



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

**ASPECTOS ESTRUTURAIS DO RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS POR
UMA LECTINA MANOSE-ESPECÍFICA DE SEMENTES DE *Dolichos lablab* COM
ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E HIPERNOCICEPTIVA**

FORTALEZA

2013

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

ASPECTOS ESTRUTURAIS DO RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS POR UMA
LECTINA MANOSE-ESPECÍFICA DE SEMENTES DE *Dolichos lablab* COM
ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E HIPERNOCICEPTIVA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

FORTALEZA

2013

VINÍCIUS JOSÉ DA SILVA OSTERNE

ASPECTOS ESTRUTURAIS DO RECONHECIMENTO DE CARBOIDRATOS POR UMA
LECTINA MANOSE-ESPECÍFICA DE SEMENTES DE *Dolichos lablab* COM
ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA E HIPERNOCICEPTIVA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Profa. Dra. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus

A meus pais e avós

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela sua presença em todos os momentos, sempre me dando forças para passar por todos os desafios.

Aos meus familiares, em especial a vó Lúcia, Mãe Alzenir e tia Herbene por acreditarem em mim e darem total apoio para esta importante etapa da minha vida.

Ao irmão Victor por ter me ajudado nessa caminhada.

Aos primos Gabriel e Rodrigo pelos momentos divertidos.

Aos meus companheiros de jornada Vanir Reis e Mayara Queiroz por tudo (o que seria de mim sem vcs!!!).

A todos os meus amigos do BioMol Lab: Júnior, Mayron, Júlia, Jefferson, Cecília, Roniery, Batista, Jorge, Helton, Ito, Cláudia...(ainda falta um monte de gente!!!), obrigado por tudo!! Em especial quero agradecer ao Júnior e a Cecília por serem sempre tão legais!!!

Aos orientadores Prof. Bruno Anderson e Claudener Teixeira por todo o aprendizado e pela oportunidade de desenvolver este trabalho tão importante para mim.

Aos professores Benildo Cavada e Kyria Santiago por terem acreditado em meu potencial e estarem sempre dispostos a me ajudar com o que fosse.

A todos amigos e colegas de curso, em especial Adolph Barreto e João Victor pelos momentos divertidos e importantes pelo qual passamos durante esse curso.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

“Pedras no caminho? Guardo todas,
um dia vou construir um castelo!”

Fernando Pessoa

RESUMO

As lectinas são proteínas que se ligam especificamente a carboidratos e formam complexos com moléculas biológicas e estruturas contendo sacarídeos, sem alterar a estrutura covalente dos ligantes glicosídicos. Estas proteínas têm um grande potencial biotecnológico devido às suas diversas atividades biológicas. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da lectina de *Dolichos lablab* no processo inflamatório e analisar sua interação com carboidratos. A lectina Man/Glc específica de *Dolichos lablab*, denominada FRIL, é uma lectina tetramérica de duas cadeias $(\alpha\beta)_2$ apresentando 67 kDa de massa molecular. A interação de FRIL com carboidratos, tal como determinado por *docking* molecular, mostrou que esta lectina tem afinidade mais elevada para o carboidrato trimanosídeo (-135,618 MDS), seguido por trealosamina (-127,072 MDS) e α -trealose (-121,729 MD). Nos ensaios de inflamação FRIL elicou edema dose-dependente, aumentando volumes da pata dos animais. O efeito edematogênico da lectina foi acompanhada por um aumento significativo na permeabilidade vascular, cerca de 10 vezes maior em comparação com o controle. FRIL também elevou significativamente a hipernocicepção em resposta a estímulo mecânico na primeira, segunda e terceira horas em relação ao controle. A injeção de α -metil-manosídeo associado com a lectina inibiu tanto o edema na terceira hora, quanto a hipernocicepção. A análise histopatológica das patas dos animais mostraram um processo inflamatório agudo que caracteristicamente incluiu infiltração severa de leucócitos mistos, alterações na citoarquitetura, edema e áreas focais de hemorragia. Além disso, ensaios *in silico* confirmaram que FRIL interage preferencialmente com trimanosídeos que constituem o núcleo de *N*-glicanos celulares. Esses dados em conjunto corroboram com a hipótese de que o domínio lectínico e/ou os glicoconjugados contendo resíduos de α -metil-manosídeo e trimanosídeos contribuem para os efeitos inflamatórios de FRIL.

Palavras-chave: *Dolichos lablab*, lectina, FRIL, *docking* molecular, pro-inflamatória.

ABSTRACT

Lectins are proteins that specifically bind to carbohydrates and form complexes with molecules and biological structures containing saccharides, without altering the covalent structure of the glycosyl ligands, these proteins have great biotechnological potential because of its diverse biological activities. The aim of this study was to investigate the effects of *Dolichos lablab* lectin in inflammatory process and analyze its interaction with carbohydrates. The Man/Glc-specific lectin of *Dolichos lablab*, termed FRIL, is a dimeric two-chain ($\alpha\beta$)₂ lectin presenting 67 kDa molecular mass. The interaction of FRIL with carbohydrates, as determined by molecular docking, showed that this lectin has highest affinity to the carbohydrate trimannoside (-135.618 MDS), followed by trehalosamine (-127.072 MDS) and $\alpha\alpha$ -trehalose (-121.729 MDS). FRIL evoked dose-dependent paw edema, increasing animal paw volumes. The edematogenic effect of FRIL was paralleled by a significant increase in vascular permeability, about 10-fold higher compared to control. FRIL also significantly raised the animals flinch reaction in the first, third and fifth hours in response to mechanical stimulation. Injection of α -methyl-D-mannoside associated with FRIL inhibited either edema, at the third hour and hypernociception. The histopathological analysis of animal paws showed a characteristically acute inflammatory process that included severe infiltration of mixed leukocytes, changes in cytoarchitecture, edema and focal areas of hemorrhage. In addition, *in silico* assays confirmed that FRIL preferentially interacts with trimannoside that makes up the core *N*-glycans cell. Therefore, our study supports the hypothesis that the lectin domain and/or the likely glycoconjugates containing α -methyl-D-mannoside and trimannosides residues contribute to the inflammatory effects of FRIL.

Keywords: *Dolichos lablab*, lectin, FRIL, Molecular docking, pro-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASC: área sob a curva.

ConA: lectina ligante a manose/glicose extraída de sementes de *Canavalia ensiformes*.

CRL I: lectina ligante a manose/glicose extraída de sementes de *Cymbosema roseum*.

DRC: Domínio de reconhecimento a carboidrato.

DWL: lectina ligante a manose/glicose extraída de sementes de *Dioclea wilsonii*.

FRIL: lectina ligante a manose/glicose extraída de sementes de *Dolichos lablab*.

Gal: galactose

GalNac: *N*-acetil-galactosamina.

HCl: ácido clorídrico.

IgM: Imunoglobulina M.

MDS: escore dado pelo programa Molegro Virtual Docker.

NPC: células progenitoras neurais.

NaCl: Cloreto de sódio.

PAF: fator de agregação plaquetária.

PDB: Protein Data Bank – Banco de dados de estruturas de proteínas.

PPL 2: quimerolectina ligante a *N*-acetil-galactosamina extraída de sementes de *Parkia platycephala*.

RIP: proteína inativadora de ribossomos.

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-Page: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

TxLCl: lectina do bulbo da tulipa.

UH: unidades de hemaglutinação.

TEMED: *N,N,N',N'*-Tetrametiletlenodiamina.

Tris: trisaminometano.

WGA: lectina do gérmen de trigo.

Xyl: xilose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação das lectinas de plantas em famílias evolutivamente relacionadas	17
Figura 2 – Classificação das lectinas de plantas quanto a estrutura e os domínios de reconhecimento a carboidrato	18
Figura 3 – Imagens da planta e sementes de <i>Dolichos lablab</i>	21
Figura 4 – Estrutura tridimensional de FRIL	22
Figura 5 – Capacidade de FRIL de preservar células progenitoras neurais indiferenciadas em cultura	23
Figura 6 – Exemplo do uso de <i>docking</i> para lectinas	24
Figura 7 – Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório	26
Figura 8 – Emigração de leucócitos para o local da injúria	28
Figura 9 – Cromatograma da fração 0-60% em cromatografia de afinidade Sepharose-manose	35
Figura 10 – <i>Docking</i> molecular de FRIL	38
Figura 11 – SDS-Page do último passo de purificação de FRIL	39
Figura 12 – Resultados dos testes do edema e pata e permeabilidade vascular	40
Figura 13 – Resultados do modelo de hipernocicepção	41
Figura 14 – Fotomicrografias das secções histológicas dos tecidos subplantar das patas	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tabela de purificação da lectina manose-específica de <i>Dolichos lablab</i>	36
Tabela 2 – Efeito inibitório de carboidratos na atividade hemaglutinante de FRIL, comparação com os resultados de MO et al., 1999 e resultados das análises por <i>docking</i>	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Lectinas - Definição e histórico.....	13
1.2. Funções das lectinas de plantas	14
1.3. Classificação das lectinas	15
1.3.1. Classificação baseada em relações de sequência e evolutivas	15
1.3.2. Classificação baseada em estrutura e nos DRCs.	17
1.4. Lectinas de leguminosas.....	19
1.5. Aplicações das lectinas.....	20
1.6. <i>Dolichos lablab</i>	21
1.7. Lectina manose/glicose de <i>Dolichos lablab</i> (FRIL).....	22
1.8. <i>Docking</i> molecular.....	23
1.9. Inflamação	25
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Purificação da lectina de sementes de <i>Dolichos lablab</i>	30
3.1.1. Preparação da farinha	30
3.1.2. Extração e fracionamento das proteínas	30
3.1.3. Cromatografia de Afinidade Manose-Sepharose.....	30
3.2. Atividade hemaglutinante e ensaios de inibição.....	31
3.3. Determinação da massa molecular	32
3.4. <i>Docking</i> molecular.....	32
3.5. Edema de pata e permeabilidade vascular	33
3.6. Hipernocicepção	34
3.7. Análises histopatológicas	34
3.8. Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Purificação.....	35
4.2. Atividade hemaglutinante e ensaios de inibição.....	35
4.3. Determinação da massa molecular	38
4.4. Edema de pata e permeabilidade vascular	39
4.5. Hipernocicepção	41

4.6. Análises histopatológicas	42
5. CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas - Definição e histórico

A palavra lectina vem do latim *legere* que significa “selecionar” ou “escolher”. Lectinas tem sido definidas como proteínas ou glicoproteínas de origem não imune capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos sem, no entanto, alterar suas estruturas químicas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995, KOCOUREK; HOUREJSI, 1983). Essas moléculas estão amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas em praticamente todos os organismos desde microorganismos como vírus e bactérias até animais superiores como os seres humanos. As lectinas também são chamadas de aglutininas devido a sua capacidade de aglutinar células (eritrócitos, por exemplo).

O primeiro relato de uma atividade aglutinante com o envolvimento de lectinas foi realizado em 1860 pelo psiquiatra e neurologista Silas Weir Mitchel, que verificou que uma gota do veneno da cobra *Crotalus durissus* foi capaz de aglutinar rapidamente uma gota de sangue de um pombo (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Em relação a lectinas oriundas de plantas, o primeiro relato que se tem data de 1888 por Peter Hermann Stillmark que, enquanto estudava os efeitos tóxicos da mamona (*Ricinus communis*), verificou o fenômeno da hemaglutinação e, a partir desse dado, a aglutinina tóxica foi isolada de sementes da mamona e foi denominada Ricina. Posteriormente, em 1891, H. Hellin demonstrou que o extrato de sementes de *Abrus precatorius* possuía atividade hemaglutinante, e a hemaglutinina tóxica foi isolada e denominada abrina (MOREIRA et al., 1991). Em 1891, Paul Ehrlich fez uso das duas hemaglutininas tóxicas Ricina e abrina e, com isso, ele foi capaz de estabelecer vários dos princípios fundamentais da imunologia tais como: a especificidade da resposta do anticorpo, o fenômeno da memória imunológica e a transferência da imunidade humoral da mãe para sua progênie (SHARON; LIS, 2004).

Em 1919, se teve o primeiro relato da purificação de uma hemaglutinina de planta, quando James B. Summer purificou a lectina chamada de Concanavalina A ou ConA a partir de sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes*). Passadas duas décadas, no ano de 1936, Summer e Howell relataram que a lectina de *Canavalia ensiformes* (ConA) tinha a capacidade de aglutinar células como eritrócitos e leveduras e também era capaz de precipitar glicogênio em solução. Esses pesquisadores também demonstraram a inibição da atividade hemaglutinante da ConA com o uso de sacarose, e esse é tido como o primeiro relato da que

as lectinas eram capazes de se ligar a carboidratos. A partir desse dados foi sugerido que a lectina era capaz de interagir com os carboidratos encontrados na superfície celular (SHARON; LIS, 2004). Os pesquisadores Boyd e Shapleigh (1954) propuseram o nome de lectinas para essas moléculas, porque verificaram que extratos brutos de várias plantas possuíam perfis de hemaglutinação distintos quando testados com diferentes grupos sanguíneos humanos. As lectinas de plantas eram anteriormente designadas como aglutininas ou fitoaglutininas, mas depois da observação de Boyd e Shapleigh que essas proteínas possuíam certa especificidade pelo tipo sanguíneo foi proposto o nome de lectinas. O número de lectinas purificadas cresceu significativamente a partir da década de 70 com o desenvolvimento das cromatografias de afinidade aplicado a purificação dessas proteínas (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965). Houve um aumento no interesse pelas lectinas quando essas proteínas mostraram ter diversas aplicações biotecnológicas tais como: detecção e caracterização de glicoconjugados (FISHER et al., 1984); análises de mudanças que ocorrem na superfície celular durante processos fisiológicos e patológicos (AUB et al., 1965) e mitogenicidade para linfócitos (MOREIRA et al., 1991). Devido as diversas aplicações biotecnológicas das lectinas, hoje já se tem um grande número de lectinas de plantas, microorganismos, algas e animais, todas purificadas e caracterizadas.

