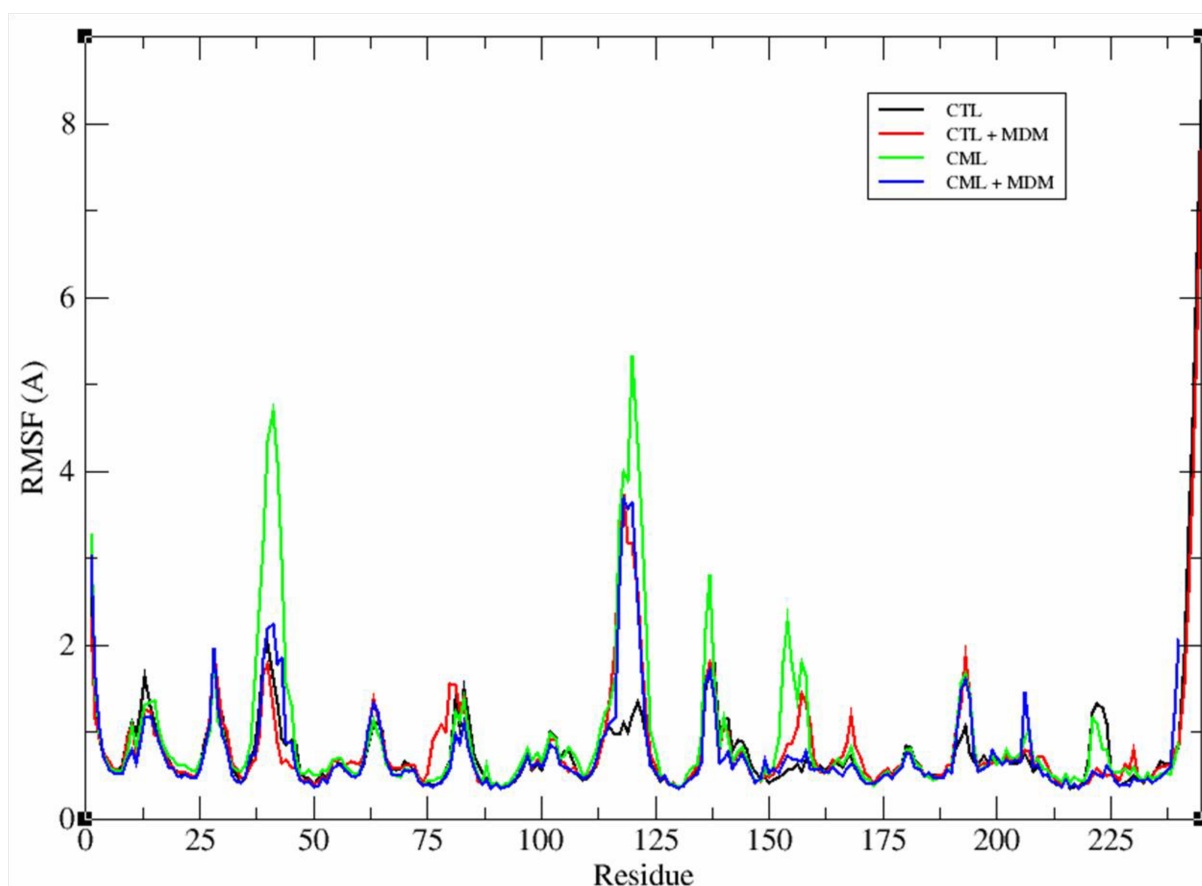
apesar da pequena diferença de dois aminoácidos entre CTL e CML, a conformação dessas lectinas sem MDM por dinâmica molecular mostrou diferenças conformacionais significativas.

Ademais, analisando o perfil de estabilidade de cada resíduo das lectinas durante a dinâmica, na Figura 31, o gráfico RMSF confirma flutuações de resíduos em algumas regiões do sistema. Sobre CTL e CTL + MDM foi observado desvios maiores na região 112-125, 150-175 para CTL + MDM e 212-225 para CTL. Vale destacar a região 112-125 com discrepância de desvio de resíduos de CTL + MDM acima 2 Å, provavelmente, em consequência do ligante interagindo com resíduos do CRD e as interações MBS ao complexo CRD/ligante em comparação a CTL. Sobre CML e CML + MDM houve desvios maiores na região 25-50, 150-162 e 212-225 para CML. Sobre CTL e CML os desvios foram observados na região 37-50, 112-125, 150-162. Também vale destacar as regiões 37-50 e 112-125 dos sistemas CTL e CML, das quais mostraram CML mostrou flutuações acima de 2 Å em comparação a CTL. Entre CTL + MDM e CML + MDM foi observado desvios na região 150-175, no entanto, o perfil de desvio sobre o restante de aminoácidos foi semelhante, com pequenas variações. Agora, observando a região 212-225 (Figura 31) com diferenças de desvio inferiores a 1 Å dos sistemas sem ligante (CTL e CML) em comparação com os sistemas com ligante (CTL + MDM e CML + MDM), pode ser em razão dos resíduos Gly221, Glu222 e Gln223 estarem livres, os quais fazem parte do CRD de ambas.

Curiosamente, observando o RMSF de CML caracterizada por modelagem molecular, na região 215-225 de CML, CML + MDM e CML + M13 (NECO et al., 2018) não houve diferença de flutuação entre os resíduos. Apesar da divergência entre a CML com a estrutura terciária proveniente de modelagem molecular ou por cristalografia, o tempo de dinâmica entre os estudos é diferente. Outro aspecto curioso, como mencionado, anteriormente, essa região é composta por uma fita (211-220) da folha- β frontal e um loop (221-225) que faz parte do CRD. Nesse loop, apresenta a glicosilação do resíduo Asn119 com o NAG (PINTO-JUNIOR et al., 2016). Geralmente, as regiões de loop são mais instáveis e sujeitas a mudanças conformacionais de acordo com as interações de superfícies que pode aumentar ou diminuir os desvios de RMSF. Além disso, sobre a CTL, enquanto a região 125-150 estão todos os resíduos que coordenam os cátions divalentes no MBS, as regiões 95-112 é composta por um loop após a terceira fita da folha- β frontal, seguida de uma pequena α -hélice (113-117) e outro loop 118-125 (PINTO-JUNIOR et al., 2016), que sofreu flutuações em decorrência do ligante a partir da α -hélice até a próxima fita da folha- β traseira. Adicionalmente, em um estudo da ADL com MMA, em vez de MAN que não causou

alterações, foi observado flutuações de resíduos na região 125-150 (NASCIMENTO et al., 2018). Diferentemente, em uma simulação da lectina de *Pisum arvense*, região 115-120 (composta por um loop), sem flutuações, com a segunda fita da folha- β traseira na região 121-133 demonstrou mais agitação em comparação a lectina sem ligante (PINTO-JUNIOR et al., 2017c, 2017d), confirmando a influência do ligante. Além disso, em simulações com PELa complexada com MDM, o gráfico de RMSF mostrou uma provável variação dos resíduos Ser138 e Asn139, que fazem parte de um loop próximo ao CRD, em comparação com PELa sem ligante (CAVADA et al., 2018b), no entanto, nos sistemas de CTL e CML com e sem ligantes, não foi verificado nenhuma diferença de flutuações nesta região.

Figura 31 - Resultados de dinâmica molecular de CML e CTL sem ligante e complexada com MDM. Gráfico da flutuação quadrática média (RMSF).



Fonte: elaborado pelo autor.

Ademais, dessemelhante do efeito MDM causado à CTL de acordo com RMSD e RMSF, CML + MDM provocou menor desvio estrutural e menor flutuação de seus resíduos,

principalmente nas regiões entre 34-46 e 153-162, comparado à CML. A primeira região (34-46) é composta por um loop, após uma pequena folha- β formada por duas pequenas fitas antiparalelas, que se conecta a segunda fita da folha- β frontal. A segunda região também é composta por um pequeno loop (153-158) e uma fita (159-162) da folha- β frontal que fica na parte mais externa do motivo *jellyroll*. Em termos comparativos, observando o RMSF da lectina *Pisum arvense*, foi verificado uma maior flutuação dos resíduos na região 30-45 (loop) e região 90-109 (loop) com da lectina sem o ligante, mas na região 152-159 (loop) foi verificado maior flutuação dos resíduos com o ligante (PINTO-JUNIOR et al., 2017c, 2017d). Contudo, observando o RMSF de DlyL (PINTO-JUNIOR et al., 2017a; CAVADA et al., 2022), mesmo sem e com diversos ligantes, não foi verificado flutuação diferente em nenhuma dessas regiões.

