

Vasodilatação mediada pela lectina de *Dioclea rostrata* em artérias de condutância e resistência: mecanismos e predições de ligação com glicoconjugados

Tatiani Botelho Nascimento

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, 19 julho de 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

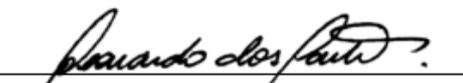
REGISTRO DE JULGAMENTO DA TESE DA CANDIDATA AO GRAU DE
DOUTORA PELO PPGCF CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS.

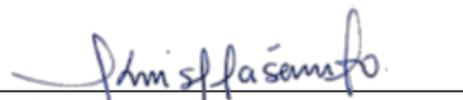
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “VASODILATAÇÃO MEDIADA PELA LECTINA DE *Dioclea rostrata* EM ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA E RESISTÊNCIA: MECANISMOS E PREDIÇÕES DE LIGAÇÃO COM GLICOCONJUGADOS” elaborada por **TATIANI BOTELHO NASCIMENTO**, candidata ao Grau de Doutora em Ciências Fisiológicas, recomendou, após apresentação da Tese, realizada no dia 19 de julho de 2021, que a mesma seja (assinale um dos itens abaixo):

Aprovada

Reprovada

Vitória, 19 de julho de 2021.


Prof. Dr. Leonardo dos Santos
(PPGCF-UFES) – Orientador


Profª. Drª Kyría Santiago do Nascimento
(UFCE) – Titular externo

Profª. Drª. Silvana dos Santos Meyrelles
(PPGCF-UFES) – Titular interno

Profª. Drª. Fabiana Dayse Magalhaes Siman Meira
(UFES-Alegre) – Titular externo

Profª. Drª. Suely Gomes Figueiredo
(PPGCF-UFES) - Titular interno





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA

O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
FABIANA DAYSE MAGALHAES SIMAN MEIRA - SIAPE 2649037
Departamento de Farmácia e Nutrição - DFN/CCENS
Em 26/07/2021 às 21:02

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/236959?tipoArquivo=O>





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA

O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
SILVANA DOS SANTOS MEYRELLES - SIAPE 2299966
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 27/07/2021 às 17:29

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/237655?tipoArquivo=O>



Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

N244d Nascimento, Tatiani Botelho, 1982-
Differential vasodilator effect of Dioclea rostrata lectin in conductance and resistance arteries: Mechanisms and glycoconjugate binding relationships / Tatiani Botelho Nascimento. - 2021.
91 f. : il.

Orientador: Leonardo dos Santos.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Lectinas. 2. endotélio. 3. artérias. 4. artérias de resistência. 5. vasodilatação. 6. glicano. I. dos Santos, Leonardo. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

DEDICATÓRIA

Dedico este doutorado a todos que amo.

O grande segredo dos grandes homens de todas as épocas foi a capacidade de entrar em contato com a mente subconsciente e libertar os seus poderes. Você pode fazer o mesmo.

(Livro: O poder do subconsciente, Dr. Joseph Murphy)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1. Lectinas	25
1.1.1 Aspectos gerais.....	25
1.1.2. Lectinas obtidas de plantas leguminosas.....	26
1.1.2.1 Lectina da semente de <i>Dioclea rostrata</i>	27
1.1.3. Domínio de reconhecimento de carboidratos e a diversidade de efeitos das lectinas.....	28
1.1.4 Efeitos biológicos das lectinas de leguminosas.....	30
1.2. O Sistema Vascular.....	32
1.2.1. Endotélio e a homeostase vascular.....	32
1.2.1.1 O glicocálice endotelial.....	33
1.2.1.2. Mediadores endoteliais para vasodilatação.....	37
1.2.1.3. Óxido nítrico (NO).....	37
1.2.1.4. Prostaciclina.....	39
1.2.1.5. Hiperpolarização derivada do endotélio (EDHF).....	40
1.2.2. O controle local do tônus em diferentes tipos de artérias.....	41
1.3. Mecanismos de vasodilatação das lectinas de leguminosas.....	43
1.4. Justificativa e hipótese.....	44
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo Geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1. Estudo “in vitro” dos efeitos vasodilatadores da DRL.....	47