1.2 Funções das lectinas de plantas

As funções fisiológicas das lectinas nas plantas ainda não são bem entendidas. Porém se tem evidências que essas proteínas estão envolvidas no reconhecimento célula-célula e célula com outras moléculas glicosiladas, sugerindo que as lectinas estão envolvidas na regulação das funções fisiológicas das plantas. Outras funções atribuídas as lectinas são: atuação como proteínas de reserva, forte envolvimento nos mecanismos de defesa das plantas contra microorganismos, insetos, herbívoros e fungos, envolvimento na ligação de rizóbios simbiotes, principalmente em plantas leguminosas, para formação dos nódulos nas raízes (DE HOFF et al., 2009).

Uma outra suposição é que as lectinas de plantas podem se ligar a metabólitos secundários e/ou compostos hidrofóbicos como hormônios vegetais e efetuar o carreamento dos mesmos na planta (DELATORRE et al., 2013).

1.3 Classificação das lectinas

1.3.1 Classificação baseada em relações de sequência e evolutivas

Peumans e Van Damme (1998) propuseram uma divisão das lectinas em famílias baseando-se em suas relações de sequência e evolutivas, e de acordo com essa divisão as lectinas são subdivididas nas sete famílias a seguir: lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose, lectinas ligantes a quitina contendo domínios heveínicos, proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2, proteínas relacionadas a jacalina, lectinas de *Amaranthaceae* lectinas e lectinas do floema de *Cucurbitaceae*.

1.3.1. a) Lectinas de leguminosas: correspondem a família de lectinas mais bem estudada, as proteínas desse grupo contém alta similaridade estrutural e de sequência. Se enquadram nesse grupo a lectina extraída de *Canavalia ensiformes* (ConA) e as lectinas de *Cymbosema roseum* (CAVADA et al., 2006, ROCHA et al., 2009). Mais detalhes sobre as lectinas de leguminosas é mostrado adiante. A estrutura da lectina manose específica de *Cymbosema roseum* é mostrada na figura 1A.

1.3.1 b) Lectinas de monocotiledôneas ligantes a manose: é um grupo de lectinas bastante similares que foram encontradas em diversas famílias de monocotiledôneas: *Amaryllidaceae*, *Alliaceae*, *Araceae*, *Orchidaceae*, *Liliaceae* e *Bromeliaceae* (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Quando se compara a sequência desse grupo de lectinas verifica-se que essas lectinas pertencem a uma única superfamília de proteínas evolucionariamente relacionadas. Quanto a estrutura esse grupo de lectinas são formados por 1 a 4 subunidades de aproximadamente 12 kDa e são específicas exclusivamente por manose. Algumas atividades biológicas relatadas para esse grupo de proteínas são as atividades antiviral (KAUR et al., 2007) e inseticida (MAJUNDER et al., 2005, MONDAL et al., 2012). Na figura 1B. tem-se a estrutura da lectina manose-específica de *Gastrodia elata*.

1.3.1. c) Lectinas ligantes a quitina homólogas a heveína: é um grupo de lectinas que possui especificidade por *N*-acetil-glicosamina e possuem como característica principal a presença de um domínio heveínico. Esse domínio heveínico se refere a heveína, uma merolectina ligante a quitina que possui em sua estrutura primária 43 resíduos de aminoácidos e é extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (WAIJUNO et al., 1975). Esse grupo de lectinas possui

como principal representante a lectina de gérmen de trigo (WGA), que é composta por duas subunidades de 18 kDa e é constituído por quatro domínios estruturalmente semelhantes a Heveína (RAIKHEL et al., 1993). A estrutura da lectina WGA é mostrada na figura 1C.

1.3.1. d) Proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2: As RIPs tipo 2 consistem uma típica família de quimerolectinas compostas de um domínio com atividade de inativação de ribossomos (Cadeia A) ligado em tandem com um domínio de reconhecimento a carboidrato (Cadeia B) (BARBIERI et al., 1993). Esse grupo de moléculas é formado por duas cadeias polipeptídicas sintetizadas a partir de uma única molécula precursora. A atividade de inativação dos ribossomos por essas proteínas ocorre devido a sua capacidade de remover um resíduo de adenina específico de um *loop* na grande subunidade do RNA ribossomal 28 S. A cadeia A das RIPs tipo 2 é formada por um polipeptídeo constituído de um domínio adenosina glicosidase e a cadeia B contém o sítio de ligação a carboidrato, essas cadeias estão inicialmente unidas por ligações dissulfeto mas quando há a penetração nas células a ligação é rompida e a cadeia A adquire forte atividade N-glicosidase e, com isso, a proteína consegue inativar ribossomos procarióticos e eucarióticos (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Como exemplos clássicos se tem a Ricina e a Abrina extraídas de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*, respectivamente, e a Pulchelina, lectina extraída de *Abrus pulchellus* (CASTILHO et al., 2008). A estrutura da Abrina é mostrada na figura 1D.

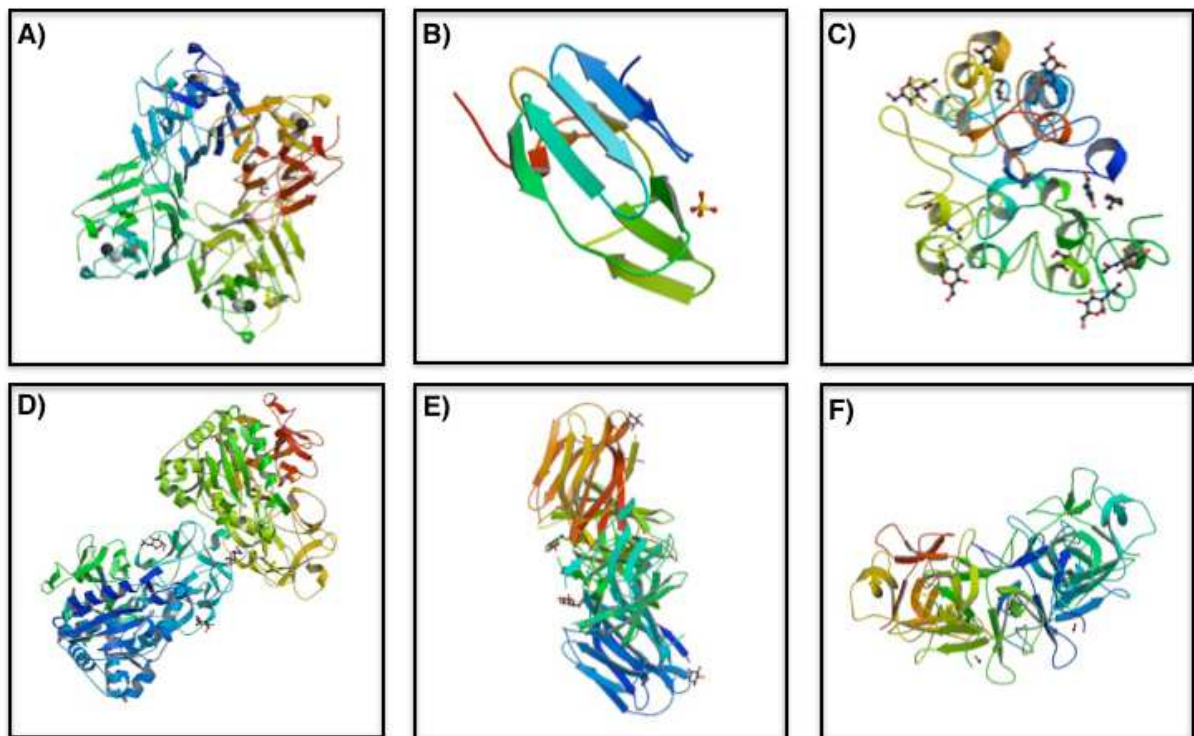
1.3.1. e) Lectinas relacionadas a jacalina: esse grupo de lectinas compreende dois subgrupos diferentes as que reconhecem galactose e as que reconhecem manose. Esse grupo de lectinas recebem essa denominação devido a relação evolucionária e estrutural com as lectinas extraídas de sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Lectinas pertencentes a esse grupo são encontradas em espécies de *Moraceae* e *Convolvulaceae* (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). Sabe-se que as lectinas galactose específicas, principalmente extraída de espécies de *Moraceae* possuem alta afinidade pelo antígeno T expresso em vários tipos de câncer [Gal β (1,3)GalNAc] (JEYAPRAKASH et al., 2002, GAIKWAD; KHAN, 2006). A estrutura da jacalina é mostrada na figura 1E.

1.3.1. f) Lectinas de Amaranthaceae: esse grupo tem como representante principal a Amarantina, lectina extraída de *Amaranthus caudatus*, que não se assemelha a nenhuma outra lectina de planta tanto sequencialmente quanto em sua estrutura tridimensional. Esse grupo contém várias outras lectinas extraídas de plantas do gênero *Amaranthus*, todas elas sendo

ligantes a *N*-acetil-galactosamina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998). A estrutura da Amarantina é mostrada na figura 1F.

1.3.1. g) Lectinas do floema de Cucurbitaceae: representam a menor entre as famílias de lectinas, sendo que um número considerável de espécies de Cucurbitaceae apresentam altas concentrações de lectinas que são específicas a *N*-acetil-glicosamina (WANG et al., 1994). Estruturalmente esse grupo contém lectinas diméricas compostas de duas subunidades idênticas de 24 kDa. Essas lectinas possuem grande similaridade sequencial entre si mas são muito diferentes de outras lectinas de plantas. Até o momento não se tem estruturas resolvidas de lectinas de floema de *Cucurbitaceae*.

Figura 1 – Classificação das lectinas de plantas em famílias evolutivamente relacionadas. Exemplos de lectinas com estrutura tridimensional. a) CRL I (PDB 3A0K), b) Lectina manose específica de *Gastrodia elata* (PDB 1XD6), c) WGA (2UVO), d) Abrina (PBD 2ZR1), e) Jacalina (PBD 1UGW), f) Amarantina (PDB 1JLY).



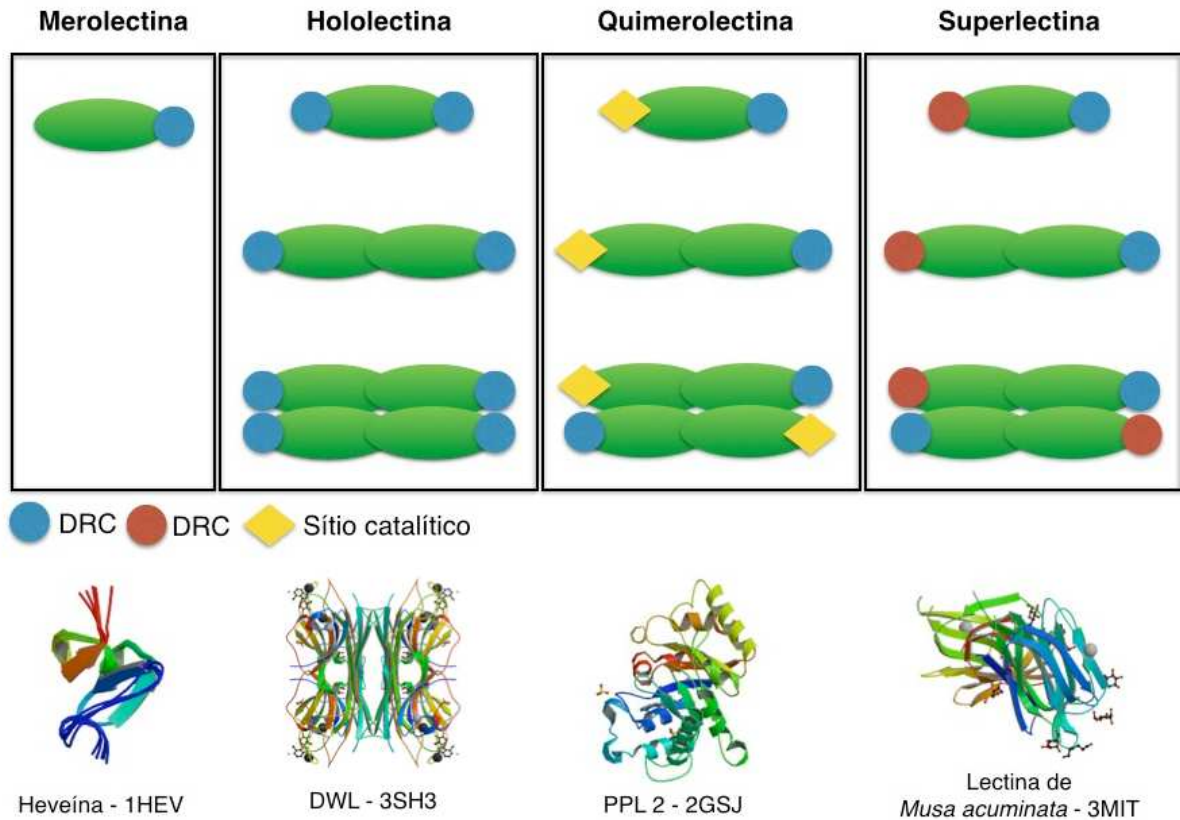
Fonte: Imagem produzida pelo autor.

1.3.2 Classificação baseada em estrutura e nos DRCs.

Estruturalmente Peumans e Van Damme em 1995 e 1998 dividiram as lectinas em quatro classes levando em consideração tanto a estrutura quanto aos domínios de ligação à carboidratos. Essas classes foram: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

Os esquemas e exemplos de estruturas de lectinas de cada um dos grupos é mostrado na figura 2.

Figura 2 – Classificação das lectinas de plantas quanto a estrutura e os domínios de reconhecimento a carboidrato, merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.



Fonte: Imagem adaptada de VAN DAMME et al., 1998.

1.3.2. a) Merolectinas: são as lectinas que possuem em sua estrutura apenas um domínio de ligação a carboidrato sendo, portanto, monovalentes e não possuindo a capacidade de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados por não formarem a ligação cruzada entre as células e/ou glicoconjugados. Como exemplo de merolectina se tem a heveína, lectina ligante a quitina extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (VAN PARIJS et al., 1991).