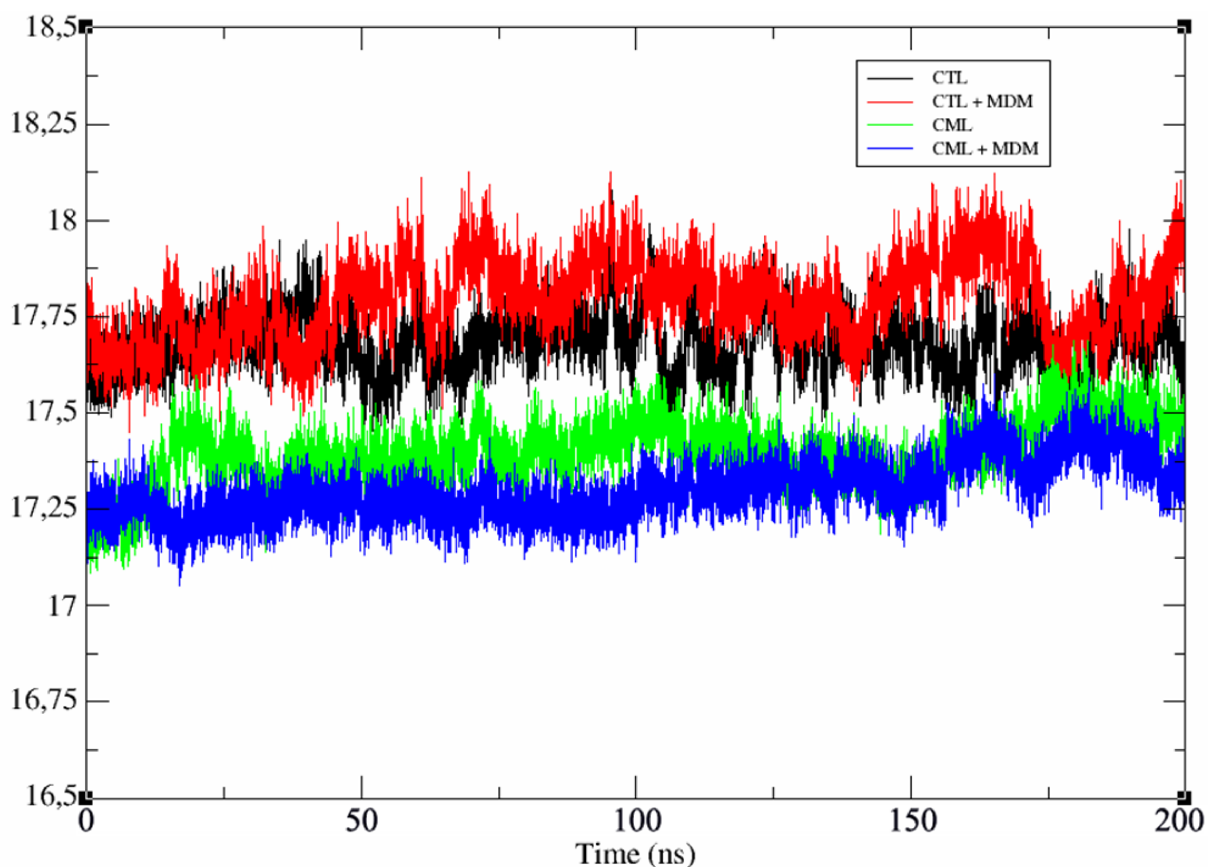
Para avaliar a compactação do enovelamento da proteína com e sem o ligante o raio de giro (RoG) das lectinas foram avaliadas durante toda a trajetória (Figura 32). Os valores médios de RoG para CTL, CTL + MDM, CML e CML + MDM, são 17,68 Å, 17,79 Å, 17,39 Å e 17,30 Å, respectivamente. Baseado na média dos valores de RoG, fica evidente que a CTL se mostrou mais compacta em relação à CTL + MDM com menor RoG, no entanto, os desvios observados entre CML e CML + MDM foram ainda menores, embora não possua diferenças estatísticas significativas comprovadas. A propósito, em relação à CTL e CML, ficou evidente a compactação de CML, complementando os resultados de RMSD e RMSF. Os desvios ficam ainda maiores quando comparados os sistemas CTL + MDM com CML + MDM. Mais uma vez, agora sobre o RoG, enquanto CML aumenta sua compactação com MDM, diminuindo seu RoG, CTL diminui, aumentando o RoG.

Mesmo não sendo uma regra definida, estudos mostram que, normalmente, o RoG aumenta com o ligante, exemplo, DlyL (17,32 Å) e DlyL com X-man (17,35 Å), DlyL com MAN3 (17,38 Å), DlyL com MAN5 (17,40 Å) e DlyL com MAN9 (17,36 Å) (CAVADA et al., 2022). Esse resultado está em concordância com o RoG da CTL, apesar que CML mostrou o contrário, necessitando de mais estudos em lectinas de leguminosas para entender esse comportamento.

Figura 32 - Resultados de compactação de CML e CTL sem ligante e complexada com MDM.

Raio de giro (RoG).

Fonte: elaborado pelo autor.

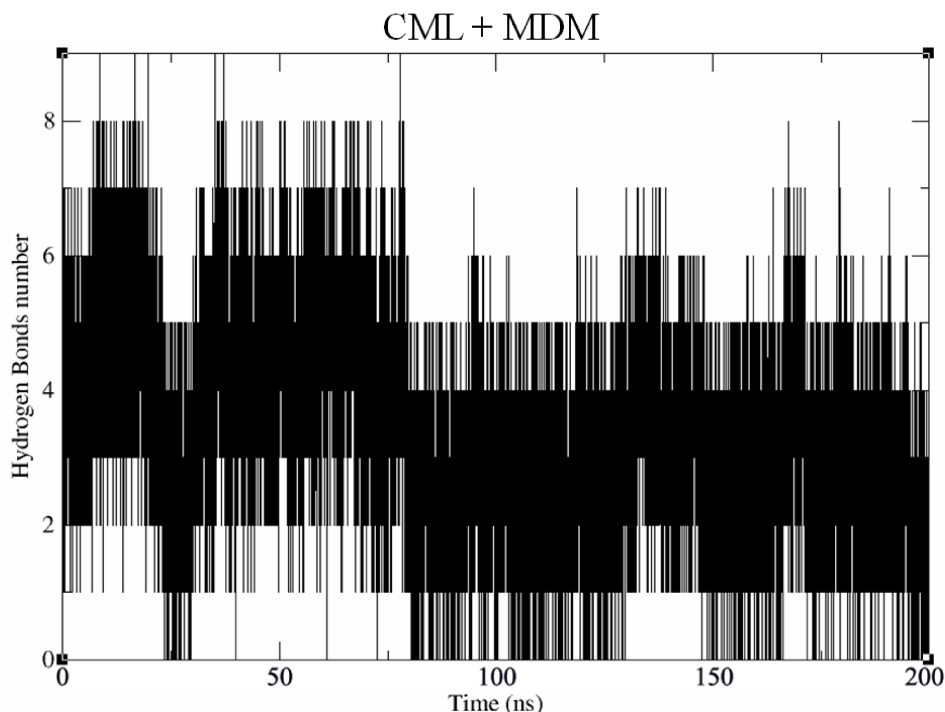


As pontes de hidrogênio são importantes interações entre a proteína e seu ligante. Apesar de observar a ausência de pontes de hidrogênio em diversos pontos da simulação da CML com MDM (Figura 33) e em alguns pontos no início da dinâmica da CTL com MDM (Figura 34), o ligante permaneceu ligado durante toda a simulação. Nesse caso, existem outros tipos de ligações que estão envolvidas nessa interação lectina/ligante, como interações eletrostáticas e van der Waals.

Surpreendentemente, o perfil de pontes de hidrogênio entre CML e CTL são bem diferentes, envolvendo outros tipos de interações para justificar a estabilidade e compactação da CML em relação a CTL. Para evitar interações irrelevantes ou aleatórias foram consideradas como relevantes as interações com frequência de no mínimo 10%. Por esse viés, os resíduos de CML que mais tiveram interações de pontes de hidrogênio com MDM não ultrapassou 50% do tempo de simulação (Tabela 5). Os resíduos que mais interagiram foram o Glu222 (47,63%) e Gly107 (44,43%), Ser138 (34,39%) e Asn139 (28,38%). Entretanto, existem outras interações que precisam ser mencionadas, como Ala87, Gly107, Ser133, Gly221, Glu222 e Gln223

envolvidas com interações de van der Waals e polares, a Asn139 envolvida com interação polar e Ala86 com interação de van der Waals, de acordo com a Tabela 4.

Figura 33 - Análise de pontes de hidrogênio de CML complexada com MDM.

