



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado em Biologia Celular e Molecular



VANESSA ERIKA FERREIRA ABRANTES

**A MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA PHA-LIKE DE *Acacia farnesiana*
REVELA MECANISMO ANTI-INFLAMATÓRIO**

Vanessa Erika Ferreira Abrantes

João Pessoa - PB
2013



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado em Biologia Celular e Molecular



VANESSA ERIKA FERREIRA ABRANTES

**A MODELAGEM MOLECULAR DA PROTEÍNA PHA-LIKE DE *Acacia farnesiana*
REVELA MECANISMO ANTI-INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Plínio Delatorre

Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª Tatiane Santi Gadelha

João Pessoa – PB
2013

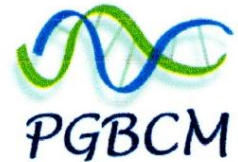
A161m Abrantes, Vanessa Erika Ferreira.
A modelagem molecular da proteína PHA-like de *Acacia farnesiana* revela mecanismo anti-inflamatório / Vanessa Erika Ferreira Abrantes.-- João Pessoa, 2013.
75f. : il.
Orientador: Plínio Delatorre
Co-orientadora: Tatiane Santi Gadelha
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
1. Biologia celular e molecular. 2. Lectina. 3. Acacia farnesiana. 4. AFAL. 5. Atividade anti-inflamatória.
6. Carragenina.

UFPB/BC

CDU: 576+577.2(043)



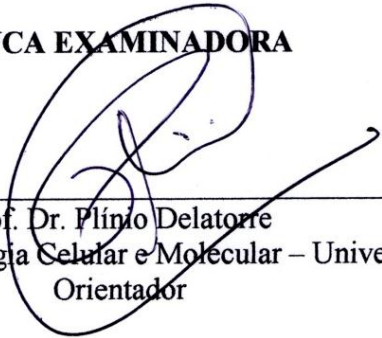
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências Exatas e da Natureza
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado em Biologia Celular e Molecular



Vanessa Erika Ferreira Abrantes

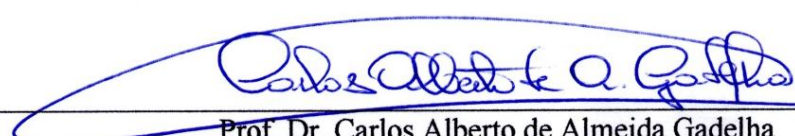
Dissertação de Mestrado Avaliada em 21/02/13

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Plínio Delatorre
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Orientador

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha
Universidade Federal do Ceará
Examinador Externo



Prof. Dr. Carlos Alberto de Almeida Gadelha
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof. Dr. Cleyton Zambeli Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Valdesso e Edna e à minha avó, Rita.

EPIGRAFE

"A busca da verdade não obedece à conveniência de ninguém, nem ao gosto de ninguém, nem à necessidade de ninguém. A verdade é; independente da gente, com a gente, sem a gente, ou apesar da gente."

(Paulo Chaves – Professor da UFPB)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Senhor da minha vida. À Ele sempre será minha maior gratidão.

Ao professor Plínio Delatorre pela orientação e pelo incentivo de sempre. Obrigada por toda ajuda e pelos ensinamentos, professor!

À professora Tatiane Santi Gadelha, pela colaboração no trabalho e também ao professor Carlos Alberto Gadelha, por me permitirem fazer alguns experimentos no BioGeR-Lab e por me acompanharem como tutores no Projeto Reuni, bem como à professora Naila Francis, confiando no meu trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, professor Eleônidas Moura Lima.

Aos colegas de pesquisa, principalmente Raphael Nóbrega, pela grande ajuda com os trabalhos.

À turma de mestrado do PGBCM de 2011, especialmente Suellen Menezes, Nureyev Ferreira, Tarcísio Coutinho e Jonatas Diego que são amigos com os quais pude contar e aprender.

Ao pessoal do BioGer-Lab, prestativos e animados, pelos materiais cedidos.

À todos os professores do PGBCM, pelos ensinamentos passados e contribuição na minha formação.

À professora Darlene Camati Persuhn, por aceitar de tão boa vontade ser revisora do meu trabalho, bem como ao professor Bruno Anderson M. da Rocha e o professor Clayton Zambeli, por aceitarem participar da minha banca avaliadora. À vocês, o meu muito obrigada!

Às secretárias do DBM e do PGBCM, Regina Emy, Dione Alves e Ludmilla Maul pela simpatia, eficiência e disponibilidade em ajudar, bem como os demais funcionários, pela dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES - REUNI), pela concessão da bolsa de mestrado como apoio financeiro ao desenvolvimento científico.

À minha família, especialmente meus pais, por acreditarem em mim mais do que eu mesma e ao meu irmão Vinícius e vó Ritinha. Amo vocês!

Ao meu namorado Hugo André, por todo o apoio e carinho. Esse trabalho também é dedicado a você.

À Vinicius de Moraes Gomes, pela força no inglês e pela amizade de sempre. Muito obrigada, best!

Aos meus demais amigos, que simplesmente por existirem na minha vida já me ajudam a superar os desafios. À todos, **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Lectinas são proteínas e/ou glicoproteínas de origem não imune que possuem, no mínimo, um sítio não-catalítico que se liga de forma reversível a carboidratos e glicoconjugados, o que as tornam modelos ideais de estudos de interações célula-célula, célula-vírus, sendo bons modelos para o desenho de novos fármacos. Algumas proteínas possuem capacidade de se ligar a carboidratos, assemelhando-se às lectinas, porém com algumas diferenças estruturais e funcionais, que as excluem desse grupo. A Fabaceae *Acacia farnesiana* possui em suas sementes uma aglutinina ligante de quitina (AFAL), classificada como PHA-like¹. Seu padrão cromatográfico revelou oligomerização tempo-dependente. Esse comportamento dinâmico dificulta a cristalização dessa proteína, bem como determinação da estrutura tridimensional. Visando compreender melhor a relação estrutura-função, este trabalho teve por objetivo analisar a atividade anti-inflamatória de AFAL através de comparação estrutural com lectinas de leguminosas. Para tanto, fez-se a modelagem e docking molecular com um glicano e a carragenina. A AFAL apresentou um modelo dobrado como um sanduiche de folhas β , que difere do molde utilizado (lectina de *Pisum sativum*) em regiões de *loops*, no número de folhas β e no sítio de ligação à carboidratos. O docking revelou que a proteína se liga à carragenina e ao glicano em sítios diferentes, o que pode ser explicado pela ausência de uma sexta folha β frontal e de duas folhas β na região posterior. A aglutinina de *A. farnesiana* pode inibir a inflamação causada por carragenina, por se ligar a ela, impedindo sua entrada na célula e o desencadeamento de reações típicas do processo inflamatório.

Palavras-chave: *Acacia farnesiana*, AFAL, lectina, atividade anti-inflamatória, carragenina.

¹PHA – Lectina de *Phaseolus vulgaris*

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin that have at least one non-catalytic site which binds reversibly to carbohydrates and glycoconjugates, which makes them ideal models for studies of cell-cell interactions and cell-virus, being good models for the design of new drugs. Some carbohydrate-binding proteins resembling the lectins but with some structural and functional differences, that exclude of this group. The Fabaceae *Acacia farnesiana* has in its seeds an agglutinin chitin-binding (AFAL), classified as PHA-like¹. Its standard chromatographic revealed time-dependent oligomerization. This dynamic behavior complicates the protein crystallization and determining of the three dimensional structure. To better understand the structure-function relationship, this study aimed to examine AFAL anti-inflammatory activity through structural comparison with legume lectins. For both, it was the molecular modeling and docking with a glycan and carrageenan. AFAL model is folded as a β sandwich, which differs from the template used (*Pisum sativum* lectin) in loop regions, number of β -sheets and carbohydrate site. The docking showed that the protein binds to the carrageenan and glycan at different sites, which can be explained by absence of the sixth β -sheet (frontal β -sheets) and two β -sheets in posterior region. The *A. farnesiana* agglutinin can inhibit carrageenan induced inflammation due binding it, preventing its entrance into the cell and triggers the inflammatory process reactions.

Keywords: *Acacia farnesiana*, AFAL, lectin, anti-inflammatory activity, carrageenan.

¹PHA –*Phaseolus vulgaris* lectin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL	Lectina de <i>Arisaema amaurense</i>
AFAL	Aglutinina de <i>Acacia farnesiana</i>
Ala	Alanina
AML ^a	Primeira lectina de <i>Arum maculatum</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Bcl10 (B-cell lymphoma/leukemia)	Células-B de linfoma
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	Ferramenta para alinhamento de sequencias de proteínas
BLOSUM62 (Blocks substitution Matrix at 62%)	Uma matriz de logaritmos de probabilidades entre segmentos de identidade inferior a 62%
BVL	Lectina de <i>Bauhinia variegata</i>
cDNA (complementary DNA)	DNA complementar
CGN	Carragenina
ConA	Concavalina A
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CRD (Carbohydrate Recognition Domain)	Domínio de reconhecimento de carboidratos
DBL	Lectina de <i>Dolichus biflorus</i>
DB58	Segunda lectina de <i>Dolichus biflorus</i>
DOLBI	<i>Dolichus biflorus</i>
Dvir	Lectina de <i>Dioclea virgata</i>
ECorL	Lectina de <i>Erythrina corallodendron</i>
Gal	Galactose
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GalNac-T1	Galactosaminil-transferase humana
GlcNAc	N-acetilglicosamina
GLDA	Glicerol-desidrogenase
GNA	Lectina de <i>Galantus nivalis</i>
GPI	Glicofosfatidilinositol
GS1	Segunda lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>

GS4	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
HA	Hemaglutinina
Ig	Imunoglobulina
IGF (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)	Fator de crescimento tipo insulina
IL-8	Interleucina 8
I κ B α	Inibidor do fator nuclear Kappa B
NCBI (<i>Nacional Center for Biotechnology Information</i>)	Site do Centro Nacional de Informação Tecnológica
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B
PDB (<i>Protein Data Bank</i>)	Banco de dados contendo estruturas tridimensionais de proteínas
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogaeae</i>
PSL	Lectina de <i>Pisum sativum</i>
RIP (<i>Ribosome Inactive Protein</i>)	Proteína inibidora de ribossomo
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROBPS	<i>Robinia pseudoacacia</i>
SBA	Lectina de <i>Glycine max</i>
TGL	Lectina de <i>Tulipa gesneriana</i>
TLR-4 (<i>Toll-like receptor 4</i>)	Receptor tipo Toll 4
YFL	Lectina de <i>Yucca filamentosa</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	3
LISTA DE TABELAS.....	4
1 – INTRODUÇÃO.....	6
1.1 - Lectinas.....	6
1.1.1 – Considerações Gerais.....	6
1.2 – Lectinas de Leguminosas.....	9
1.2.1 Aspectos Moleculares e Estruturais.....	9
1.2.2 Múltiplos Estados Oligoméricos.....	13
1.3 – Proteínas PHA-Like.....	14
1.4 – Aglutinina de <i>Acacia farnesiana</i> (AFAL): Uma PHA-like.....	16
1.4.1 <i>Acacia farnesiana</i> (L.) Will.....	16
1.4.2 Características da AFAL.....	18
1.5 – Aplicações das Lectinas.....	20
1.5.1 Atividade Anti-inflamatória.....	22
1.5.1.1 O processo Inflamatório Causado por Carragenina.....	22
1.6 – Estudo Estrutural de Proteínas.....	26
1.6.1 BLAST: Alinhamento e Análise de Sequências.....	26
1.6.2 Modelagem Molecular.....	27
1.6.2.1 Modelagem Molecular por Homologia.....	27
1.6.2.2 SWISS-MODEL.....	29
1.6.2.3 Docking Molecular.....	31
1.6.2.4 Modelagem Molecular de Proteínas.....	31
2 – OBJETIVOS.....	36
2.1 – Objetivo Geral.....	36

2.2 – Objetivos Específicos.....	36
3 – CONCLUSÃO.....	38
4 – REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE (Manuscrito Submetido).....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da aglutinação por lectinas.....	7
Figura 2 – Interação entre lectinas e carboidratos ou glicoproteínas de superfície celular...	8
Figura 3 – Representação dos modos de dimerização de proteínas.....	11
Figura 4 – Estrutura tridimensional da lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>	15
Figura 5 – Esquema estrutural da aprede celular de fungos.....	16
Figura 6 – Partes vegetativas da <i>Acacia farnesiana</i>	17
Figura 7 – Cromatografia de exclusão molecular do extrato de <i>Acacia farnesiana</i>	19
Figura 8 – Eletroforese e Espectrometria de Massa de AFAL.....	19
Figura 9 – Alinhamento de aminoácidos do N-terminal de AFAL.....	20
Figura 10 – Representação das diferenças estruturais de carrageninas comerciais.....	24
Figura 11 – Modelo dupla-hélice de iota-carragenina.....	24
Figura 12 – Modelo experimental da ativação de IL-8 por CGN em células epiteliais.....	25
Figura 13 – Interface do BLAST.....	27
Figura 14 – Interface do SWISS-MODEL Repository.....	30
Figura 15 – Estrutura da BVL-I/SWISS-MODEL.....	32
Figura 16 – Modelo da região C-terminal de GalNac-T1.....	33
Figura 17 – Lectinas relacionadas à GNA e hemaglutininas do vírus Influenza humano.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lectinas produzidas por técnicas recombinantes.....	9
Tabela 2 – Tipos de associações de dímeros em algumas lectinas.....	12

1 – INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Considerações Gerais

A primeira evidência das lectinas ocorreu em meados de 1888, quando Petter Hermann Stillmark estudava fatores de toxicidade em extratos de mamona (*Ricinus communis*) em sua tese de doutorado, apresentada à Universidade de Dorpart [BARONDES, 1988]. Ele observou que esses extratos continham uma substância com capacidade de aglutinar eritrócitos. À essa substância Stillmark deu o nome de “ricina” [PEUMANS & VAN DAMME, 1998]. Hoje sabe-se que o que ele chamou de ricina era, na verdade, uma mistura de substâncias tóxicas e lectinas não tóxicas [BOLETI, 2003]. A ricina tem dois domínios principais, cada um possui um sítio de ligação à D-galactose e um terceiro domínio com atividade enzimática, que é capaz de ligar-se ao ribossomo e inativar a síntese protéica, caracterizando-o como uma RIP (do inglês – **R**ibosome **I**nactive **P**rotein) [RUTENBER et al., 1991]. Em 1978, o público em geral tomou conhecimento dessa proteína, depois do assassinato do escritor búlgaro Georgi Markov, utilizando ricina na ponta de um guarda-chuva. Após isso, a ricina já foi cotada como potencial arma de guerra por países como Estados Unidos e Inglaterra. Posteriormente, H. Hellin demonstrou a presença de hemaglutinina tóxica em feijão jequiriti (*Abrus precatorius*), a qual chamou de abrina [SHARON & LIS, 2004].

Posteriormente, foram descobertas lectinas não-tóxicas, como as da ervilha (*Pisum sativum* L.) e da lentilha (*Lens culinaris* L.). Isso descartou a ideia de que a toxicidade era característica dessas macromoléculas. Constatou-se também a presença de lectinas em animais, vírus e outros organismos, abandonando a suposição de que eram exclusivamente vegetais [ZANETTI, 2007].

Em 1919, James B. Summer, da Universidade de Cornell, isolou uma lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* e a chamou de concavalina A (ConA). Em 1936, Summer e Howell relataram que ConA aglutinava células, como hemácias e precipitava glicogênio. Mostraram que a aglutinação por ConA foi inibida por sacarose, demonstrando especificidade por açúcar. Na década de 1940, William C. Boyd, da Universidade de Boston e

Karl O. Renkanen, da Universidade de Helsinki, Finlândia, descobriram a especificidade de hemaglutininas por determinados grupos sanguíneos [SHARON & LIS, 2004].

Por possuírem capacidade de se ligar reversivelmente a carboidratos, essas proteínas foram chamadas “lectinas”, do latim *lego* (escolher, selecionar) [BOYD e SHAPLEIGH, 1954]. O termo “aglutinina” foi sugerido por Peumans e Van Damme em 1995, devido à habilidade dessas macromoléculas de aglutinarem eritrócitos e outras células (Figura 1).

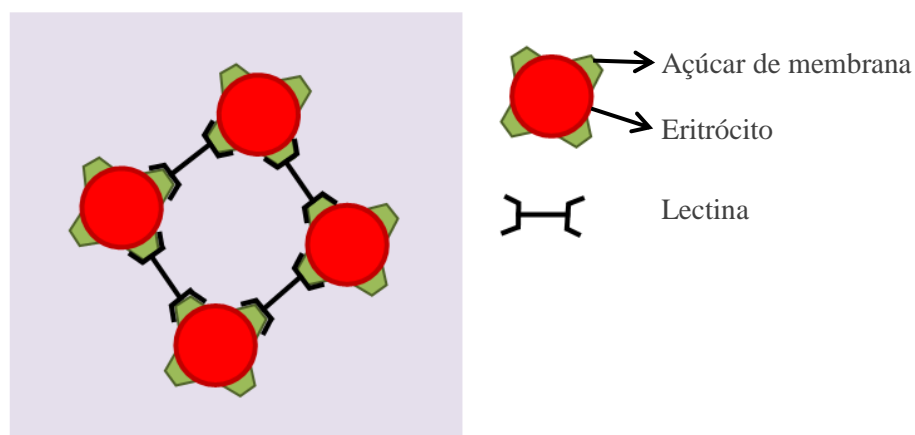


Figura 1 - Representação esquemática da aglutinação por lectinas.

Lectinas podem ser definidas como (glico)proteínas com capacidade de ligarem-se de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos sem alterar a estrutura do sítio de ligação [PEUMANS & VAN DAMME, 1995]. A ligação entre proteína e carboidrato é feita através de pontes de hidrogênio (devido ao grande número de hidroxilas em açúcares), ligações metálicas, forças de Van der Waals e ligações hidrofóbicas. Além disso, algumas lectinas, como aquelas de leguminosas, dependem da ligação com íons, como Ca^{2+} e Mn^{2+} , sendo denominadas de metaloproteínas. [ELGAVISH & SHAANAN, 1997].

Num sentido mais amplo, pode-se afirmar que lectinas possuem a capacidade de atuar como moléculas de reconhecimento no interior das células, na superfície das células (Figura 2) e em fluidos fisiológicos.