3.1.1. Obtenção e preparação da lectina de semente da DRL.....	47
3.1.2. Animais experimentais e obtenção das artérias de diferentes tipos.....	47
3.1.2.1. Reatividade vascular em aorta.....	47
3.1.2.2. Reatividade vascular em artéria mesentérica de resistência.....	50
3.1.2.3. Reatividade vascular em artéria coronária.....	53
3.1.3. Principais mecanismos de vasodilatação nas artérias de diferentes tipos.....	54
3.1.3.1. Papel da liberação de óxido nítrico.....	54
3.1.3.2. Papel da hiperpolarização do músculo liso vascular.....	55
3.1.3.3. Papel da prostaciclina derivada da ciclooxigenase.....	55
3.2. Estudo “<i>in sílico</i>” da interação entre DRL e glicanos/carboidratos de membrana.....	56
3.2.1. Ancoragem ou “ <i>Docking</i> ” molecular.....	56
3.3. Drogas e soluções utilizadas.....	57
3.4. Análise estatística.....	58
4. RESULTADOS.....	60
4.1 A lectina <i>Dioclea rostrata</i> induz vasodilatação em artérias de condutância e resistência	60
4.2. Papel do óxido nítrico na vasodilatação mediada pela DRL.....	62
4.3. Papel da hiperpolarização na vasodilatação mediada pela DRL.....	64
4.4. Papel dos derivados da ciclooxigenase na vasodilatação mediada pela DRL.....	66
4.5. Interação entre DRL e carboidratos/glicanos por Ancoragem Molecular.....	68
5. DISCUSSÃO.....	72
5.1. Conclusão.....	82
6. REFERÊNCIAS.....	84

Lista de Figuras

- Figura 1: Planta *Dioclea rostrata* e suas sementes (foto cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, UFC).....28
- Figura 2: Imagem mostrando a estrutura geral de uma lectina de leguminosa. (A) mostra a configuração do tetrâmero, com o domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) marcado em vermelho; e (B) mostra uma imagem ampliada do monômero com folhas β (em amarelo), curva α (em roxo), sítios de ligação a metal (área com esferas verde e cinza) e o DRC (área ocupada pela molécula cinza e vermelha) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).....29
- Figura 3: Esquema representativo mostrando a membrana glicocálice endotelial: heparan sulfato (HS), ácido hialurônico (HA), condroitina sulfato (CS), são glicosaminoglicanos que estão ligados proteínas ou receptores (glicosanos, sindecano, CD44). Resíduos de ácido siálico e proteínas solúveis como a albumina estão presentes. As selectinas, integrinas e imunoglobulinas são glicoproteínas presentes na base do glicocálice. Modificado de (HARDING et al., 2019).....35
- Figura 4: Esquema representativo proposto para a produção de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂) induzidos por *Shear stress* (tensão de cisalhamento). (A) Gq/11/PECAM-1 ligado por heparan sulfato (HS) é o mecanossensor de fase inicial para produção de NO. (b) Glipicano-1 é o sensor de tensão de cisalhamento de fase sustentada que leva à ativação intracelular de PECAM-1 e à produção de NO. (c) A tensão induzida por cisalhamento em PECAM-1 induz a produção de PGI₂ através de uma via de sinalização que inclui PI3K-Integrins-COX-2. Modificado de (ZENG et al., 2018).....36
- Figura 5: Preparação dos segmentos isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *in vitro* (modificado de MUSTAFA; ANSARI; ABEBE, 2009).....49
- Figura 6: Registro apresentando o protocolo experimental para segmentos de aorta. O protocolo se inicia com a estabilização dos segmentos nas preparações de órgão isolado. Após período de estabilização foi adicionado ao banho KCl 75 mM, gerando uma reposta contrátil. Essa contração é mantida até atingirem a variação de 1g em relação ao basal, em seguida foram lavados três vezes com solução. Na sequência, outro período de estabilização, e novamente é adicionado ao banho KCl 75mM para permanecer por 30 minutos, e após, lavagem dos segmentos com solução. Um novo período de estabilização. Após, foi realizado o teste do endotélio com uma contração com fenilefrina. Ao atingir um platô de contração é adicionado ao banho acetilcolina para estimular um relaxamento. Após, as preparações são lavadas três vezes seguido de um novo tempo de estabilização para a realização dos protocolos experimentais.....50
- Figura 7: Esquema representando a preparação experimental dos segmentos de artéria mesentérica e segmentos de artéria coronária *in vitro* (Fonte: modificado de Nunes, 2018)52
- Figura 8: Esquema representativo mostrando incubação de 30 minutos com L-NAME e indometacina (INDO). Após contração com fenilefrina para segmentos de aorta ou mesentérica, serotonina para