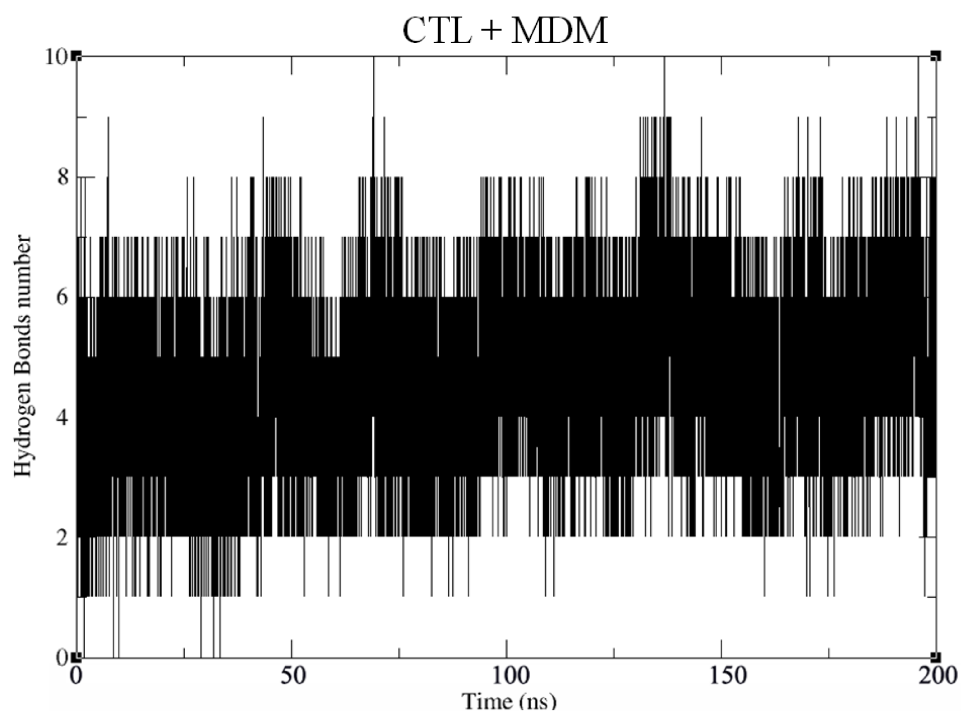


Fonte: elaborado pelo autor.

Comparando as interações entre as lectinas, no CRD da CTL, a porção MAN do MDM há maior interação de resíduos com Asp87, Glu222, Asn139, Gly107 e Gln223 por pontes de hidrogênio em relação a porção MMA que possuem interações com Ser138 e Glu222 (Tabela 6). Contudo, distinto do que ocorreu em CML, o resíduo mais relevante foi Asp87 com 94,06% do tempo interagindo com MDM nos O4 e O6 da MAN, seguido pelos resíduos Glu222, Asn139 e Gly107 com 48,30%, 47,23% e 37,53% do tempo, interagindo com O5, O4 e O3 da MAN, respectivamente (Tabela 6). Chama atenção para Asp que faz parte do *cis*-peptídeo confirmando sua conservação na interação aos ligantes específicos de cada lectina de leguminosa por ligações de hidrogênio (CAVADA et al., 2018b, 2018c, 2022), embora com CML (Tabela 5) tenha interagido apenas 20,68% com O4 e 19,43% com O6 na simulação. Outro aspecto importante é o balanço de interações apolares entre CML e CTL, pois, CML (Tabela 4) mostrou Ala86, Asp87, Gly107, Ser138, Gly221, Glu222 e Gln223 envolvidos nesse tipo de interação. Em concordância, de forma incompleta, a CTL mostrou interações de van der Waals e contatos polares com Asp87, Gly107, Ser138, Gly221, Gln223, somente interações

polares com Glu222 e Asn139, e somente interações de van der Waals com Ala86, Phe133 e Gly106 (ALMEIDA et al., 2016).

Figura 34 - Análise de pontes de hidrogênio de CTL complexada com MDM.



Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Lista de interações de ponte de hidrogênio entre os resíduos da CML e os átomos

do MDM.

Aceptor	Doador	Frames	%	Dist (Å)	Avgang
MAN O5	GLU 222 N	19051	47,63	2.8848	161.5832
MAN O3	GLY 107 N	17771	44,43	2.8892	160.5441
SER 138 OG	MAN O4	13755	34,39	2.8345	164.3549
MAN O4	ASN 139 ND2	11353	28,38	2.8654	156.8408
ASP 87 OD1	MAN O4	10661	26,65	2.6444	166.5318
MAN O6	GLN 223 N	9605	24,01	2.9037	162.0885
ASP 87 OD2	MAN O4	8273	20,68	2.6630	165.9686
ASP 87 OD1	MAN O6	7774	19,43	2.7605	163.8535
ALA 105 O	MAN O2	5870	14,67	2.8449	154.0791
GLU 222 OE1	MMA O4	4470	11,18	2.6859	166.2047

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Lista de interações de ponte de hidrogênio entre os resíduos da CTL e os átomos do MDM.

Aceptor	Doador	Frames	%	Dist (Å)	Avgang
ASP 87 OD2	MAN O4	37624	94,06	2.64	164.9189
ASP 87 OD1	MAN O6	33489	83,72	2.68	165.7562
MAN O5	GLU 222 N	19321	48,30	2.89	163.1742
MAN O4	ASN 139 ND2	18892	47,23	2.89	158.7166
MAN O3	GLY 107 N	15012	37,53	2.90	160.2367
MMA O2	SER 138 OG	10080	25,20	2.82	160.2940
GLU 222 OE2	MMA O4	8183	20,46	2.69	166.0188
SER 138 OG	MMA O2	7896	19,74	2.85	151.4430
MAN 248 O6	GLN 223 N	6742	16,86	2.93	159.2895
GLU 222 OE1	MMA O4	6548	16,37	2.69	166.0741

Fonte: elaborado pelo autor.

Por fim, relacionando outros estudos, sobre o tempo de equilíbrio em outras espécies, PELa complexada com MDM atingiu equilíbrio com aproximadamente 5000 ps (CAVADA et al., 2018b), observando diminuição de interação de resíduos polares, apolares e mudança de resíduo apolar, com exceção da Ala86 que manteve a interação em toda trajetória. Diferentemente, observando simulações com porções de carboidratos que fazem parte do MDM (MAN + MMA), em simulações com duas lectinas do gênero *Arachis*, específicas a α -metil-D-manosídeo, o ligante MAN complexado à ADL desligou da proteína entre 9 e 15 ns, mas quando complexada ao α -metil-D-manosídeo (MMA), permaneceu à proteína durante toda simulação, no entanto, sistemas com MAN e MMA complexada com AIL, desligaram da proteína entre 2-15 ns e 15-20 ns, respectivamente (NASCIMENTO et al., 2018). Adicionalmente, em simulações de PELa com MMA foram observadas interações dos resíduos Asp87, Gly106, Gly107, Gly221, Glu222 e Gln223 e participação de um novo resíduo (Ser46) entre 5 e 10 ns comparados ao 0 ns (CAVADA et al., 2018b), apesar de Ser46 estar em uma região que não tem função direta com reconhecimento a carboidrato na maioria das lectinas. Além disso, foi observado a presença dos resíduos Ala105 e Ala106 atuando na formação de interações hidrofóbicas em 5 e 10 ns (CAVADA et al., 2018b). Vale ressaltar que em relação ao estudo apresentado foi pequeno, tendo em vista que o tempo de simulação e quantidade de frames foram maiores com 200 ns e 40.000 frames, respectivamente.

4.4.2 Análise da energia livre MM/Pbsa

A energia de ligação calculada pelo MM/Pbsa para CML e CTL com MDM foi -3.37 ± 2.92 kcal mol⁻¹ e $-8,26 \pm 2.42$ kcal mol⁻¹, respectivamente (Tabela 7). Fica evidente que CTL possui energia livre de ligação mais negativa e portanto uma ligação mais forte com MDM do que CML. Na Tabela 7 mostra alguns resultados de cálculos de energias livres utilizando os dados de dinâmica molecular, os quais somados o ΔG_{gas} (composto por interações de van der Waals e eletrostáticas da lectina) com o ΔG_{solv} (composto por interações de superfície, polares e energia de dispersão ocasionados pela água do solvente), mostrou um ΔG_{TOTAL} favorável a interação das lectinas com o ligante MDM com ΔG negativo.

Tabela 7 - Resumos das contribuições energéticas para interação da CTL e CML com o ligante MDM em kcal mol⁻¹.

Componente de energia	CML + MDM	CTL + MDM
VDWAALS	-20.08±2.91	-19.68 ± 3.24
EEL	-50.60±22.18	-66.15 ± 14.06
EPB	55.31±15.90	65.54 ± 10.71
ENPOLAR	-18.22±1.72	-19.85 ± 1.50
EDISPER	30.22±1.80	31.20 ± 1.51
ΔG_{gas}	-70.68 ± 19.75	-85.15 ± 11.42
ΔG_{solv}	67.31±15.80	76.89 ± 10.59
ΔG_{TOTAL}	-3.37 ± 2.92	-8.26±2.42

Fonte: elaborado pelo autor.