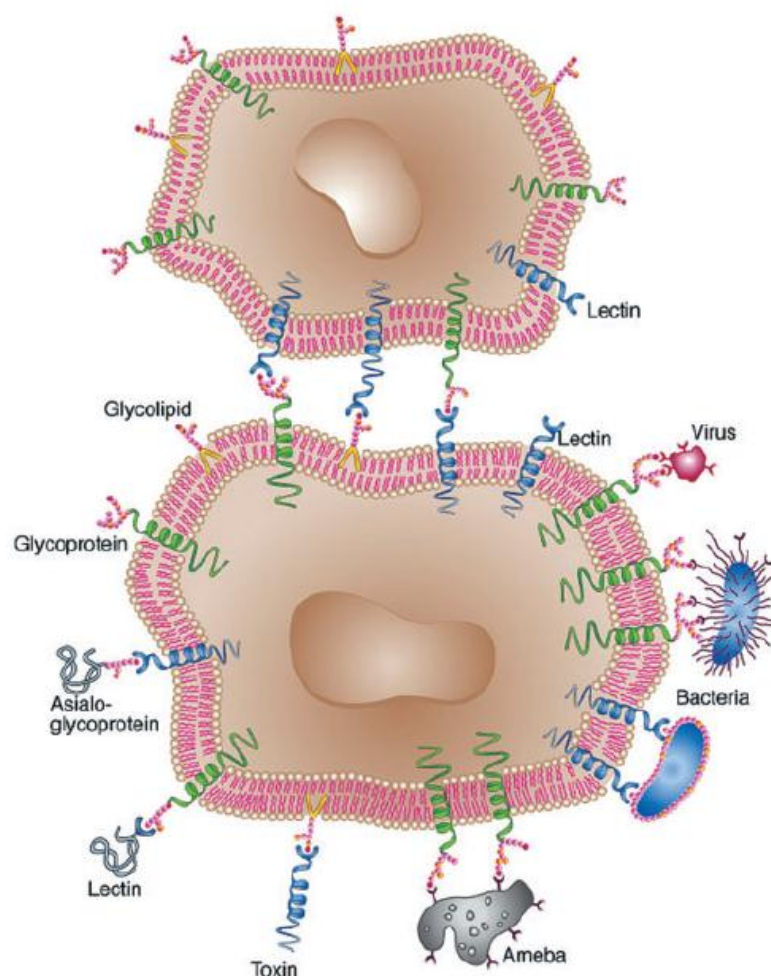


Figura 2 – Interações entre lectinas e carboidratos ou glicoproteínas de superfície celular. Fonte: Retirado de SHARON & LIS, 2004.

As lectinas podem ser encontradas em muitos organismos e estão envolvidas em diversos processos celulares que envolvem reconhecimento de carboidratos, como interações hospedeiro-patógenos, direcionamento de proteínas dentro das células e interação célula-célula [ELGAVISH & SHAANAN, 1997]. Muitos genes de lectinas com atividades específicas já foram clonados [LAM & NG, 2011], desde vegetais como alho [UPADHYAY et al., 2010], fruta-pão [OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009], soja [ADAR et al., 1997], tabaco [LANNOO et al., 2007], arroz [BRANCO et al., 2004], ervilha [STUBBS et al., 1986] até fungos [TATENO et al., 2004], como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Lectinas produzidas por técnicas recombinantes.

Fonte Natural da Lectina	Modificação Genética em Células
Folha do Alho (<i>Allium sativum</i>)	cDNA clonado no plasmídeo pET19b, restrito e expresso em <i>E. coli</i>
Fruta-pão (<i>Artocarpus incise</i>)	cDNA clonado em pET-25b(+) e expresso em <i>E. coli</i>
Fruta-pão (<i>Artocarpus incise</i>)	cDNA clonado e restrito no plasmídeo pUC57 e expresso em <i>E. coli</i>
Soja (<i>Glicine max</i>)	cDNA clonado no plasmídeo PET-3d e expresso em <i>E. coli</i>
Folhas de Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	cDNA clonado em plasmídeo restrito EcoRI/NotI e expresso em <i>E. coli</i>
Raiz de Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	cDNA clonado no plasmídeo pET3D e expresso em <i>E. coli</i>
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	cDNA clonado em plasmídeo restrito HindIII/PstI/BamHI e expresso em <i>E. coli</i>
Corpos de Frutificação de <i>Polyporus squamosus</i>	cDNA clonado em plasmídeo restrito NdeI/BamHI e expresso em <i>E. coli</i>

Adaptado de LAM & NG, 2011.

1.2 Lectinas de Leguminosas

1.2.1 Aspectos Moleculares e Estruturais

Landstein e Raubischek (1908) foram os primeiros a discutir a especificidade das lectinas e observaram que a hemaglutinação causada por extratos de sementes de leguminosas diversas variava de animal para animal e também variava entre os tipos sanguíneos humanos [KENNEDY et al., 1995]. Essas diferenças podem ser explicadas através de estudos estruturais dessas proteínas. É certo que as lectinas possuem ao menos um sítio de ligação a carboidratos, chamado de “domínio de reconhecimento de carboidrato” (CRD), em cada cadeia polipeptídica [ZANETTI, 2007].

Existe uma grande diversidade estrutural entre as lectinas e o número de subunidades por molécula. Além disso, as cadeias polipeptídicas podem ter funções distintas, como atividade enzimática, por exemplo. As subunidades podem se associar por interações hidrofóbicas, pontes dissulfeto e ligações de hidrogênio. Outra característica é como os sítios de ligação a carboidratos estão distribuídos. Os resíduos de aminoácidos vizinhos podem participar da formação do sítio de ligação [QUIOCHO, 1986].

A concavalina A (ConA), presente em sementes de *C. ensiformis* foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e que teve a estrutura tridimensional determinada por cristalografia de Raios X. Os diversos estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais realizados sobre essa proteína faz dela a lectina vegetal melhor caracterizada até hoje [CAVADA et al., 2001].

Outras lectinas da subtribo Diocleinae também foram isoladas e tiveram sua estrutura determinada a partir das propriedades da ConA, tanto do gênero *Canavalia*, como a do feijão brasileiro *C. brasiliensis* (ConBr) [MOREIRA & CAVADA, 1984], quanto de outros gêneros, como a lectina de sementes de *Dioclea virgata* (Dvir) [DELATORRE et al., 2011], além de lectinas de outras subtribos, como a Phaseolinae, entre elas a ECorL (*Erythrina corallodendron*) [ARANGO et al., 1990], DBL (*Dolichus biflorus*) [SCHNELL & ETZLER, 1987], PHA-L (*P. vulgaris*) [HOFFMAN & DONALDSON, 1985], SBA (*Glycine max*) [VODKIN et al., 1983], também da subtribo Viciae, como a lectina da ervilha (PSL -*Pisum sativum*) [HIGGINS et al., 1983] e da lentilha (*Lens culinaris*) [FORIERS et al., 1981].

Para as lectinas ConA-like (nome dado ao grupo dessas proteínas que se seguem o padrão estrutural da lectina de sementes de *C. ensiformis*), o sítio de ligação do carboidrato apresenta uma conservação necessária para interação com os monossacarídeos. A disposição espacial idêntica dos resíduos tem sido atribuída à ligação com os íons Ca^{2+} [SHARMA & SUROLIA, 1997]. A ligação com esses íons conduz à isomerização *trans-a-cis* da ligação peptídica entre Ala207 e Asp208, que é conservada em estruturas cristalinas de lectinas de leguminosas. Esta ligação contribui para a estabilização da bolsa de ligação por orientar as posições dos resíduos Asn14 e Arg228 [DELATORRE et al., 2007]. O dobramento de uma lectina de leguminosa é um “sanduíche” de folhas- β antiparalelas, que foi primeiro descrito para ConA [LORIS et al., 1998].

Cada lectina de leguminosa tem uma subunidade formada por 237 a 253 resíduos de aminoácidos. Apresentam um alto grau de homologia, com identidade primária de até 99%. As

estruturas terciárias de todas elas são as mesmas, exceto por algumas variações nos *loops* [MANOJ & SUGUNA, 2001].

O monômero de lectina é formado por três folhas β antiparalelas. A arquitetura “*jelly roll*” dos monômeros da concavalina A é essencialmente conservada na família Leguminosae. Esta consiste em seis folhas próximas planares ditas folhas “*back*”, sete folhas côncavas ditas folhas “*front*” e uma pequena folha no topo da molécula. Estas folhas são conectadas por muitos loops de variados comprimentos [LORIS et al., 1998; VIJAYAN & CHANDRA et al., 1999]. As estruturas tetraméricas das concanavalinas podem ser descritas como “dímeros de dímeros”, denominados “dímeros canônicos” (Figura 3), caracterizados por doze folhas β , que é resultado do alinhamento antiparalelo de seis pares de folhas β “*back*”. Dois dímeros se associam para formar o tetrâmero [LORIS et al., 1998; LUZ, 2006].

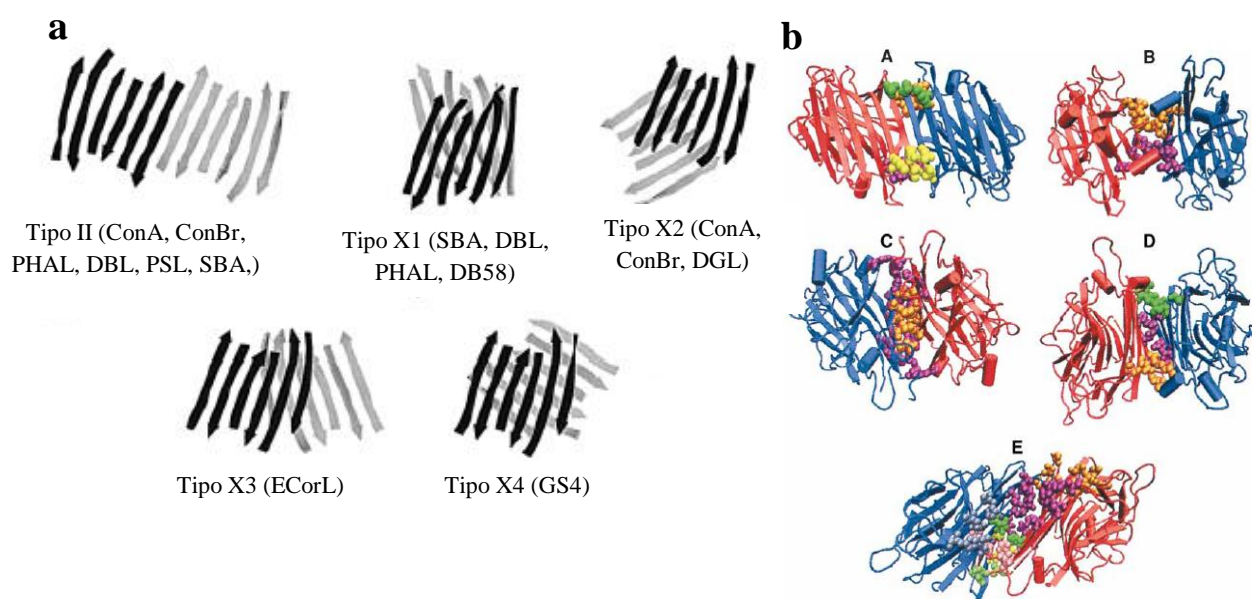


Figura 3 - a) Representação esquemática de folhas β envolvidas em diferentes modos de dimerização em lectinas de leguminosas. Extraída e modificada de Manoj et al., 2001. b) Exemplos das cinco maiores interfaces em lectinas de leguminosas. A-E representam estruturas tridimensionais de lectinas de leguminosas pertencentes aos cinco tipos de interfaces diméricas. As cadeias monomérica estão representadas em azul e vermelho. Apesar das estruturas terciárias serem similares, em todos os cinco casos, as estruturas quaternárias diferem, como visto na figura. Os agrupamentos de resíduos que formam a região de contato entre as cadeias estão representada como esferas de van der Waals. Cada agrupamento está colorido de forma distinta, para diferenciá-los na estrutura tridimensional. (A) Canônico-tipo II (1FAT cadeias A e B); (B) ECorL tipo X3 (1axy); (C) GS4 tipo X4 (1GSL); (D) DB58 tipo X1 (1QNW cadeias A e C); (E) Interface não canônica de ConA tipo X2 (1DGL, cadeias A e C). [BRINDA et al., 2004].

A dimerização, na maioria das vezes, envolve um arranjo lado-a-lado, resultando de uma rede contínua de doze folhas β . Esta associação pode ser descrita como tipo II [JONES & THORTON, 1995]. Esse processo também envolve diferentes tipos de associações “back-to-back” da rede de seis folhas β (chamadas tipo X1, X2, X3 e X4). Vários tipos de associações diméricas podem ser observados na estrutura de lectinas de leguminosas, como mostrado esquematicamente na figura 3. Entre as lectinas diméricas, a de *Pisum sativum* [EINSPAHR et al., 1986] se associa no modelo tipo II e as lectinas tetraméricas de *C. ensiformis*, *C. brasiliensis*, *Glycine max*, *Dolichus biflorus* e a aglutinina de *P. vulgaris* possuem subunidades 1-2 e 3-4 associadas lado-a-lado (tipo II). Todos esses tetrâmeros podem ser considerados como resultantes de associações de dímeros tipo X (Tabela 2).

Tabela 2 – Tipos de Associações de dímeros em algumas lectinas.

Lectina	Estado de Oligomerização	Natureza da(s) interface(s)	Referência
<i>Phaseolus vulgaris</i>	4		[HAMELRYCK et al., 1996]
<i>Glycine max</i>	4	2 tipo II e 2 tipo X1	[DESSEN et al., 1995]
<i>Dolichus biflorus</i>	4		[HAMELRYCK et al., 1999]
<i>Maackia amaurensis</i>	4		[IMBERTY et al., 2000]
<i>Canavalia ensiformis</i>	4	2 tipo II e 2 tipo X2	[SANZ-APARICIO et al., 1997]
<i>Canavalia brasiliensis</i>	4		[SANZ-APARICIO et al., 1997]
<i>Erythrina corallodendron</i>	2	Tipo X3	[SHAANAN et al., 1991]
<i>Griffonia simplicifolia IV</i>	2	Tipo X4	[DELBAERE, et al., 1993]
<i>Pisum sativum</i>	2	Tipo II	[EINSPAHR et al., 1986]

Adaptado de MANOJ, 2001.

Todos os modelos de oligomerização observados até agora em lectinas de leguminosas podem ser explicados pela formação de duas classes de dímeros (tipo II e tipo X) e várias associações de dois desses dímeros em tetrâmeros [MANOJ & SUGUNA, 2001].

A partir da classificação das lectinas em diferentes tipos de associações, podemos dividir as associações quaternárias em Canônica, tipo ECor1 (lectina de *Erythrina corallodendron*), tipo GS4 (lectina de *Griffonia simplicifolia*), tipo DBL (lectina de *Dolichus biflorus*), tipo ConA, tipo PNA (lectina de *Arachis hypogaeae*), tipo GS1 (uma segunda lectina de *Griffonia simplicifolia*), tipo DB58 (uma segunda lectina de *Dolichus biflorus*) e tipo Arcelina-5 (aglutinina de *P. vulgaris*) (Figura 3). Todos são dímeros e tetrâmeros, exceto arcelina-5, que existe como monômero, que é considerada devido à sua similaridade com as lectinas de leguminosas em sequência e estrutura terciária [MANOJ, et al., 2001].

1.2.2 Múltiplos Estados Oligoméricos

A estrutura quaternária da concavalina A em solução é pH e temperatura-dependente. Em pH fisiológico (pH 7,2) e temperatura 0°C, a proteína é um dímero, mas a 37°C é um tetrâmero. Em pH 5,6, na mesma temperatura, é sempre um dímero. Há um intervalo de temperatura em que o modelo de transição dímero-tetrâmero ocorre [HUET & CLAVERIE, 1978; SENEAR & TELLER, 1980].

Entre os casos de variabilidade das associações quaternárias de lectinas, podemos destacar o que foi observado na lectina de *Erythrina corallodendron* (EcorL), no qual foi sugerido que a dimerização é impedida devido aos sítios de glicosilação presentes em cada dímero [SHAANAN et al., 1991], mas a lectina de *Psophocarpus tetragonolobus* tem 63% de homologia com EcorL, mesmo com locais de glicosilação situados longe da região que constitui o dímero canônico, o que não impediria a formação do tal dímero, ela forma dímeros tipo EcorL, demonstrando que a dimerização é ditada por fatores intrínsecos da proteína [PRABU et al., 1998].

A lectina de amendoim [BANERJEE, et al., 1996; BANERJEE et al., 1994] é um tetrâmero não-glicosilado e ainda assim sua interface dimérica não é canônica, sugerindo que a variabilidade em associação quaternária em lectinas de leguminosas não é necessariamente causada por interações envolvendo o açúcar covalentemente ligado [PRABU et al., 1999].

Outro exemplo é a lectina de *Dolichus biflorus* (DB58), conhecida por ser um dímero tipo X1 em solução e um tetrâmero tipo II + X1 na estrutura cristalina [BUTS et al., 2001]. Já a outra proteína da mesma planta (DBL), altamente semelhante à primeira, existe como tipo II +

X1 tanto em solução como no cristal. Foi proposto, então, que ambos podem existir como dímeros e tetrâmeros em solução e que existe um equilíbrio dinâmico entre os dois estados oligoméricos em ambos os casos, onde a preferência por tetrâmeros é mais forte em DBL e por dímeros em DB58 [BUTS et al., 2001]. Esta preferência tem sido atribuída à substituição de um aminoácido, causando a desestabilização do tipo II em DB58 [BRINDA et al., 2004].

Duas outras lectinas, a de *Maackia amaurensis* [IMBERTY et al., 2000] e a de *Lablab purpureus* [HAMELRYCK et al., 2000] existem como tetrâmeros no cristal, mas se apresentam como dímeros em solução [BRINDA et al., 2004].

A arcelina-5 [HAMELRYCK et al., 1996] é um monômero, embora seja capaz de formar um dímero canônico. Isso mostra que outras lectinas oligoméricas podem existir como monômeros, que podem estar em estado de equilíbrio com seus oligômeros mais ordenados [BRINDA ET AL., 2004], o que demonstra que em lectinas de leguminosas, pequenas mudanças na sequência primária podem causar grandes alterações na estrutura quaternária da proteína, mesmo que a estrutura terciária permaneça a mesma [PRABU et al., 1999].

1.3 Proteínas PHA-Like

Apesar das centenas de monossacarídeos que são encontrados na natureza, a grande maioria das lectinas reconhece apenas poucos desses açúcares, principalmente manose, glicose, galactose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, fucose e ácido N-acetilneuramínico. Entretanto, essas proteínas apresentam especificidade por um grande número de oligossacarídeos compostos por esses monossacarídeos [SHARON & LIS, 2003]. Um exemplo disso é a lectina extraída das sementes do feijão comum (*P. vulgaris* L.), denominada PHA-L que no seu processo de isolamento e caracterização não apresentou especificidade por açúcares simples [MOREIRA & PERRONE, 1977].

A PHA-L é uma glicoproteína tetramérica, com as quatro subunidades idênticas, que hemaglutina todos os tipos sanguíneos (Figura 4). Assim como as demais lectinas de leguminosas, possui sítios de ligação a íons metálicos (Ca^{2+} e Mn^{2+}). Além disso, possui sítios de alta afinidade para Adenina [HAMELRYCK et al., 1996].

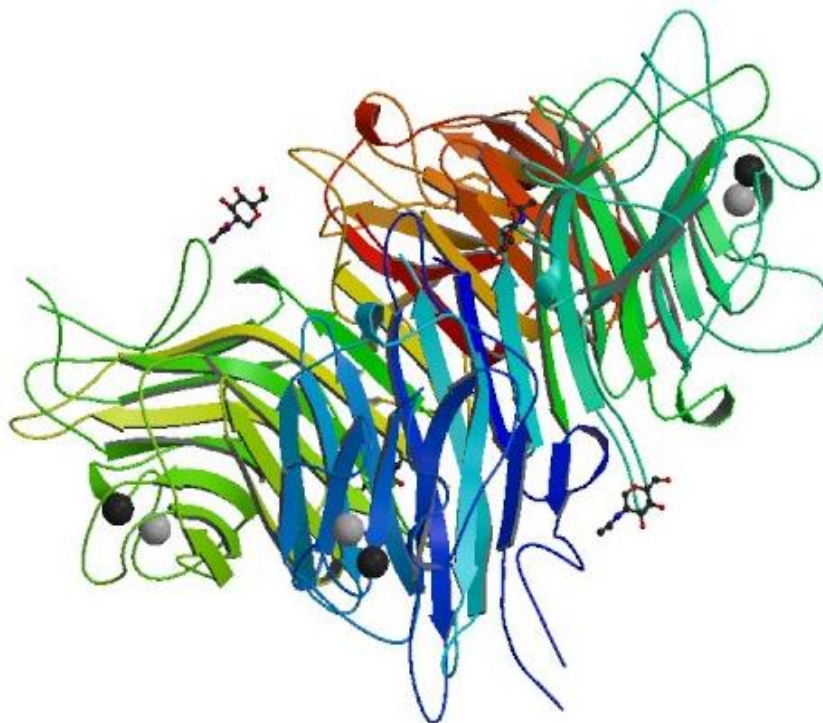


Figura 4 – Estrutura tridimensional da lectina das sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA), representada pelo código 1FAT [<http://www.rcsb.org/pdb> Acesso em 17/12/12].