segmentos de artéria coronária ou contração com KCl 60 mM, e na sequência, curva cumulativa com lectina de DRL.....	56
Figura 9: Relaxamento vascular induzido por lectina isolada de sementes de <i>Dioclea rostrata</i> (DRL) em segmentos da aorta, artéria mesentérica de resistência e artéria coronária. Os resultados são expressos como média ± EPM. + indica p <0,05 vs. aorta; * indica p <0,05 vs. artéria mesentérica, por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.....	61
Figura 10: Efeito remoção endotelial no relaxamento vascular induzido por DRL na aorta. Os resultados são média ± EPM. *p <0,05 vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.....	62
Figura 11: Efeitos da inibição da NO sintase pela incubação prévia com L-NAME 100 µM no relaxamento vascular induzido por DRL na aorta (A), artéria de mesentérica de resistência (B) e artéria coronária (C). Os resultados são média ± EPM. *p <0,05 vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.....	63
Figura 12: Efeitos da solução despolarizante com altas concentrações de KCl no relaxamento vascular induzido por DRL em segmentos de aorta (A), artéria de resistência mesentérica (B) e artéria coronária (C). Os resultados são média ± EPM. *p <0,05 vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.....	65
Figura 13: Efeitos da inibição da COX pela incubação prévia com indometacina sobre o relaxamento vascular induzido por DRL em segmentos de aorta (A), artéria de mesentérica (B) e artéria coronária (C). Os resultados são média ± EPM. * p <0,05vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.....	67
Figura 14: Resultados de docking molecular da DRL com glicanos representativos encontrados em glicoproteínas presentes na superfície membrana celular. A pontuação de docking foi obtida, e a ligação favorável (barras escuras) foi considerada quando as pontuações foram mais negativas do que aquelas de D-manose e X-manose (linhas pontilhadas), ligantes nativos conhecidos e conhecidos como aplicados na cristalização de DRL, respectivamente.....	69
Figura 15: Ilustração demonstrando a melhor pose da DRL no complexo formado com heparan sulfato. A DRL é representada em verde com a representação da sua superfície em cinza. O heparan sulfato de heparan pode ser visto na representação em bastão. O cálcio e o manganês são representados pelas esferas verdes e roxas, respectivamente.....	70
Figura 16: Resumo gráfico do estudo.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1: Efeito vasodilatador mostrado em porcentagem de relaxamento máximo alcançado. As participações do óxido nítrico e dos produtos da ciclooxigenase foram testadas pela incubação de L-NAME e indometacina, inibidores das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase, respectivamente. Todas as lectinas foram testadas em segmentos de aorta de ratos. Modificado (CAVADA, Benildo S. et al., 2019).....	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT: 5-hidroxitriptamina