1.3.2. b) Hololectinas: são as proteínas que possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato em sua estrutura, esse é a classe de lectinas mais comum e corresponde a maioria das lectinas estudadas, as hololectinas possuem a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados devido a sua capacidade de formar ligações cruzadas. Como exemplo dessa classe de lectinas se tem a lectina extraída de sementes de *Dioclea wilsonii* (DWL) (RANGEL et al., 2011).

1.3.2. c) Quimerolectinas: são a classe de lectinas que, além do(s) domínios de ligação a carboidrato, possuem um domínio que pode ser catalítico com uma atividade bem definida e com atividade não relacionada a ligação a carboidrato. De acordo com o número de sítios de ligação a carboidrato as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. Um exemplo típico de quimerolectina é a Ricina que é uma RIP tipo 2 extraída de sementes de *Ricinus communis* que possui um domínio inativador de ribossomo e dois sítios de ligação a carboidrato se comportando como uma hololectina. Um segundo exemplo de quimerolectina é a PPL-2 uma lectina ligante a quitina isolada de semente de *Parkia platycephala*, que possui também um sítio catalítico com atividade endoquitinásica além dos domínios de ligação a carboidrato (CAVADA *et al.*, 2006).

1.3.2. d) Superlectinas: é a classe que engloba as lectinas que possuem pelo menos dois domínios de reconhecimento a carboidrato que reconhecem açúcares estruturalmente distintos. Como exemplo de superlectina se tem a lectina do bulbo da tulipa (TxLCl) que é capaz de se ligar a manose e *N*-acetil-galactosamina e a lectina da banana que possui dois sítios distintos de reconhecimento de laminaribiose e Xyl- β 1,3-Man- α -O-Methyl em domínios distintos (MEAGHER *et al.*, 2005), além da lectina de *Burkholderia cenocepacia* recentemente caracterizada (SULÁK *et al.*, 2010).

1.4 Lectinas de leguminosas

Entre as plantas, a família das leguminosas tem recebido maior atenção, devido as sementes dessas plantas serem particularmente ricas em lectinas. Por esse motivo e a relativa facilidade de purificação dessas proteínas se tem um grande número de lectinas de leguminosas que foram purificadas e caracterizadas (PINTO-JÚNIOR *et al.*, 2013, CORREIA *et al.*, 2011, NASCIMENTO *et al.*, 2012). Esse grupo de lectinas são bastante similares quanto as suas propriedades físico-químicas e estruturais. Porém apesar da grande similaridade entre elas, as lectinas de leguminosas possuem muitos resultados diferentes quando testadas em várias atividades biológicas (REEKE; BECKER, 1988, CAVADA *et al.*, 2001).

Lectinas de leguminosas normalmente consistem de duas ou quatro subunidades com cerca de 25 - 30 kDa. Cada subunidade ou monômero apresenta um sítio de ligação a carboidrato e, geralmente, dois sítios de ligação a íons metálicos (cálcio e manganês).

Comparações realizadas com as sequências primárias dessas lectinas indicam que elas se mantêm bem conservadas durante a evolução (ROUGÉ et al., 1992) Ainda em relação a sequência primária, verifica-se uma alta homologia principalmente nos aminoácidos que estão relacionados ao domínio de reconhecimento a carboidrato (SHARON; LIS, 2002) e os aminoácidos que coordenam os íons metálicos (BREITWIESER, 2003). Muitas dessas lectinas apresentam o fenômeno de oligomerização dependente de pH, onde a proporção de lectinas no estado dimérico e tetramérico depende do pH do meio (CALVETE et al., 1999, NAGANO et al., 2008).

1.5 Aplicações das lectinas

As são bastante empregadas no ramo da biotecnologia. Como foi citado anteriormente algumas lectinas são potentes toxinas e podem ser aplicadas como agentes terapêuticos. Por exemplo a Ricina e a Abrina foram combinadas com anticorpos monoclonais específicos e usadas como immunotoxinas na terapia do câncer (OLSNES, 2004). Lectinas podem ser utilizadas como carreadores de agentes terapêuticos, principalmente com o uso de nanopartículas (GUPTA et al., 2007), além do que essas proteínas são importantes reagentes para investigação de receptores celulares glicosilados de microorganismos, plantas e animais superiores (FRANZ, et al., 2006). Lectinas tem sido aplicadas para identificação e tipagem de microorganismos como: bactérias, fungos e protozoários (LIS; SHARON, 1986). Além disso podem ser usadas em experimentos de tipagem sanguínea onde se utilizam lectinas específicas para grupos sanguíneos diferentes, visando a identificação desse grupo (SHARON; LIS, 2004), tornando-as ferramentas muito úteis em bancos de sangue.

Buscando-se aplicações biotecnológicas para essas proteínas também encontram-se lectinas com atividade inseticida (WANG et al., 2003), fungicida (KLAFKE et al., 2013), bactericida e anti-biofilmes (CAVALCANTE et al., 2011), lectinas com efeito no processo inflamatório (ROCHA et al., 2011, RANGEL et al., 2011, ASSREUY et al., 1997), lectinas com efeito vasodilatador (ASSREUY et al., 2009), lectinas usadas para mapeamento e diagnóstico do câncer (DE MEJÍA; PRISECARU, 2005), lectinas imobilizadas em matrizes visando seu uso para captura de glicoproteínas e glicoproteômica (PINTO-JÚNIOR et al., 2013), etc. Recentemente, também é possível se encontrar o uso dessas moléculas em nanobiotecnologia principalmente visando o seu uso terapêutico (LIU et al., 2010).

1.6 *Dolichos lablab*

A *Dolichos lablab* (Subtribo: *Phaseolinae*), originária da África, é uma das mais antigas plantas cultivadas, tendo relatos de sua cultura inclusive no Antigo Egito e na Índia. É uma leguminosa conhecida popularmente como labe-labe, de talos bastante longos, trepadores e cilíndricos que pode ser encontrada em distintas variedades (ex: *lignosus*, *typicus*, *rongai*) (Figura 3). É anual ou bianual, de hábito indeterminado, de clima tropical e subtropical, não tolerando geadas. Desde a antiguidade, é utilizada na alimentação humana e como forragem verde para bovinos e equinos. Algumas variedades com suas vagens tenras e grãos, são bastante apreciadas também para o consumo humano. O labe-labe contém duas lectinas onde uma delas é ligante a manose (FRIL) e a segunda é uma quimerolectina ligante a galactose com atividade polifenol oxidase (DLL-II) (LATHA et al., 2006).

Reino: *Plantae*

Filo: *Magnoliophyta*

Classe: *Magnoliopsida*

Ordem: *Fabales*

Família: *Leguminosae*

Tribo: *Phaseolae*

Subtribo: *Phaseolinae*

Gênero: *Dolichos*

Espécie: *Dolichos lablab*

Figura 3 - Imagens da planta e sementes de *Dolichos lablab*



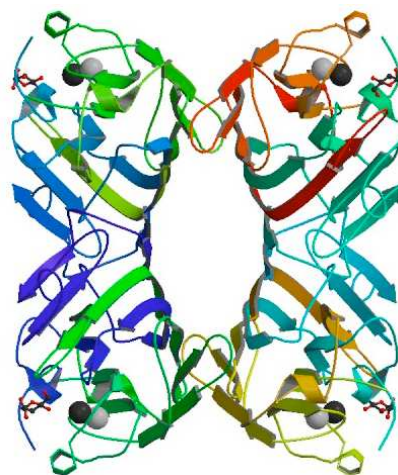
Fonte: Fotos retiradas e adaptadas de: www.lablablab.org. Acesso em 10/11/13 às 17:30h

1.7 Lectina manose/glicose de *Dolichos lablab* (FRIL)

A FRIL é uma lectina tetramérica extraída a partir das sementes da leguminosa *Dolichos lablab*. A lectina possui uma massa aparente de 67.000 daltons e é formada por duas subunidades diferentes (α e β) onde a cadeia α tem uma massa relativa de 15.000 daltons e a cadeia β tem massa relativa de 12.000 daltons. Essas subunidades se associam não covalentemente na forma $\alpha_2\beta_2$, cada um dos monômeros possuindo um domínio de reconhecimento a carboidrato (GOWDA et al., 1994).

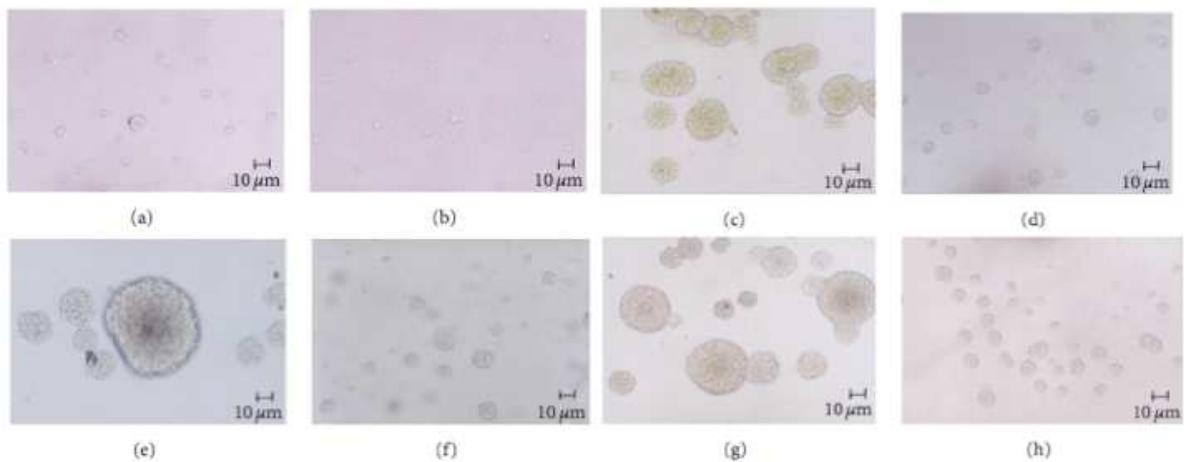
A FRIL foi isolada e parcialmente caracterizada por Sivakumar e Rao (1986), utilizando uma metodologia de cromatografia de afinidade por manose, apresentou especificidade por carboidratos como manose e glicose e carboidratos relacionados. A sua sequência primária foi publicada por Gowda, Savithri e Rao (1994) onde verificou-se uma similaridade de 52 % em relação a sequência da ConA. A estrutura tridimensional da lectina (Figura 4) foi resolvida por cristalografia de raios X usando como modelo para substituição molecular a ConA (HAMELRYCK et al., 2000). Uma aplicação biotecnológica dessa lectina é a sua capacidade de preservar células tronco em cultura (Figura 5) por até um mês sendo capaz de inibir tanto a proliferação de células quanto a sua diferenciação, lembrando que essa manutenção de células é muito importante para muitas aplicações clínicas dessas células (YAO et al., 2008).

Figura 4 – Estrutura tridimensional de FRIL (PDB 1QMO).



Fonte: Imagem retirada e adaptada de HAMELRYCK et al., 2000).

Figura 5 – Capacidade de FRIL de preservar células progenitoras neurais indiferenciadas em cultura. (a, b) – NPCs e NPCs + FRIL em meio sem agente de diferenciação respectivamente, (c, e, g) – NPCs em meio contendo agentes de diferenciação, (d, e, h) – Meio contendo NPCs, agentes de diferenciação e FRIL.



Fonte: Imagem retirada e adaptada de YAO et al., 2008.

1.8 Docking molecular

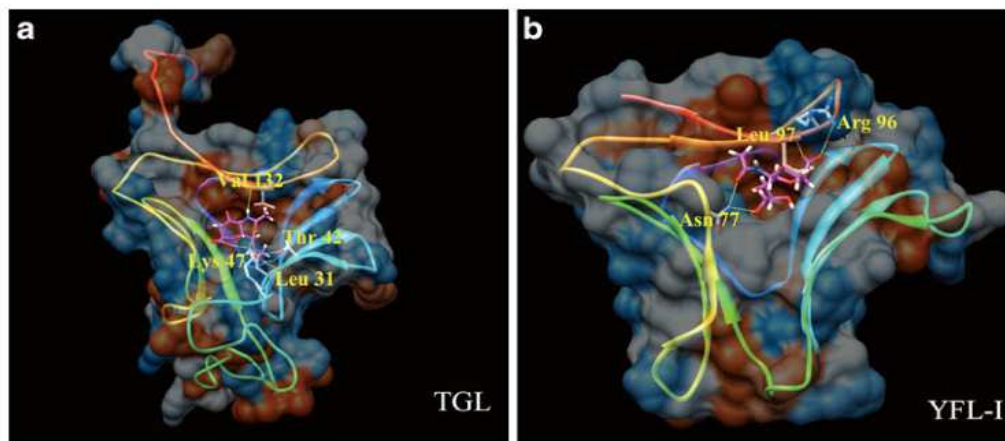
O *docking* molecular é uma técnica computacional e preditiva que tem como função encontrar o melhor ajuste de encaixe entre duas moléculas buscando-se, na maioria das vezes, da orientação preferencial de uma molécula com relação à outra, quando ambas tendem a formar complexos. A orientação assumida pelas moléculas em um complexo depende da complementaridade em tamanho, forma, distribuição de cargas, polaridade e potencial de interações, e da afinidade entre as moléculas (POLANSKI; KIMMEL, 2007).

Análises de *docking* podem ser úteis para a localização de sítios ativos em proteínas, locais preferenciais para ligação de drogas, análises de ligação entre lectinas e carboidratos, medida da força das interações entre as moléculas. Além disso com o uso do *docking* é possível verificar como as alterações estruturais podem afetar a formação do complexo, para isso são feitas análises comparativas com outras moléculas mutadas (REGO, 2012).