Existe um grupo de proteínas que possuem propriedades semelhantes às da lectina de *P. vulgaris*, tanto em relação à capacidade de ligação a carboidratos complexos, como na homologia da sequência de aminoácidos. Essas proteínas são caracterizadas como PHA-like. As isolectinas de *P. vulgaris* (PHA) normalmente se ligam a 1,6 N-acetilglicosamina ramificada contendo N-glicanos [SANTI-GADELHA et al., 2008]. Uma PHA-like que se liga à quitina pode representar uma proteína de defesa mais potente contra insetos, fungos, nematóides e bactérias [SHARON & LIS, 2003].

A quitina é um bipolímero de $\beta(1-4)$ - ligado de N-acetilglicosamina (GlcNAc)_n. As plantas sintetizam uma grande variedade de proteínas capazes de se ligar reversivelmente a uma matriz de quitina. Todas as proteínas que se ligam a esse polímero e possuem sua sequência de aminoácidos conhecida contêm um motivo comum de 30-43 aminoácidos com cisteínas e glicinas em posições conservadas. Esse motivo é referido como domínio de ligação de quitina. Esse biopolímero nunca foi detectado em plantas superiores, mas é um componente estrutural da parede celular de fungos e do exoesqueleto de muitos invertebrados, como insetos e nematóides (Figura 5). Isso implica que proteínas que podem se ligar a esse carboidrato complexo atuam, dentre outras funções, na defesa do hospedeiro [RAIKHEL & LEE, 1993].

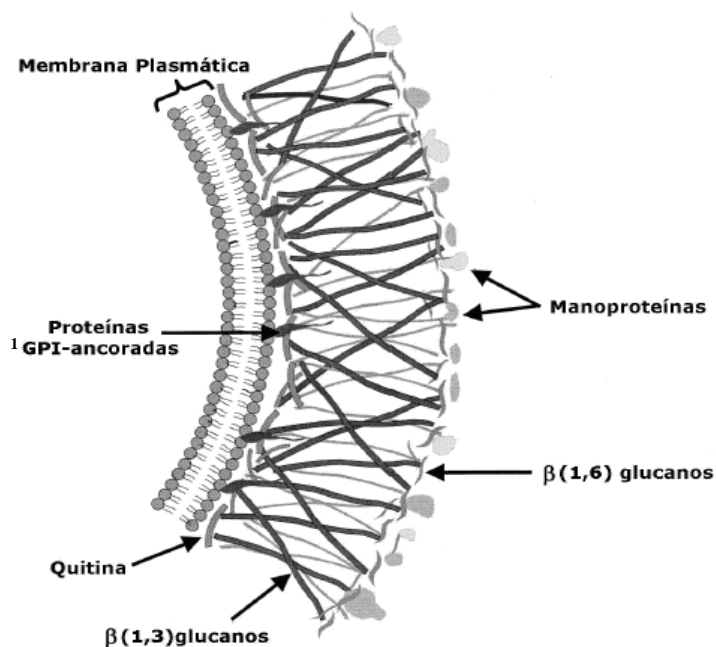


Figura 5 - Esquema estrutural da parede celular de fungos. ¹glicosfosfatidilinositol (GPI). Fonte: Selitrenkoff, 2001.

1.4 A aglutinina de *Acacia farnesiana* (AFAL): uma PHA-like

1.4.1 *Acacia farnesiana* (L.) Willd.

Popularmente conhecida no Brasil como esponjeira ou acácia-amarela, a *A. farnesiana* é um arbusto pertencente à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae. Possui sinônimos botânicos como *A. cavenia* Bert, *A. leptophylla* D.C., *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn, *A. minuta* (M.E. Jones) R.M. Beauch, *A. smallii* Isely, *Mimosa farnesiana* L., *Pithecellobium minutum* M.E. Jones e *Vachellia densiflora* Alexander ex Small. [Dados do USDA, Link para acesso: <http://plants.usda.gov>]. Seus nomes populares variam de acordo com o país, sendo conhecida como *sweet acácia*, *cassie*, *espino blanco*, *aroma* e muitos outros nomes [LITTLE & WADSWORTH, 1964]. Essa planta é um arbusto médio com muitos ramos espalhados. Suas flores são amarelas ou alaranjadas (Figura 6) e devido ao aroma característico, são utilizadas na indústria de perfumes em alguns países, como na França [PARROTTA, 1992].

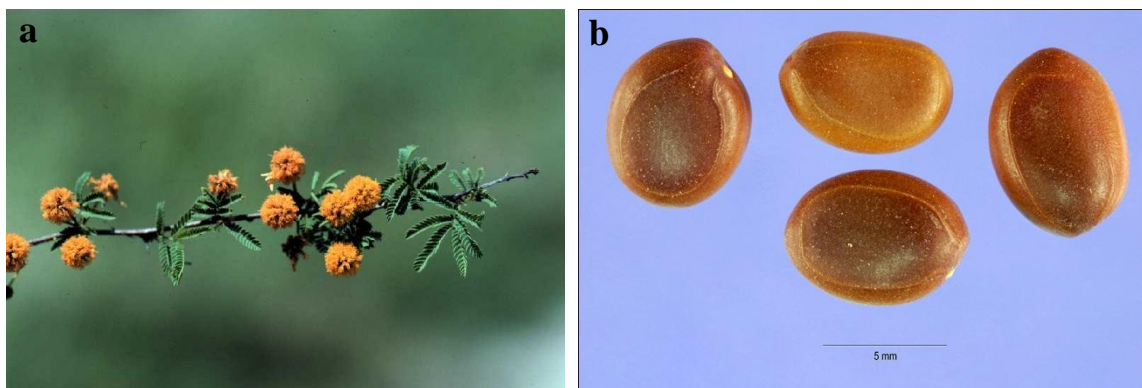


Figura 6 – a) Partes vegetativas da *A. farnesiana*. b) Detalhe das sementes. Fonte: Site do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. (<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=acfa>). Acesso em 12 de Fevereiro de 2013.

Acredita-se ser nativa dos trópicos americanos. Hoje é encontrada no sul dos EUA, da Califórnia à Flórida, em todo o Ocidente, Índia, México, América Central e América do Sul, até o sul do Chile e da Argentina e em muitos países do chamado Velho Mundo. É a espécie mais amplamente distribuída de acácia amarela [SEIGLER, 2003].

A *A. farnesiana* é uma espécie resistente à secas e cresce bem em regiões com uma estação seca de 4 a 6 meses [WEBB, 1980]. Essa planta é usada para reflorestamento de terras áridas degradadas e para alimentação do gado. Várias partes são utilizadas na medicina tradicional [LIOGIER, 1990; PARROTTA, 2001]. Estudos sobre a fitoquímica dessa leguminosa revelaram que as sementes contêm ácido linoléico e ácido coronárico. Também está presente o aminoácido não protéico N-acetildjenkolic. As flores de acácia amarela contêm salicilato de metila, anisaldeído, geraniol, benzaldeído, acetato de geranil, dentre outros componentes, alguns responsáveis pelo aroma que deu origem ao perfume criado a partir dessa planta. São encontrados também alguns flavonoides, como a vicentina [SEIGLER et al., 1986; SEIGLER, 2003]. No México, as flores são usadas para tratar dor de cabeça e indigestão, uma decocção das vagens verdes é usada para o tratamento de disenteria e inflamações na pele. Na Índia, casca, cerne e folhas também são usados para fins medicinais [PARROTTA, 2001].

1.4.2 Características da AFAL

Entre as proteínas PHA-like está a que é extraída de sementes da leguminosa *A. farnesiana*, denominada AFAL. Essa macromolécula foi bem caracterizada por Santi-Gadelha et al. (2008). É uma proteína solúvel, retirada da fração albumina e possui processo de oligomerização tempo-dependente, apresentando dois picos na cromatografia de exclusão molecular com massa aparente de 40 e 80 KDa (Figura 7). Devido a essa demora na formação de dímeros e tetrâmeros, sua atividade hemaglutinante é tardia e sua afinidade por quitina é variável, podendo ser detectada tanto no pico retido como no pico não-retido da cromatografia de afinidade. Sua atividade não foi inibida por açúcares simples nem compostos, bem como os metilados ou derivados de (GlcNAc)_n. Devido à dificuldade em se inibir sua atividade hemaglutinante, não foi possível tirar conclusões a respeito da afinidade dessa proteína [SANTI-GADELHA et al., 2008].

A purificação de AFAL foi verificada por SDS-PAGE, apresentando perfil eletroforético consistindo de duas bandas de massa molecular aparente de 50 e 29KDa (Figura 8a). A espectrometria de massa (MALDI-ToF) revelou uma forma monomérica de aproximadamente 24.2KDa e uma forma dimérica de 50KDa (Figura 8b) e massa molecular aparente de 120KDa, que indica que AFAL é uma proteína tetramérica composta de subunidades idênticas com a mesma massa molecular aparente [SANTI-GADELHA et al., 2008].

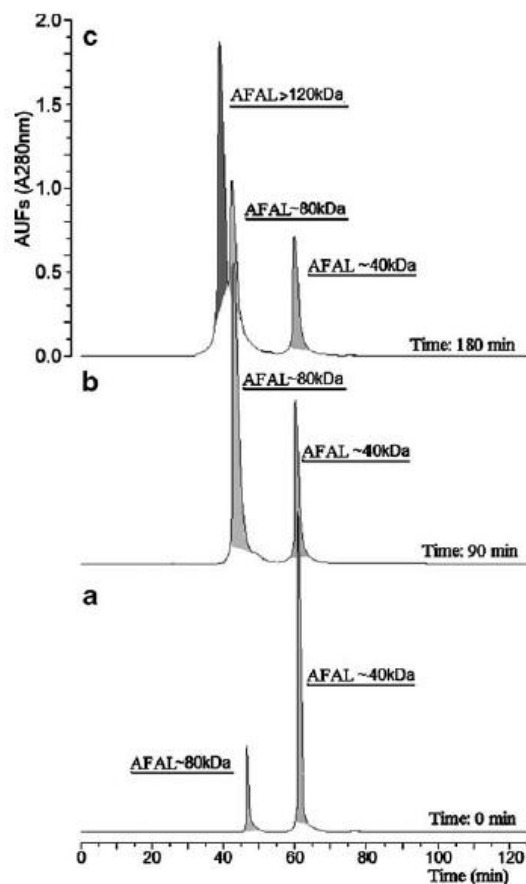


Figura 7 - Cromatografia de exclusão molecular da fração albumina de sementes de *A. farnesiana*. O processo de oligomerização é evidenciado em AFAL a 37°C em relação ao tempo de incubação. AFAL imediatamente injetada (a, Tempo 0). AFAL incubada em tampão por 90 (b) e 180 min (c) a 37°C. Fonte: Santi-Gadelha, 2008.

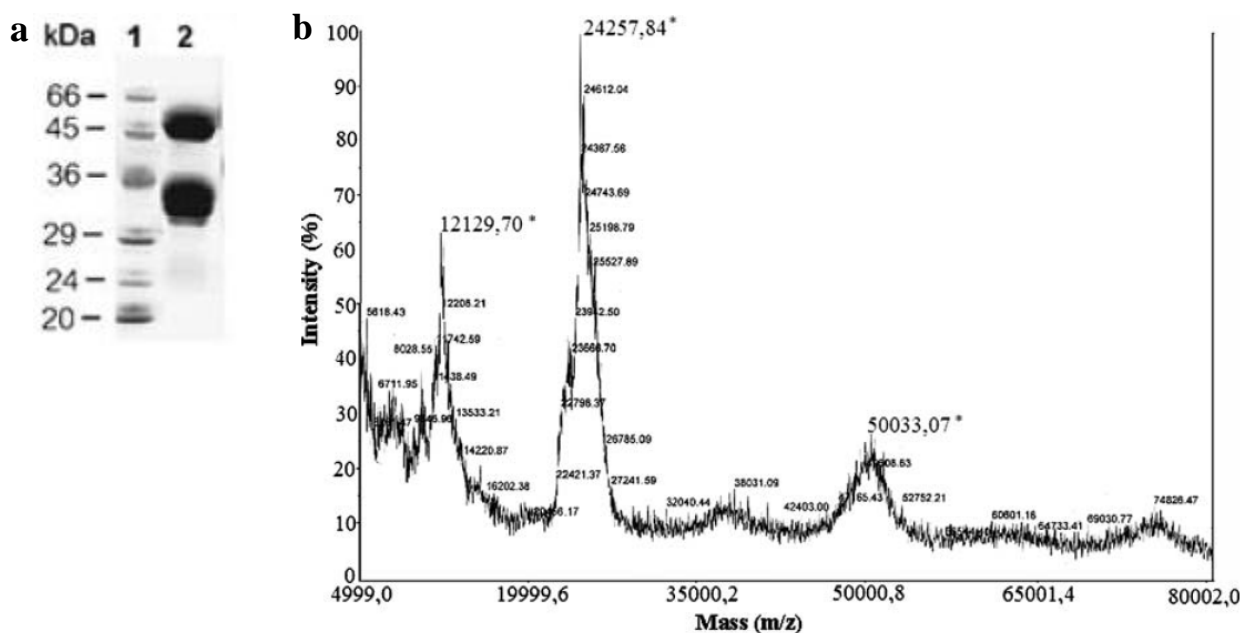


Figura 8 – a) SDS-PAGE da proteína purificada de *A. farnesiana*. Poço 1: marcadores de peso molecular (BSA 66KDa, ovoalbumina 45KDa, Gliceraldeído 3P- desidrogenase 36KDa, anidrase carbônica 29KDa, tripsina pancreática bovina 24KDa, inibidor de tripsina de soja 20KDa). Poço 2: AFAL. b) Espectrometria de massa (MALDI-ToF) da proteína da fração albumina de *A. farnesiana* (pico retido na exclusão iônica).

* - massa molecular aparente de 12,7; 24,2 (monômero) e 50KDa (dímero). Fonte: Santi-Gadelha, 2008.

A análise da sequência de aminoácidos demonstrou que a AFAL tem um alto teor de ácido aspártico (13,94%) e ácido glutâmico (12,19%) e seu ponto isoelétrico está em torno do pH 4,0. Essa proteína possui um alto grau de homologia com outras proteínas PHA-like, tendo um N-terminal muito similar ao da lectina de *A. constricta* e outras lectinas de *Phaseolus* e *Dolichos*, mas a similaridade é menos quando comparada à lectinas de *Robinia*. (Figura 9). O alinhamento entre sequências de AFAL, DBL (*Dolichos biflorus* lectin) e PHA-L demonstrou pelo menos cinco regiões com alto grau de conservação [SANTI-GADELHA, 2008].

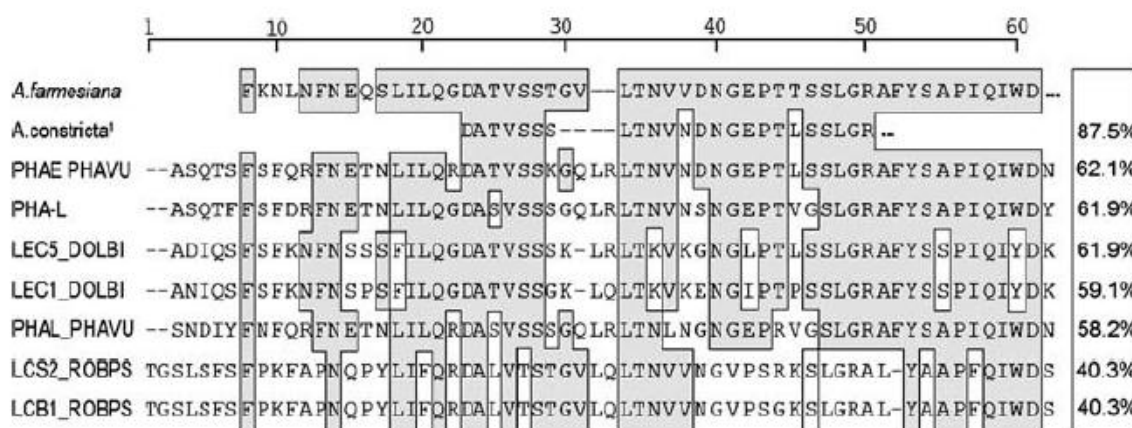


Figura 9 - Alinhamento de aminoácidos do N-terminal de AFAL. . Esses resultados mostraram uma identidade de aminoácidos com outras lectinas vegetais de 87,5%, 62,1%, 61,1%, 61,9%, 59,1%, 58,2%, 40,3% e 40,3% com a lectina de *A. constricta*; PHAE-PHAU (*P. vulgaris*); PHA-L (*P. vulgaris*); LEC5_DOLBI (*D. biflorus*); LEC1_DOLBI (*D. biflorus*); PHAL_PHAUU (*P. vulgaris*); LCS2_ROBPS (*Robinia pseudoacacia*) e LCS1_ROBPS (*R. pseudoacacia*), respectivamente. Fonte: Santi-Gadelha, 2008.

Os sítios de ligação de íons metálicos permanecem conservados e são bastante semelhantes aos de PHA-L. Os sítios de ligação a carboidratos também apresentam o mesmo grau de conservação de aminoácidos [SANTI-GADELHA, 2008].

1.5 Aplicações das Lectinas

Apesar das lectinas vegetais formarem a maior família de lectinas estudada, o papel fisiológico dessas proteínas ainda é pouco esclarecido. Alguns papéis têm sido descritos com base na capacidade que elas têm de se ligar a carboidratos em superfícies celulares, podendo

atuar como mediadores de interações proteína-carboidrato [VAN DAMME et al., 2004B]. Também podem atuar na defesa, no caso de lectinas que se ligam à açúcares que não estão presentes em plantas, como lactose e galactose, servindo, assim, para interação com outros organismos [VAN DAMME, et al., 2004A]. Algumas lectinas, como a de sementes de *Canavalia gladiata*, reconhecem outros compostos além de carboidratos, o que indica que essas proteínas podem atuar no transporte de metabólitos secundários, agindo na defesa da planta [DELATORRE et al., 2007].

Em 1995, Kennedy e colaboradores enumeraram algumas aplicações das lectinas, dentre elas o estudo de superfícies celulares; identificação de eritrócitos; detecção de fungos; mudanças dos sacarídeos na superfície celular; fabricação de matrizes para purificar glicoproteínas; identificação de algumas infecções causadas por bactérias anaeróbicas e caracterização e quantificação de proteínas séricas.

Lectinas possibilitam o estudo de padrões glicídicos que podem ocorrer nas superfícies celulares e auxiliar no entendimento do reconhecimento celular em sistemas biológicos [SHARON & LIS, 1993]. Por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, as lectinas podem interagir com diversas moléculas e receptores de superfície celular, podendo atuar como decodificador de informações trocadas entre moléculas, células e organismos [MISQUITH, 1994].