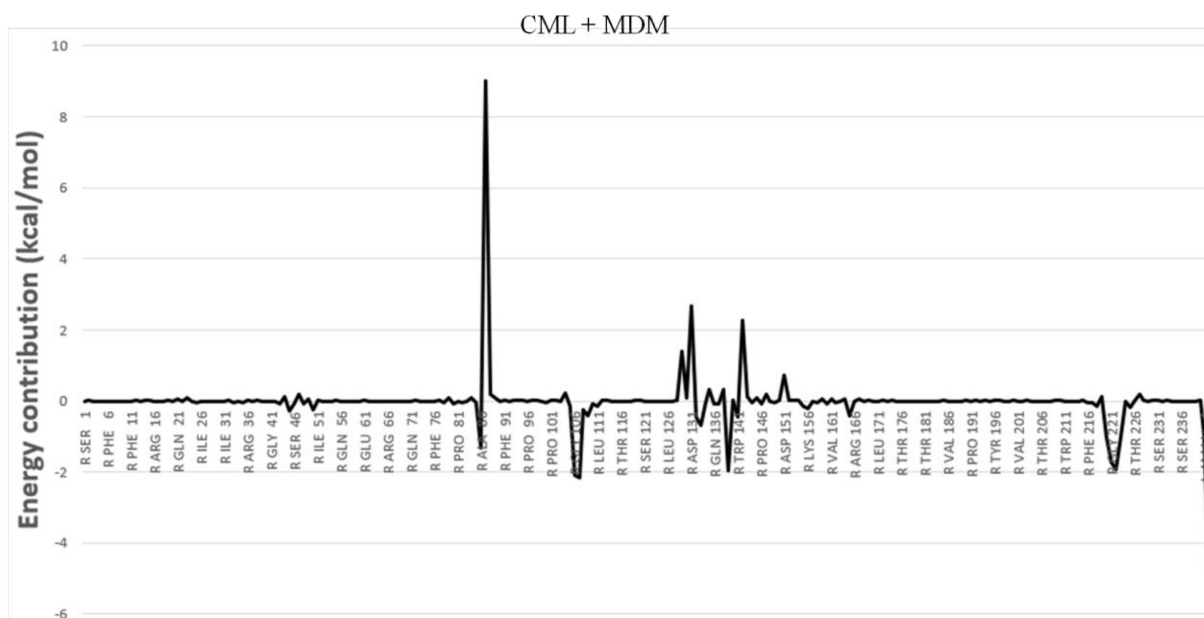
Na Figura 35 mostra um gráfico de decomposição de energia para analisar a contribuição de cada resíduo da CML e porção de carboidrato para a energia livre de ligação. Observando a contribuição mais significativos dos resíduos que fazem parte do CRD, a decomposição mostrou energia negativa para maioria dos resíduos envolvidos: Ala86 (-1,33 kcal mol⁻¹), Gly106 (-2,08 kcal mol⁻¹), Gly107 (-2,15 kcal mol⁻¹), Phe133 (-0,68 kcal mol⁻¹), Asn139 (-1,95 kcal mol⁻¹), Gly221 (-1,74 kcal mol⁻¹), Glu222 (-1,91 kcal mol⁻¹) e Gln223 (-1 kcal mol⁻¹), com exceção da Asp87 (+9 kcal mol⁻¹) e Ser138 (+0,31 kcal mol⁻¹). Dos resíduos envolvidos ao MBS a Phe133 (-0,68 kcal mol⁻¹), Asn139 (-1,95 kcal mol⁻¹) mostraram energia negativa e os demais Glu129 (+1,4 kcal mol⁻¹), Asp131 (+2,68 kcal mol⁻¹), Asp142 (+2,27 kcal mol⁻¹) e His147 (+0,18 kcal mol⁻¹) mostraram energia positiva. Já a decomposição do MDM, a porção MAN (-4,64 kcal mol⁻¹) e a porção MMA (-0,9 kcal mol⁻¹) foram negativos. Nesse momento, a intenção foi pontuar os principais resíduos envolvidos no CRD e MBS, independentemente de ser acima do módulo de 1 kcal mol⁻¹.

A respeito da decomposição de energia de ligação livre do sistema CTL com MDM (Figura 36) os resíduos com contribuições mais significativas foram os que fazem parte do CRD, como: Ala86 (-1,12 kcal mol⁻¹), Asp87 (+7,71 kcal mol⁻¹), Gly106 (-1,76 kcal mol⁻¹), Gly107 (-1,59 kcal mol⁻¹), Phe133 (-1,2 kcal mol⁻¹), Asn139 (-2,29 kcal mol⁻¹), Gly221 (-2,24 kcal mol⁻¹), Glu222 (-2,4 kcal mol⁻¹) e Gln223 (-1,51 kcal mol⁻¹). Para os resíduos envolvidos ao MBS a Phe133 (-1,2 kcal mol⁻¹) e Asn139 (-2,29 kcal mol⁻¹) mostraram energia negativa e

Glu129 (+0,63 kcal mol⁻¹), Asp131 (+1,18 kcal mol⁻¹), Asp142 (+1,04 kcal mol⁻¹) mostraram energia positiva. A decomposição do MDM no sistema mostrou para a porção MAN (-12,28 kcal mol⁻¹) e MMA (-1,78 kcal mol⁻¹).

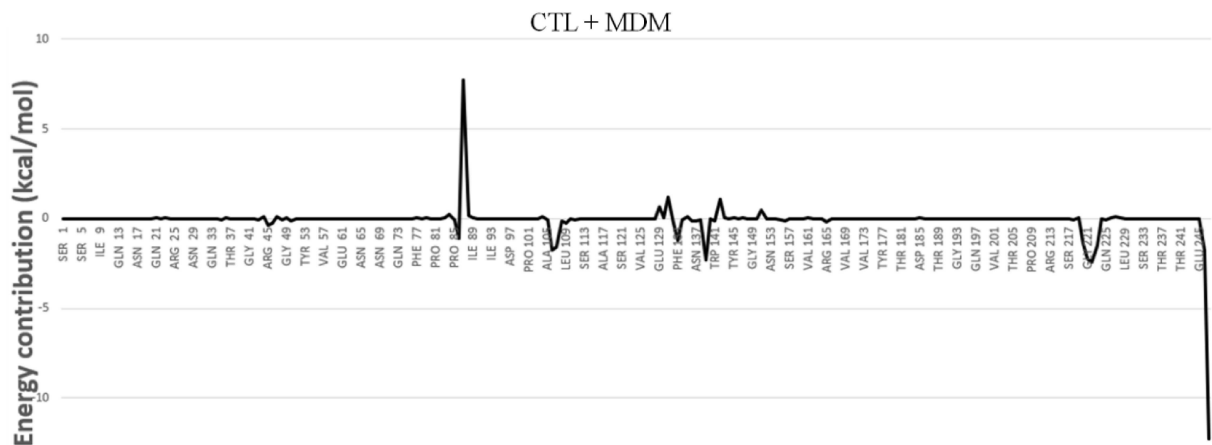
Com Dlyl, nenhuma energia decomposta mostrou valor positivo que ultrapassasse +0,5 kcal mol⁻¹ (CAVADA et al., 2022). Portanto, o balanço de contribuição energética dos resíduos com o ligante deve ficar negativo, sugerindo que, mesmo com uma energia alta e positiva da Asp87 de ambas lectinas, essa barreira energética deve ser compensada com as energias negativas dos demais resíduos juntamente com energia livre do ligante de forma que o CRD esteja apto a interagir com o ligante, tornando, assim, o *cis*-peptídeo um fator de seleção fundamental para cada ligante específico em CTL e CML.

Figura 35 - Decomposição de energia livre de ligação por resíduo de simulações por dinâmica molecular da CML complexada com MDM.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 36 - Decomposição de energia livre de ligação por resíduo de simulações por dinâmica molecular da CTL complexada com MDM.