O *docking* de moléculas com suas moléculas ligantes seguem uma ordem lógica. Primeiramente tem-se a separação de regiões prováveis para acontecerem ligações entre ambas as moléculas, posteriormente faz-se a sobreposição destas regiões e utiliza-se estatística e funções de pontuação para obtenção dos complexos mais próximos do que acontece experimentalmente. A análise dos encaixes é dada pontuando-se a formação de cada complexo e, esta análise é feita de modo comparativo, em que cada complexo formado é avaliado com uma pontuação, que ao final será posicionado em um *ranking* (SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2005).

Para a realização do *docking* tem que se levar em consideração as propriedades importantes para a interação das proteínas com outras moléculas. Essas propriedades são: o potencial eletrostático, que é uma força atrativa entre grupamentos de aminoácidos de cargas opostas e, estas interações representam um dos tipos de forças que estabilizam a estrutura proteica. Este tipo de interação ocorre quando as cargas negativas de uma região da proteína são neutralizadas pelas excedente de cargas positivas de outra porção da mesma proteína ou de algum ligante, o que resulta na formação de interações eletrostáticas entre essas moléculas, sendo que a força de interação entre elas é maior conforme há o aumento da carga e a diminuição das distâncias entre os sítios de interação (XIONG, 2006). A polaridade das proteínas é uma das características importantes para a interação com ligantes, essa polaridade advém especificamente das cadeias laterais dos aminoácidos que as compõem. Esta propriedade caracteriza a interação com outros componentes químicos e moléculas de água. Cadeias laterais polares podem interagir com outras cadeias laterais polares, com a cadeia principal, ou com moléculas de água, formando ligações de hidrogênio, enquanto que as cadeias apolares somente interagem com moléculas formadas por átomos de mesma eletronegatividade (LESK, 2006). O exemplo do uso de docking para lectinas (XU et al., 2012) é mostrado na figura 6.

Figura 6 – Exemplo do uso de *docking* para lectinas. a) *Docking* da lectina de *Yucca filamentosa* com ácido siálico, b) *Docking* da lectina de *Arum maculatum* com ácido siálico.



Fonte: Imagem retirada de XU et al., 2012.

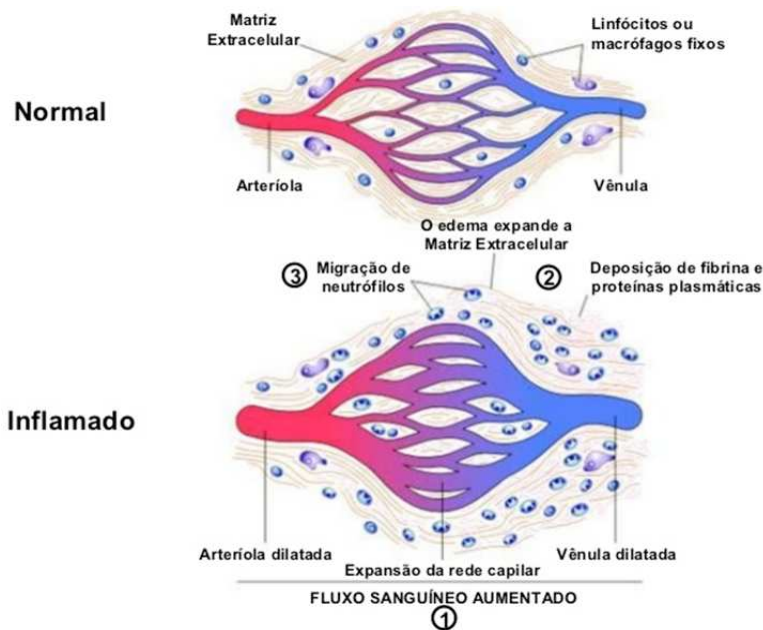
1.9 Inflamação

A inflamação pode ser definida como um evento localizado e protetor elicitado por injúria ou outros traumas que serve para destruir, diluir ou repelir tanto o agente nocivo quanto o tecido injuriado. A resposta inflamatória é desencadeada por sinais químicos liberados por tecidos ou células do sistema imune (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004). Celsus na Roma antiga, caracterizou a inflamação baseando-se em observação visual, usando cinco sinais principais: a vermelhidão (rubor), inchaço (tumor), calor e dor (FANTONE; WARD, 1990). O quinto sinal da inflamação: lesão aguda dos tecidos com perda de função dos órgãos foi mencionado no século XIX por Virchow. Mesmo que a inflamação fosse reconhecida como parte do processo de cura, nos tempos antigos, esse processo foi visto como uma resposta não desejável que era prejudicial ao portador, sendo que essa visão permaneceu até o fim do século XIX. O trabalho de Metchikoff e outros pesquisadores no século XIX contribuíram para a formação de novas percepções na papel da inflamação nas defesas do corpo e no processo de cura (ROCHA E SILVA, 1978).

Os processos inflamatórios podem ser divididos em crônicos e agudos dependendo do tempo de duração e das características patológicas. A inflamação aguda apresenta curta duração (horas a dias) enquanto a inflamação crônica pode durar semanas, meses ou até mesmo anos, este último caracteriza-se pela presença do processo inflamatório simultaneamente com a tentativa de reparo tecidual com conseqüente destruição do tecido e formação de fibrose. Durante o processo inflamatório agudo, muitos mediadores como o óxido nítrico (NO) e prostaglandinas, promovem principalmente vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004). A vasodilatação é uma das primeiras mudanças físicas em resposta ao estímulo inflamatório. Em condição fisiológica normal, as células do endotélio funcionam como uma barreira semipermeável, restringindo a entrada das proteínas plasmáticas no espaço intravascular. Como conseqüência da mudança conformacional do endotélio ocorrem dois eventos importantes: o aumento do leito dos capilares, promovendo maior aporte sanguíneo e levando à vermelhidão e ao calor locais; e aumento da permeabilidade vascular, que ocorre por contração das células endoteliais pós-capilares (MAJNO; PALADE, 1961) e pela abertura de canais intracelulares nas próprias células endoteliais (LAMPUGNANI; DEJANA, 1997). Este último permite a saída de fluido plasmático rico em proteínas do interior dos vasos para o interstício e a presença de proteínas plasmáticas no tecido, como a albumina, provoca um aumento da pressão oncótica intersticial

que leva a um maior extravasamento de plasma. Dependendo do volume de líquido extravasado e da eficiência do sistema de drenagem linfática, pode ocorrer um aumento no volume local: o edema (CARNEIRO, 2009). O edema ocorre justamente devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas (Figura 7), como resultado da liberação de substâncias vasoativas como histamina, bradicinina, leucotrienos, produtos da ativação do complemento e da coagulação, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamado (SHERWOOD; TOLIVER KINSKY, 2004, PIRES, 2011).

Figura 7 – Alterações vasculares e celulares induzidas pelo processo inflamatório.



Fonte: imagem adaptada de Robbins, 2010.

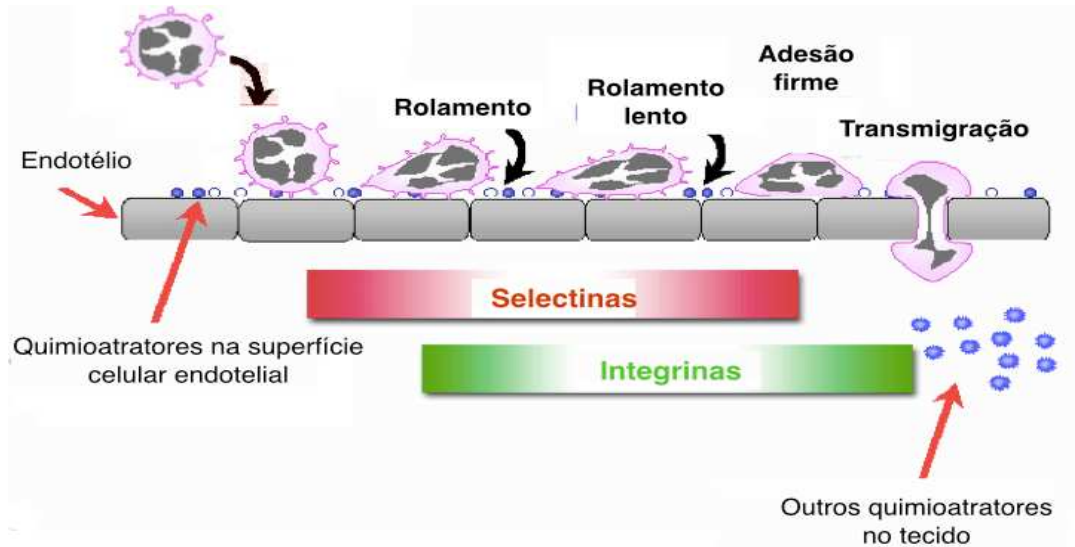
Uma das funções principais da inflamação é recrutar os leucócitos diretamente ao local da injúria. Essas células de defesa atuam no processo inflamatório fagocitando os agentes agressores, impedindo o crescimento de um eventual microorganismo patogênico, removendo restos celulares da área afetada, degradando o tecido necrótico e iniciando a reparação tecidual (FORD-HUTCHINSON, 1992). O extravasamento de leucócitos (Figura 8) da corrente sanguínea para o tecido perivascular (diapedese) ocorre através de três passos coordenados: rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão firme às células endoteliais e a transmigração para o sítio de injúria (SPRINGER, 1995). Os eventos iniciais de migração são mediados pelas moléculas chamadas selectinas. Entre essas moléculas

destacam-se a E-selectina e a P-selectina presentes no endotélio ativado e em plaquetas e a L-selectina, presentes constitutivamente nos leucócitos. O papel desta classe de moléculas de adesão é formar ligações de baixa afinidade entre os leucócitos e a parede endotelial, diminuindo a velocidade destas células dentro das vênulas e promovendo a etapa de captura e rolamento (SPRINGER, 1995, MULLER, 2002).

Estruturalmente as selectinas apresentam um domínio N-terminal semelhante ao domínio lectínico que é responsável por sua propriedade adesiva, um domínio semelhante ao fator de crescimento epidérmico, um número variável de repetições consenso de uma sequência encontrada em proteínas reguladoras do sistema complemento, um domínio transmembrana e uma curta cauda citoplasmática (ROSSITER et al., 1997, CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993).

Enquanto os leucócitos rolam sobre o endotélio movidos pela força do fluxo sanguíneo, eles são ativados por quimiocinas e outros fatores atraentes, mudando seu padrão de expressão de receptores de superfície tanto para estas substâncias, como para as moléculas de adesão (VIDEM; STRAND, 2004). Como consequência da ativação, ocorre uma redistribuição das integrinas leucocitárias, seguindo-se uma mudança conformacional nas mesmas, facilitando assim a aderência firme às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, expressas no endotélio ativado. O aumento da aderência leva a uma diminuição do rolamento dos leucócitos, fazendo com que os mesmos parem, apesar do fluxo sanguíneo contínuo (DIAMOND; SPRINGER, 1993; MULLER, 2002). Após a firme fixação ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrente do fluxo sanguíneo aumentando-se, desta forma a área de contato com a superfície endotelial vascular. Firmemente aderidos ao endotélio, os leucócitos iniciam então o processo de transmigração do espaço intra para o extravascular através das junções endoteliais. Após o extravasamento os leucócitos emigram nos tecidos em direção à região injuriada através de um processo denominado de quimiotaxia ou locomoção através de um gradiente químico. A inflamação aguda finaliza-se com a resolução de todos os eventos do processo inflamatório e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY et al., 2004, ADEREM; SMITH, 2004).

Figura 8 – Emigração de leucócitos para o local da injúria, são mostradas as etapas de rolamento, adesão e transmigração.



Fonte: adaptado de PIRES, 2011.

É importante citar que a liberação de mediadores em tecidos inflamados pode sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva (VANEGAS; SHAIBLE, 2004), levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo, fenômeno chamado de hiperalgesia (SANDKUHLER, 2009).

Em geral, muitas lectinas da tribo *Phaseolae* possuem algum efeito na inflamação, podendo ser pro- e/ou anti-inflamatórias dependendo da via de aplicação. Por exemplo, quando aplicadas sistematicamente várias lectinas da subtribo *Diocleinae* inibem o edema de pata induzido por carragenina, sendo, portanto, anti-inflamatórias por via sistêmica (ASSREUY et al., 1997). Quando as lectinas são aplicadas por via local a resposta tende a ser mais estimulatória da inflamação, tendo-se como exemplo algumas lectinas de *Canavalia* e a lectina de *Cymbosema roseum* que induzem edema e/ou peritonite em ratos, sendo consideradas pro-inflamatórias por via local (BENTO et al., 1993, ROCHA et al., 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Purificar, analisar a interação com carboidratos e investigar o efeito da lectina manose-específica de *Dolichos lablab* (FRIL) em modelos de inflamação e hipernociceção em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Purificar a lectina a partir de sementes de *Dolichos lablab* utilizando metodologias tradicionais de química de proteínas.
- Analisar a massa molecular aparente da lectina usando SDS-PAGE.
- Testar a atividade hemaglutinante de FRIL.
- Realizar a inibição da atividade hemaglutinante de FRIL por carboidratos.
- Analisar a associação de FRIL com diversos carboidratos utilizando metodologias de Docking molecular.
- Verificar o efeito da lectina em modelo de edema de pata em camundongos.
- Testar a lectina em modelo de hipernociceção em camundongos.
- Realizar análises histopatológicas com os animais submetidos aos experimentos com a lectina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Purificação da lectina de sementes de *Dolichos lablab*

3.1.1 Preparação da farinha

Para a obtenção da farinha de *Dolichos lablab*, as sementes foram descascadas e submetidas a trituração através do uso de moedor elétrico. A farinha fina foi armazenada em frascos hermeticamente fechados para posterior utilização.