Δ GL: Energia livre de Gibbs

μ g: Microgramas

ACh: Acetilcolina

Ang-II: Angiotensina II

AA-COX: Ácido araquidônico - enzima ciclooxigenase

BH₄: Tetra-hidrobiopterina

BK_{Ca}: Canais para K⁺ de larga condutância

CGL: *Canavalia gladiata*

ConA: *Canavalia ensiformis*

ConBr: *Canavalia brasiliensis*

ConGF: *Canavalia grandiflor*

ConM: *Canavalia maritima*

ConV: *Canavalia virosa*

CO: Monóxido de carbono

COXs: Ciclooxigenases

CRL1: *Cymbosema roseum*

CS: condroitina sulfato

DLL: *Dioclea lasiocarpa*

DRC: Domínio de reconhecimento de carboidrato

DrfL: *Dioclea reflexa*

DRL: *Dioclea rostrata*

DSL: *Dioclea sclerocarpa*

DVL: *Dioclea violacea*

DvirL: *Dioclea virgata*

EDHF: Hiperpolarização derivada do endotélio

EET Ácidos epoxieicosatrienos

EDH: endothelium-dependent hyperpolarization

eNOS: Óxido nítrico sintase endotelial

ET-I: Endotelina

GAGs: glicosaminoglicanos

GCs: Guanilato ciclase solúvel

GPI: Glicofosfatidilinositol

GPCRs: Receptores acoplados a proteína G

GlcNac: *N*-acetilglucosamina

GMPc: 3,5 – monofosfato cíclico de guanosina

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂S: Sulfeto de hidrogênio

HA: ácido hialurônico

HS: heparan sulfato

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

IP: Fosfato inositol

IK_{Ca}: Canais de K⁺ de Intermediária Condutância

K⁺: Potássio

KCa⁺²: Canais para K⁺ dependentes de Ca⁺²

K_D: Constante de dissociação

kDa: Quilodalton

Kv: Canais de K⁺ voltagem dependente

Kir: Canais de K⁺ retificadores

KCl: Cloreto de potássio

MAN: manose

MLC: Cadeia leve de miosina

MLCK: Cinase de cadeia leve de miosina

PECAM-1 ou CD31: Molécula de adesão de células endoteliais de plaquetas

PVAT: tecido adiposo perivascular

AMPC: Monofosfato cíclico de adenosina

L-NAME: N-Nitro-L-arginina metil éster

MLV: Músculo liso vascular

mL: Mililitros

nNOS: Óxido nítrico sintase neuronal

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

O-Fuc: O-fucose

O-Gal: O-galactose

O-Man: O-manose

PKA: Proteína quinase A

PKG: Proteína quinase G

PDB: Protein Data Bank

PGI₂: Prostaciclina

RE: Retículo endoplasmático

SKCa: Canais de K⁺ de pequena condutância

TXA₂: Tromboxano

O-GlcNAc: β-N-acetilglucosamina nucleocitoplasmático

RESUMO

Resumo

Lectinas são proteínas encontradas em vários organismos, desde microrganismos como vírus e bactérias até em animais e plantas, e possuem a capacidade de ligar a carboidratos de forma específica e reversível através do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC). Lectinas encontradas em sementes de leguminosas possuem diversos efeitos que incluem ação anti-inflamatória, nociceptiva, antiproliferativa, antimicrobiana e antitumoral. Estudo prévio demonstrou que a lectina isolada da leguminosa *Dioclea rostrata* (DRL) possui efeito vasodilatador em aorta de ratos. O objetivo desse estudo foi avaliar se as vias de relaxamento induzido por DRL se alternam entre diferentes tipos de artéria, e identificar possíveis interações moleculares envolvidas. Aorta torácica de rato, artéria mesentérica de resistência e artéria coronária foram testadas "in vitro" com curvas cumulativas de DRL (0,01–100 µg/mL). Além disso, também foram testadas as possíveis interações da DRL com glicanos ou glicoproteínas presentes na membrana celular por meio de estudos "in silico" de ancoragem molecular. Nos estudos de reatividade, L-NAME, indometacina e KCl alto foram usados para avaliar os efeitos dependentes de óxido nítrico (NO), da ciclooxigenase (COX) e da hiperpolarização. A DRL promoveu relaxamento de todos os vasos através de diferentes mecanismos. Enquanto a inibição da síntese de NO com L-NAME atenuou os efeitos induzidos pela DRL apenas na aorta e na artéria de mesentérica de resistência, nenhum efeito significativo foi identificado na artéria coronária. Ao usar a solução despolarizante (KCl), a vasodilatação mediada pela DRL foi inibida em todas as artérias, porém com menor efeito nas artérias coronárias. Enquanto a incubação com indometacina reduziu significativamente o relaxamento, indicando papel para os fatores derivados da ciclooxigenase nos efeitos da DRL nas artérias mesentéricas e coronárias, nenhum efeito foi notado nos segmentos de aorta. De maneira interessante, o efeito mediado pela DRL na artéria mesentérica de resistência é bifásico (relaxamento seguido de contração), sendo o efeito final provavelmente mediado pela liberação de prostanoídes constritores derivados da COX. Os resultados de docking molecular sugeriram interações entre DRL e heparan sulfato, CD31 (PECAM-1) e vários outros glicanos biologicamente relevantes presentes na superfície da membrana e glicocálice do endotélio. Esses dados indicam que os mecanismos envolvidos na vasodilatação mediada por DRL variam entre artérias de condutância e resistência de diferentes origens, e esses efeitos poderiam

estar relacionados à capacidade do DRL de ligar uma diversidade de glicanos, especialmente heparan sulfato e PECAM-1 (CD31), dois mecanorreceptores propostos para ativação da NO sintase e da ciclooxigenase no endotélio vascular.

Palavras-chave: Lectinas, endotélio, artérias, artéria de resistência, vasodilatação, glicanos, molecular docking.

ABSTRACT

Abstract

Lectins are proteins found in many organisms, from microorganisms such as viruses and bacteria to animals and plants, and have the ability to specifically and reversibly bind carbohydrates through the carbohydrate recognition domain (CDR). Lectins found in legume seeds have several effects that include anti-inflammatory, nociceptive, antiproliferative, antimicrobial and antitumor actions. A previous study has demonstrated that the lectin isolated from the legume *Dioclea rostrata* (DRL) has a vasodilator effect in rat aorta. The aim of this study was to test whether DRL-induced vasorelaxation pathways may vary among different types of arteries, and to identify possible molecular interactions involved. Rat thoracic aorta, resistance mesenteric and coronary arteries were tested "*in vitro*" with cumulative DRL curves (0.01-100 µg/mL). Also, the possible interactions of DRL with glycans or glycoproteins present in the cell membrane were tested by "*in silico*" molecular docking study. In vascular reactivity studies, L-NAME, indomethacin and high KCl were used to assess the nitric oxide (NO), cyclooxygenase (COX) and hyperpolarization dependent effects. Our results indicated that DRL promotes relaxation of all vessels through different mechanisms. The inhibition of NO release with L-NAME attenuated the DRL effects only in the aorta and resistance mesenteric artery, but not in the coronary artery. When using the depolarizing solution (KCl), DRL-mediated vasodilation was inhibited in all arteries, but with smaller effect in the coronary arteries. Although incubation with indomethacin significantly reduced the relaxation of DRL in mesenteric and coronary arteries, indicating a role for COX-derived factors, no effect was found in the aortic segments. Interestingly, the DRL-mediated effect on the resistance mesenteric artery was biphasic (relaxation followed by contraction), with the final effect probably mediated by the release of COX-derived constrictor prostanoids. The molecular docking assays suggested interactions between DRL and heparan sulfate, CD31 (PECAM-1) and several other biologically relevant glycans present on the membrane surface and endothelial glycocalyx. These data indicate that the mechanisms involved in DRL-mediated vasodilation vary between conductance and resistance arteries from different origins, and these effects may be related to the ability of DRL to bind a diversity of glycans, especially heparan sulfate and PECAM-1, two proposed mechanoreceptors involved in the activation of NO synthase and COX in the vascular endothelium.