Fonte: elaborado pelo autor.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, relatou o processo e resolução da estrutura tridimensional da lectina de *Centrolobium microchaete*, denominada CML, por cristalografia de raio X com resolução de 1,45 Å complexada com MDM. Além disso, foram realizadas simulações de dinâmica molecular de CTL e CML, as quais, embora semelhantes, mostraram comportamentos diferentes com e sem o ligante MDM. Sobre isso, o ligante MDM provocou diferentes impactos nas lectinas, promovendo maiores desvios de conformação em CTL e maior compactação em CML. Ainda assim, mesmo com as diferentes interações polares e apolares, mudanças e ausências de resíduos ao MDM, os complexos permaneceram durante toda a simulação. Inclusive, analisando a decomposição de energia livre dos resíduos foi possível identificar a contribuição de vários resíduos na compensação de energia livre positiva de Asn87, sugerindo uma função importante do *cis*-peptídeo na seleção do carboidrato específico. Porém, mais investigações são necessárias, como analisar a interação com outros carboidratos e *N*-glicanos por docking molecular seguido de uma possível atividade biológica. À vista disso, o estudo contribui para a biologia estrutural enriquecendo a lectinologia e se tornando uma ferramenta promissora para novos testes *in silico* com carboidratos e *N*-glicanos importantes como estratégias de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D. et al. PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 2, p. 213–221, fev. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909052925>. Acesso em: 14 jan. 2023.
- AGOSTINO, M. 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, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwu095>. Acesso em: 14 jan. 2023.
- ALBUQUERQUE, D. A. et al. The Adjuvant Effect of Jacalin on the Mouse Humoral Immune Response to Trinitrophenyl and Trypanosoma Cruzi. **Immunology letters**, v. 68, n. 2-3, p. 375–381, 1 jun. 1999. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478\(99\)00079-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-2478(99)00079-6). Acesso em: 14 jan. 2023.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Effect of Lectin from Lonchocarpus Sericeus Seeds in an Experimental Rat Model of Infectious Peritonitis. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 919–922, jul. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1211/0022357056352>. Acesso em: 15 jan. 2023.
- ALMEIDA, A. C. et al. Structural Analysis of Centrolobium Tomentosum Seed Lectin with Inflammatory Activity. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 596, p. 73–83, 15 abr. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.001>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- ANDERSEN, N. H. et al. Hevein: NMR Assignment and Assessment of Solution-State Folding for the Agglutinin-Toxin Motif. **Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1407–1422, 16 fev. 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00057a004>. Acesso em: 14 jan. 2023.
- ANIMASHAUN, T. et al. Inhibitory Effects of Novel Mannose-Binding Lectins on HIV-Infectivity and Syncytium Formation. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, v. 4, n. 3, p. 145–153, jun. 1993. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/095632029300400303>. Acesso em: 16 jan. 2023.
- ASENSIO, J. L. 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. 529–543, jul. 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1074-5521\(00\)00136-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1074-5521(00)00136-8). Acesso em: 17 jan. 2023.
- ASTBURY, W. T.; STREET, A. X-Ray Studies of the Structure of Hair, Wool, and Related Fibres.- I. General. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 230, n. 681-693, p. 75–101, 17 set. 1931. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsta.1932.0003>. Acesso em: 19 jan. 2023.
- BANERJEE, 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**, v. 259, n. 2, p. 281–296, 7 jun. 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0319>. Acesso em: 8 jan. 2023.
- BARROSO-NETO, I. L. et al. Structural Analysis of a Dioclea Sclerocarpa Lectin: Study on the Vasorelaxant Properties of Dioclea Lectins. **International journal of biological**

macromolecules, v. 82, p. 464–470, jan. 2016. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052>. Acesso em: 9 jan. 2023.

BATEMAN, A.; BYCROFT, M. The Structure of a LysM Domain from E. Coli Membrane-Bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD). **Journal of molecular biology**, v. 299, n. 4, p. 1113–1119, 16 jun. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.3778>. Acesso em: 14 jan. 2023.

BERMEO, R.; BERNARDI, A.; VARROT, A. BC2L-C N-Terminal Lectin Domain Complexed with Histo Blood Group Oligosaccharides Provides New Structural Information. **Molecules**, v. 25, n. 2, 7 jan. 2020. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25020248>. Acesso em: 11 jan. 2023.

BERTHELOT, K.; PERUCH, F.; LECOMTE, S. Highlights on Hevea Brasiliensis (pro)hevein Proteins. **Biochimie**, v. 127, p. 258–270, ago. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.06.006>. Acesso em: 17 jan. 2023.

BEWLEY, C. A. et al. Solution Structure of Cyanovirin-N, a Potent HIV-Inactivating Protein. **Nature structural biology**, v. 5, n. 7, p. 571–578, jul. 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/828>. Acesso em: 18 jan. 2023.

BIES, C.; LEHR, C.-M.; WOODLEY, J. F. Lectin-Mediated Drug Targeting: History and Applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 4, p. 425–435, 3 mar. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.030>. Acesso em: 20 jan. 2023.

BOONS, G.-J.; WU, P. Chemical Glycobiology. **Glycobiology**, v. 26, n. 8, p. 788, ago. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cww072>. Acesso em: 20 jan. 2023.

BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. et al. Lectins as Antimicrobial Agents. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 5, p. 1238–1252, nov. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14055>. Acesso em: 12 jan. 2023.

BRINDA, K. V. et al. Determinants of Quaternary Association in Legume Lectins. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 7, p. 1735–1749, jul. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1110/ps.04651004>. Acesso em: 12 jan. 2023.

BUTS, L. et al. Weak Protein-Protein Interactions in Lectins: The Crystal Structure of a Vegetative Lectin from the Legume Dolichos Biflorus. **Journal of molecular biology**, v. 309, n. 1, p. 193–201, 25 maio 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2001.4639>. Acesso em: 29 jan. 2023.

CARDOSO, M. R. D. et al. ArtinM, a D-Mannose-Binding Lectin from Artocarpus Integrifolia, Plays a Potent Adjuvant and Immunostimulatory Role in Immunization against Neospora Caninum. **Vaccine**, v. 29, n. 49, p. 9183–9193, 15 nov. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.136>. Acesso em: 28 jan. 2023.

CAROTENUTO, G. et al. The Rice LysM Receptor-like Kinase OsCERK1 Is Required for the Perception of Short-Chain Chitin Oligomers in Arbuscular Mycorrhizal Signaling. **The New phytologist**, v. 214, n. 4, p. 1440–1446, jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/nph.14539>. Acesso em: 27 jan. 2023.

CARRIZO, M. E. 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. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10614–10623, 18 mar. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M411989200>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CASE, D. A. et al. The Amber Biomolecular Simulation Programs. **Journal of computational chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1668–1688, dez. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20290>. Acesso em: 11 jan. 2023.

CAVADA, B. S. et al. 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, jun. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/1389203013381152>. Acesso em: 13 jan. 2023.

CAVADA, B. S. et al. cDNA Cloning and 1.75 Å Crystal Structure Determination of PPL2, an Endochitinase and N-Acetylglucosamine-Binding Hemagglutinin from *Parkia Platycephala* Seeds. **The FEBS journal**, v. 273, n. 17, p. 3962–3974, set. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05400.x>. Acesso em: 13 jan. 2023.

CAVADA, B. S. et al. *Canavalia Bonariensis* Lectin: Molecular Bases of Glycoconjugates Interaction and Antiglioma Potential. **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 369–378, jan. 2018a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023>. Acesso em: 13 jan. 2023.

CAVADA, B. S. et al. Structural Studies and Nociceptive Activity of a Native Lectin from *Platygodium Elegans* Seeds (nPELa). **International journal of biological macromolecules**, v. 107, n. Pt A, p. 236–246, fev. 2018b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.174>. Acesso em: 15 jan. 2023.

CAVADA, B. S. et al. ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 1, 21 dez. 2018c. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010030>. Acesso em: 16 jan. 2023.

CAVADA, B. S. et al. Exploring the Carbohydrate-Binding Ability of *Canavalia Bonariensis* Lectin in Inflammation Models. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 33, n. 11, p. e2870, nov. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.2870>. Acesso em: 17 jan. 2023.

CAVADA, B. 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**, v. 40, n. 15, p. 6817–6830, set. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2021.1890224>. Acesso em: 21 jan. 2023.

CHEN, Y. 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, jun. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.01-0598fje>. Acesso em: 22 jan. 2023.

DAMODARAN, D. et al. CancerLectinDB: A Database of Lectins Relevant to Cancer. **Glycoconjugate journal**, v. 25, n. 3, p. 191–198, abr. 2008. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1007/s10719-007-9085-5>. Acesso em: 9 jan. 2023.

DAM, T. K. et al. Thermodynamic, Kinetic, and Electron Microscopy Studies of Concanavalin A and Dioclea Grandiflora Lectin Cross-Linked with Synthetic Divalent Carbohydrates. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 10, p. 8640–8646, 11 mar. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M412827200>. Acesso em: 9 jan. 2023.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of chemical physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.464397>. Acesso em: 9 jan. 2023.

DASH, P.; MINZ, A. P.; SENAPATI, S. Possible autocrine function of galectin-3 in pancreatic stellate cells. **Gastroenterology Elsevier BV**, set. 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508518346523>. Acesso em: 10 jan. 2023.

DE FREITAS PIRES, A. et al. Lectin Purified from Lonchocarpus Campestris Seeds Inhibits Inflammatory Nociception. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 53–60, 15 mar. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.233>. Acesso em: 23 jan. 2023.

DELBAERE, L. T. et al. Structures of the Lectin IV of Griffonia Simplicifolia and Its Complex with the Lewis B Human Blood Group Determinant at 2.0 Å Resolution. **Journal of molecular biology**, v. 230, n. 3, p. 950–965, 5 abr. 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1993.1212>. Acesso em: 24 jan. 2023.

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, 19 maio 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20059029>. Acesso em: 25 jan. 2023.