3.1.2 Extração e fracionamento das proteínas

A extração de proteínas totais foi realizada através da ressuspensão da farinha fina em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (p/v). A mistura foi mantida sob agitação por 12 horas em temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 minutos. O precipitado obtido foi descartado e o sobrenadante foi coletado e denominado extrato bruto. Esse extrato foi submetido a fracionamento proteico por precipitação com sulfato de amônio a 60 % de saturação durante um período de 12 h na temperatura de 4 °C. A fração 0-60% obtida foi centrifugada a 10.000 x g durante 15 min a 4 °C e o precipitado foi ressuspensão em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,15 M e foi usado nas demais etapas de purificação.

3.1.3 Cromatografia de Afinidade Manose-Sepharose

A fração 0-60% foi submetida a cromatografia de afinidade em matriz de Manose-Sepharose. Primeiramente a fração foi centrifugada (10.000 x g / 15 min, 4 °C) para a retirada de proteínas precipitadas, em seguida a fração clarificada foi aplicada na matriz de manose-Sepharose previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 com NaCl 0,15 M. As proteínas não retidas na matriz foram eluídas com o tampão de equilíbrio e a fração retida foi eluída com tampão de equilíbrio adicionado de manose 0,2 M. Foram coletadas frações de 1,5 ml a um fluxo de 1 ml/min. As frações retiradas da coluna foram acompanhadas por espectrofotometria em um comprimento de onda de 280 nm. As frações retidas foram reunidas, dialisadas exaustivamente contra água destilada e liofilizadas (Protocolo adaptado de SIVAKUMAR; RAO, 1986).

3.2. Atividade hemaglutinante e ensaios de inibição

Os testes de hemaglutinação foram aplicados para se determinar a atividade da lectina após cada passo de purificação. Os testes foram realizados utilizando-se placas de microtitulação de 96 poços (contendo 8 fileiras de 12 poços cada), esses poços foram preenchidos com 50 μ L tampão tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 0,15 M e em seguida foram adicionados 50 μ L da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi então diluída seriadamente, com agitação e transferência de 50 μ L para o poço seguinte. Após a diluição das amostras foram adicionados 50 μ L da suspensão de eritrócitos de coelho a 3 % (nativos e tratados com as enzimas proteolíticas tripsina e papaína), sendo que o tratamento dos eritrócitos com as enzimas foi realizado seguindo protocolo de (AINOUZ et al., 1992).

As placas foram incubadas a 37 °C em estufa durante 30 min seguido de incubação a temperatura ambiente por mais 30 min. A hemaglutinação foi avaliada macroscopicamente. O experimento foi realizado em duplicata e poços contendo apenas os eritrócitos foram utilizados como controle.

O título da hemaglutinação (Unidades de hemaglutinação-UH) foi definido como sendo o inverso da maior diluição capaz de apresentar hemaglutinação visível macroscopicamente.

Os ensaios de inibição foram utilizados para se definir os carboidratos capazes de inibir a atividade hemaglutinante da FRIL, bem como as concentrações mínimas requeridas para essa inibição. Em placas de microtitulação de 96 poços foram adicionados 50 μ L de tampão tris-HCl 50 mM pH 7,6 com NaCl 0,15 M em cada poço, 50 μ L de diferentes carboidratos (concentração inicial de 0,1 M preparados em NaCl 0,15 M) foram adicionados nos primeiros poços das fileiras e diluídos seriadamente, seguiu-se com a adição da lectina (4 UH em NaCl 0,15 M) nos poços contendo os carboidratos. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e, em seguida foram adicionados 50 μ L da suspensão de eritrócitos de coelho a 3 %. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa durante 30 min. A inibição foi avaliada macroscopicamente. A concentração inibitória mínima dos carboidratos sobre a atividade hemaglutinante da FRIL foi calculada dividindo-se a concentração inicial dos açúcares pelo fator de diluição. O experimento foi realizado em duplicata e poços contendo apenas os açúcares foram utilizados como controle. Os açúcares utilizados nesse teste foram: D-glicose, D-manose, α -metil-manosídeo, *N*-acetil-D-glicosamina, *N*-acetil-D-manosamina, sacarose, α -lactose, β -lactose, D-galactose e D-xilose.

3.3 Determinação da massa molecular

A avaliação da pureza da amostra bem como a determinação da massa molecular aparente das subunidades foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE) seguindo método descrito por Laemmli (1970) com algumas alterações. O gel de separação (*separation gel*) foi montado em uma concentração de 15 % (proporção de acilamida/bisacrilamida 30:0,8) preparado usando-se tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, contendo SDS 1 %, persulfato de amônio 0,1 % e TEMED 0,04 %. O gel de empilhamento (*stacking gel*) foi preparado na concentração de 4 % em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, 1 % de SDS, 0,1 % de persulfato de amônio e 0,04 % de TEMED.

Uma alíquota da fração retida da cromatografia de afinidade foi solubilizada em tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, 10 % de glicerol, 0,02% de azul de bromofenol e 1 % de SDS.

Como tampão de corrida foi utilizado Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1 %, pH 8,8. A corrida eletroforética foi realizada com amperagem constante de 25 mA, potência de 5 W e voltagem variando até 150 V. O marcador de massa molecular utilizado foi utilizado como padrão de comparação e era composto de: Fosforilase B (97 KDa), albumina sérica bovina (66 HDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa) e inibidor de tripsina (20,1 KDa). Após a corrida as bandas proteicas foram coradas com Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05%, dissolvido em metanol, ácido acético e água a uma proporção 1 : 3,5 : 8 (v/v/v). O excesso de corante foi retirado através de sucessivas lavagens com água destilada aquecida.

3.4 Docking molecular

Para as simulações de *docking* de ligantes a estrutura cristalográfica do monômero de FRIL (PDB - código 1QM0) foi utilizado para todas as simulações. As estruturas 3D dos carboidratos foram desenhadas usando o programa PRODRG (SCHÜTTELKOPF; AALTEN, 2004). Os carboidratos utilizados foram: D-glicose, D-manose, α -metil-manosídeo, N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-D-manosamina, sacarose, α -lactose, β -lactose, D-galactose e D-xilose, $\alpha\alpha$ -trealose, trealosamina e trimanosídeo. As simulações de *docking* molecular foram realizadas usando o programa Molegro Virtual Docker (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O Moldock Score [GRID] foi calculado usando a função de pontuação do programa. A resolução do grid foi 0.30 Å com raio de 15. O algoritmo de busca utilizado foi o Moldock optimizer, com configurações padrão. O número de corridas foram 10 e o número máximo de interações foram 2000. O tamanho da população e o número máximo de posições foram 200 e 10 respectivamente. A energia de interação proteína-ligante foi expressa na forma de escore do Moldock (MDS) em unidades arbitrárias onde um valor mais negativo indica uma interação mais forte (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

3.5 Edema de pata e permeabilidade vascular

O modelo experimental de edema de pata, induzido pela FRIL, em camundongos foi empregado para se verificar a capacidade da lectina de desencadear um processo inflamatório. Foram utilizados camundongos Swiss machos (25-30 g) mantidos em ambiente controlado (ciclo circadiano, 25 °C, comida e água à vontade). Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios para uso de animais na pesquisa (diretrizes NIH) e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE - nº 10130208-8/40)

O edema de pata foi induzido por injeção subcutânea intraplantar de FRIL nas concentrações de 3, 30 e 300 µg/ pata solubilizada em NaCl 0,9 % estéril, o grupo controle recebeu apenas a salina estéril (NaCl 0,9 %; 0,01 ml/pata). O edema foi mensurado por pletismometria no tempo zero (antes dos estímulos) e de 30 minutos a 72 horas após as injeções. Os dados foram expressos como a diferença de volume da pata (em µL) em relação ao tempo zero, ou a área sob a curva (ASC) (unidades arbitrárias). Para se verificar a importância do domínio de ligação a carboidrato no processo edematogênico provocado pela lectina, para isso 300 µg da FRIL foram incubados com o açúcar inibitório α -metil-D-manosídeo (0,1 M) por 60 minutos a 37 °C antes da injeção. A lectina e o açúcar também foram incubados em soluções separadas nas mesmas condições experimentais como controles.

A permeabilidade vascular foi analisada 5 horas após o estímulo com a lectina a 300 µg/pata. Para isso o corante azul de Evans na concentração de 25 mg/Kg foi injetado por via intravenosa uma hora antes da eutanásia. As patas foram então seccionadas, pesadas e incubadas em formamida por 72 horas a 37 °C para a extração do corante. O corante extraído foi estimado por espectrofotometria analisando-se a absorbância a 600 nm (µg de azul de Evans/ g de tecido). (LEME; WILHELM, 1975).

3.6 Hipernocicepção

Os camundongos foram colocados individualmente em caixas de acrílico transparentes em plataformas elevadas de malha de arame para permitir o acesso à face ventral das patas traseiras. Após o período de aclimação a frequência de retirada da pata em resposta a 6 aplicações do filamento de Von Frey foi determinada antes (valor basal) e 1, 3 e 5 horas depois da injeção subcutânea intraplantar de Fril a 300 µg/pata. O grupo controle recebeu salina estéril na concentração de 0,01 ml/pata. A reversão da atividade foi tentada utilizando, para a injeção, a lectina previamente incubada com α -metil-D-manosídeo (0,1 M).

3.7 Análises histopatológicas

As análises histopatológicas dos tecidos das patas foram realizados 5 horas após a injeção subcutânea intraplantar de Fril na concentração de 300 µg/pata. O tecido subplantar das patas foram coletados e fixados em formaldeído 10 % por 24 horas e foram analisados macroscopicamente. As amostras foram então desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol, impregnadas com parafina, aquecidas a 60 °C, blocadas em parafina, seccionadas com cortes de 5 µm por um micrótomo e coradas com eosina-hematoxilina. As mudanças histopatológicas observadas foram: edema e congestão do vaso, extravasação de eritrócitos, necrose e infiltrado inflamatório.

3.8 Análises estatísticas

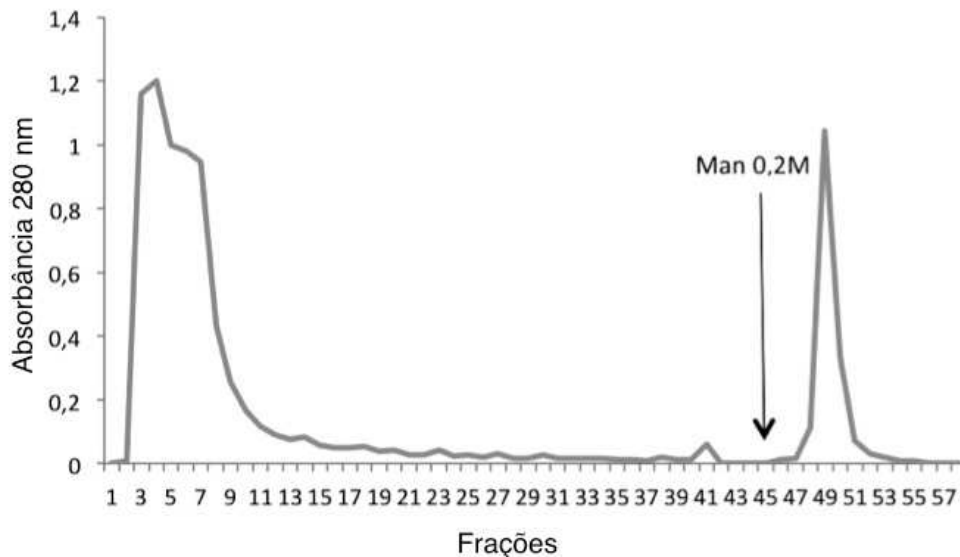
Dados histopatológicos foram expressos como uma mediana (máxima e mínima) e analisadas pelo teste de Mann-Whitney. Todos os outros dados foram expressos como uma média \pm o erro estatístico padrão analisado pelos testes de variância de dois sentidos (ANOVA) e de Bonferroni. A significância estatística foi fixada em $p < 0.05$. Todos os protocolos foram realizados usando 6 a 8 animais por grupo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Purificação

A lectina manose/glicose específica de sementes de *Dolichos lablab* foi purificada através de metodologia baseada em precipitação com sulfato de amônio (0-60 %) seguido de cromatografia de afinidade em coluna de manose-Sepharose. O pico retido foi eluído com 0,2 M de D-manose e toda a atividade hemaglutinante se concentrou nessa fração onde se obteve a lectina 14,73 vezes mais pura em relação ao extrato bruto (Figura 9).

Figura 9 – Cromatograma da fração 0-60% em cromatografia de afinidade Sepharose-manose.



4.2 Atividade hemaglutinante e ensaios de inibição

A atividade hemaglutinante de FRIL foi determinada utilizando-se eritrócitos de coelho a 3 %, tanto nativos quanto tratados com tripsina e papaína. Os resultados são mostrados na tabela 1. Observou-se que a lectina aglutina fortemente eritrócitos de coelho em geral, mas possui maior seletividade para os eritrócitos tratados com as enzimas proteolíticas.

A ação inibitória e a concentração inibitória mínima de diferentes carboidratos sobre a atividade hemaglutinante de FRIL foi testada com a lectina purificada solubilizada em NaCl 0,15 M. O ensaio foi realizado com dez açúcares diferentes e os resultados são mostrados na tabela 2. Eritrócitos de coelho nativos a 3 % foram utilizados nos ensaios. Como resultado

verificou-se que a atividade hemaglutinante de FRIL é completamente inibida por D-glicose (50 mM), D-manose (25 mM), *N*-acetil-D-glicosamina (25 mM) e α -metil-D-manosídeo (6,25 mM) diferentemente dos açúcares D-galactose, D-xylose, *N*-acetil-D-manosamina, sacarose, α -lactose e β -lactose, que não foram capazes de inibir a atividade da lectina nas concentrações testadas. A inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos, determinada como concentração inibitória mínima (MIC), foi comparada com os resultados obtidos anteriormente (MO et al., 1999), onde os ensaios de inibição foram realizados por imunoprecipitação. A comparação é mostrada na tabela 2. Verificou-se que os resultados pelas duas metodologias em respeito aos açúcares inibitórios foram bastante semelhantes.