Em animais, algumas lectinas têm sido implicadas na imunidade inata. Um exemplo é o receptor manose-específico presente na superfície de macrófagos, que se liga a organismos infecciosos [SHARON & LIS, 2004]. Em animais e microrganismos, podem servir para mediar o reconhecimento biológico em diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral e inflamação [CAVADA et al., 2001]

Dentre as funções de lectinas com potencial farmacológico e biotecnológico já estudadas, pode-se destacar atividade cicatrizante [FIGUEIREDO, 2008; MELO, 2007; SILVA et al., 2009], coagulante [SANTOS, 2007], analgésica [BITENCOURT et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009], antibacteriana [FREIRE, 2003; GAIDAMASHVILI & VAN STADEN, 2002; PANDO, 2001], antifúngica [FREIRE, 2003; NGAI & NG, 2007; VAZ et al., 2010], inseticida [BOLETI, 2003; FREIRE, 2003], nematocida [ZANETTI, 2007], antitumoral [YAN et al., 2010], mitogênica [MACIEL, 2002; ZANETTI, 2007], antioxidante [SANTOS, 2007], entre muitas outras.

1.5.1 Atividade Anti-inflamatória

Um dos papéis desempenhados por esta classe de proteínas que tem recebido destaque, principalmente entre as leguminosas, é a atividade anti-inflamatória que as lectinas apresentam. Já foram testadas várias lectinas, como as presentes em sementes de *Dioclea violaceae*, *Cratylia floribunda*, *Dioclea guianensis* e *Dioclea virgata* [ASSREUY et al., 1997; ASSREUY et al., 1999], *Lonchocarpus sericeus* [ALENCAR et al., 2005], *Clitoria fairchildiana* [LEITE et al., 2012], além de outras famílias de plantas, como a lectina presente no quiabo (*Abelmoschus esculentus*) [SOARES et al., 2012], na monocotiledônia *Araucaria angustifolia* [SANTIGADELHA et al., 2006; MOTA et al., 2006] e até em lectinas de algas, como a de *Hypnea cervicornis* [BITENCOURT et al., 2008] e em invertebrados marinhos, como *Holoturia grisca* [MOURA et al., 2012].

1.5.1.1 O processo inflamatório causado por carragenina

A palavra “Inflamação” é derivada do grego “*phlogosis*” e do latim “*flamma*”, que significa fogo, área em chamas. As características da inflamação são bem conhecidas e foram descritas desde o primeiro século, como sendo rubor, tumor, calor e dor. O rubor é causado pelo aumento do fluxo sanguíneo e dilatação de pequenos vasos no local, necessário para recrutamento das células de defesa, o tumor é devido à permeabilidade vascular aumentada, o que causaria calor, devido ao aumento da temperatura local [ROCHA E SILVA & LEME, 2006]

A resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa. O sistema imune inato é ativado imediatamente após a infecção e faz o reconhecimento do patógeno, emitindo um sinal para a resposta imune adaptativa. Seus componentes celulares primários são os macrófagos, células dendríticas, células NK (do inglês, Natural **K**iller) e neutrófilos. A resposta imune adaptada torna a resposta inata muito mais eficaz. Os linfócitos são as principais células desse tipo de resposta [CASTARDO, 2007].

Em modelos experimentais, uma forma bastante utilizada para indução de inflamação se dá por inoculação de algum agente flogístico, como a carragenina ou dextrana [HONMURA et al., 1999]. Quando injetada na pata, a carragenina promove uma resposta inflamatória que

envolve diversos mediadores como histamina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, óxido nítrico, infiltração de leucócitos e hiperalgesia [DAMAS & REMACLE-VOLON, 1992; MEDEIROS et al., 1995; VAZ et al., 1996; HANDY & MOORE et al., 1998]. Esse modelo foi descrito em ratos em 1962 por Winter e colaboradores e em 1969 foi adaptado para camundongos [LEVY, 1969].

A carragenina (CGN) é um poligalactano sulfatado de alto peso molecular derivado de algumas espécies de algas vermelhas (*Rhodophyceae*), as formas mais comuns de carragenina são a *lambda* (λ), *kappa* (κ) e *iota* (ι), que diferem quanto à posição do grupo sulfatado e a presença ou não de anidrogalactose (Figura 10). São extraídas de algumas espécies de algas, incluindo *Gigartia sp.*, *Chondrus sp.* e *Euचेuma sp.* e são usadas na indústria alimentícia para melhorar a textura dos alimentos, emulsionando produtos lácteos, molhos para saladas, carne processada, leite de soja, entre outros produtos [TOBACMAN, 2001; TOBACMAN, 2003]. Também tem sido utilizada em produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, como creme dental e cosméticos.

A administração da carragenina induz uma inflamação aguda que resulta em alterações no fluxo sanguíneo, calibre dos vasos e permeabilidade vascular [GEHLEN et al., 2004] e é um modelo convencional para estudo desse tipo de inflamação [KALE et al., 2007]. Além disso, CGN tem sido usada em modulação de inflamação intestinal em animais e para introduzir inflamação em outras áreas, como espaço peritoneal [TOBACMAN, 2001; TOBACMAN, 2003; NACIFE et al., 2000]. Um método de avaliar a ação da CGN é através da contagem de leucócitos diferenciais, observando a migração de neutrófilos quatro horas após a administração desse agente flogístico [SOUZA & FERREIRA, 1985]. Outro teste é a avaliação da permeabilidade vascular [THURSTON et al., 2000], através do uso do azul de Evans. Esse corante se liga à albumina plasmática, formando um complexo que extravasa através da barreira endotelial que sofreu lesão [STEELE & WILHELM, 1966].

A maioria das carrageninas consistem de três β -D-galactopiranoses e quatro α -D-galactopiranoses ou 3,6-anidro- α -D-galactopiranoses ligados alternadamente [CAMPO et al., 2009].

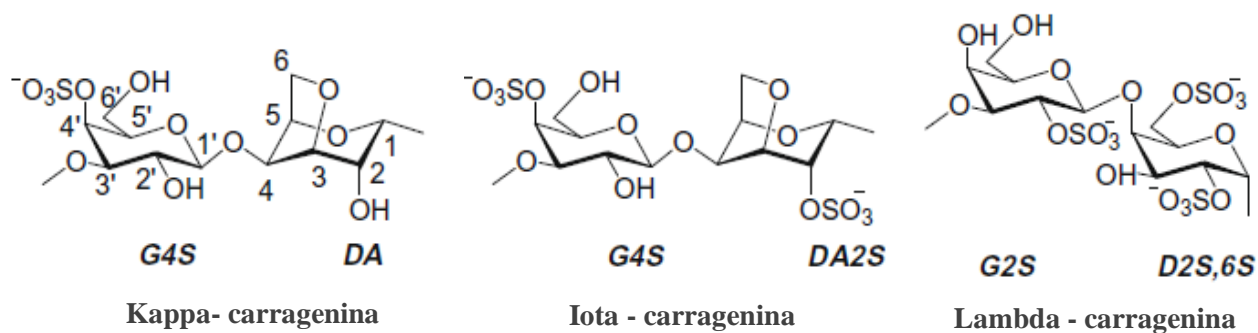


Figura 10 – Representação esquemática das diferentes estruturas de carrageninas comerciais. Adaptado de CAMPO et al, 2009.

As carrageninas do tipo *kappa* e *iota* formam uma rede de duplas hélices tridimensionais (Figura 11), resultando da ligação cruzada de cadeias adjacentes que contêm grupos sulfato orientados externamente, já nas do tipo *lambda*, o grupo sulfato é orientado internamente, evitando a ligação cruzada [CAMPO et al., 2009].

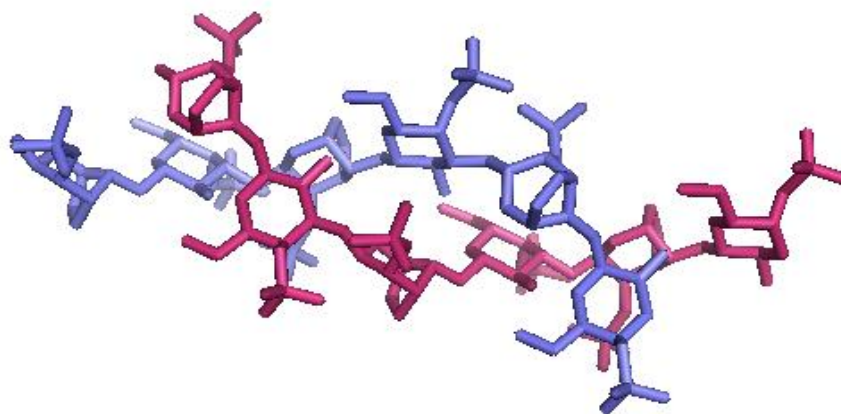


Figura 11 – Modelo dupla hélice da ι -carragenina. Cada cadeia foi representada de uma cor para melhor entendimento (PDB 1CAR). Disponível Para download em <http://www.rcsb.org/pdb>.

A carragenina induz uma via de NF κ B e IL-8 nas células epiteliais do intestino humano. Essa via é mediada por Bcl10 [BORTHAKUR et al., 2006; BHATTACHARYYA et al, 2008].

Estudos realizados por Borthakur e colaboradores (2007) com inflamação induzida por carragenina, sugerem que esta estimule uma cascata de reações em células epiteliais normais.

Esta via envolve a ativação de Bcl10 (B-cell lymphoma/leukemia 10), aumento da fosforilação de I κ B α , translocação nuclear de NF κ B e aumento da produção de Interleucina-8 por um mecanismo transcricional, como mostra a figura 12. NF κ B (Fator Nuclear *Kappa* B) é um complexo protéico que atua como fator de transcrição na defesa do organismo. Para ser liberado do citoplasma e translocado ao núcleo da célula, é necessário que a proteína I κ B α (Inibidor do Fator Nuclear de Kappa B) [BAEUERLE, 1998] seja fosforilada e degradada. Para realizar essa cascata de reações a carragenina precisaria entrar na célula de alguma forma. Um estudo posterior a esse, identificou o TLR4 (Receptor Toll-Like 4), um membro da família de receptores da resposta imune inata, como receptor de membrana para carragenina [BHATTACHARYYA et al, 2008].

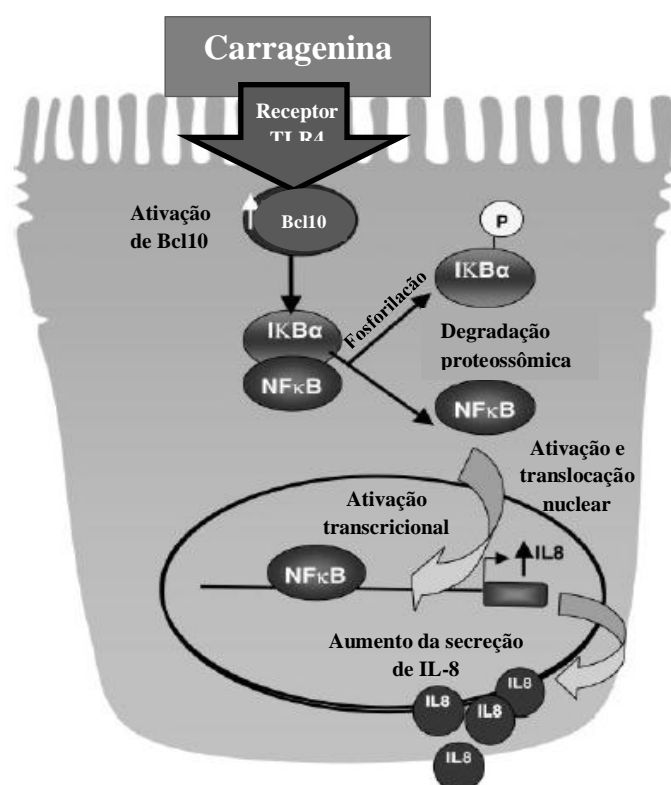


Figura 12 - Modelo experimental da ativação de IL-8 por CGN em células epiteliais coloniais. As setas indicam 1) ativação de Bcl10 após exposição à CGN, seguindo para 2) fosforilação de I κ B α , 3) ativação e translocação nuclear de NF κ B, em seguida, 4) ativação transcricional e aumento da secreção de IL-8. Extraída e Modificada de BORTHAKUR et al., 2007.

1.6 Estudo Estrutural de Proteínas

1.6.1 BLAST: Alinhamento e Análise de Sequências Protéicas

O primeiro passo para se obter a estrutura protéica por modelagem molecular é encontrar uma proteína-molde que possua um alto grau de homologia com a molécula estudada. Esse grau é encontrado a partir da análise das sequências de aminoácidos de proteínas da mesma família. O BLAST (do inglês, **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) é uma ferramenta do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) e está entre as mais usadas para análise de sequências (Figura 13). Existem vários tipos de BLAST para comparar todas as combinações de nucleotídeos ou proteínas. Consiste em uma heurística que, além de realizar alinhamentos, fornece informações estatísticas para ajudar a decifrar a significância biológica do alinhamento realizado [MCGINNIS & MADDEN, 2004].

O BLAST foi o último dos mais populares programas de pesquisa de semelhanças em bases de dados a ser publicado [ALTSCHUL et al., 1990] e passou a ser muito usado pelo fato de procurar coincidências em sequências que se assemelham e não apenas nas que são estritamente idênticas [ROCHA, 2000]. Muitas versões diferentes dessa ferramenta apareceram nos últimos anos [ALTSCHUL et al., 1997]. Ela utiliza o método de “blocos de identidades” para selecionar regiões de alinhamento mais promissoras, procurando apenas por matches exatos de um certo comprimento em alinhamentos de sequências. Procura unicamente blocos de identidade (semelhança) perfeita. A matriz utilizada por defeito em BLAST é a BLOSUM62 (*BLOCKS SUBstitution Matrix at 62%*). Uma matriz de logaritmos de probabilidades derivada das substituições de aminoácidos entre segmentos de sequências de identidade inferior a 62% [ROCHA, 2000].

Figura 13 - Interface da ferramenta Protein BLAST, disponibilizada no site do NCBI. Link para acesso: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

1.6.2 Modelagem Molecular

1.6.2.1 Modelagem Molecular por Homologia

A biologia estrutural nasceu em Cambridge, na Inglaterra dos anos 1950, quando foi desvendada a estrutura da dupla hélice do DNA [WATSON & CRICK, 1953; WILKINS & STOKES, 1953]. Também foram resolvidas, não muito tempo depois, as primeiras estruturas tridimensionais de proteínas a partir da cristalização destas, sendo elas a mioglobina [KENDREW et al., 1958] e a hemoglobina [PERUTZ et al., 1960]. A partir daí, o número de estruturas disponibilizadas só cresceu, contribuindo para aumentar o conhecimento acerca das relações intrínsecas entre sequências, estruturas e funções de proteínas [BERMAN, 2012A]. Desde 1971, os dados tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos vêm sendo depositados no PDB (do inglês, **P**rotein **D**ata **B**ank) [BERMAN, 2008]. Hoje, mais de 83.000 estruturas, desvendadas por cristalografia de Raios X, espectrometria de RNM (Ressonância Magnética Nuclear), microscopia eletrônica 3D e métodos híbridos encontram-se depositadas nesse banco de dados [BERMAN et al., 2012B].

Apesar de todos os avanços feitos na biologia estrutural nos últimos anos, não são muitos os métodos capazes de caracterizar completamente a estrutura tridimensional de uma molécula, desvendando as distâncias e ângulos de sua conformação [BARREIRO &

RODRIGUES, 1997]. A técnica de cristalografia de Raios X ainda é a mais usada e mais eficiente para obtenção de todos os dados necessários nesse processo [ABRAHAM, 1989], mas ainda assim não há garantia de que a conformação no estado cristalino seja a mesma que a molécula apresenta em solução. Um exemplo é a lectina de *Dolichus biflorus* (DB58), que apresenta-se como um dímero tipo X1 em solução e um tetrâmero tipo II + X1 na estrutura cristalina [BUTS et al., 2001]. Além disso, algumas moléculas não possuem uma estabilidade estrutural a ponto de se arranjar organizadamente para formar cristais, que são ordenações perfeitas e infinitas de unidades assimétricas que se arranjam em simetrias definidas [DUCRUIX & GIEGÉ, 1992], como é o caso da lectina de *Bauhinia variegata* (BVL-I), que apesar de já ter sido parcialmente caracterizada [PINTO, et al., 2008], não tem estrutura tridimensional determinada por ser intensamente glicosilada, dificultando, assim, sua cristalização [MOREIRA et al., 2010]. Desta forma, o uso da modelagem da estrutura molecular por métodos computacionais surgiu como alternativa para resolução desses problemas.

A modelagem molecular é uma técnica usada para simular o comportamento e/ou movimento de moléculas com a finalidade de ganhar entendimentos mais profundos de processos tais como estabilidade de macromoléculas, mudanças conformacionais, enovelamento de proteínas, reconhecimento molecular em proteínas, DNA, membranas e carboidratos, desenho racional de fármacos, transições de fase – interfaces, fenômeno fora do equilíbrio termodinâmico, efeitos quânticos e na bioinformática, como na modelagem por homologia. O reconhecimento dessa técnica pelo mundo científico veio com o prêmio Nobel em Química de 1998, concedido a John Pople e Walter Kohn, por suas contribuições no desenvolvimento da Química computacional e modelagem molecular [FREITAS, 1998].

Em um comunicado técnico sobre o uso da modelagem molecular por homologia para análise genômica funcional em 2005, Figueiredo e colaboradores relataram que a modelagem molecular por homologia utiliza dados cristalográficos conhecidos para determinar a estrutura e prever função de proteínas desconhecidas. Esse procedimento utiliza dados estruturais existentes para a construção dos modelos. As etapas para obtenção da estrutura através da homologia consistem na identificação do template (molde) para modelagem da proteína alvo, alinhamento da seqüência-alvo com a seqüência molde, construção e ajuste do esqueleto carbônico da molécula, adição de cadeias laterais dos aminoácidos e refinamento do modelo,

para que a molécula assuma menor estado de energia livre (minimização de energia) e aperfeiçoamento e avaliação da qualidade do modelo gerado [KIEFER et al., 2009].

A predição da estrutura de proteínas pode ser feita por programas de acesso *online* gratuito para análise estrutural comparativa, como o SWISS-MODEL [KIEFER et al., 2009] e o 3D Jigsaw [BATES, et al., 2001].

1.6.2.2 SWISS-MODEL

Construir modelos por homologia requer programas especializados e bancos de dados de sequências e estruturas. Integrar todas as ferramentas necessárias, programas e bancos de dados em um único espaço de trabalho na *World Wide Web* (ou simplesmente *web*), facilita o acesso à modelagem por homologia sem a necessidade de baixar e instalar grandes pacotes de programas e bancos de dados. O SWISS-MODEL (Figura 14) é um espaço de trabalho de acesso *online* dedicado à modelagem de proteínas por homologia [ARNOLD et al., 2006].

Ao usar o SWISS-MODEL, três opções diferentes de se fazer a modelagem são oferecidas: modo automático, modo de alinhamento e modo de projeto. O modo automático foi desenvolvido para os casos em que a similaridade entre o molde (modelo usado) e o alvo (proteína cuja estrutura será simulada) é suficientemente alta. Como regra geral, há uma preferência que se use sequências com mais de 50% de homologia [ROST, 1999]. O modo de alinhamento de sequências múltiplas é usado para comparação de proteínas de uma mesma família, quando ao menos uma delas tem estrutura tridimensional resolvida e depositada no PDB [WESTBROOK et al., 2003]. O modo de projeto é usado quando a modelagem é difícil e o alinhamento das sequências pode gerar um modelo não muito claro, assim, o usuário pode melhorar significativamente a qualidade do modelo resultante, fazendo uma inspeção visual e manipulação da estrutura gerada [BATES et al., 2001]. Isso pode ser feito utilizando-se o programa DeepView-SwissPabView [GUEX & PEITSH, 1997].