Keywords: Lectins, endothelium, arteries, resistance artery, vasodilatation, glycans, molecular docking.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

1.1.1. Aspectos gerais

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos de forma específica e reversível através do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC)(BARROSO-NETO, Ito Liberato et al., 2014). Recentes revisões publicadas indicam que os estudos com lectinas vegetais têm seu primeiro registro e sua história iniciando com extrato da semente de mamona (*Ricinus communis*) em 1888 e outras plantas que também apresentam a capacidade de aglutinar hemácias de animais, mostrando uma classe de proteínas com capacidade de aglutinação de hemácias de animais (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2018, MISHRA et al., 2019). Porém, Mishra et al (2019) afirma que somente com os estudos de Boyd e Shapleigh, em 1954, surgiu o termo “lectina” (que vem do latim *legere* e significa ler, escolher ou selecionar) para denominar aglutininas derivadas de plantas e específicas para grupos sanguíneos (MISHRA et al., 2019).

A capacidade de reconhecer e se ligar a carboidratos foi mantida durante o processo evolutivo das lectinas. (CAVADA, Benildo S. et al., 2019). Lectinas da Subtribo *Diocleinae*, por exemplo, possuem domínios de reconhecimento de carboidratos (DRCs) altamente conservados, e apenas as distâncias entre os resíduos que o compõe afetam sua forma e volume (BARROSO-NETO, Ito Liberato et al., 2014). As lectinas são amplamente distribuídas na natureza e encontradas desde em microorganismos como vírus e bactérias, até em plantas e animais (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; CAVADA, Benildo S. et al., 2019). Como podem ser produzidas por vários organismos, as lectinas podem ser agrupadas com relação à espécie ou origem (MISHRA et al., 2019). Entre as lectinas de plantas, as mais estudadas são aquelas

identificadas nas leguminosas, sendo encontradas de forma abundante em suas sementes como por exemplo o feijão e a ervilha, e possuem grande similaridade na sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017; GOMES et al., 2012; ASSREUY et al., 2009).

1.1.2. Lectinas obtidas de plantas leguminosas

As lectinas de leguminosas são metaloproteínas que precisam de íons cálcio e magnésio para estabilizar a sua ligação com carboidratos. Além disso, possuem especificidade por resíduos de manose e glicose (MISHRA et al., 2019) e compartilham uma semelhança estrutural, apesar das diferentes atividades biológicas (BRINDA; SUROLIA; VISHVESHWARA, 2005; CAVADA, Benildo S. et al., 2019). Estudos demonstraram que lectinas da subtribo *Diocleinae*, que faz parte da família das leguminosas, possuem ação anti-inflamatória, nociceptiva, antiproliferativa, antimicrobiana, antitumoral, vasoativa, entre outros efeitos biológicos (ALENCAR et al., 2005; CAVADA, Benildo S. et al., 2019; LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). As ligações das lectinas aos carboidratos acontece através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Essas ligações são mediadas por moléculas de água, que funcionam como extensão na superfície da proteína, sendo um papel significativo para o reconhecimento de carboidratos (AMBROSI; CAMERON; DAVIS, 2005). O fato de tanto proteínas como carboidratos estarem presentes na superfície celular, permite que ambos sejam considerados como marcadores de reconhecimento. É a forma tetramérica das lectinas que determina a ligação ao carboidrato e sua distinção entre diferentes açúcares, devido ao formato dos locais de ligação (BARROSO-NETO, Ito Liberato et al., 2014). A fácil

solubilidade, especificidade com carboidratos, e o fato de serem abundantemente encontradas em sementes de plantas, tem permitido um amplo estudo das interações proteínas-carboidratos, além da investigação de potenciais aplicações dessas substâncias (CAVADA, Benildo S. et al., 2019).