As simulações de *docking* para a FRIL foram realizadas utilizando-se o programa Molegro Virtual Docker e como modelo para a lectina utilizou-se a estrutura cristalográfica depositada no PDB (código 1QM0). Como resultado se obteve os Moldock score para cada carboidrato testado onde um escore mais negativo indica uma interação teoricamente mais forte: D-glicose (-60,62 MDS), D-manose (-62,65 MDS), α -metil-manosídeo (-68,56 MDS). Interessantemente os valores de inibição obtidos por MO *et al.* (1999) mostraram que FRIL tem especificidade muito alta pelos carboidratos: $\alpha\alpha$ -trealose, trealosamina e trimanosídeo e, então, achou-se interessante investigar essas interações com uso de *docking* molecular e constatou-se que a lectina possui uma interação mais forte pelo trimanosídeo (-135,618 MDS) (Figura 10), seguido por trealosamina (-127,072 MDS) e $\alpha\alpha$ -trealose (-121,729 MDS). Tanto esses quanto os demais valores obtidos por meio de *docking* corroboram tanto com os dados obtidos por imunoprecipitação quanto com os resultados obtidos pelo nosso grupo.

Tabela 1 – Tabela de purificação da lectina manose-específica de *Dolichos lablab* (FRIL).

Etapa	Proteína (mg/ml)^a	Atividade hemaglutinante (U.H/mL)^b	Atividade específica (U.H/mgP)	Índice de purificação (x)
Extrato bruto	0,35	64	182,85	1
Fração (NH₄)SO₂ 0-60%	0,93	512	550,5	3,01
Sepharose-mannose	0,19	512	2694,73	14,73

Tabela 2 – Efeito inibitório de carboidratos na atividade hemaglutinante de FRIL, comparação com os resultados de MO *et al.* (1999) e resultados das análises por *docking*.

<u>Carboidrato</u>	CIM (mM)	I ₅₀ (mM) ^a	MDS ^b
D-manose	25	1,45	-62,95
D-glicose	50	2,5-3,0	-60,62
α-Metil-D-manosídeo	6,25	0,4	-68,56
N-acetil-D-glucosamina	25	0,93	ND
N-acetil-D-manosamina	NI	NI	ND
Sacarose	NI	9,8	ND
α-Lactose	NI	NI	ND
β-Lactose	NI	NI	ND
D-galactose	NI	NI	ND
D-xilose	NI	NI	ND

CIM –Concentração inibitória mínima.

NI – não inibitório em todas as concentrações testadas.

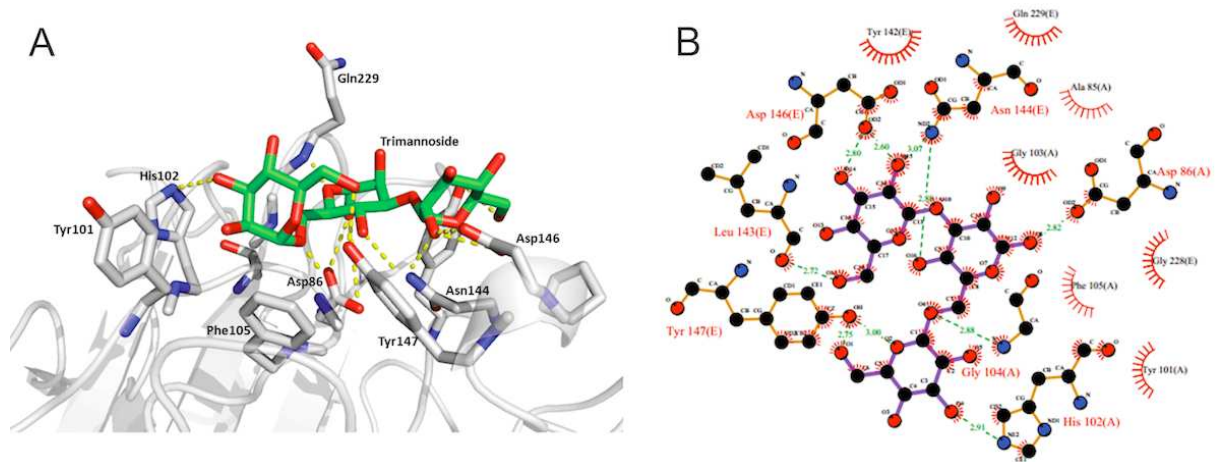
ND - Não determinado

a – Resultados de inibição de FRIL com precipitação de IgM (MO *et al.*, 1999).

b – Escore MolDock (MDS) = E_{inter} + E_{intra} onde E_{inter} é a energia de interação entre a proteína e o ligante.

$$E_{inter} = \sum_{i \in ligand} \sum_{j \in ligand} \left[E_{PLF}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$

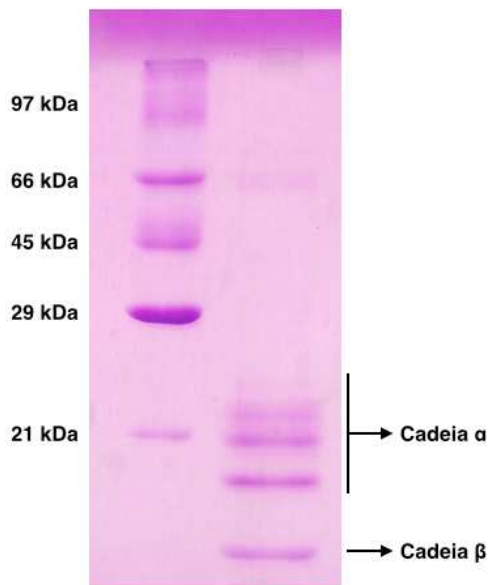
Figura 10 – *Docking* molecular de FRIL. a) Interações do trimanosídeo no domínio de reconhecimento a carboidrato. Linhas amarelas representam pontes de hidrogênio, b) Representação Ligplot das interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre o trimanosídeo e o DRC de FRIL.



4.3 Determinação da massa molecular

A determinação da pureza da amostra após os passos de purificação bem como a massa molecular aparente das subunidades de FRIL foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % em presença de SDS (Figura 11). Pode-se verificar que a lectina apresenta uma banda de massa aparente de 67 kDa correspondendo a lectina intacta, e apresenta quatro bandas com massas aparentes entre 14 e 22 kDa que correspondem as 4 cadeias α e uma pequena banda de massa aparente 10 kDa correspondente a cadeia β da lectina, demonstrando sua heterogeneidade. Esse padrão eletroforético foi o mesmo encontrado por MO *et al.* (1999). Em FRIL, essa variação na massa relativa das bandas provavelmente ocorre devido a diferente número de *N*-glicanos, processamento diferencial dos *N*-glicanos ou processamento dos aminoácidos no C-terminal (COLUCCI *et al.*, 1999).

Figura 11 – SDS-Page do último passo de purificação de FRIL.



4.4 Edema de pata e permeabilidade vascular

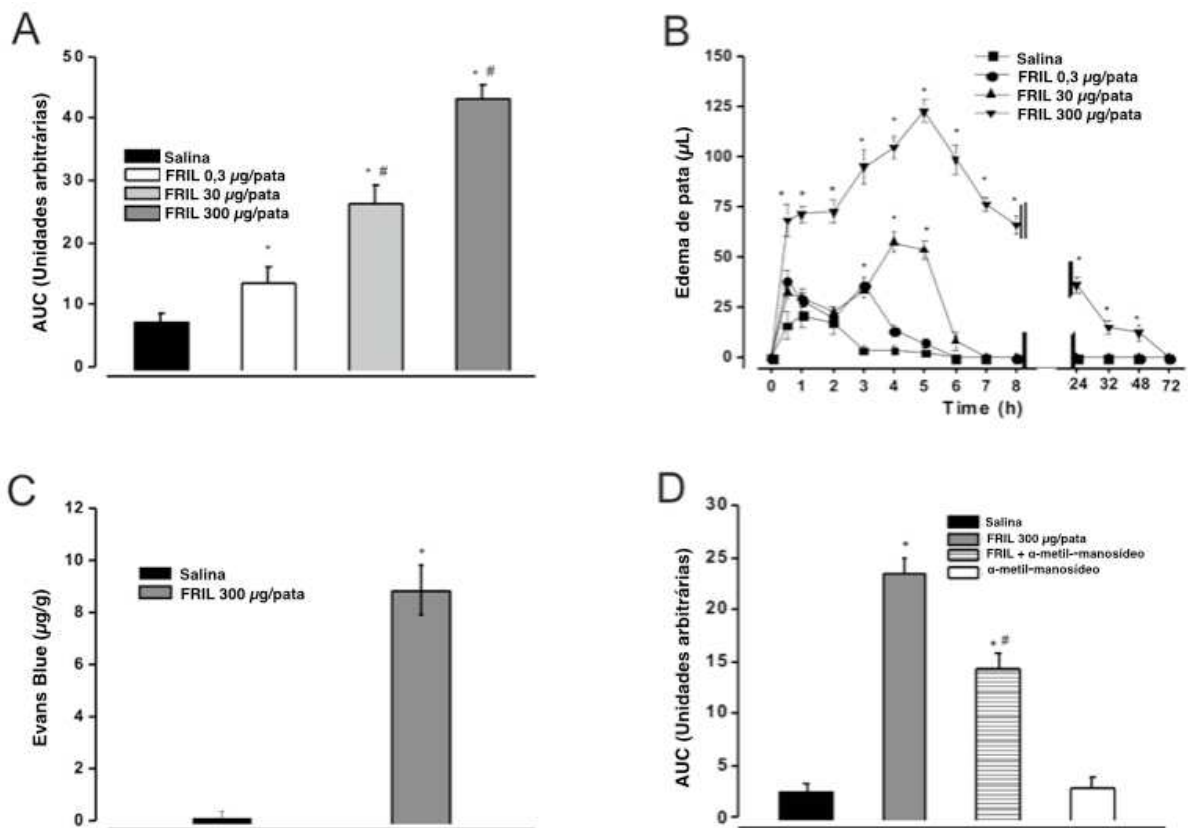
Verificando-se o efeito edematogênico de FRIL injetada por via subcutânea intraplantar nas concentrações de 3, 30 e 300 $\mu\text{g/pata}$, observou-se que a lectina, nas três doses testadas, induziu um efeito edematogênico dose-dependente (Figura 12A, B). O aumento volume da pata do animal foi comparado ao grupo controle que recebeu salina estéril ($7,04 \pm 1,46$ ASC) e obtiveram-se os seguintes resultados: nos animais que receberam 3 $\mu\text{g/pata}$ observou-se um aumento no volume da pata 2 vezes maior que o controle ($13,59 \pm 2,73$ ASC), sendo que nessa concentração de lectina o edema se mostrou significativo apenas na terceira hora ($36,25 \pm 4,2$ μL); na dose de 30 $\mu\text{g/pata}$ o aumento no volume da pata dos animais foram 4 vezes maior em comparação ao controle ($26,21 \pm 3,18$ ASC), o edema, com esse concentração de lectina se iniciou na terceira hora após a injeção ($33,75 \pm 3,75$ μL) e se manteve significativo até a quinta hora; com 300 $\mu\text{g/pata}$ verificou-se um aumento do volume 6 vezes maior que o do controle ($42,98 \pm 2,31$ ASC), e nessa dose o edema iniciou-se com 30 minutos, alcançou seu máximo na quinta hora ($122,5 \pm 5,9$ μL) e durou 48 horas ($12,5 \pm 3,65$ μL) em comparação com o grupo controle ($3,75 \pm 2,63$ μL).

A injeção do açúcar associado a FRIL na dose de 300 $\mu\text{g/pata}$ inibiu o edema induzido pela lectina em 50%. FRIL a 300 $\mu\text{g/pata}$ ($29,45 \pm 4,5$ ASC), FRIL + α -metil-D-manosídeo ($14,85 \pm 3,95$ ASC). Tanto a salina quanto o α -metil-D-manosídeo isoladamente não tiveram

efeito considerável no processo inflamatório. Esses resultados indicaram a participação do domínio de reconhecimento a carboidrato na indução do edema de pata (Figura 12D).

Com relação a permeabilidade vascular o efeito edematogênico de FRIL na dose de 300 µg/pata na quinta hora foi acompanhada por aumento significativo na permeabilidade vascular, o que foi verificado através da quantificação do corante azul de Evans na pata dos animais, esse corante possui a capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas sendo uma medida indireta para o extravasamento proteico e, portanto, permeabilidade vascular. Verificou-se que as patas dos animais que receberam a lectina mostraram uma liberação do corante cerca de 10 vezes maior ($8,84 \pm 0,95$ µg) em comparação com o grupo controle ($0,03 \pm 0,26$ µg azul de Evans/g de peso seco da pata) (Figura 12C).

Figura 12 – FRIL induz edema de pata com aumento de permeabilidade vascular com participação do domínio lectínico. A) Edema expresso como área sob a curva (unidades arbitrárias), B) Edema expresso como aumento do volume da pata do animal, C) Permeabilidade vascular expressa como µg/g de azul de Evans por g de peso seco de pata, D) Reversão do edema com α-metil-D-manosídeo expressa como aumento da pata do animal. *P<0,05 comparado a salina, #P<0,05 comparado a FRIL 0,3 µg/para ou 30 µg/pata.