SWISS-MODEL Repository
Modelling Tools Repository Documentation

[Repository Query] [Full Text Query]

SWISS-MODEL Repository - Model Details

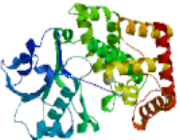
Model Overview [+/-]
Click on the bars to get more details about individual Models or experimental structures

1 387

Sequence [+/-]
UniProt P0A9S5
Database: TrEMBL (Unreviewed) ☆

Domain [+/-]

Model 3D Structure [+/-]



Model information:
 Modelled residue range: 1 to 364
 Based on template: [1kq3]
 Sequence Identity [%]: 52%
 Model date: 2012-09-21
 Revision date: 2012-09-11

Quaternary structure information: [details]
 Template (1kq3): OCTAMER
 Model built: SINGLE CHAIN

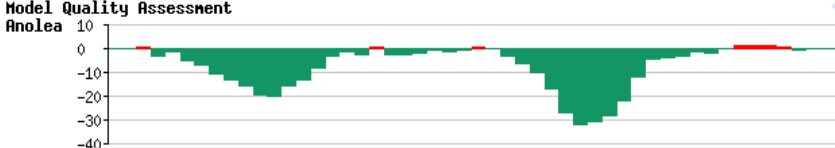
Ligand information: [details]
 Ligands in the template: CL: 1, TRS: 1, ZN: 1.
 Ligands in the model: ZN: 1

Alignment [+/-]

TARGET	1	MDRIIQS	PGKYIQGADV	INRLGEYLKP	LAERWLVVD	KFVLGFA-QS
1kq3A	0	h--mitttif	pgryvqgaga	inileeelsr	fgerafvvid	dfvdknvlge

Quality [+/-] [start new quality assessment in Works]

Model Quality Assessment
Anolea



Template Selection [+/-]

Template Search [+/-] [start new template identification in Workspace]

Informações do UniProt

Informações do modelo utilizado

Alinhamento das seqüências

Estimativa de qualidade do modelo

Figura 14 - Vista típica da interface do SWISS-MODEL Repository. Para a entrada da seqüência da glicerol-desidrogenase de *E. coli* (GLDA_ECOLI), cujo código no UniProt [BAIROCH, et al., 2005] é P0A955, é obtido um modelo 3D, incluindo informações sobre a estrutura do modelo utilizado para construção (molde), que nesse caso foi a estrutura cristalina da glicerol-desidrogenase de *Thermotoga marítima* (código PDB: 1kq3), além de informações sobre o alinhamento das seqüências e avaliação da qualidade do modelo obtido. Link para acesso: <http://swissmodel.expasy.org/repository>

1.6.2.3 Docking Molecular

Docking (“encaixe”, em português) é uma simulação computacional para prever a conformação de um complexo receptor-ligante, em que o receptor é geralmente uma proteína ou uma molécula de ácido nucléico (DNA ou RNA) e o ligante é uma pequena molécula ou uma proteína. Também pode ser definida como uma simulação em que a posição de um ligante é estimada em um sítio de ligação predito ou pré-definido [DIAS & DE AZEVEDO, 2008].

Simulações de docking molecular podem ser usadas para reproduzir dados experimentais através de algoritmos de validação de interações, onde as conformações proteína-ligante ou proteína-proteína, para uma proteína obtida *in silico* e comparar com estruturas obtidas a partir de cristalografia de raios X ou ressonância nuclear magnética (RMN). Além disso, o docking é uma das principais ferramentas para “screenings” virtuais, onde uma biblioteca de vários compostos pode ser usada para docking contra uma droga marcada, resultando na melhor conformação (mais provável do ponto de vista termodinâmico). [DIAS & DE AZEVEDO, 2008].

A riqueza de estruturas tridimensionais disponíveis tem sido de grande valor para testes de ligações entre moléculas. Há vários programas desenvolvidos para testes de docking molecular, entre eles o *Hex*, que é um programa de superposição molecular e encaixe interativo de proteínas, que realiza uma simulação onde o ligante pode ser considerado um corpo rígido, sem liberdade de girar os ângulos de torção (*dock* rígido), ou pode girar seus ângulos de torção (*dock* flexível). O problema da simulação de docking é um problema de otimização computacional, onde temos que reproduzir computacionalmente a posição de um ligante na estrutura de uma proteína (receptor) [RITCHIE & KEMP, 2000; RITCHIE et al., 2008].

1.6.2.4 Modelagem Molecular de Proteínas

Com a dificuldade encontrada na cristalização de algumas proteínas e a necessidade de estudar suas atividades biológicas de forma mais detalhada, a modelagem molecular tem sido cada vez mais usada nas pesquisas envolvendo essas macromoléculas. É o caso da lectina I de *Bauhinia variegata* (BVL-I), que se liga preferencialmente a D-galactose [PINTO et al., 2008]

e cuja estrutura ainda não foi determinada devido à intensa glicosilação que apresenta, o que dificulta sua cristalização. Dessa forma, sua estrutura foi obtida por modelagem, utilizando-se o SWISS-MODEL e o 3D JIGSAW para análise estrutural comparativa e a lectina 4 de *Griffonia simplicifolia* (GS-IV) como molde (Figura 15) [MOREIRA et al., 2010].

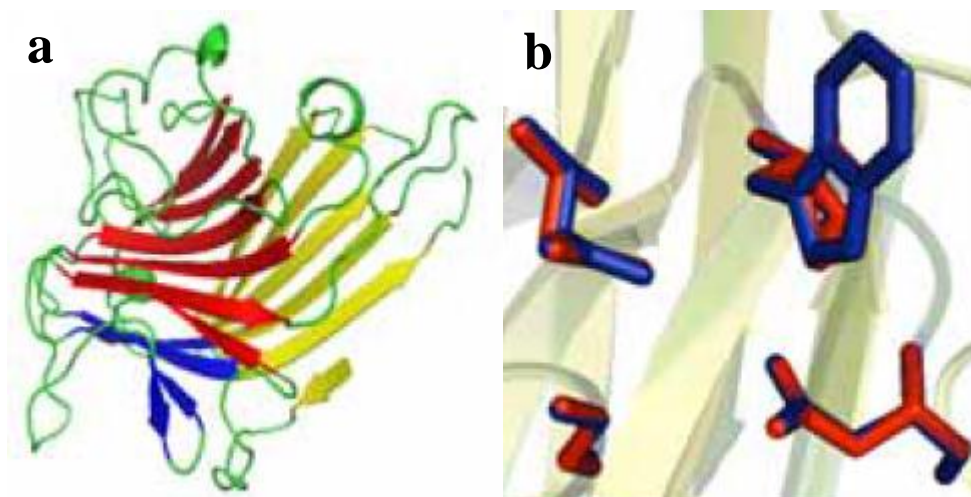


Figura 15 - a) Estrutura da BVL-I/SWISS-MODEL. Representação das folhas β características de lectinas de leguminosas: folha frontal (vermelha), folha posterior (amarela) e folha S (azul). b) Detalhe do CRD de BVL-I/SWISS-MODEL sobreposta à GS-IV. Os quatro aminoácidos responsáveis pela interação com o açúcar são mostrados para BVL-I em azul e para GS-IV em vermelho. Fonte: Moreira et al., 2010.

Outra proteína que teve sua estrutura resolvida por homologia foi a frutalina, lectina de *Artocarpus incisa* L, tendo como base a estrutura da jacalina, lectina de *Artocarpus integrifolia* [NEPOMUCENO, et al., 2008]. Em 1997, Inberty e colaboradores obtiveram o modelo da região C-terminal (um domínio tipo lectina) da proteína GalNac-T1 (Galactosaminil-transferase humana), usando como molde as lectinas de *Ricinus communis* L. (ricina) e de *Abrus precatorius* (abrina) (Figura 16).

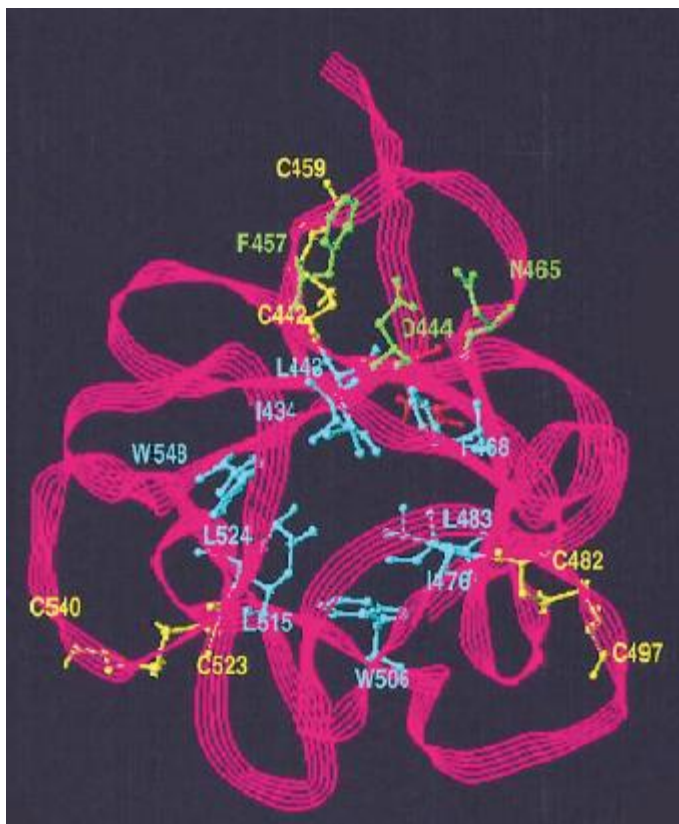


Figura 16 - Modelo da região C-terminal de GalNac-T1. Os aminoácidos azuis estão envolvidos na formação do núcleo hidrofóbico, os amarelos representam as cisteínas, envolvidos nas ligações dissulfeto, os verdes compõem os resíduos de ligação direta com a galactose e os vermelhos são os resíduos responsáveis pela N-glicosilação [INBERTY, et al., 1997].

Um estudo recente envolvendo a família de lectinas relacionadas com a GNA (lectina de *Galantus nivalis*) e da hemaglutinina do vírus Influenza (HA), objetivou a análise e relação de suas estruturas tridimensionais obtidas através de modelagem por homologia, para investigar a atividade anti-influenza dessas proteínas vegetais. As estruturas foram feitas usando o software MODELLER9v7, a partir da estrutura da GNA (Figura 17) [XU et al., 2012].

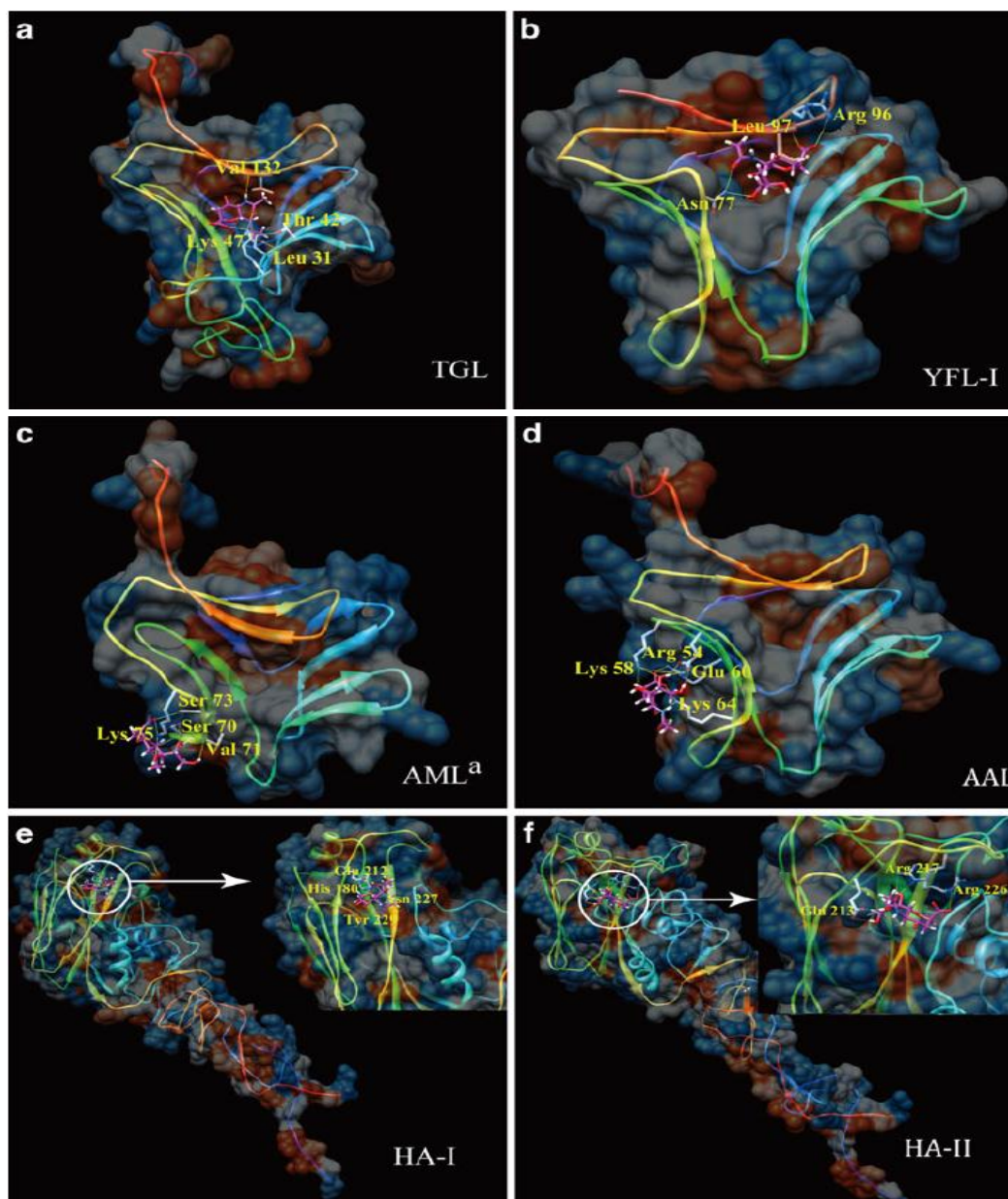


Figura 17 - Estruturas das lectinas relacionadas à GNA e hemaglutininas do vírus influenza humano, todas ligadas ao ácido siálico. a) lectina de *Tulipa gesneriana* (TGL); b) lectina 1 de *Yucca filamentosa* (YFL-I); c) lectina de *Arum maculatum* (AML^a); d) lectina de *Arisaema amaurense* (AAL); e) hemaglutinina do vírus 1934 H1 humano; f) hemaglutinina do vírus 1918 H1 humano. Os modelos de bola e bastão apresentam o ácido siálico em roxo, enquanto as ligações de hidrogênio são mostradas como linhas amarelas [XU et al., 2012].

2 – OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral:

Compreender a atividade anti-inflamatória da aglutinina ligante de quitina presente em sementes de *A. farnesiana* e suas características através da obtenção da estrutura tridimensional por modelagem molecular.

2.2 - Específicos:

- Analisar a sequência primária de AFAL através de alinhamento múltiplo para identificação de uma lectina com alto grau de homologia em relação à proteína estudada, para que sirva de molde na obtenção da estrutura por modelagem molecular;
- Obter a estrutura tridimensional da AFAL através da modelagem molecular, relacionando interações possíveis entre monômeros, dímeros e tetrâmeros;
- Realizar testes de atividade pró e anti-inflamatória da AFAL;
- Correlacionar a estrutura 3D com a função biológica encontrada para a AFAL;
- Realizar o docking molecular da AFAL com a carragenina a fim de explicar sua atividade diante desse agente flogístico;

3 – CONCLUSÃO

3 - CONCLUSÃO

A obtenção da estrutura tridimensional de uma proteína é um passo crucial para explicação de sua atividade biológica e de características estruturais, entretanto, nem todas as proteínas possuem estruturas estáveis e aptas a formar cristais ou não são isoladas em quantidades satisfatórias. Desta forma, no presente, a técnica de modelagem molecular por homologia é a que melhor se aplica na predição da estrutura tridimensional de AFAL.

Através do alinhamento de múltiplas sequências entre AFAL e outras lectinas da mesma família e obtenção de estruturas tridimensionais por homologia, encontrou-se a lectina de ervilha (*Pisum sativum*) como um bom molde para AFAL, apesar de seu grau de homologia ser maior com a lectina de *P. vulgaris* (PHA-L).

O modelo estrutural obtido para a AFAL revelou a ausência de folhas β , o que permite ligação direta desta proteína com a carragenina e ao mesmo tempo com glicanos, conforme resultados observados no docking molecular realizado. Dessa forma, a AFAL pode diminuir os efeitos da inflamação por impedir que a carragenina entre na célula para desencadear a cascata de reações características do processo inflamatório.

4 - REFERÊNCIAS

4 – Referências

- ABRAHAM, D. J. X-ray crystallography and drug design. In: Perun, T. J. & Propst, C. L. (eds) **Computer-aided drug nodesign: methods and applications**. Marcel Dekker, New York, 1989.
- ADAR, R.; STREICHER, H.; ROZENBLATT, S.; SHARON, N. Synthesis of soybean agglutinin in bacterial and mammalian cells. **Eur J Biochem**, v. 249, p. 684–689, 1997.
- ALENCAR, N. M. N; CAVALCANTE, C. F.; VASCONCELOS, M. P; LEITE, K. B; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S; NOGUEIRA, N. A. P; VALE, M. R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 57, p. 912-922, 2005b.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYRERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARANGO, R.; ROZENBLAT, S.; SHARON, N. Cloning and sequence analysis of the *Erythrina corallodendron* lectin cDNA. **FEBS Letters**. v. 264, p. 109-111, 1990.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOOP, J.; SCHWEDEL, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201, 2006.
- ASSREUY, A. M. S, SHIBUYA, M. D; MARTINS, G. J; SOUSA, M. L. P; CAVADA, B. S; MOREIRA, R. A; OLIVEIRA, J. T. A; RIBEIRO, R. A; FLORES, C. A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.
- ASSREUY, A. M. S; MARTINS, G. J; MOREIRA, M. E; BRITO, G. A. C; CAVADA, B. S; RIBEIRO, R. A; FLORES, C. A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The Journal of Urology**, v. 161, p. 1988-1993, 1999.
- BAEUERLE, P. A. I κ -NF- κ B structures: at the interface of inflammation control. **Cell**. v. 95, p. 729–731, 1998.
- BAIROCH, A. APWEILER, R.; WU, C. H.; BARKER, W. C.; BOECKMANN, B.; FERRO, S.; GASTEIGER, E.; HUANG, H.; LOPEZ, R.; MAGRANE, M.; MARTIN, M. J.; NATALE,

D. A.; O'DONOVAN, C.; REDASCHI, N.; YEH, L. S. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.**, v. 33, D154-D159, 2005.

BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin lactose complex. **J Mol Biol.** v.259, p. 281–296, 1996.

BANERJEE, R.; MANDE, S.C.; GANESH, V.; DAS, K.; DHANARAJ, V.; MAHANTA, S.K.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure. *Proc Natl Acad Sci.* v. 91, p. 227–231, 1994.

BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. ALBUQUERQUE, M. G.; SANT'ANA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Quimica Nova**, v. 20, 1997.

BARONDES, S.H. Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, p. 480-482, 1998.

BATES, P.; KELLEY, L.; MACCALLUM, R.; STERNBERG, M. Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 45, p. 39-46, 2001.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank: a historical perspective. **Acta cryst.** v. A64, p. 88-95, 2008.

BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The future of the protein data bank. **Biopolymers.** v. 99(3), p. 218-22, 2012.

BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The Protein Data Bank at 40: reflecting on the past to prepare for the future. **Structure.** v. 20(3), p. 391-6, 2012.

BHATTACHARYYA S.; GILL R.; CHEN M. L.; ZHANG F.; LINHARDT R. J.; DUDEJA P. K.; TOBACMAN, J. K. Toll-like receptor 4 mediates induction of Bcl10-NFκB-IL-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. **J Biol Chem**, 283, 10550–10558, 2008.

BITENCOURT, F. S; FIGUEIREDO, J. G; MOTA, M. R. L; BEZERRA, C. C. R; SILVESTRE, P. P; VALE, M. R; NASCIMENTO, K. S; SAMPAIO, A. H; NAGANO, C. S; SAKER-SAMPAIO, S; FARIAS, W. R. L; CAVADA, B. S; ASSREUY, A. M. S; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 377, p. 139-148, 2008.

BORTHAKUR A.; BHATTACHARYYA S.; DUDEJA P. K.; TOBACMAN J. K. Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 292, 829–838, 2007.

BOLETI, A. P. A. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (Mart.) Radlk. 2003.** Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

BRANCO, A. T.; BERNABÉ, R. B.; DOS SANTOS, F. B.; DE OLIVEIRA, M. V.; GARCIA, A. B.; DE SOUSA FILHO, G. A. Expression and purification of the recombinant SALT lectin from rice (*Oryza sativa* L.). **Protein Expr Purif.** v. 33, p. 34–38, 2004.

BRINDA, K. V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Science**. v. 13, p. 1735–1749. 2004.

BUTS, L.; DAO-THI, M. H.; LORIS, R.; WYNS, L.; ETZLER, M.; HAMELRYCK, T. Weak protein–protein interactions in lectins: The crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. **J. Mol. Biol.** v. 309, p. 193–201. 2001.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D. F.; SILVA, D. B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 167-180, 2009.

CASTARDO, J. C. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *garcinia gardneriana* (planchon & triana) zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos.** Curitiba, 2007. Dissertacao (Mestrado), Universidade Federal do Parana, 137p.

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 Peptides Science**. v 2. p. 1-13, 2001.

DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G., Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 211, p. 81–86, 1992.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A .A.; TOYAMA, M. H.; PEREIRA-JÚNIOR, F. N.; SIMÕES, R. C.; SILVA, H. C.; MARQUESDOMINGOS, G. F. O.; FARIAS, D. L.; ASSREUY, A. M. S.; MARINHO, E. S.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. Mass spectrometry and X-ray diffraction analysis of two crystal types of *Dioclea virgata* lectin: An antinociceptive protein candidate to structure/function analysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v 164. p.741-751. 2011.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A.; SOUZA, E. P.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; MORENO, F. B.; FREITAS, B. T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A. H.; AZEVEDO, W. F. JR.; CAVADA, B. S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct Biol.** v 7:52. 2007.

DELBAERE, L. T. J.; VANDONSELAAR, M.; PRASAD, L.; QUAIL, J. W.; WILSON, K. S.; DAUTER, Z. Structure of the lectin IV of *Griffonia simplicifolia* and its complex with the Lewis B human blood group determinant at 2.0 Å resolution. **J Mol Biol.** v. 230, p. 950-965, 1993.

DIAS, R. & DE AZEVEDO JR, W. F. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets.** v.9, p. 1040-1047, 2008.

DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A Practical Approach). **Oxford University Press**, 1992.

ELGAVISH, S. & SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, V. 22, nº 22. P. 462-467, 1997.

EINSPAHR, H.; PARKS, E. H.; SUGUNA, K.; SUBRAMANIAM, E.; SUDDATH, F. L. The crystal structure of pea lectin at 3.0 Å resolution. **J Biol Chem.** v. 261, p. 16518-16527, 1986.

FIGUEIREDO, J. E. F.; ROCHA, W. D.; BENEDITO, V. A.; COELHO, V. T. S. **Estudos de modelagem molecular por homologia para análise genômica funcional.** Comunicado técnico – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, MG. Novembro de 2005.

FIGUEIREDO, I. S. T. **Avaliação do efeito da lectina de *Cratylia floribunda* Benth em feridas cutâneas experimentais.** Fortaleza, 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará. 111p.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; BESERRA, I. G.; TEIXEIRA, C. S.; LUZ, P. B.; BEZERRA, E. H. S.; MOTA, M. R. L.; ASSREUY, A. M. S.; CUNHA, F. Q.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 407-414, 2009.

FORIERS, A.; LEBRUN, E.; VAN RAPENBUSCH, R.; DE NEVE, R.; STROSBERG, A. D. The structure of the lentil lectin. **J. Biol. Chem.** v. 256, p. 5550-5560, 1981.

FREIRE, M. G. M. **Isolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina isolada de sementes de *Talisia esculenta* (St Hil) Radlk.** Campinas, 2003. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular). Universidade Estadual de Campinas.

FREITAS, L. C. G. Prêmio Nobel de Química 1998. **Química Nova na Escola**, n. 8, p. 3-6, 1998.

GAIDAMASHVILI, M., VAN STADEN, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 80, p. 131-135, 2002.

GEHLEN, M. L.; MOREIRA, H.; MOREIRA, L.; SAGAB, F. P.; REPKA, J. C. D. Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans na reação inflamatória da córnea: estudo experimental em coelhos. **Arq Bras Oftalmol**, v. 67, p. 219-225, 2004.

GUEX, N. & PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714–2723, 1997.

HAMELRYCK, T. W.; DAO-THI, M. H.; POORTMANS, F.; CHRISPPEELS, M. J. V.; WYNS, L.; LORIS, R. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. **J. Biol. Chem.** v. 271, p. 20479-20485, 1996.

HAMELRYCK, T. M.; MOORE, J. G.; CHRISPPEELS, M. J.; LORIS, R.; WYNS, L. The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL. **J.Mol.Biol.** v. 299, p. 875, 2000.

HALMERYCK, T.; POORTMANS, F.; GOOSSENS, A.; ANGENON, G.; VAN MONTAGU, M.; WYNS, L.; LORIS, R. Crystal structure of arcein-5, a lectin-like defense protein from *Phaseolus vulgaris*. **J.Biol.Chem.** v. 271, p. 32796-32802, 1996.

HANDY, R.L. & MOORE, P.K. A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1119–1126, 1998.

HIGGINS, T. J. V.; CHANDLER, P. M.; ZURAWSKI, G.; BUTTON, S. C.; SPENCER, D. The biosynthesis and primary structure of pea seed lectin. **J. Biol. Chem.** v. 258, p. 9544-9549, 1983.

HOFFMAN, L. M. & DONALDSON, D. D. Characterisation of two *Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin genes closely linked on the chromosome. **Embo J.** v. 4, p. 883-889, 1985.

HONMURA, A.; YANSE, M.; OBATOR, J.; HARUKI, E. Therapeutic effect of Gal-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Lasers Surgery Medical.** v. 12. P. 441-449, 1999.

HUET, M & CLAVERIE, J. M. Sedimentation Studies of the Reversible Dimer-Tetramer Transition Kinetics of Concanavalin A. **Biochemistry**. v. 17, n. 2, 1978.

IMBERTY, A.; PILLER, V.; PILLER, F.; BRETONL, C. Fold recognition and molecular modeling of a lectin-like domain in UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases. **Protein Engineering**. v.10, p. 1353–1356, 1997.

IMBERTY, A.; GAUTIER, C.; LESCAR, J.; PEREZ, S.; WYNS, L.; LORIS, R. An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid containing oligosaccharides. **J.Biol.Chem.** v. 275, p. 17541-17548, 2000.

JONES, S. & THORNTON, J. M. Protein-protein interactions - a review of protein dimer structures. **Progr. Biophy. Molec. Biol.** v. 63, p. 31-65.

KALE, M.; MISAR, A. V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUNDAR, A. M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* barc ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 300-304, 2007.

KENDREW, J.C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H.; PHILLIPS, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**. v. 181, p. 662-6, 1958..

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COREIA, M. T. S.; CAVALCANTE, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KIEFER, F.; KONSTANTIN, A.; KÜNZLI M.; BORDOLI L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 387-392, 2009.

LAM, S. K. & NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, p. 45–55, 2011.

LUZ, D. F. **Expressão heteróloga e caracterização bioquímica da proteína recombinante Gm SBP2/S64 da soja (*Glycine max*)**. Viçosa, 2006. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa. 87 p.

LANNOO, N.; VERVECKEN, W.; PROOST, P., ROUGÉ, P.; VAN DAMME, E. J. Expression of the nucleocytoplasmic tobacco lectin in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 53, p. 275–282, 2007.

LEITE, J. F.; ASSREUY, A. M.; MOTA, M. R.; BRINGEL, P. H.; LACERDA, R. R.; GOMES, V. M.; CAJAZEIRAS, J. B.; NASCIMENTO, K. S.; PESSOA, H. L.; GADELHA, C. A. A.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S.; SANTI-GADELHA, T. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a lectin-like substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard seeds. **Molecules**. v. 17, p. 3277-90, 2012.

- LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.
- LIOGIER, H.A. **Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe**. Iberoamericana de Ediciones, Inc., San Juan, 566 p., 1990.
- LITTLE, E. L. Jr. & WADSWORTH, F. H. Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. **Agriculture Handbook. U.S. Department of Agriculture, Forest Service**. V.249, p. 548. Washington, DC, 1964.
- LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1383, p. 9 – 36, 1998.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1572, p. 198-208, 2002.
- MACIEL, E. V. M. **Determinação do efeito mitogênico das lectinas de *Cratylia mollis* sobre linfócitos humanos utilizando um método colorimétrico**. Recife, 2002. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal de Pernambuco.
- MANOJ, N. & SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Eng.** v 14(10). p 735-745. 2001.
- MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W20-W25, 2004.
- MEDEIROS, M.V.; BINHARA, I. M.; MORENO-JÚNIOR, H.; ZATZ, R.; DE-NUCCI, G.; ANTUNES, E. Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenan in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 285, p. 109–114, 1995.
- MELO, C. M. L. **Avaliação da atividade cicatrizante da lectina de *Cratylia mollis* em camundongos normais e imunodeprimidos experimentalmente**. Recife, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. 72p
- MISQUITH, S.; RANI, P.G.; SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **J. Biol. Chem.** v 269(48). p 30393-30401. 1994.
- MOREIRA, R. A; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v.59, n.5, p.783-7, 1977.
- MOREIRA, R. A.; CASTELO-BRANCO, C. C.; MONTEIRO, A. C.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L. M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incise* L. seeds. **Phytochemistry**. v. 47(7), p. 1183-1188. 1998

MOREIRA, G.; PINTO, L.; CONCEIÇÃO, F. **Predição comparativa da estrutura tridimensional da lectina BVL-I**. XIX Congresso de Iniciação Científica, XII Encontro de Pós-Graduação, II Mostra Científica da UFPel. Pelotas- RS, 2010.

MOREIRA, R. A. & CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**. v 26, n. 2. p 113-120, 1984.

MOURA, R. D.; ARAGÃO, K. S.; DE MELO, A. A.; CARNEIRO, R.F.; OSÓRIO, C. B.; LUZ, P. B.; DE QUEIROZ, A. F.; DOS SANTOS, E. A.; DE ALENCAR, N. M.; CAVADA BS. Holothuria grisea agglutinin (HGA): the first invertebrate lectin with anti-inflammatory effects. **Fundam.Clin.Pharmacol**, 2012.

MOTA, M. R. L; CRIDDLE, D. N; ALENCAR, N. M. N; GOMES, R. C; MEIRELES, A. V P; SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A. A; BENEVIDES, R. G; CAVADA, B. S; ASSREUY, A M. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 374, p. 1-10, 2006.

NACIFE, V.P.; SOEIRO, M.D.; ARAUJO-JORGE, T.C.; CASTRO-FARIA NETO, H.C.; MEIRELLES, M. D. Ultrastructural, immunocytochemical and flow cytometry study of mouse peritoneal cells stimulated with carrageenan. **Cell Struct Funct**, v. 25, p. 337–350, 2000.

NEPOMUCENO, D. R.; MOREIRA, R. A.; CARVALHO, C. P. S.; CORREIA, T. O.; PEREIRA, H. M.; GRANGEIRO, T. B. **Modelagem por homologia de uma lectina de *Artocarpus incisa* L. (Frutalina)**. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, 2008.

NGAI, P. H. K; NG, T. B. A lectin with antifungal and mitogenic activities from red cluster pepper (*Capsicum frutescens*) seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, p. 366-371, 2007.

OLIVEIRA, C.; FELIX, W.; MOREIRA, R. A.; TEIXEIRA J. A.; DOMINGUES, L. Expression of frutalin, an alpha-D-galactose-binding jacalin related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein Expr Purif**, v. 60, p.188–193, 2008.

OLIVEIRA, C.; COSTA, S.; TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. cDNA cloning and functional expression of the alpha-D-galactose-binding lectin frutalin in *Escherichia coli*. **Mol Biotechnol**, v. 43, p. 212–220, 2009.

PANDO, L. A. **Caracterização físico-química e biológica de proteínas isoladas de sementes de leguminosas: Lectinas e Inibidores de proteinases**. Campinas, 2001. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular Área de Bioquímica). Universidade Estadual de Campinas. 107p.

PARROTTA, J.A. *Acacia farnesiana* (L.) Willd. – **Aroma, huisache**. Research Note SO-ITF-SM-49. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans. 6 p., 1992.

PARROTTA, J.A. **Healing plants of peninsular India**. CAB International, New York. 944 p., 2001.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v.109, n.2, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. v 15. p. 199 – 228. 1998.

PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A. F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, A. C. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**. v. 185, p. 416-422, 1960.

PINTO, L.; NAGANO, C.; OLIVEIRA, T.; MOURA, T.; SAMPAIO, A.; DEBRAY, H.; PINTO, V.; DELLAGOSTIN, O.; CAVADA, B. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v.33, p. 355–363, 2008.

PRABU, M. M.; SUGUNA, K.; VIJAYAN, M. Variability in quaternary association of proteins with the same tertiary fold: a case study and rationalization involving legume lectins. **Struct. Funct. Genet.** v 35. p 58–69. 1999.

PRABU, M.M.; SANKARANARAYANAN R.; PURI, K.D., SHARMA, V.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M.; SUGUNA, K. Carbohydrate specificity and quaternary association in basic winged bean lectin. X-ray analysis of the lectin at 2.5 Å resolution. **J Mol Biol.** v. 276, p.787–796, 1998.

QUIOCHO, F.A. Carbohydrate-binding proteins. Tertiary structures and protein-sugar interactions. **Ann. Rev. Biochem.** v. 55, p.287-315, 1986.

RAIKHEL, N. V. & LEE, H. I. Structure and functions of chitin-binding proteins. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 44, p. 591-615, 1993.

RITCHIE, D. W. & KEMP, G. J. L. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. **Proteins: Struct. Func. Genet.** v. 39, p. 178-194, 2000.

RITCHIE, D. W.; KOZAKOV, D.; VAJDA, S. Accelerating and Focusing Protein-Protein Docking Correlations Using Multi-Dimensional Rotational FFT Generating Functions. **Bioinformatics**. p. 1-10, 2008.

ROCHA, E. **Módulo de BioInformática: Análise de sequências**. Cadeira de Algorítmica e Programação. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2000.

ROCHA E SILVA, M. & LEME, G. J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: International series of Monographs in Pure and Applied Biology, **Modern Trends in Physiological Sciences**, v. 37, 47 p., 2006.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Eng.**, v. 12, p. 85–94, 1999.

RUTENBER, E.; KATZIN, B.J.; ERNST, S.; COLLINS, E.J.; MLSNA, D.; READY, M.P.; ROBERTUS, J.D. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. **Proteins**. v 10. P. 240-250, 1991.

SANTI-GADELHA, T; ROCHA, B. A; OLIVEIRA, C. C; ARAGÃO, K. S; MARINHO, E. S; GADELHA, C. A; TOYAMA, M. H; PINTO, V. P; NAGANO, C. S; DELATORRE, P; MARTINS, J. L; GALVANI, F. R; SAMPAIO, A. H; DEBRAY, H; CAVADA, B. S. Purification of a PHA-like chitin-binding protein from *Acacia farnesiana* seeds: a time-dependent oligomerization protein. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, n.1, p.97-111, 2008.

SANTI-GADELHA, T; GADELHA, C. A. A; ARAGÃO, K. S; OLIVEIRA, C. C; MOTA, M. R. L; GOMES, R. C; PIRES, A. F; TOYAMA, M. H; O, TOYAMA, D; ALENCAR, N. M. N; ASSREUY, A. M. S; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SANTOS, A. F. S. **Moléculas bioativas de *Moringa oleifera*: detecção, isolamento e caracterização**. Recife, 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco. 112p.

SCHNELL, D. J. & ETZLER, M. E. Primary structure of the *Dolichos biflorus* seed lectin. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 7220-7225, 1987.

SEIGLER, D.S.; SEILHEIMER, S.; KESSY, J.; HUANG, H.F. Tannins from four common *Acacia* species of Texas and northeastern Mexico. **Economic Botany**, v.40, p. 220-232, 1986.

SEIGLER, D. S. Phytochemistry of *Acacia-sensu lato*. **Biochemical systematics and ecology**, v.31, p. 845-873, 2003.

SENEAR, D. F. & TELLER, D. C. Thermodynamic studies of concavalin A dimer-tetramer equilibria. **Biophys J.** v. 32(1), p. 433-436, 1980.

SHAANAN, B.; LIS, H.; SHARON, N. Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. **Science**. v. 254, p. 862–866, 1991.

SHARMA V. & SUROLIA A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J Mol Biol.** v 267. p 433–445. 1997.

SHARON, N. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.** v 268. p 82-88. 1993.

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

SHARON, N. & LIS, H. Plant lectins: legumes. In **Lectins** (Sharon, N., and Lis, H., eds.), pp. 105-116. Kluwer, Academic Publishers: Dordrecht, 2003.

SILVA, F. O; ARAÚJO, R. V. S; SCHIRATO, G. V; TEIXEIRA, E. H; MELO JÚNIOR, M. R; CAVADA, B. S; LIMA-FILHO, J. L; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A; PORTO, A. L. F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1808-1814, 2009.

SOARES, G. S. F.; ASSREUY, A. M.; GADELHA, C. A. A.; GOMES, V. M.; DELATORRE, P.; SIMÕES, R. C.; CAVADA, B. S.; LEITE, J. F.; NAGANO, C. S.; PINTO, N. V.; PESSOA, H. L. F.; SANTI-GADELHA, T. Purification and biological activities of *Abelmoschus esculentus* seed lectin. **Protein J.** v. 31, p. 674-680, 2012.

SOUZA, G. E. & FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

STEELE, R. H. & WILHELM, D. L. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular permeability and erythema induced by various chemicals. **Br J Exp Pathol**, v. 47, p. 612-623, 1966.

STUBBS, M. E.; CARVER, J. P.; DUNN, R. J. Production of pea lectin in *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, v. 261, p. 6141–6144, 1986.

SUMMER, J.B. & HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriol.** v. 32, p.227-237, 1936.

TATENO, H.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I.J. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant Neu5-Ac α 2, 6Gal β 1, 4GlcNAc-specific high-affinity lectin and its mutants from the mushroom polyporus squamosus. **Biochem J**, v. 382, p. 667–675, 2004.

TOBACMAN, J.K. Review of harmful gastrointestinal effects of carrageenan in animal experiments. **Environ Health Perspect**, v. 109, p. 983–994, 2001.