1.1.2.1 Lectina da semente de *Dioclea rostrata*

A lectina encontrada na espécie *Dioclea rostrata* (DRL) possui 237 aminoácidos, peso molecular de 25,49 kDa, e tem grande similaridade com outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, principalmente as do mesmo gênero (DE OLIVEIRA et al., 2008). A *Dioclea rostrata* é uma leguminosa (Figura 1) cujas sementes são a maior fonte da DRL isolada e purificada. Interessantemente, devido a variações em resíduos presentes no seu domínio de reconhecimento, a DRL apresenta um DRC maior e mais raso que os de outras lectinas homólogas, tal como daquela da *Dioclea violácea* (DVL) (BARROSO-NETO, Ito Liberato et al., 2014). Essa característica, determinada pelas distâncias entre os resíduos presentes no seu DRC, favorece uma melhor interação da lectina com seus carboidratos, diferentemente do que acontece em lectinas com um DRC mais estreito e profundo (BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016). Quanto à sequência dos aminoácidos e estrutura tridimensional, a DRL apresenta similaridades com outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, mas com pequenas diferenças que certamente também levam às diferentes atividades biológicas (CAVADA, Benildo S. et al., 2019). Finalmente, outra característica estrutural dessa lectina, que é compartilhada por outras isoladas de plantas da mesma família, é a posição 205 ocupada pelo resíduo de aminoácido aspartato na sua sequência primária. Isso pode contribuir com uma maior intensidade de seus efeitos biológicos, como por exemplo

uma maior capacidade de relaxamento vascular, tanto que em determinadas lectinas com menor efeito vasodilatador, essa mesma posição é ocupada por glutamato (BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016).



Figura 1: Planta *Dioclea rostrata* e suas sementes (foto cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, UFC).

1.1.3. Domínio de reconhecimento de carboidratos e a diversidade de efeitos das lectinas

O DRC das lectinas e sua ligação com carboidratos é o mais importante evento que permite as atividades biológicas. A presença de sítios de ligação para carboidratos nesta estrutura presente nas lectinas é de fato considerada a sua principal característica na determinação da função e efeitos biológicos (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). Na superfície de células endoteliais, por exemplo, existem inúmeras glicoproteínas que poderiam se ligar com DRC de lectinas (BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016). O que muda é a conformação

do DRC, que é influenciado pela composição dos aminoácidos e pela forma dessas proteínas (dimérica ou tetramérica) (SANZ-APARICIO et al., 1997). Tal como mostrado na figura 2, cada monômero da forma tetramérica há um domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) acessível à monossacarídeos e oligossacarídeos, além de locais de ligação para cálcio e manganês (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). É sabido que o pH pode influenciar a forma das lectinas das espécies da subtribo *Diocleinae*, ou seja, determinando assim sua forma dimérica e tetramérica. Com isso, as alterações no pH pode alterar a configuração dos DRC e, conseqüentemente os efeitos biológicos, que podem ter qualidade e intensidades diferentes (BARROSO-NETO, Ito Liberato et al., 2014; BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016).

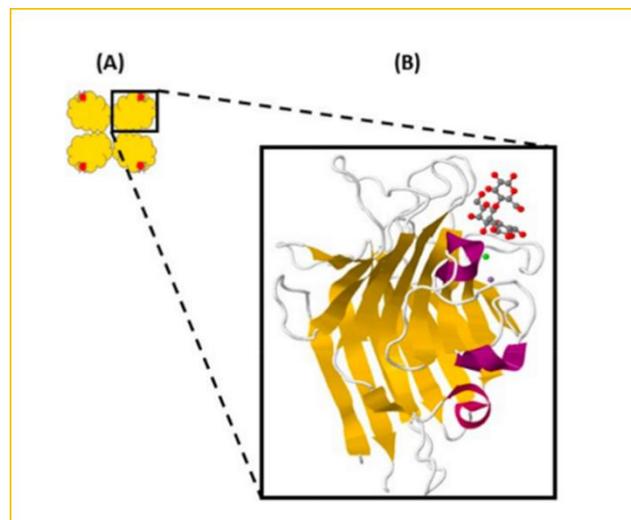


Figura 2: Imagem mostrando a estrutura geral de uma lectina de leguminosa. (A) mostra a configuração do tetrâmero, com o domínio de reconhecimento de carboidrato (DRC) marcado em vermelho; e (B) mostra uma imagem ampliada do monômero com folhas β (em amarelo), curva α (em roxo), sítios de ligação a metal (área com esferas verde e cinza) e o DRC (área ocupada pela molécula cinza e vermelha) (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017).

Entretanto, é importante mencionar que além dos DRC, outros locais específicos dessas proteínas, como o de ligação ao metal e de ligação hidrofóbica, são capazes de ocasionalmente interagir com determinadas moléculas, e assim, mediar alguma atividade biológica (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; CAVADA, Benildo S. et al., 2019).