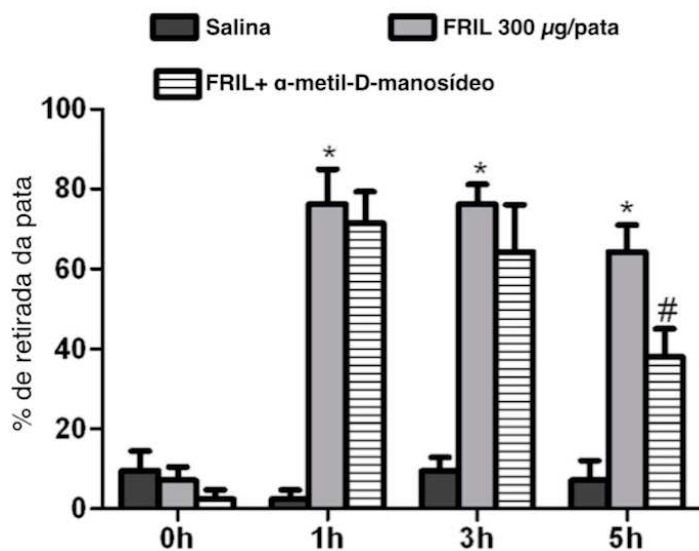


4.5 Hipernociceção

O teste de hipernociceção foi realizado através do uso do filamento de Von Frey. O teste foi realizado em animais que receberam a lectina na dose de 300 $\mu\text{g/pata}$, FRIL aumentou significativamente a resposta de retirada da pata dos animais na primeira hora ($76,17 \pm 8,8 \%$), terceira hora ($76,16 \pm 4,9 \%$) e na quinta hora ($63,87 \pm 7,9 \%$) em resposta ao estímulo mecânico do filamento de Von Frey em comparação com o grupo controle que recebeu salina estéril: primeira hora ($2,30 \pm 2,3 \%$); terceira hora ($9,48 \pm 3,3 \%$) e quinta hora ($7,12 \pm 4,9 \%$).

A aplicação da lectina na dose de 300 $\mu\text{g/pata}$ previamente incubada com α -metil-D-manosídeo reduziu a hipernociceção consideravelmente na quinta hora ($38,06 \pm 7,0 \%$) enquanto a lectina não incubada teve como resultado $63,87 \pm 7,9 \%$ de retirada da pata. A salina e/ou o açúcar isoladamente não exerceram nenhum efeito considerável na hipernociceção (Figura 13).

Figura 13 – Efeito hipernociceptivo de FRIL ocorre via domínio lectínico. * $P < 0,05$ comparado a salina, # $P < 0,05$ comparado a FRIL.



4.6 Análises histopatológicas

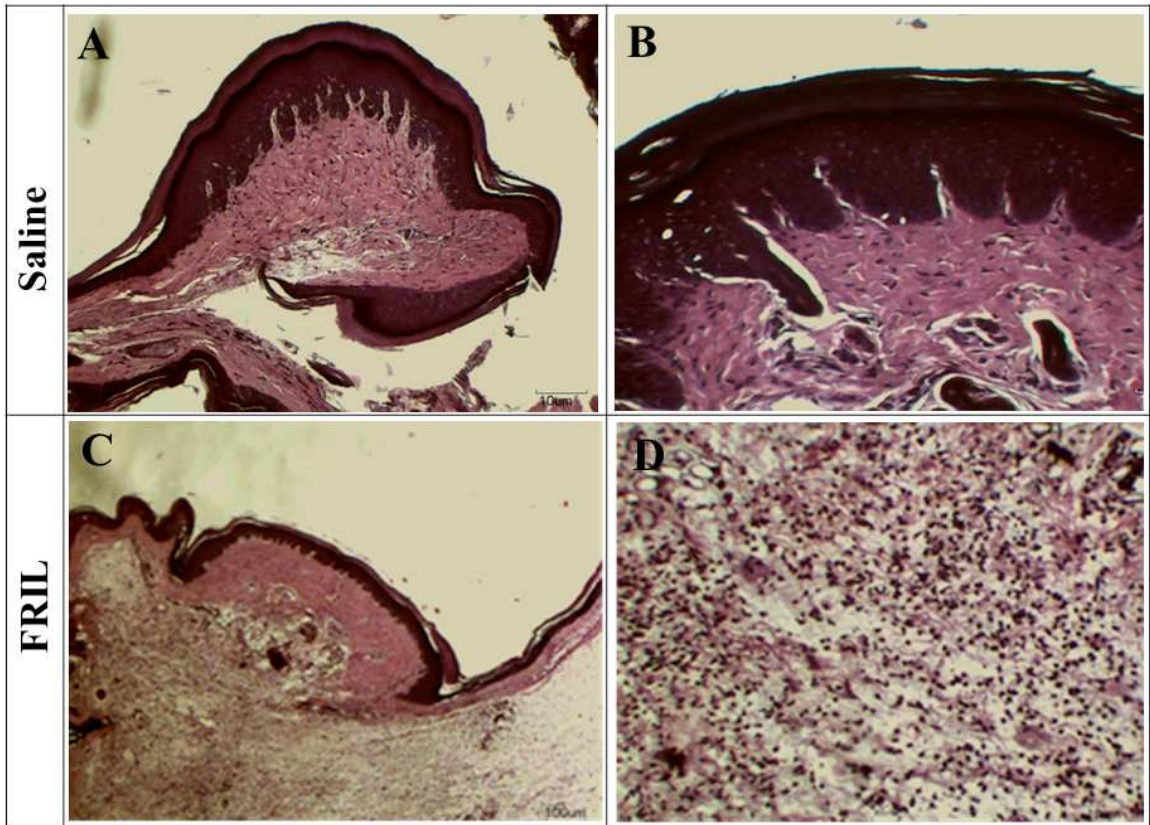
As análises histopatológicas das patas dos animais que receberam a injeção da lectina na dose de 300 µg/pata mostraram, em comparação com o grupo controle, características de processo inflamatório agudo que incluem: infiltrado severo de leucócitos, mudanças na citoarquitetura, edema e área com foco de hemorragia (Figura 14).

Focando-se na fase aguda da resposta inflamatória desencadeada pela FRIL verifica-se a presença de edema, aumento na permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos e hipernocicepção nas patas inflamadas. Muitos mediadores da inflamação, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas estão associadas com esses eventos (MONCADA; HIGGS, 1991). Outras lectinas da subtribo Phaseolae extraídas de *Canavalia gradiflora*, *C. ensiformes* (BENTO et al., 1993), *Dioclea rostrata* (FIGUEIREDO et al., 2009), *C. brasiliensis*, *C. gladiata*, *C. maritima* (ASSREUY et al., 2009) e *Cymbosema roseum* (ROCHA et al., 2011) são exemplos de lectinas que também elicitam respostas inflamatórias que podem ser revertidas pelos seus carboidratos inibitórios. Os processos inflamatórios eliminados por FRIL foram parcialmente inibidos com α -metil-D-manosídeo, o monossacarídeo mais inibitório da lectina.

Através das análises de *docking* se verificou que a lectina interage preferencialmente com os trimanosídeos presentes nas células. Essa interação pode corroborar com a hipótese que a lectina interage com os *N*-glicanos presentes na membrana dos leucócitos, o que pode auxiliar o reconhecimento da selectina que é responsável pela adesão do leucócito no endotélio vascular na cascata de eventos que levam ao processo inflamatório (BEVILACQUA; NELSON, 1993).

O presente estudo suporta a hipótese que o domínio lectínico e/ou os glicoconjugados contendo resíduos de α -metil-D-manosídeo estão envolvidos no efeito inflamatório de FRIL visto que Os *N*-glicanos principais envolvidos no reconhecimento molecular das células são os esqueletos de *high-mannoses* e carboidratos complexos (MITOMA et al., 2007).

Figura 14 – Fotomicrografias das secções histológicas dos tecidos subplantar das patas. A e B) Imagem de tecidos normais (ausência de edema, infiltrados inflamatórios ou áreas com foco de hemorragia (Aumento de 100x e 200x respectivamente). C e D) Imagens do processo inflamatório agudo desencadeado por FRIL, com mudanças na citoarquitetura e infiltrado severo de leucócitos (Aumento de 100x e 200x respectivamente).



5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível purificar uma lectina a partir de sementes de *Dolichos lablab*, denominada FRIL, utilizando-se de protocolo estabelecido anteriormente composto por técnicas de química de proteínas tradicionais como precipitação por sulfato de amônio e cromatografia de afinidade. A lectina mostrou-se heterogênea no SDS-PAGE apresentando quatro bandas para a cadeia α , heterogeneidade que ocorre provavelmente devido a processamentos pós traducionais, e uma banda para a cadeia β .

A lectina mostrou ter uma alta especificidade para monossacarídeos como α -metil-manosídeo e as análises por *docking* molecular revelaram alta especificidade para trealose, trealosamina e trimanosídeo.

Em relação a participação no processo inflamatório FRIL apresenta atividade pró-inflamatória e hipernociceptiva e ambas essas atividades foram parcialmente inibidas por α -metil-manosídeo indicando que ocorrem com a participação do domínio de reconhecimento a carboidrato. Esse é o primeiro relato de uma análise da hipernocicepção em um processo inflamatório desencadeado por uma lectina.

Esses resultados sugerem que FRIL possa ser utilizada como ferramenta importante no estudo dos mecanismos da inflamação e para estudos relacionados a estrutura/função de lectinas pró-inflamatórias. Como próximos passos se buscará resolver a estrutura tridimensional da lectina em uma boa resolução além de buscar aplicá-la em outras atividades biológicas como, por exemplo, imobilização e análises glicoproteômicas.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A., SMITH, K. D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Semin Immunol.** v. 16(1), p. 55-67, 2004.
- AGRAWAL, B. B. L., GOLDSTEIN, I. J. Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochemical Journal.** v. 96, p. 23-25, 1965.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; BENEVIDES, N. M. B.; FREITAS, A. L. P.; COSTA, F. H. F.; CARVALHO, M. R.; JOVENTINO, F. P. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae extracts. **Botanica Marinha.** v. 35, p. 447-479, 1992.
- ASSREUY, A. M., SHIBUYA, M. D., MARTINS, G. J., DE SOUZA, M. L., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T., RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation.** v. 6(3), p. 201-10, 1997.
- ASSREUY, A. M., FONTENELE, S. R., PIRES, A. F., FERNANDES, D. C., RODRIGUES, N. V., BEZERRA, E. H., MOURA, T. R., DO NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S. Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.** v. 380(6)5, p. 09-21, 2009.
- AUB, J. C., SANFORD, B. H., COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **PNAS- Biological Sciences.** v. 54 (2), p. 396-399, 1965
- BARBIERI, L., BATELLI, G. B., STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1154, p. 237-282, 1993
- BENTO, C. A., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T., MOREIRA, R. A., BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions.** v. 38(1-2), p. 48-54, 1993.
- BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M. Selectins. **Journal of Clinic Investigation.** V. 91 , P. 379 - 387. 1993.
- BOYD, W. C., SHAPLEIGH, E.. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science,** v. 119, p. 419, 1954.
- BREITWIESER, O. V. **Leguminous lectins binds non-specifically to DNA.** 135 f. Dissertação de pós doutorado - der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln, 2003.
- CALVETE, J. J.; THOLE, H. H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; ROCHA, I. M. A.; GUIMARÃES, F. N.; CAVADA, B. S. Molecular characterization and crystallization of *Diocleinae* lectins. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1430, p. 367-375, 1999.

CARNEIRO, P. S. **Análise Da Expressão Diferencial Dos Genes Envolvidos Na Resposta Inflamatória Aguda E Crônica E Sua Influência Na Carcinogênese Química Cutânea Em Camundongos Geneticamente Seleccionados Para Alta Ou Baixa Reatividade Inflamatória Aguda.** 166 f. Tese de doutorado - Imunologia - Universidade de São Paulo, 2009

CASTILHO, P. V., GOTO, L. S., ROBERTS, L. M., ARAÚJO, A. P. Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. **FEBS Journal.** v. 275, p. 948-959, 2008.

CAVADA, B. S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T. B., BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science.** v. 2, p. 123-35, 2001

CAVADA, B. S., MARINHO, E. S., SOUZA, E. P., BENEVIDES, R.G., DELATORRE, P., SOUZA, L. A. G., NASCIMENTO, K. S., SAMPAIO, A. H., MORENO, F. B. M. B., RUSTIGUEL, J. K. R., CANDURI, F., DE AZEVEDO JÚNIOR, W. F., DEBRAY, H. Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology and Crystalization.** v. 62, p. 235-237, 2006

CAVADA, B. S.; MORENO, F. B. B.; ROCHA, B. A. M. da.; AZEVEDO, J. R.; W. F. de., CASTELLÓN, R. E. R.; GOERSCH, G. V.; NAGANO, C. S.; SOUZA, E. P. de; NASCIMENTO, K.S.; RADIS-BAPTISTA, G.; DELATORRE, P.; LEROY, Y.; TOYAMA, M. H.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; BARETTINO, D.; DEBRAY, H.; CALVETE, J. J. AND SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and *N*-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal,** v. 273, p. 3962–3974, 2006.

CAVALCANTE, T. T., ROCHA, B. A. M., CARNEIRO, V. A., ARRUDA, F. V. S., DO NASCIMENTO, A. S. F., SÁ, N. C., DO NASCIMENTO, K. S., CAVADA, B. S., TEIXEIRA, E. H. Effect of lectins from *Diocleinae* subtribe against oral Streptococci. **Molecules.** V. 16(5), P. 3530-43, 2011.

COLUCCI, G., MOORE, J. G., FELDMAN, M., CHRISPPEELS, M. J. cDNA cloning of FRIL, a lectin from *Dolichos lablab*, that preserves hematopoietic progenitors in suspension culture. **PNAS USA.** v. 19;96(2), p. 646-50, 1999.

CORREIA, J. L., DO NASCIMENTO, A. S., CAJAZEIRAS, J. B., GONDIM, A. C., PEREIRA, R. I., DE SOUSA, B. L., DA SILVA, A. L., GARCIA, W., TEIXEIRA, E. H., DO NASCIMENTO, K. S., DA ROCHA, B. A., NAGANO, C. S., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S. Molecular characterization and tandem mass spectrometry of the lectin extracted from the seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. **Molecules.** v. 16, p. 9077-89, 2011.

CRONSTEIN, B. N., WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis & Rheumatism.** v. 36, p. 147–157, 1993.

DE HOFF, P. L., BRILL, L. M., HIRSCH, A. M. Plant lectins: the ties tha bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetics and Genomics.** v. 282, p. 1-15, 2009.

DELATORRE, P., SILVA-FILHO, J. C., ROCHA, B. A., SANTI-GADELHA, T., DA NÓBREGA, R. B., GADELHA, C. A., DO NASCIMENTO, K. S., NAGANO, C. S., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**. v. 95, p. 1697-1703, 2013.