DO NASCIMENTO NETO, L. G. et al. Wound Healing Activity of Lectin Isolated from Seeds of Mart. Ex Benth. on Cutaneous Wounds in Mice. **Natural product research**, v. 36, n. 18, p. 4740–4745, set. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2021.2005053>. Acesso em: 10 jan. 2023.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in Cancer and Inflammation--Potential for Therapeutics and Diagnostics. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 6, p. 477–488, jun. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1751>. Acesso em: 26 jan. 2023.

EDELMAN, G. M. 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, set. 1972. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.69.9.2580>. Acesso em: 26 jan. 2023.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Structures of the Erythrina Corallodendron Lectin and of Its Complexes with Mono- and Disaccharides. **Journal of molecular biology**, v. 277, n. 4, p. 917–932, 10 abr. 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.1664>. Acesso em: 9 jan. 2023.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Chemical Characteristics of Dimer Interfaces in the Legume Lectin Family. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 10, n. 4, p. 753–761, abr. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1110/ps.44001>. Acesso em: 6 jan. 2023.

EMSLEY, P. et al. Features and Development of Coot. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 66, n. Pt 4, p. 486–501, abr. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910007493>. Acesso em: 26 jan. 2023.

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, abr. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1107/S090744491003982X>. Acesso em: 24 jan. 2023.

FEDOROV, D. G.; KITAURA, K. Extending the Power of Quantum Chemistry to Large Systems with the Fragment Molecular Orbital Method. **The journal of physical chemistry. A**, v. 111, n. 30, p. 6904–6914, 2 ago. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/jp0716740>. Acesso em: 5 jan. 2023.

FEIZI, T. E. N.; HALTIWANGER, R. S. Editorial Overview: Carbohydrate-Protein Interactions and Glycosylation: Glycan Synthesis and Recognition: Finding the Perfect Partner in a Sugar-Coated Life. **Current opinion in structural biology**, v. 34, p. vii–ix, out. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2015.10.005>. Acesso em: 5 jan. 2023.

FOUQUAERT, E. et al. The “Old” Euonymus Europaeus Agglutinin Represents a Novel Family of Ubiquitous Plant Proteins. **Plant physiology**, v. 147, n. 3, p. 1316–1324, jul. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.116764>. Acesso em: 6 jan. 2023.

FOUQUAERT, E. et al. Proteins with an Euonymus Lectin-like Domain Are Ubiquitous in Embryophyta. **BMC plant biology**, v. 9, p. 136, 23 nov. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-9-136>. Acesso em: 7 jan. 2023.

FREIRE, M. das G. M. et al. Isolation and Partial Characterization of a Novel Lectin from *Talisia Esculenta* Seeds That Interferes with Fungal Growth. **Plant physiology and biochemistry: PPB / Societe francaise de physiologie vegetale**, v. 40, n. 1, p. 61–68, jan. 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942801013420>. Acesso em: 28 jan. 2023.

FUJIKAWA, K. et al. Approaches toward High-Mannose-Type Glycan Libraries. **Chemical record**, v. 16, n. 1, p. 35–46, fev. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/tcr.201500222>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GOHLKE, H.; CASE, D. A. Converging Free Energy Estimates: MM-PB(GB)SA Studies on the Protein-Protein Complex Ras-Raf. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 2, p. 238–250, 30 jan. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.10379>. Acesso em: 17 jan. 2023.

GUPTA, P. N. et al. Lectin Anchored Stabilized Biodegradable Nanoparticles for Oral Immunization I. Development and in Vitro Evaluation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 318, n. 1-2, p. 163–173, 2 ago. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.017>. Acesso em: 17 jan. 2023.

HAMELRYCK, T. W. et al. Crystal Structure of Arcelin-5, a Lectin-like Defense Protein from *Phaseolus Vulgaris*. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 51, p. 32796–32802, 20 dez. 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.51.32796>. Acesso em: 13 jan. 2023.

HAMELRYCK, T. W. et al. Carbohydrate Binding, Quaternary Structure and a Novel Hydrophobic Binding Site in Two Legume Lectin Oligomers from Dolichos Biflorus. **Journal of molecular biology**, v. 286, n. 4, p. 1161–1177, 5 mar. 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1998.2534>. Acesso em: 13 jan. 2023.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M. et al. Current Tools and Methods in Molecular Dynamics (MD) Simulations for Drug Design. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 34, p. 3909–3924, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/0929867323666160530144742>. Acesso em: 5 jan. 2023.

HESTER, G. et al. 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, jun. 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nsb0695-472>. Acesso em: 5 jan. 2023.

HIRABAYASHI, J. (ed.). **Lectin purification and analysis: Methods and protocols**. [s.l.] 1. ed. New York, NY: Springer, 2020.

HOOVER, W. G. Canonical Dynamics: Equilibrium Phase-Space Distributions. **Physical review A: General physics**, v. 31, n. 3, p. 1695–1697, mar. 1985. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1103/physreva.31.1695>. Acesso em: 3 jan. 2023.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–8, 27–8, fev. 1996. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0263785596000185>. Acesso em: 3 jan. 2023.

IORDACHE, F. et al. Antimicrobial and Antiparasitic Activity of Lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152–161, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2174/138920101602150112151907>. Acesso em: 3 jan. 2023.

JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. **Journal of applied crystallography**, v. 24, n. 4, p. 409–411, 1 ago. 1991. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889891004430>. Acesso em: 1 jan. 2023.

JANDÚ, J. J. B. et al. Targeting the Immune System with Plant Lectins to Combat Microbial Infections. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 671, 4 out. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2017.00671>. Acesso em: 1 jan. 2023.

JO, S. et al. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, ago. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20945>. Acesso em: 2 jan. 2023.

KENDREW, J. C. et al. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. **Nature**, v. 181, n. 4610, p. 662–666, 8 mar. 1958. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/181662a0>. Acesso em: 4 jan. 2023.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, Versatile Proteins of Recognition: A Review. **Carbohydrate polymers**, v. 26, n. 3, p. 219–230, jan. 1995. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0144861794000917>. Acesso em: 19 jan. 2023.

KIRSCHNER, K. N. et al. GLYCAM06: A Generalizable Biomolecular Force Field.

Carbohydrates. **Journal of computational chemistry**, v. 29, n. 4, p. 622–655, mar. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20820>. Acesso em: 14 fev. 2023.

KOHARUDIN, L. M. I.; GRONENBORN, A. M. Sweet Entanglements--Protein:glycan Interactions in Two HIV-Inactivating Lectin Families. **Biopolymers**, v. 99, n. 3, p. 196–202, mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/bip.22106>. Acesso em: 15 fev. 2023.

KRISSINEL, E.; HENRICK, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. **Journal of molecular biology**, v. 372, n. 3, p. 774–797, 21 set. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.05.022>. Acesso em: 15 fev. 2023.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>. Acesso em: 15 fev. 2023.

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, 12 jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18061242>. Acesso em: 16 fev. 2023.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic Plant Lectins. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1800, n. 2, p. 190–201, fev. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.021>. Acesso em: 15 fev. 2023.

LAW, I. J.; HAYLETT, T.; STRIJDOM, B. W. Differences in Properties of Peanut Seed Lectin and Purified Galactose- and Mannose-Binding Lectins from Nodules of Peanut. **Planta**, v. 176, n. 1, p. 19–27, nov. 1988. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00392475>. Acesso em: 20 fev. 2023.

LAW, I. J.; KFIR, R. Effect of mannose-binding lectin from peanut and pea on the stem borer *Chilo partellus*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 82, n. 3, p. 261–265, mar. 1997. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1570-7458.1997.00139.x>. Acesso em: 20 fev. 2023.

LEAL, R. B. et al. Crystal Structure of DlyL, a Mannose-Specific Lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth Seeds That Display Cytotoxic Effects against C6 Glioma Cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 64–76, 15 jul. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.080>. Acesso em: 3 fev. 2023.

LEE, J. et al. CHARMM-GUI Supports the Amber Force Fields. **The Journal of chemical physics**, v. 153, n. 3, p. 035103, 21 jul. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1063/5.0012280>. Acesso em: 4 fev. 2023.

LEWIS, G. P. et al. **Legumes of the World**. [s.l.] Royal Botanic Gardens Kew, 2005.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chemical reviews**, v. 98, n. 2, p. 637–674, 2 abr. 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/cr940413g>. Acesso em: 20 fev. 2023.

LI, X.-T. et al. The Antitumor Activity of PNA Modified Vinblastine Cationic Liposomes on Lewis Lung Tumor Cells: In Vitro and in Vivo Evaluation. **International journal of pharmaceuticals**, v. 487, n. 1-2, p. 223–233, 20 jun. 2015. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.04.035>. Acesso em: 25 fev. 2023.

LORIS, R. et al. Legume Lectin Structure. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1383, n. 1, p. 9–36, 3 mar. 1998. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167483897001829>. Acesso em: 6 jan. 2023.