1.1.4. Efeitos biológicos das lectinas de leguminosas

Como mencionado, as lectinas são capazes de modular muitos processos de reconhecimento celular, patogênese viral e bacteriana, além de inflamação (PIETRZYK-BRZEZINSKA; BUJACZ, 2020). Por exemplo, lectinas isoladas de espécies da subtribo *Diocleinae* possuem ação antibacteriana e antifúngica dependente de seu DRC (GOMES et al., 2012), podendo tanto se ligar à superfície bacteriana e inibir sua ligação com as células hospedeiras, quanto se ligar aos carboidratos presentes na superfície das células imunológicas sinalizando ações contra as bactérias (MISHRA et al., 2019). Ademais, estudos têm mostrado certa capacidade pró-apoptótica em células cancerígenas com determinadas lectinas de leguminosas, ao se ligarem a proteínas glicosiladas (geralmente alteradas) na membrana dessas células (CAVADA, Benildo S. et al., 2019). Possuem também efeito antidepressivo em ratos, reportado recentemente para a lectina isolada da *Canavalia brasiliensis* (ConBr), provavelmente modulando receptores serotoninérgicos (Rieger et al., 2014). Outro efeito descrito para as lectinas de leguminosas é seu potencial inseticida: foi sugerido que o mecanismo envolve ligação aos glicanos presentes na superfície das células do epitélio intestinal dos insetos, interferindo nos processos digestivos (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Finalmente, um importante efeito

com potencial aplicabilidade farmacológica é a capacidade vasodilatadora descrita para diversas lectinas da subtribo *Diocleinae* em aorta de ratos (ASSREUY et al., 2009; BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016; BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; GADELHA et al., 2005). Na tabela 1 são apresentados os resultados resumidos dos estudos já publicados até o momento, que avaliaram os efeitos agudos da incubação de lectinas isoladas de leguminosas da subtribo *Diocleinae* em segmentos de aorta de ratos e as respectivas características da vasodilatação encontrada, o que se sugere dever às especificidades de seus DRC.

Lectinas	Capacidade de relaxamento máximo (0-100%)	Efeito da inibição da ciclooxigenase	Efeito da inibição do óxido	Efeito da ocupação do DRC pelo seu carboidrato específico
<i>Canavalia brasiliensis</i> - ConBr	74%	Bloqueio parcial	Bloqueio parcial	Bloqueio parcial
<i>Canavalia gladiata</i> - CGL	108%	Bloqueio parcial	Bloqueio total	Bloqueio parcial
<i>Canavalia grandiflora</i> - ConGF	25%	Não avaliado	Bloqueio total	Não avaliado
<i>Canavalia maritima</i> - ConM	110%	Não avaliado	Bloqueio total	Não avaliado
<i>Canavalia ensiformis</i> - ConA	85%	Não avaliado	Não avaliado	Não avaliado
<i>Canavalia virosa</i> - ConV	77%	Não avaliado	Não avaliado	Bloqueio parcial
<i>Cymbosema roseum</i> - CRL1	96%	Sem resposta	Bloqueio total	Não avaliado
<i>Dioclea lasiocarpa</i> - DLL	81%	Não avaliado	Bloqueio parcial	Bloqueio parcial
<i>Dioclea reflexa</i> - DrfL	32%	Não avaliado	Bloqueio total	Bloqueio parcial
<i>Dioclea sclerocarpa</i> - DSL	36%	Não avaliado	Bloqueio total	Bloqueio total
<i>Dioclea rostrata</i> - DRL	96%	Bloqueio parcial	Bloqueio total	Bloqueio parcial
<i>Dioclea violacea</i> - DVL	43%	Sem resposta	Bloqueio parcial	Bloqueio parcial
<i>Dioclea virgata</i> - DvirL	70%	Não avaliado	Bloqueio total	Não avaliado

Tabela 1: Efeito vasodilatador mostrado em porcentagem de relaxamento máximo alcançado. As participações do óxido nítrico e dos produtos da ciclooxigenase foram testadas pela incubação de L-NAME e indometacina, inibidores das enzimas óxido nítrico sintase e ciclooxigenase, respectivamente. Todas as lectinas foram testadas em segmentos de aorta de ratos. Modificado (CAVADA, Benildo S. et al., 2019).

Vale notar que, historicamente, várias substâncias derivadas de plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da farmacologia cardiovascular, e não resta dúvidas da importância dos seus estudos na descrição de potenciais efeitos vasculares das substâncias recém isoladas, ou até mesmo no processo de descobrimento de novas drogas com ação sobre esse sistema.