DE MEJÍA, E. G., PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Critic Reviews of Food Science and Nutrition**. v. 45(6), p. 425-45, 2005.

DIAMOND, M. S.; SPRINGER, T. A. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. **Journal Cell Biology**., v. 120, p. 545-556, 1993.

DO NASCIMENTO, A. S., GONDIM, A. C., CAJAZEIRAS, J. B., CORREIA, J. L., PIRES, A. F., DO NASCIMENTO, K. S., DA SILVA, A. L., NAGANO, C. S., ASSREUY, A. M., CAVADA, B. S. Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. **Journal of Molecular Recognition**. v. 25, p. 657-64, 2012

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radical and metabolites in leukocyte- dependent inflammatory reactions. **American Journal of Pathology**. v. 107, p. 395-418, 1982.

FERREIRA, R. R., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T., GOMES, J. C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflammation Research**. v. 45, p. 442-447, 1996.

FIGUEIREDO, J. G., BITENCOURT, F. S., MOTA, M. R., SILVESTRE, P. P., AGUIAR, C. N., BENEVIDES, R. G., NASCIMENTO, K. S., DE MOURA, T. R., DAL-SECCO, D., ASSREUY, A. M., CUNHA, F. Q., VALE, M. R., CAVADA, B. S., ALENCAR, N. M. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**. v. 54(6) p. 736-44, 2009.

FISHER, J., KLEIN, P. J., VIERBUCHEN, M., SKUTTA, B., VHLENBRUCK, G., FISHER, R. Characterisation of glycoconjugates of lectin binding sites in normal alimentary tract as well as in benign and malignant gastic neoplasms. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. V. 32 (7), p. 681-689, 1984.

FORD-HUTCHINSON, A. W. Activation of leukotriene production in granulocytes: effects on cell activation. **Immunological Series**., v. 57, p. 87-106, 1992.

FRANZ, S., FREY, B., SHERIFF, A., GAJPL, U. S., BEER, A., VOLL, R. E., KALDEN, J. R., HERRMANN, M. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. **Cytometry A**. v. 69(4), p. 230-9, 2006.

GAIKWAD, S. M., KHAN, M. I. Binding of T-antigen disaccharides to *Artocarpus hirsuta* lectin and jacalin are energetically different. **Photochemistry and Photobiology**. v. 82, p. 1315-8, 2006.

- GILROY, D. W., LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 3(5), p. 401-16, 2004.
- GOWDA, L. R., SAVITHRI, H. S., RAO, D. R. The complete primary structure of a unique mannose/glucose-specific lectin from field bean (*Dolichos lab lab*). **Journal of Biological Chemistry**. v. 269(29), p. 18789-93, 1994.
- GUPTA, P. N., KHATRI, K., GOYAL, A. K., MISHRA, N., VYAS, S. P. M-cell targeted biodegradable PLGA nanoparticles for oral immunization against hepatitis B. **Journal of Drug Targeting**. v. 15(10), p. 701-13, 2007.
- HAMELRYCK, T. W., MOORE, J. G., CHRISPEELS, M. J., LORIS, R., WYNS, L. The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. **Journal of Molecular Biology**. v. 299(4), p. 875-83, 2000.
- KAUR, A., KAMBOJ, S. S., SINGH, J., SINGH, R., ABRAHAMS, M., KOTWAL, G. J., SAXENA, A. K. Purification of 3 monomeric monocot mannose-binding lectins and their evaluation for antipoxviral activity: potential applications in multiple viral diseases caused by enveloped viruses. **Biochemistry Cell Biology**. v. 85, p. 88-95, 2007
- KLAFKE, G. B., MOREIRA, G. M., MONTE, L. G., PEREIRA, J. L., BRANDOLT, T. M., XAVIER, M. O., SANTI-GADELHA, T., DELLAGOSTIN, O. A., PINTO, L. S. Assessment of plant lectin antifungal potential against yeasts of major importance in medical mycology. **Mycopathologia**. v. 175(1-2), p.147-51, 2013.
- KOCOUREK, J.; HOREKSI, V. A note of the recent discussion of definition of the term "lectin". **In lectins biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry** v. 3, p 3-6, 1983.
- JEYAPRAKASH, A. A., GEETHA RANI, P., BANUPRAKASH REDDY, G., BANUMATHI, S., BETZEL, C., SEKAR, K., SUROLIA, A., VIJAYAN, M. Crystal structure of the jacalin-T-antigen complex and a comparative study of lectin-T-antigen complexes. **Journal of Molecular Biology**. v. 23;321, p. 637-645, 2002.
- LAMPUGNANI, M. G.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 9, p. 674-682, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LATHA, V. L., RAO, R. N., NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). **Protein Expression and Purification**. v. 45(2), p. 296-306, 2006 .
- LEME, J. G., WILHELM, D. L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 56(5), p. 402-7, 1975.
- LESK, M. A. **Introduction to bioinformatics**. 3ed. New York: Oxford. 2006

- LIS, H., SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**. v. 55, p. 35-67, 1986.
- LIU, J., ZHANG, L., WANG, C., XU, H., ZHAO, X. Preparation and characterization of lectin-conjugated chitosan fluorescent nanoparticles. **Molecular Biosystems**. v. 6(6), p. 954-7, 2010.
- MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation. I. Effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**. v. 11, p. 571- 605, 1961.
- MAJUMDER, P., MONDAL, H. A., DAS, S. Insecticidal Activity of *Arum Maculatum* Tuber Lectin and Its Binding to the Glycosylated Insect Gut Receptors. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 53, p. 6725-6729, 2005
- MEAGHER, J. L., WINTER, H. C., EZELL, P., GOLDSTEIN, I. J., STUCKEY, J. A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**. v. 15, p. 1033-42, 2005.
- MITOMA, J. X., BAO, B., PETRYANIK, P., SCHAERLI, J., GAUGUET, S., YU, H., KAWASHIMA, H., SAITO, K., OHTSUBO, J. D., MARTH, K., KHOO, U. H., VON ANDRIAN, J. B., LOWE, M. F. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment, **Nature Immunology**. v. 8:, p. 409-418, 2007.
- MO, H., MEAH, Y., MOORE, J. G., GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of *Dolichos lablab* lectin. **Glycobiology**. v. 9(2), p. 173-9, 1999.
- MONCADA, S., HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 21, p. 361–374, 1991.
- MONDAL, H. A., ROY, A., GUPTA, S. DAS, S. Exploring the Insecticidal Potentiality of *Amorphophallus paeonifolius* Tuber Agglutinin in Hemipteran Pest Management. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 780-790, 2012.
- MOREIRA, R.; AINOUS, I. L.; OLIVEIRA, D.; CAVADA, B. S. Plant Lectins chemical and biological aspects; **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-28, 1991
- MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**. v. 82, p. 521-533, 2002.
- NAGANO, C. S.; CALVETE, J. J.; BARETTINO, D.; PÉREZ, A.; CAVADA, B. S.; SANZ, L. Insights in to the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer Equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. **Biochemical Journal**, v. 409, p. 417 – 428, 2008.
- OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**. v. 44(4), p. 361-70, 2004.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.. The role of lectins in plant defense. **Histochemical Journal**. v. 27, p. 253–271, 1995.

PINTO-JÚNIOR, V. R., DE SANTIAGO, M. Q., OSTERNE, V. J., CORREIA, J. L., PEREIRA-JÚNIOR, F. N., CAJAZEIRAS, J. B., DE VASCONCELOS, M. A., TEIXEIRA, E. H., DO NASCIMENTO, A. S., MIGUEL, T. B., MIGUEL, E. C., SAMPAIO, A. H., DO NASCIMENTO, K. S., NAGANO, C. S., CAVADA, B. S. Purification, partial characterization and immobilization of a mannose-specific lectin from seeds of *Dioclea lasiophylla* mart. **Molecules**. v. 18, p. 10857-69, 2013

PIRES, A. F. **Lectinas isoladas de sementes de *Diocleinae* (Leguminosae; Papilionoideae): modelo para estudos de relações estrutura/função de proteínas**. 150 f. Tese de doutorado - Universidade Estadual do Ceará, 2011.

POLANSKI, A; KIMMEL, M. **Bioinformatics**. New York: Springer. 376 pp; 2007

RAIKHEL, N. V., LEE, H.-I., AND BROEKAERT, W. F.. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 44, p. 591–615, 1993.

REGO, F. O. R. **Análise In Silico De Proteínas: Modelo Baseado Na Apolipoproteína-E Relacionada à Doença de Alzheimer**. Monografia de graduação - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

RAMOS, B. F., ZHANG, Y., ANGKACHATCHAI, V., JAKSCHIK, B. A. Mast cell mediators regulate vascular permeability changes in Arthus reaction. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 262(2) p. 559-65, 1992.

RANGEL, T. B. A., ASSREUY, A. M. S., PIRES, A. F., CARVALHO, A. U., BENEVIDES, R. G., SIMÕES, R. D. C., SILVA, H. C., BEZERRA, M. J., NASCIMENTO, A. S. F., NASCIMENTO, K. S., NAGANO, C.S., SAMPAIO, A.H., DELATORRE, P., ROCHA, B. A. M., FERNANDES, P. M. B., CAVADA, B. S. Crystallization and Characterization of an Inflammatory Lectin Purified from the Seeds of *Dioclea wilsonii*. **Molecules**, v.16, p. 5087–5103, 2011

REEKE, J. G. N., AND BECKER, J. W. Carbohydrate-binding sites of lectins. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 139, p. 35-58, 1988.

ROCHA, B. A., DELATORRE, P., OLIVEIRA, T. M., BENEVIDES, R. G., PIRES, A. F., SOUSA, A. A., SOUZA, L. A., ASSREUY, A. M., DEBRAY, H., DE AZEVEDO, W. F., SAMPAIO, A. H., CAVADA, B. S. Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**. v. 93(5), p. 806-16, 2011.

ROCHA, B. A., MORENO, F. B., DELATORRE, P., SOUZA, E. P., MARINHO, E. S., BENEVIDES, R. G., RUSTIGUEL, J. K., SOUZA, L. A., NAGANO, C. S., DEBRAY, H., SAMPAIO, A. H., DE AZEVEDO, W. F. JR, CAVADA, B. S. Purification, characterization, and preliminary X-ray diffraction analysis of a lactose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.152, p. 383-93, 2009

ROCHA E SILVA M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**. v. 8(1-2), p. 45-9 1978.

ROSSITER, H., ALON, R., KUPPER, T. S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Molecular Medicine Today**. v. 3(5), p. 214-22, 1997.

ROUGÉ, P., BARRE, A., CHANTELAIN, C., PORTHÉ, G. Leguminosae lectins as phenetic and Phylogenetic tools. **In: Advances in Lectin Research**. v. 5, p. 95-122, 1992

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiology Reviews**. v. 89(2), p. 707-58, 2009.

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

SHARON, N., AND LIS, H. How proteins bind to carbohydrates: lessons from legume lectins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 6586-6591, 2002

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research Clinic Anaesthesiology**. v. 18, p. 385-405, 2004.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D., INBAR, Y., NUSSINOV, R., WOLFSON, H.J. PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric *docking*. **Nucleic Acids Research**. v. 33, p. 363- 367; 2005.

SCHÜTTELKOPF, A. W., VAN AALTEN, D. M. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**. v. 60(8), p. 1355-63, 2004.

SPRINGER, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. **Annual Reviews in Physiology**., v. 57, p. 827-872, 1995.

SIVAKUMAR, N., RAO, R. The nature of lectins from *Dolichos lablab*. **Journal of Biosciences**. v. 10, p. 95-109, 1986.

SULÁK, O., CIOCI, G., DELIA, M., LAHMANN, M., VARROT, A., IMBERTY, A., WIMMEROVÁ, M. A TNF-like trimeric lectin domain from *Burkholderia cenocepacia* with specificity for fucosylated human histo-blood group antigens. **Structure**. v. 18(1), p. 59-72, 2010.

THOMSEN, R., CHRISTENSEN, M. H. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular *docking*. **Journal of Medical Chemistry** v. 49, p. 3315–3321, 2006.

VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, v.17, n.6, p.575-692, 1998.

VAN PARIJS, J., BROEKAERT, W. F., GOLDSTEIN, I. J., & PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, p. 258–262, 1991.

VANEGAS, H., SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**. v. 46(3), p. 295-309, 2004.

VIDEM, V.; STRAND, E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 59, p. 25-33, 2004.

WALJUNO, K., SCHOLMA, R. A., BIENTEM, J., MARIONO, A., HAHN, A. M. Amino acid sequence of heveine. **Proc. Int. Rubber Conf., Kuala Lumpur**. v. 2, p. 518-531, 1975.

WANG, M. B., BOULTER, D., GATEHOUSE, J. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*. **Plant Molecular Biology**. v. 24, p. 159-170, 1994.

WANG, W., HAUSE, B., PEUMANS, W. J., SMAGGHE, G., MACKIE, A., FRASER, R., VAN DAMME, E. J. The Tn antigen-specific lectin from ground ivy is an insecticidal protein with an unusual physiology. **Plant Physiology**. v. 132(3), p. 1322-34, 2003.

XIONG, J. **Essential Bioinformatics**. New York: United States of America by Cambridge University Press, 2006. 339p.

Xu, H. L., Li, C. Y., He, X. M., Niu, K. Q., Peng, H., Li, W. W., Zhou, C. C., Bao, J. K. Molecular modeling, *docking* and dynamics simulations of GNA-related lectins for potential prevention of influenza virus (H1N1). **Journal of Molecular Modeling**. v. 18(1), p. 27-37, 2012.

YAO, H., XIE, X., LI, Y., WANG, D., HAN, S., SHI, S., NAN, X., BAI, C., WANG, Y., PEI, X. Legume lectin FRIL preserves neural progenitor cells in suspension culture in vitro. **Clinical and Developmental Immunology**. v. 2008, 2008.