LORIS, R. et al. Crystal Structure of Pterocarpus Angolensis Lectin in Complex with Glucose, Sucrose, and Turanose. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 18, p. 16297–16303, 2 maio 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M211148200>. Acesso em: 6 out. 2022.

LORIS, R. et al. Structural Basis of Oligomannose Recognition by the Pterocarpus Angolensis Seed Lectin. **Journal of molecular biology**, v. 335, n. 5, p. 1227–1240, 30 jan. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2003.11.043>. Acesso em: 20 dez. 2022.

LUNDSTRÖM, M. et al. Host Cell-Induced Differences in O-Glycosylation of Herpes Simplex Virus gC-1. **Virology**, v. 161, n. 2, p. 385–394, dez. 1987. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0042682287901310>. Acesso em: 23 dez. 2022.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014–2033, 27 jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20022014>. Acesso em: 5 dez. 2022.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of Quaternary Structure in the Sequences of Legume Lectins. **Protein engineering**, v. 14, n. 10, p. 735–745, out. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/protein/14.10.735>. Acesso em: 15 dez. 2022.

MASUMIAN, E.; DANIEL BOESE, A. Intramolecular Resonance-Assisted Hydrogen Bonds: Insights from Symmetry Adapted Perturbation Theory. **Chemical physics**, v. 557, n. 111474, p. 111474, maio 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301010422000295>. Acesso em: 20 dez. 2022.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Structural and Functional Overview of the Lectin Complement Pathway: Its Molecular Basis and Physiological Implication. **Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis**, v. 61, n. 4, p. 273–283, ago. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-013-0229-y>. Acesso em: 18 dez. 2022.

MILLER, B. R., 3rd et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. **Journal of chemical theory and computation**, v. 8, n. 9, p. 3314–3321, 11 set. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/ct300418h>. Acesso em: 20 dez. 2022.

MISHRA, A. et al. Structure-Function and Application of Plant Lectins in Disease Biology and Immunity. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 134, p. 110827, dez. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>. Acesso em: 2 dez. 2022.

NAKAMURA-TSURUTA, S. et al. Evidence That Agaricus Bisporus Agglutinin (ABA) Has Dual Sugar-Binding Specificity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 347, n. 1, p. 215–220, 18 ago. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.073>. Acesso em: 3 dez. 2022.

- NAPIMOGA, M. H. et al. Lonchocarpus Sericeus Lectin Decreases Leukocyte Migration and Mechanical Hypernociception by Inhibiting Cytokine and Chemokines Production. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 824–835, jun. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2007.02.001>. Acesso em: 8 dez. 2022.
- NASCIMENTO, K. S. et al. Structural Analysis of Dioclea Lasiocarpa Lectin: A C6 Cells Apoptosis-Inducing Protein. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 92, p. 79–89, nov. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.014>. Acesso em: 17 dez. 2022.
- NASCIMENTO, K. S. et al. Homology Modeling, Molecular Docking, and Dynamics of Two α -Methyl-D-Mannoside-Specific Lectins from Arachis Genus. **Journal of molecular modeling**, v. 24, n. 9, p. 251, 25 ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00894-018-3800-y>. Acesso em: 26 dez. 2022.
- NASCIMENTO, K. S. et al. Dalbergieae Lectins: A Review of Lectins from Species of a Primitive Papilionoideae (leguminous) Tribe. **International journal of biological macromolecules**, v. 144, p. 509–526, 1 fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.117>. Acesso em: 20 dez. 2022.
- NATCHIAR, S. K. et al. Structural Studies on Peanut Lectin Complexed with Disaccharides Involving Different Linkages: Further Insights into the Structure and Interactions of the Lectin. **Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography**, v. 62, n. Pt 11, p. 1413–1421, nov. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444906035712>. Acesso em: 22 dez. 2022.
- NECO, A. H. B. et al. Structural Analysis, Molecular Docking and Molecular Dynamics of an Edematogenic Lectin from Centrolobium Microchaete Seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 117, p. 124–133, 1 out. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.166>. Acesso em: 1 dez. 2022.
- NIKOLAKOPOULOU, C.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. C-Type Lectin Receptors in Antifungal Immunity. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1204, p. 1–30, 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-1580-4_1. Acesso em: 2 dez. 2022.
- NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. Em: VARKI, A. et al. (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- NOSÉ, S. A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. **The Journal of chemical physics**, v. 81, n. 1, p. 511–519, jul. 1984. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.447334>. Acesso em: 4 dez. 2022.
- ODEKANYIN, O. O.; KAYODE, A. S.; ADEWUYI, J. O. Purification, characterization and antioxidant potential of a novel lectin from Pterocarpus soyauxii Taub seeds. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 11, n. 1, p. 112–121, 21 mar. 2019. Disponível em: <https://www.notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/view/10317>. Acesso em: 7 nov. 2022.
- OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, R. C. M. U. SAPT: ligação de hidrogênio ou interação de van der Waals? **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2002–2012, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/JQSzsGFycTHvqxgptCHVgsM/?lang=pt&format=pdf>. Acesso

em: 1 mar. 2023. Acesso em: 7 nov. 2022.

OSTERNE, V. J. S. et al. Structural Characterization of a Lectin from *Canavalia Virosa* Seeds with Inflammatory and Cytotoxic Activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, n. Pt A, p. 271–282, jan. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.020>. Acesso em: 7 nov. 2022.

OSTERNE, V. J. S. et al. A Galactoside-Specific Dalbergiaceae Legume Lectin from Seeds of *Vataireopsis Araroba* (Aguiar) Ducke. **Glycoconjugate journal**, v. 40, n. 1, p. 85–95, fev. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-022-10082-8>. Acesso em: 6 out. 2023.

PANUNTO-CASTELO, A. et al. KM(+), a Lectin from *Artocarpus Integrifolia*, Induces IL-12 p40 Production by Macrophages and Switches from Type 2 to Type 1 Cell-Mediated Immunity against *Leishmania* Major Antigens, Resulting in BALB/c Mice Resistance to Infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035–1042, dez. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/11.12.1035>. Acesso em: 6 out. 2022.

PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. **Journal of applied physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, dez. 1981. Disponível em: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.328693>. Acesso em: 16 out. 2022.

PEREIRA-JUNIOR, F. N. et al. Purification and Characterization of a mannose/N-Acetyl-D-Glucosamine-Specific Lectin from the Seeds of *Platymiscium Floribundum* Vogel. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 25, n. 8, p. 443–449, ago. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jmr.2207>. Acesso em: 16 out. 2022.

PERRAKIS, A. et al. Crystal Structure of a Bacterial Chitinase at 2.3 Å Resolution. **Structure**, v. 2, n. 12, p. 1169–1180, 15 dez. 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(94\)00119-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(94)00119-7). Acesso em: 26 out. 2022.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>. Acesso em: 29 out. 2022.

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, 21 jul. 2000. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01801-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01801-9). Acesso em: 16 out. 2022.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, out. 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.2.347>. Acesso em: 7 nov. 2022.

PINEDO, M. et al. Molecular Characterization of Helja, an Extracellular Jacalin-Related Protein from *Helianthus Annuus*: Insights into the Relationship of This Protein with Unconventionally Secreted Lectins. **Journal of plant physiology**, v. 183, p. 144–153, 1 jul. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2015.06.004>. Acesso em: 17 out. 2022.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. **Tetragonal Form of Centrolobium tomentosum seed lectin (CTL) complexed with Man1-3Man-OMe**. Worldwide Protein Data Bank, 16 mar. 2016. . Disponível em: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00005eyy. Acesso em: 8 nov. 2022.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Molecular Modeling, Docking and Dynamics Simulations of the Dioclea Lasiophylla Mart. Ex Benth Seed Lectin: An Edematogenic and Hypernociceptive Protein. **Biochimie**, v. 135, p. 126–136, abr. 2017a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.002>. Acesso em: 16 out. 2022.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Structural Studies of a Vasorelaxant Lectin from Dioclea Reflexa Hook Seeds: Crystal Structure, Molecular Docking and Dynamics. **International journal of biological macromolecules**, v. 98, p. 12–23, maio 2017b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.092>. Acesso em: 16 out. 2022.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. **Crystal structure of Pisum arvense lectin (PAL) complexed with X-Man**. Worldwide Protein Data Bank, , 9 ago. 2017c. Disponível em: https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00005t7p. Acesso em: 15 fev. 2023.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Crystal Structure of Pisum Arvense Seed Lectin (PAL) and Characterization of Its Interaction with Carbohydrates by Molecular Docking and Dynamics. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 630, p. 27–37, 15 set. 2017d. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2017.07.013>. Acesso em: 7 nov. 2022.