TOBACMAN, J.K. Toxic considerations related to ingestion of carrageenan. In: **Reviews in Food and Nutrition Toxicity**, edited by Preedy VR and Watson RR. p. 204–229, 2003.

THURSTON, G.; BALUK, P.; MCDONALD, D. M. Determinants of endothelial cell phenotype in venules. **Microcirculation**, v. 7, p. 67-80, 2000.

UPADHYAY, S.K.; SAURABH, S.; RAI, P.; SINGH, R.; CHANDRASHEKAR, K.; VERMA, P. C.; SINGH, P. K.; TULLI, R. SUMO fusion facilitates expression and purification of garlic leaf lectin but modifies some of its properties. **J Biotechnol**, v. 146, p. 1–8, 2010.

VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends Plant Sci.** v 9(10). p 484- 489. 2004b

VAN DAMME, E. J.; LANNON, N.; FOUQUAERT, E.; PEUMANS, W. J. The identification of inducible cytoplasmic/nuclear carbohydrate-binding proteins urges to develop novel concepts about the role of plant lectins. **Glycoconjugate J.** v 20. p 449-460. 2004a

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

VAZ, A. F. M; COSTA, R. M. P. B; MELO, A. M. M. A; OLIVA, M. L. V; SANTANA, L. A; SILVA-LUCCA, R. A; COELHO, L. C. B. B; CORREIA, M. T. S. Biocontrol of *Fusarium* species by a novel lectin with low ecotoxicity isolated from *Sebastiania jacobinensis*. **Food Chemistry**. v. 119, p. 1507-1513, 2010.

VAZ, Z.R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 278, p. 304–312, 1996.

VIJAYAN, M. & CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**. v 9. p707-714. 1999.

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

WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**. v. 171, p. 737-738, 1953.

WEBB, D.B.; WOOD, P.J.; SMITH, J. **A guide to species selection for tropical and subtropical plantations**. Tropical Forestry, Forestry Institute, University of Oxford, London, v.15, 256 p., 1980.

WESTBROOK , J.; FENG, Z.; CHEN, L.; YANG, H.; BERMAN, H. M. The Protein Data Bank and structural genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 489–491, 2003.

WILKINS, M. H.; STOKES, A. R.; WILSON, H. R. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. **Nature**. v 171, p. 738-40, 1953.

XU, H.; LI, C.; HE, X.; NIU, K.; PENG, H.; LI, W.; ZHOU, C.; BAO, J. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of GNA-related lectins for potential prevention of influenza virus (H1N1). **J. Mol Model**. v. 18, p. 27–37, 2012.

YAN, Q; ZHU, L; KUMAR, N; JIANG, Z; HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**. v. 122, p. 589-595, 2010.

ZANETTI, G. D. **Lectinas de Rizomas de *Arund donax* L.: Purificação, Caracterização, Propriedades, Imuno- Histoquímica e Separação das Isoformas. 2007.** 262f. Tese (Doutorado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

APÊNDICE
(Manuscrito Submetido)

Manuscript Number:

Title: The molecular modeling from Acacia farnesiana lectin-like reveals anti-inflammatory mechanism

Article Type: Research Report

Keywords: Acacia farnesiana; lectin; molecular modeling; molecular docking; carrageenan.

Corresponding Author: Dr. Plinio Delatorre, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal da Paraíba

First Author: Plinio Delatorre, Ph.D.

Order of Authors: Plinio Delatorre, Ph.D.; Vanessa E Abrantes, Master; Bruno A Rocha, Doctor; Raphael B Nóbrega, Master; José Caetano -Filho, Master; Benildo S Cavada, Doctor; Carlos A Gadelha, Doctor; Sergio H Ferreira, Doctor; Jozi G Figueiredo, Doctor; Tatiane Santi-Gadelha, Doctor

Abstract: Anti-inflammatory activity of Acacia farnesiana (AFAL) was analyzed through structural comparison with legume lectins. The molecular modeling and molecular docking with glycan and carrageenan was performed to explain the AFAL structural behavior and biological activity. AFAL model is folded as a β sandwich. The model differs of template in loops regions, number of β -sheet and carbohydrate site. AFAL molecular docking was performed with carrageenan and oligosaccharide and both bind to different sites on AFAL. The ability to AFAL binding carrageenan can be explained by absence of the sixth β -sheet (frontal β -sheets) and two β -sheets in posterior region. AFAL can inhibiting pathway inflammatory process by carrageenan injection by connecting to it and preventing its entry into the cell and triggers the reaction.

Abstract**Abstract:**

Anti-inflammatory activity of *Acacia farnesiana* (AFAL) was analyzed through structural comparison with legume lectins. The molecular modeling and molecular docking with glycan and carrageenan was performed to explain the AFAL structural behavior and biological activity. AFAL model is folded as a β sandwich. The model differs of template in loops regions, number of β -sheet and carbohydrate site. AFAL molecular docking was performed with carrageenan and oligosaccharide and both bind to different sites on AFAL. The ability to AFAL binding carrageenan can be explained by absence of the sixth β -sheet (frontal β -sheets) and two β -sheets in posterior region. AFAL can inhibiting pathway inflammatory process by carrageenan injection by connecting to it and preventing its entry into the cell and triggers the reaction.

Keywords: *Acacia farnesiana*; lectin; molecular modeling; molecular docking; carrageenan.

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

The molecular modeling from *Acacia farnesiana* lectin-like reveals anti-inflammatory mechanism

*Vanessa Erika Ferreira Abrantes*¹, *Bruno Anderson Matias da Rocha*², *Raphael Batista da Nóbrega*², *José Caetano-Filho*¹, *Benildo Soysa Cavada*², *Carlos Alberto de Almeida Gadelha*¹, *Sergio Henrique Ferreira*³, *Jozi Godoy Figueiredo*³, *Tatiane Santi-Gadelha*^{1*}, *Plinio Delatorre*^{1*}

1) Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil. Zip Code: 58059-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

2) BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, P. O. Box: 6043, Zip Code: 60.440-970, Fortaleza, Ceará, Brazil.

3) Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

* Corresponding authors: pldelatorre@gmail.com

santi.tatiane@gmail.com

1. Introduction

Acacia farnesiana is a member of Leguminosae family, and it is included in the Mimosoideae subfamily. *Acacia farnesiana* lectin-like (AFAL) has been purified and classified as PHA agglutinin-like lectin [1]. Lectins are defined as carbohydrate-binding glyco/proteins that are capable of agglutinate cells, without enzymatic activity toward carbohydrate or glycoconjugates [2-4]. Plant lectins have been structural models for studying carbohydrate recognition and oligomerization states [5-7]. AFAL has a time-dependent oligomerization and based on their affinity by glycans is characterized as a chitin-binding lectin, which elect it as a good example for structural studies. AFAL hemagglutinating activity was not inhibited by carbohydrate compounds neither the methylated or (GlcNAc) derivatives ones [1]. However, *Phaseolus vulgaris* (PHA) isolectins usually bind to 1,6-branched GlcNAc containing N-glycans and the inhibition test result is normally positive [8-10].

Legume lectins represent the largest and most thoroughly studied family of these proteins [11] and show a remarkable conservation in primary, secondary and tertiary structures. Indeed, approximately 85% of each legume lectin sequence is devoted to structurally conserved regions [12]. Comparisons of these sequences and structures have established that differences in carbohydrate specificity appear to be primarily due to differences in amino acid residues residing in adjacent loops to the carbohydrate-binding site [13-16]. The conformation of these loops is determined by the presence of calcium and transition metal ions coordinated in the protein structure [17-19]. Among the known legume lectins, dimeric *Pisum sativum* lectin (PSL) [20], also a mannose/glucose specific metalloprotein, has 42% similarity with AFAL.

One of the most studied biological activities of lectins is the ability to reduce the effects of inflammation caused by certain phlogistic agents, such as carrageenan (CGN), due to the large potential for development of drugs with anti-inflammatory action [21]. Carrageenan is a sulfated polysaccharide obtained from several species of red algae. It is frequently incorporated into processed foods to improve texture and solubility [22]. CGN exposure possibly causes inflammation by inducing an increase in interleukin-8 (IL-8) secretion in cells. This increase was demonstrated in tissue cultures, animals colon and human tissues [23-25]. Mechanisms of CGN-induced IL-8 activation require nuclear localization of nuclear factor κ B (NF κ B) and can proceed for a toll-like receptor 4 (TLR4)-B-cell lymphoma/leukemia 10 (Bcl10)-mediated pathway [24].

The aim of this paper is to explain the anti-inflammatory activity of AFAL through structural comparison with legume lectins. The molecular modeling and molecular docking with glycan and carrageenan were performed to explain the AFAL structural behavior and biological activity.

2. Materials and Methods

2.1. Primary structure analysis of *Acacia farnesiana* lectin-like protein

The BLAST program [26] was used for a comparative analysis of the amino acid sequence of AFAL with the amino acid sequence of other proteins, to obtain a ranking of similar proteins. The alignment was performed with Protein Data Bank (PDB) deposited protein structures only. The multiple alignment with selected lectins was done using Mutalin tool [27].

2.2. Molecular modeling by homology of *Acacia farnesiana* protein

Models were created from known structures of proteins that had the highest degree of identity among the primary structures aligned with AFAL. The structures were created from the homology molecular modeling server SWISS-MODEL [28], a free online program of Swiss Institute of Bioinformatics. This program allows a fully automated protein structure homology-modeling, accessible via the ExPASy web server. Structures from *Phaseolus vulgaris* lectin (1FAT), *Dolichos biflorus* lectin (1LUL), *Butea monosperma* lectin (3USU), *Glycine max* lectin (2SBA), *Robinia pseudoacacia* lectin (1FNY), *Pisum sativum* lectin (2BQP), *Erythrina crastagalli* lectin (1UZY) and *Erythrina corallodendron* lectin (3N35) were tested in order to obtain the high homology.

2.3. Molecular docking

Molecular docking was performed with Hex 6.3 molecular graphics program [29]. The Hex is a fast molecular docking program for calculating and displaying interactions and feasible docking modes of pairs of protein and DNA molecules. It can superpose pairs of molecules using only knowledge of their 3D shapes and calculate protein-ligand interactions using spherical polar Fourier (SPF) correlations to accelerate the docking calculations [29].

The model of the AFAL obtained from molecular modeling was used to test the binding to different carbohydrate compounds and to estimate possible binding sites of

the sugars and other ligands. This was done in order to explain the biological activities provided by this protein. It was used one oligosaccharide obtained from the structure of the *Lathyrus ochrus* lectin (deposited under PDB code 1LGC) [30]. This oligosaccharide 2.1 kDa was isolated from human lactotransferrin and was used due be bound to a lectin which has a relativity high identity with AFAL of 40%. The Iota-carrageenan obtained under the PDB code 1CAR [31] was used as ligand for molecular docking.

2.4. Biological activity

All protocols were approved by the USP Ethics Committee (USP- N° 183-2011). Mice received intraperitoneal (i.p.) carrageenan (500 mg/cav.) dissolved in 0.5 mL of sterile saline. AFAL was administered intravenously (i.v.) in 0.1 mL of saline 15 minutes before of the carrageenan injection. As a negative control, an experiment was performed in mice that received saline i.v.

The neutrophil migration was evaluated 4 hours after injection of CGN. To this end, the animals were sacrificed by cervical dislocation. Then the cells in the peritoneal cavity were collected by rinsing injecting 3.0 mL of saline containing 5 IU/mL of heparin. The abdomens of the animals were gently massaged, and through an incision peritoneal fluids were collected.

The total and differential counting of leukocytes was performed according to methodology previously described by Souza and Ferreira [32]. In this procedure, 20 μ L of fluid collected from each animal were diluted in 380 μ L of Turk reagent and subsequently used for total leukocyte count in a Neubauer chamber. The differential cell count was performed using stained smears on slides, 50 μ L of exudate were centrifuged in cytocentrifuge at $400 \times g$ for 10 min, after this process the smears were stained with hematoxylin-eosin (HE) and the cells counted using an optical microscope and the results expressed as the mean \pm standard error mean (SEM) number of cells $\times 10^6$ /mL of peritoneal fluid.

For the assessment of vascular permeability, the mice received AFAL at a dose of 1 mg/kg i.v. 15 minutes before administration of the stimulus CGN (500 mg/cav.). Control group received only saline i.p. One hour before the sacrifice, the animals received Evans blue (50 mg/kg) in plexus eye [33]. The animals were sacrificed by cervical dislocation 3 hours after administration of CGN, and then the fluid in the peritoneal cavity was collected by rinsing injecting 3.0 mL of saline containing heparin

(5 UI/mL). The abdomens of the animals were gently massaged and an incision through were collected about 1.0 mL of peritoneal fluid. To quantify the Evans blue extravasation into the peritoneal cavity, spectrophotometry was carried out by reading the optical densities using a wavelength of 610 nm. The absorbance data obtained were converted to mg of Evans Blue, by linear regression based on a standard curve of Evans blue. Results were calculated as mg of Evans blue/mL of peritoneal fluid and expressed as mean \pm SEM.

2.5. Hemagglutinating activity of AFAL with and without carrageenan

For hemagglutinating activity (HA) it was added to test tubes 100 μ L of 0.15M NaCl solution, 100 μ L of AFAL solution (1mg/mL 0.5M NaCl). After mixing the solutions, an aliquot (100 μ L) was removed and 100 μ L of 2% native rabbit erythrocytes suspension was added. The test was placed in a stove for 30 min at 37°C and 30 min at a temperature of 25°C. To verify the action of the carrageenan, it was used 100 μ L 0.15M NaCl solution, 100 μ L of AFAL (1mg/mL) and 100 μ L of carrageenan solution (5mg/ml) maintained in a stove for 30 min at 37°C. After that, was added 100 μ l of 2% rabbit erythrocytes suspension and incubated again in the same conditions. The negative control was composed to 100 μ L of 0.15M NaCl solution and 100 μ L of 2% rabbit erythrocytes. All results were observed macroscopically and the tests were done in triplicate.

In the inhibition of hemagglutination activity by carrageenan, we used the AFAL solution (2mg/mL 0.15M NaCl). In assay tubes, the carrageenan solution (5mg/mL 0.15M NaCl) was diluted in 0.15M NaCl and taken to a stove at 37°C for 30 minutes. After this time, was added the AFAL solution and again taken to the stove. At the same time, we tested the hemagglutinating activity without addition of carrageenan. The results were observed macroscopically and were expressed as number of hemagglutinating units (HU.100 μ L⁻¹) which is calculated from the inverse of the highest dilution title still had visible agglutination. In this study, the dilution was made only to the second tube and then the title was calculated as 22.

3. Results

3.1. AFAL model structure

Phaseolus vulgaris lectin (PHA) showed high max score, but other proteins present also acceptable identities (**Fig. 1**). All similarity proteins were used as templates

for molecular modeling by SWISS-MODEL program, but only the chain A of PSL (PDB code 2BQP) [34] showed high Z-score which converges to a good structural model (**Table 1**). The best modeling was performed based on template at 1.90 Å resolution with sequence identity of 42 %.

The AFAL structure model is folded as a β sandwich, as previously observed in legume lectins (**Fig. 2**). The model differs of template PSL, in loops regions, number of β -sheet and carbohydrate binding site (**Fig. 2**). The absence in the region of an helix in of AFAL alters the unprovisions the carbohydrate binding recognition site folding not allowing binding connection to simple carbohydrates. The AFAL model structure contains five β sheets. The formation of dimer canonical structures is common in legume lectins, but the absence of a sheet in canonical domain (frontal β -sheets) prevents the possible formation of the canonical dimer in AFAL model.

3.2. Biological activity

The e.v. administration of the AFAL 15 minutes before stimulation by CGN, reduced the intense migration of neutrophils into the peritoneal cavity at a dose of 1 mg/kg, 4th hour after CGN i.p. administration (500 mg / cav.). This inhibition was 71%. The positive control group (CGN) produced a significant increase in neutrophils as compared to saline group (**Fig. 3**).

The CGN i.p. administration (500 μ g / cav.) induced a significant increase in vascular permeability in the control group, seen through the leakage of dye (Evans blue) to the intraperitoneal fluid. The pretreatment of the animals with intravenous AFAL (1 mg/kg) reduced significantly the alteration of vascular permeability (40% inhibition) in the cavity induced by CGN (**Fig. 3**).

3.3. Hemagglutinating activity of AFAL

The erythrocytes agglutination without carrageenan was observed after 24 hours while the hemagglutinating activity in the presence of carrageenan had its agglutination observed 60 minutes after the addition of erythrocytes, both calculated as $4 \text{ HU} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$. The Inhibition of hemagglutination activity of AFAL by CGN showed hemagglutinating activity against the rabbits erythrocytes diluted in 0.15 M NaCl in the first hour after. The test showed that the carrageenan has not been capable of inhibiting the binding of protein to erythrocytes membrane carbohydrates.

3.4. Molecular Docking

AFAL molecular docking was performed with carrageenan (**Fig. 4**) and revealed that carrageenan interacts with amino acids Ser129, Ala131, Leu156, Ser172, Asp173, Arg174, Ile130, Glu180 and Ala108 through hydrogen bonds, as described in the **Table 2**. AFAL/carrageenan interactions show favorable binding energy with E-value -328.430.

The AFAL/glycan molecular docking was performed (**Fig. 4**) with the aim of corroborate that the carrageenan was not able to inhibit the AFAL hemagglutination activity. AFL/oligosaccharide interactions show favorable binding energy with E-value -445.4719. The AFAL-oligosaccharide interaction occurred through amino acids Asp73, Gly92, Leu93, Leu94, Leu96, Phe97, Glu110, Cys114, Asn116, Glu118, His119, Asp120, Gly194, Leu195, Glu197 and Asn512 establishing 34 hydrogen bonds. This showed that both bind to different sites on AFAL (**Fig. 2**).

4. Discussion

Due to the inability of simple carbohydrates and by derivatives chitin saccharide (two to eight residues GlcNAc) and ovomucoid glycoprotein (rich in GlcNAc) in inhibit AFAL haemmagglutinating activity, Santi-Gadelha and collaborators (2008) characterized AFAL as PHA-like. The AFAL sequence analysis showed the highest identity among plant lectins with PHA (64%). However, the molecular modeling of AFAL not show favorable results when the model chosen was PHA, with the Z-score of -3.7 by Swiss-Model. Low quality model is expected to have strongly negative Z-scores (-1 to -4) featuring the model as unworkable.

New templates with favorable result of the Blast alignment were tested. Lectins of *Dolichus biflorus* (58%), *Butea monosperma* (51%), *Glycine max* (50%), *Robinia pseudoacacia* (48%), *Pisum sativum* (42%), *Erythrina crista-galli* (38%) and *Erythrina corallodendron* (37%) were identified as the best ones. Among these templates tested, the highest score was obtained from *Pisum sativum* lectin structure with Z-score of 0.00.

Structural superposition of AFAL/PSL showed two major differences. First, AFAL has an absent sheet in frontal β -sheets and two absent in posterior β -sheets conferring AFAL a differentiated characteristic from other legume lectins; their ability to bind to carrageenan. Molecular docking of AFAL/ carrageenan show negative E-

value confirming the ability to bind carrageenan. Second, AFAL has absence of an helix in carbohydrate binding site region changing it and not allowing binding to simple carbohydrates. AFAL/glycan molecular docking shows negative E-value confirming the integrity of the carbohydrate binding recognition site. Positive values of hemagglutinating activity corroborate this result.