PIRES, A. D. F. et al. The lectin isolated from Lonchocarpus araripensis seed elicits endothelium-dependent vasorelaxation. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 5, n. 4, p. 306, 3 out. 2017. Disponível em: <http://periodicos.unichristus.edu.br/index.php/jhbs/article/view/1351>. Acesso em: 25 out. 2022.

PONTING, C. P. et al. Eukaryotic Signalling Domain Homologues in Archaea and Bacteria. Ancient Ancestry and Horizontal Gene Transfer. **Journal of molecular biology**, v. 289, n. 4, p. 729–745, 18 jun. 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1999.2827>. Acesso em: 16 out. 2022.

READ, R. J. et al. A New Generation of Crystallographic Validation Tools for the Protein Data Bank. *Structure*, v. 19, n. 10, p. 1395–1412, 12 out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2011.08.006>. Acesso em: 7 nov. 2022.

RESENDE, R. R. **Biotecnologia aplicada à saúde - vol. 2: fundamentos e aplicações**. [s.l.] Editora Blucher, 2015.

RINDERLE, S. J. et al. Isolation and characterization of amaranthin, a lectin present in the seeds of Amaranthus caudatus, that recognizes the T- (or cryptic T)-antigen. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 27, 25 set. 1989. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2777780/>. Acesso em: 14 jan. 2023.

ROCHA, B. A. M. 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, 1 jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.003>. Acesso em: 7 nov. 2022.

RUTENBER, E.; ROBERTUS, J. D. Structure of Ricin B-Chain at 2.5 Å Resolution. **Proteins**, v. 10, n. 3, p. 260–269, 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/prot.340100310>. Acesso em: 8 fev. 2023.

RYCKAERT, J.-P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical Integration of the

Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of N-Alkanes. **Journal of computational physics**, v. 23, n. 3, p. 327–341, mar. 1977. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021999177900985>. Acesso em: 22 nov. 2022.

SANGER, F. Chemistry of Insulin; Determination of the Structure of Insulin Opens the Way to Greater Understanding of Life Processes. **Science**, v. 129, n. 3359, p. 1340–1344, 15 maio 1959. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.129.3359.1340>. Acesso em: 16 out. 2022.

SANKARANARAYANAN, 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, jul. 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nsb0796-596>. Acesso em: 16 out. 2022.

SANTOS, A. L. E. et al. Purification and Biophysical Characterization of a mannose/N-Acetyl-D-Glucosamine-Specific Lectin from *Machaerium acutifolium* and Its Effect on Inhibition of Orofacial Pain via TRPV1 Receptor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 664, p. 149–156, 30 mar. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.009>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SASTRY, M. V. 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, 5 set. 1986. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3745164>. Acesso em: 13 nov. 2022.

SCHOUPE, D. et al. Mutational Analysis of the Carbohydrate Binding Activity of the Tobacco Lectin. **Glycoconjugate journal**, v. 27, n. 6, p. 613–623, ago. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-010-9305-2>. Acesso em: 7 nov. 2022.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of Carbohydrate Recognition by Legume Lectins: Size of the Combining Site Loops and Their Primary Specificity. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 2, p. 433–445, 28 mar. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0863>. Acesso em: 5 nov. 2022.

SHARON, N.; LIS, H. Legume Lectins--a Large Family of Homologous Proteins. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, n. 14, p. 3198–3208, nov. 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1096/fasebj.4.14.2227211>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SHARON, N.; LIS, H. History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, nov. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwh122>. Acesso em: 16 nov. 2022.

SILVA, H. C. et al. Purification and Primary Structure Determination of a Galactose-Specific Lectin from *Vatairea guianensis* Aublet Seeds That Exhibits Vasorelaxant Effect. **Process biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2347–2355, dez. 2012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511312003558>. Acesso em: 11 nov. 2022.

SILVA, M. L. S. Lectin-Based Biosensors as Analytical Tools for Clinical Oncology. **Cancer letters**, v. 436, p. 63–74, 1 nov. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2018.08.005>. Acesso em: 8 fev. 2023.

- SINGH, R.; DAS, H. R. Purification of Lectins from the Stems of Peanut Plants. **Glycoconjugate journal**, v. 11, n. 4, p. 282–285, ago. 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00731199>. Acesso em: 17 nov. 2022.
- SINHA, S. et al. Subunit Assembly of Plant Lectins. **Current opinion in structural biology**, v. 17, n. 5, p. 498–505, out. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2007.06.007>. Acesso em: 27 nov. 2022.
- SOUSA, B. L. et al. High-Resolution Structure of a New Tn Antigen-Binding Lectin from *Vatairea Macrocarpa* and a Comparative Analysis of Tn-Binding Legume Lectins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 59, p. 103–110, fev. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.12.002>. Acesso em: 8 fev. 2023.
- SOUSA, B. L. et al. Structural Characterization of a *Vatairea Macrocarpa* Lectin in Complex with a Tumor-Associated Antigen: A New Tool for Cancer Research. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 72, p. 27–39, mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.12.016>. Acesso em: 29 nov. 2022.
- SULZENBACHER, G. et al. Structural Basis for Carbohydrate Binding Properties of a Plant Chitinase-like Agglutinin with Conserved Catalytic Machinery. **Journal of structural biology**, v. 190, n. 2, p. 115–121, maio 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.01.013>. Acesso em: 8 fev. 2023.
- TERWISSCHA VAN SCHELTINGA, A. C. et al. Crystal Structures of Hevamine, a Plant Defence Protein with Chitinase and Lysozyme Activity, and Its Complex with an Inhibitor. **Structure**, v. 2, n. 12, p. 1181–1189, 15 dez. 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(94\)00120-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(94)00120-0). Acesso em: 14 fev. 2023.
- TIAN, C. et al. ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. **Journal of chemical theory and computation**, v. 16, n. 1, p. 528–552, 14 jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>. Acesso em: 8 fev. 2023.
- TRANSUE, T. R. et al. Structure of Benzyl T-Antigen Disaccharide Bound to *Amaranthus Caudatus* Agglutinin. **Nature structural biology**, v. 4, n. 10, p. 779–783, out. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nsb1097-779>. Acesso em: 5 nov. 2022.
- TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 Years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533–551, out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: An automated program for molecular replacement. **Journal of applied crystallography**, v. 30, n. 6, p. 1022–1025, 1 dez. 1997. Disponível em: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889897006766>. Acesso em: 20 nov. 2022.
- VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical reviews in plant sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, nov. 1998. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689891304276>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- VAN DAMME, E. J. M. et al. A Novel Family of Lectins Evolutionarily Related to Class V

- Chitinases: An Example of Neofunctionalization in Legumes. **Plant physiology**, v. 144, n. 2, p. 662–672, jun. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.087981>. Acesso em: 23 nov. 2022.
- VAN DAMME, E. J. M. History of Plant Lectin Research. **Methods in molecular biology**, v. 1200, p. 3–13, 2014. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_1. Acesso em: 12 nov. 2022.
- 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, 29 jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00036>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- VARROT, A.; BASHEER, S. M.; IMBERTY, A. Fungal Lectins: Structure, Function and Potential Applications. **Current opinion in structural biology**, v. 23, n. 5, p. 678–685, out. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2013.07.007>. Acesso em: 2 nov. 2022.
- VASCONCELOS, M. A. de et al. Purification and Primary Structure of a Novel Mannose-Specific Lectin from Centrolobium Microchaete Mart Seeds. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 600–607, nov. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.059>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- VIJAYAN, M. Peanut Lectin Crystallography and Macromolecular Structural Studies in India. **Journal of biosciences**, v. 32, n. 6, p. 1059–1066, set. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-007-0108-y>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- 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, fev. 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/protein/8.2.127>. Acesso em: 8 fev. 2023.
- WANG, X.-W.; VASTA, G. R.; WANG, J.-X. The Functional Relevance of Shrimp C-Type Lectins in Host-Pathogen Interactions. **Developmental and comparative immunology**, v. 109, p. 103708, ago. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2020.103708>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- WEINHOLD, F.; LANDIS, C. R.; GLENDENING, E. D. What Is NBO Analysis and How Is It Useful?. **International Reviews in Physical Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 399–440, 2 jul. 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0144235X.2016.1192262>. Acesso em: 8 fev. 2023.
- WIEDERSCHAIN, G. Y. Glycobiology: Progress, Problems, and Perspectives. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 78, n. 7, p. 679–696, jul. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297913070018>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- WINN, M. 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, abr. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444910045749>. Acesso em: 21 nov. 2022.
- WLOUDWYK, M. A. et al. Lectin Binding Pattern in the Uterus of Pregnant Mice Infected with Trichomonas Foetus. **Journal of comparative pathology**, v. 149, n. 2-3, p. 341–345,

ago. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.12.004>. Acesso em: 22 nov. 2022.

ZHU, Y.; YU, X.; CHENG, G. Insect C-Type Lectins in Microbial Infections. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1204, p. 129–140, 2020. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-15-1580-4_5. Acesso em: 8 fev. 2023.