Alencar et al. [35] demonstrated that legume lectins act in inflammatory process via carbohydrate recognition domain (CDR). AFAL structural analysis showed that carrageenan and glycan binding domains are independents. This corroborates our findings for the inhibition test (HA) by carrageenan, in which no change was observed in agglutination, probably due the fact that carbohydrate binding site is not affected by the presence of carrageenan that binds in distinct domain.

The ability to AFAL binding carrageenan can be explained by absence of the sixth β -sheet (frontal β -sheets) and two β -sheets in posterior region and seems to be responsible for its inability to form dimers. The analysis of composition of the fifth β -sheet of AFAL differs from PSL lectin by presence Ala209-His230, Lys211-Glu232, Met212-Leu233, respectively. This change in the radical groups causes a frontal β -sheet deletion on AFAL and increases his loop region also preventing the stabilization and formation of the dimer. This absence allows AFAL bind to carrageenan, the full posterior β -sheets of legume lectins does not allow the stabilization of the carrageenan, not allowing their binding. Therefore, there must also be a difference in anti-inflammatory mechanism of action between AFAL and other legume lectins.

The biological activity assay of AFAL showed that intravenous administration of this protein reduced neutrophil migration into the peritoneal cavity and vascular permeability induced by CGN. From these data, it is possible make relationship between anti-inflammatory activity of AFAL and carrageenan. This sulfated polysaccharide has long been used to test inflammation and anti-inflammatory activity with lectins, but little can be deduced about how is this activity. Some authors assumed that lowering of inflammation and neutrophil migration occurs through competition for binding to the selectins to neutrophils [36], but the AFAL can inhibiting pathway the carrageenan by connecting to it and preventing its entry into the cell and trigger the reactions, allowing the protein modify the defense of the organism and simultaneously exert its activity of binding to carbohydrates as demonstrated by inhibition with carbohydrates, in which HA was not reversed by addition of carrageenan.

The time-dependent oligomerization states of the AFAL observed by Santi-Gadelha et al. [1] can be stabilized in the presence of carrageenan and also agglutinate blood cells; this is due to AFAL / CGN interaction that positively contributes to the formation of the dimer. This small increase in stability can allow the formation of fine AFAL crystals and possibility that its structure could be resolved by X-ray crystallography.

5. Conclusion

Afal differs of the legume lectins in anti-inflammatory activity by structural absence of β -sheets allows direct connection to carrageenan and at the same time with glycans, decreasing the amount of carrageenan that enters the cell and reducing the inflammation effects.

6. Acknowledgements

This study was partly funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). P.D., B.A.M.R. and B.S.C. are senior investigators of CNPq.

7. References

- [1] T. Santi-Gadelha, B.A.M. Rocha, C.C. Oliveira, K.S. Aragão, E.S. Marinho, C.A.A. Gadelha, et al., Purification of a PHA-like chitin binding lectin from *Acacia farnesiana* seeds: a time-dependent oligomerization protein, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150 (2008) 97-111.
- [2] I.J. Goldstein, R.C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon, What should be called a lectin?, *Nature* 285 (1980) 66.
- [3] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Critical Reviews in Plant Sciences* 17 (1998) 575-692.

- [4] A.M. Guzman-Partida, M.R. Robles-Burgueno, M. Ortega-Nieblas, I. Vazquez-Moreno, Purification and characterization of complex carbohydrate specific isolectins from wild legume seeds: *Acacia constricta* is (vinorama) highly homologous to *Phaseolus vulgaris* lectins, *Biochimie* 86 (2004) 335-342.
- [5] M.E. Etzler, Distribution and function of plant lectins, in: I.E. Liener, N. Sharon, I.J. Goldstein (Eds.), *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*, Academic Press, Orlando, 1986, pp. 371-435.
- [6] J.J. Calvete, H.H. Thole, M. Raida, C. Urbanke, A. Romero, T.B. Grangeiro, et al., Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins, *Biochim. Biophys. Acta.* 1430 (1999) 367-375.
- [7] F.G. Del Sol, B.S. Cavada, J.J Calvete, Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer transition, *J. Struct. Biol.* 158 (2007) 1-9.
- [8] A.T. Andrews, Navy (Haricot)-Bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. Isolation and characterization of two components from a toxic agglutinating extract, *Biochem. J.* 139 (1974) 421-429.
- [9] R.A. Moreira, J.C. Perroni, Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiol.* 59 (1977) 783-787.
- [10] A. Sharma, T.B. Ng, J.W. Wong, P. Lin, Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans). *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 1-9.
- [11] N. Sharon, H. Lis, *Lectins*, second ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003.
- [12] A. Imberty, F. Casset, C.V. Gegg, M.E. Etzler, S. Pérez, Molecular modelling of the *Dolichos biflorus* seed lectin and its specific interactions with carbohydrates: alpha-D-N-acetyl-galactosamine, Forssman disaccharide and blood group A trisaccharide, *Glycoconj. J.* 11 (1994) 400-413.

- [13] T.W. Hamelryck, J.G. Moore, M.J. Chrispeels, R. Loris, L. Wyns, The role of weak protein-protein interactions in multivalent lectin-carbohydrate binding: crystal structure of cross-linked FRIL, *J. Mo. Biol.* 299 (2000) 875-883.
- [14] R. Loris, T. Hamelryck, J. Bouckaert, L. Wyns, Legume lectin structure, *Biochim. Biophys. Acta.* 1383 (1998) 9-36.
- [15] N.M. Young, R.P. Oomen, Analysis of sequence variation among legume lectins. A ring of hypervariable residues forms the perimeter of the carbohydrate-binding site, *J. Mol. Biol.* 228 (1992) 924-934.
- [16] V. Sharma, A.J. Surolia, Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 433-445.
- [17] J. Bouckaert, R. Loris, F. Poortmans, L. Wyns, Crystallographic structure of metal-free concanavalin A at 2.5 Å resolution, *Proteins* 23 (1995) 510-524.
- [18] J. Bouckaert, Y. Dewallef, F. Poortmans, L. Wyns, R. Loris, The structural features of concanavalin A governing non-proline peptide isomerization, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 19778-87.
- [19] J. Lescar, R. Loris, E. Mitchell, C. Gautier, V. Chazalet, V. Cox, et al., Isolectins I-A and I-B of *Griffonia* (*Bandeiraea*) *simplicifolia*. Crystal structure of metal-free GS I-B(4) and molecular basis for metal binding and monosaccharide specificity, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 6608-6614.
- [20] D. Sen, D.K. Mandal, Pea lectin unfolding reveals a unique molten globule fragment chain, *Biochimie* 93 (2011) 409-417.
- [21] U.K. Mazumder, M. Gupta, L. Manikandan, S. Bhattacharyya, P.K. Haldar, S. Roy, Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. Extract in rats, *Phytomedicine* 10 (2003) 185-188.

- [22] S. Bhattacharyya, H. Liu, Z. Zhang, M. Jam, P.K. Dudeja, G. Michel, et al., Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds, *J. Nutri. Biochem.* 21 (2010) 906-913.
- [23] A. Borthakur, S. Bhattacharyya, P.K. Dudeja, J.K. Tobacman, Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292 (2007) 829-838.
- [24] S. Bhattacharyya, R. Gill, M.L. Chen, F. Zhang, R.J. Linhardt, P.K. Dudeja, et al., Toll-like receptor 4 mediates induction of Bcl10–NFkappaB–IL-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 10550-10558.
- [25] S. Bhattacharyya, P.K. Dudeja, J.K. Tobacman, Carrageenan-induced NFkappaB activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10, *Biochim. Biophys. Acta.* 1780 (2008) 973-982.
- [26] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410.
- [27] F. Corpet, Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, *Nucl. Acids Res.* 16 (1988) 10881-10890.
- [28] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195-201.
- [29] D.W. Ritchie, G.J.L. Kemp, Protein docking using spherical polar Fourier correlations, *Proteins* 39 (2000) 178-194.
- [30] Y. Bourne, J. Mazurier, D. Legrand, P. Rouge, J. Montreuil, G. Spik, et al., Structures of a legume lectin complexed with the human lactotransferrin N2 fragment, and with an isolated biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety, *Structure* 2 (1994) 209-219.
- [31] S. Arnott, W.E. Scott, D.A. Rees, C.G. McNab, Iota-carrageenan: molecular structure and packing of polysaccharide double helices in oriented fibres of divalent cation salts, *J. Mol. Biol.* 90 (1974) 253-267.
- [32] G.E. de Souza, S.H. Ferreira, Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity, *Agents Actions* 17 (1985) 97-103.

- [33] G. Thurston, P. Baluk, D.M. McDonald, Determinants of endothelial cell phenotype in venules, *Microcirculation* 7 (2000) 67-80.
- [34] V.Z. Pletnev, S.N. Ruzheinikov, I.N. Tsygannik, I. Mikhailova Yu, W. Duax, D. Ghosh, et al., The structure of pea lectin-D-glucopyranose complex at a 1.9 Å resolution, *Russ J. Bioorganic Chem.* 23 (1997) 469-478.
- [35] N.M.N. Alencar, E.H. Teixeira, A.M.S. Assreuy, B.S. Cavada, C.A. Flores, R.A. Ribeiro, Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment, *Mediators Inflamm.* 8 (1999) 107-113.
- [36] A.M.S. Assreuy, M.D. Shibuya, G.J. Martins, M.L.P. De Souza, B.S. Cavada, R.A. Moreira, et al., Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans, *Mediators Inflamm.* 6 (1997) 201-210.

Table 1. Templates for molecular modeling by Swiss-Model program. The chain A for lectin from *Pisum sativum* seeds shows high Z-score.

Table II. The overall interactions between AFAL and carrageenan

Fig. 1 Alignment of amino acid sequences of the AFAL with some lectins. Were used lectins of *Phaseolus vulgaris* (PHA), *Dolichus biflorus* (DB58), *Butea monosperma* (BMA), *Glycine max* (SBL), *Robinia pseudoacacia* (RPbAI), *Erythrina cristagalli* (ECL), *Erythrina corallodendron* (EcorL) and *Pisum sativum* (PSL).

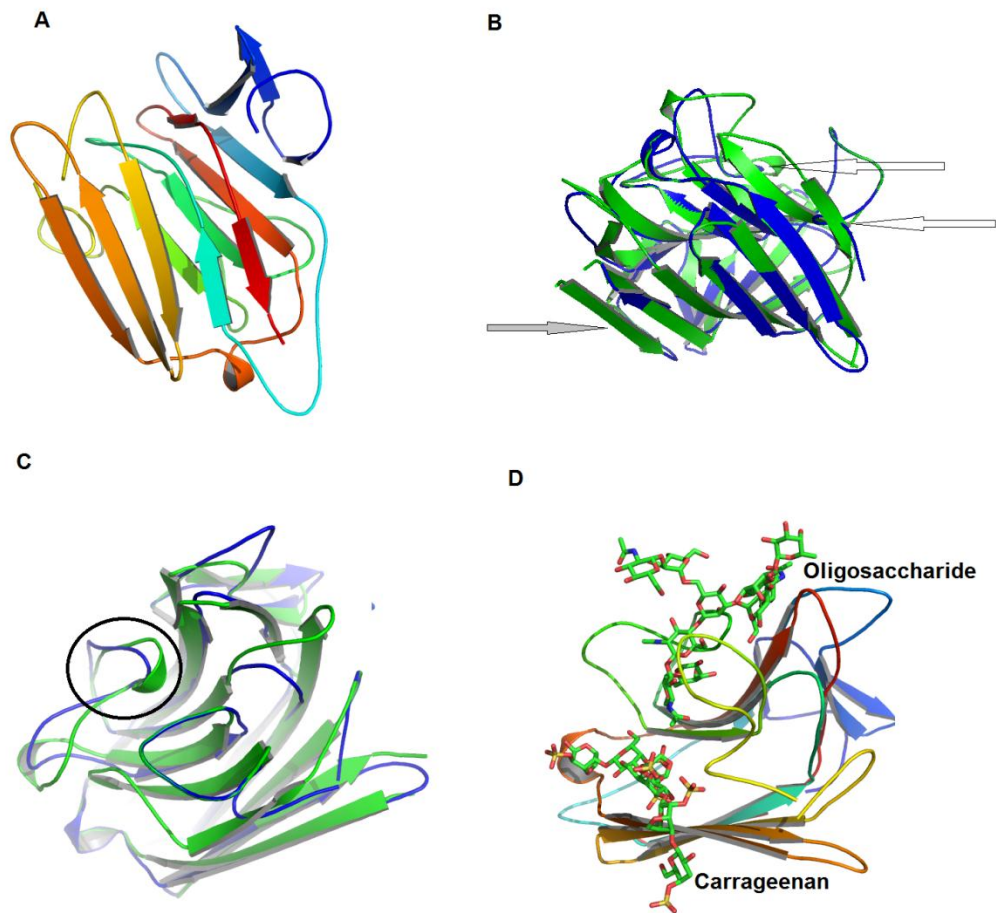
Fig. 2 AFAL structure obtained by molecular modeling. A) AFAL model. B) Superposition of *Pisum sativum* lectin (PDB code 2BQP) in green and AFAL model in blue. Gray arrow shows the absence of a frontal β -sheet in AFAL model. Empty arrows show the absence of two posterior β -sheets in AFAL model. C) Superposition of *Pisum sativum* lectin in green and AFAL model in blue. Highlighted (circle) the carbohydrate recognition domain. The Afal lacks the α -helix. D) AFAL binding the carrageenan and oligosaccharide in different sites.

Fig. 3 Antiinflammatory activity of AFAL. A) Anti-inflammatory effect of *A. farnesiana* on carrageenan-induced peritonitis in mice. Mice were treated with saline (0.1 ml, i.v.) or AFAL (1 mg/kg, i.v., 15 min before) and then injected i.p. with carrageenan at a dose of 500 μ g/cavity. The neutrophil migration was evaluated 4 h later. The white bars represent the neutrophil migration induced by saline injected i.p. The values are means \pm SD. *P<0.05 compared to carrageenan group; #P<0.05 compared to saline group (ANOVA followed by Bonferroni's t test). B) AFAL reduce vascular permeability on carrageenan-induced peritonitis in mice. Effects of the pretreatment with AFAL on vascular permeability. Vehicle (saline) or AFAL (1 mg/kg) was injected i.v. and, 15 min later, carrageenan (500 μ g/cavity). The values are means \pm SD. *P<0.05 compared to carrageenan group; #P<0.05 compared to saline group (ANOVA followed by Bonferroni's t test).

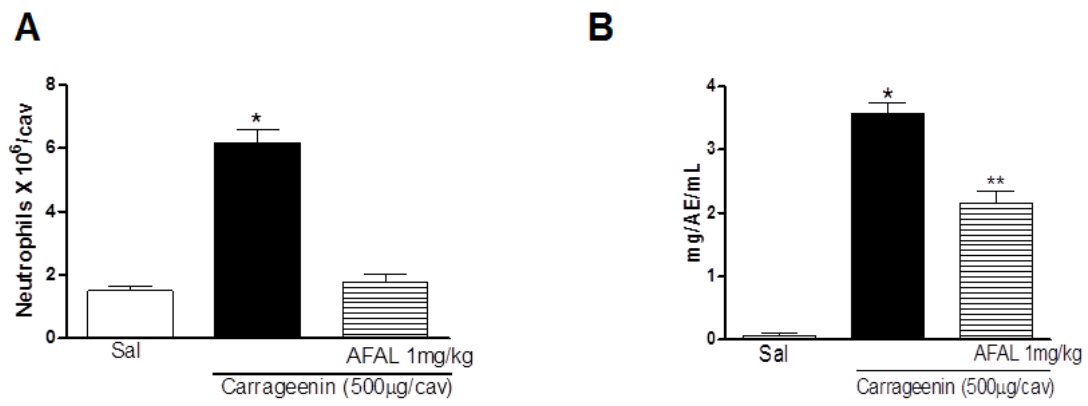
Fig. 4 AFAL molecular docking. A) The AFAL molecular docking with carrageenan which interacts via amino acids Ser129, Ala131, Leu156, Ser172, Asp173, Arg174, Ile130, Glu180 and Ala108. B) The AFAL molecular docking with oligosaccharide which interacts via amino Asp73, Gly92, Leu93, Leu94, Leu96, Phe97, Glu110, Cys114, Asn116, Glu118, His119, Asp120, Gly194, Leu195, Glu197 and Asn512.

Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)

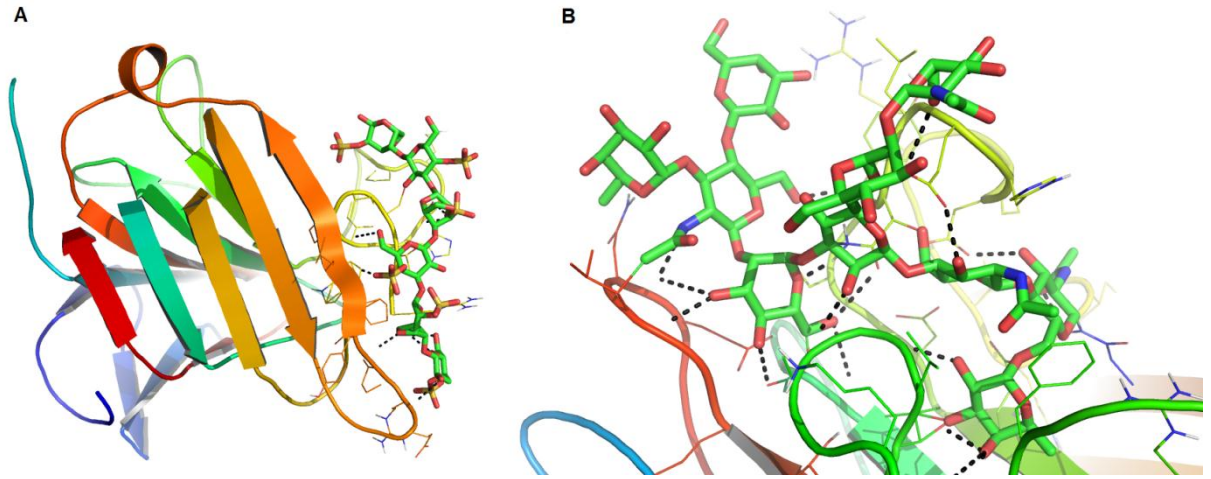


Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)

Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)



Table(s)

Code	Template	Score
1FAT	<i>Phaseolus vulgaris</i> lectin	-3.7
1LUL	<i>Dolichos biflorus</i> lectin	-3.99
3USU	<i>Butea monosperma</i> lectin	-3.18
2SBA	<i>Glycine max</i> lectin	-3.32
1FNY	<i>Robinia pseudoacacia</i> lectin	-3.75
2BQP	<i>Pisum sativum</i> lectin	0.00
1UZY	<i>Erythrina cristagalli</i> lectin	-3.87
3N35	<i>Erythrina corallodendron</i> lectin	-3.86

Table(s)

Carrageenan		Ser129		Ala131		Leu156	Ser172		Asp173	Arg174	Ile130	Glu180	Ala108
		O	OG	O	N	O	O	OD2	O	O	N	OE2	O
G4S ^a	O1	2.85	-	-	-	-	-	-	-	-	3.24	-	-
	O2	3.27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4S5	O2	-	-	-	-	-	-	-	-	3.13	-	-	-
	O6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.33	-
	O7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.29
DGS2 ^b	O7	-	-	2.51	2.33	-	-	-	-	-	-	-	-
	O9	-	-	-	3.26	-	-	-	-	-	-	-	-
	O3	3.35	3.08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DGS4	O5	-	-	-	-	-	-	3.11	-	-	-	-	-
	O7	-	-	-	-	2.82	3.21	-	2.57	-	-	-	-
	O8	-	3.39	-	-	2.96	-	-	-	-	-	-	-