1.2. O Sistema Vascular

1.2.1. Endotélio e homeostase vascular

A homeostase do sistema circulatório é garantida por uma série de processos fisiológicos (neurais, humorais e locais) que garantem o fluxo adequado aos diversos tecidos do organismo. Em uma organização estrutural geral, os vasos sanguíneos são constituídos por três camadas: uma monocamada de células endoteliais, uma camada média composta principalmente por músculo liso vascular, e uma camada adventícia externa (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). A camada muscular permite o controle dinâmico do tônus vascular e, conseqüentemente, do diâmetro do vaso e assim da resistência ao escoamento de sangue (U. SYED et al., 2020). A adventícia possui terminações nervosas, tecido adiposo perivascular, fibroblastos e fibras de colágeno, conferindo assim elasticidade e permitindo aderência ao parênquima dos órgãos (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). Porém, o endotélio vascular, antes visto apenas uma barreira inerte de separação do sangue e a parede vascular, já há algumas décadas é reconhecido como a estrutura dinâmica e metabolicamente ativa mais importante da vasculatura. As células endoteliais, que na verdade revestem o interior de todos os vasos sanguíneos (incluindo artérias, veias e capilares) e também as câmaras cardíacas, são capazes de sintetizar e liberar uma série de substâncias

frente a estímulos químicos e físicos (TARBELL; PAHAKIS, 2006; BISWAS; KHAN, 2019), que por sua vez atuam de forma autócrina e/ou parácrina na regulação de cascatas de coagulação, inflamação, permeabilidade vascular, angiogênese e tônus da vasculatura (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). É considerado o maior órgão do corpo com participação da homeostase do tônus vascular sendo responsável pela síntese e secreção tanto de substâncias relaxantes quando contráteis para o músculo liso vascular conduzindo à vasodilatação ou vasoconstrição, respectivamente. Para promover relaxamento, as células endoteliais produzem substâncias vasoativas, dentre elas as mais importantes: o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o originalmente denominado “fator hiperpolarizante derivado do endotélio” (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006). Para promover vasoconstrição, é capaz de liberar tromboxano (TXA₂) e outros prostanóides derivados da COX, angiotensina II (Ang-II), endotelina I (ET-I) e algumas espécies reativas de oxigênio (BISWAS; KHAN, 2019). O fluxo sanguíneo local é o resultado do equilíbrio do relaxamento e contração vascular determinado por esses fatores (BISWAS; KHAN, 2019).

Porém, toda essa constante intercomunicação entre os fatores físico-químicos da circulação e o endotélio subjacente é possível não só pela presença de receptores proteicos de membrana, mas também por intermédio de uma camada gelatinosa, carregada negativamente e composta principalmente de material glicoproteico denominada glicocálice endotelial (REITSMA et al., 2007).

1.2.1.1 O glicocálice endotelial

O glicocálice endotelial está presente na superfície das células e, tal como o glicocálice das células em geral é formado por uma camada de glicoconjugados

(glicoproteínas e glicolipídeos) composta por oligossacarídeos, ácidos siálicos e proteoglicanos (TARBELL; PAHAKIS, 2006). Essas moléculas de glicoconjugados são chamados de glicoproteínas devido à adição de açúcares a proteínas (REILY et al., 2019), sendo sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e no aparelho de golgi (SPROVIERI; MARTINO, 2018). Nas membranas, as glicoproteínas representam moléculas de adesão celular e são distribuídas em 3 famílias: selectinas, imunoglobulinas e integrinas (GAUDETTE; HUGHES; BOLLER, 2020). Os proteoglicanos são glicoproteínas da matriz extracelular que possuem repetições de açúcar ligadas por glicosilação, sendo essas cadeias laterais de açúcares dos proteoglicanos denominadas glicosaminoglicanos (GAGs) (REILY et al., 2019) (Figura 3). Os GAGs se estendem da proteína central para o lúmen vascular, e se ligam a outros proteoglicanos através de cadeias que incluem heparan sulfato, condroitina sulfato, dermatan sulfato, queratan sulfato e ácido hialurônico. Entretanto, o heparan sulfato é o principal componente dos GAGs, está presente principalmente na superfície luminal do glicocálice em estruturas específicas e cavéolas que contêm a enzima NO sintase, permitindo assim participar intimamente da integridade estrutural e de interações e respostas celulares (GAUDETTE; HUGHES; BOLLER, 2020; UCHIMIDO; SCHMIDT; SHAPIRO, 2019). Ainda em relação aos proteoglicanos, existem os sindecanos e glipicanos, mas o sindecano-1, um proteoglicano de heparan sulfato, tem sido o principal alvo de pesquisa no glicocálice endotelial (TARBELL; PAHAKIS, 2006; UCHIMIDO; SCHMIDT; SHAPIRO, 2019). Como os sindecanos são proteínas transmembranares, o domínio extracelular liga e detecta sinais extracelulares (tais como tensão de cisalhamento), que são transmitidos para o citoesqueleto de actina através do domínio transmembrana, e por fim, sinalizam a produção de NO. Já os glipicanos estão ligados à membrana luminal e não são

proteínas transmembranares (GAUDETTE; HUGHES; BOLLER, 2020; TARBELL; PAHAKIS, 2006).

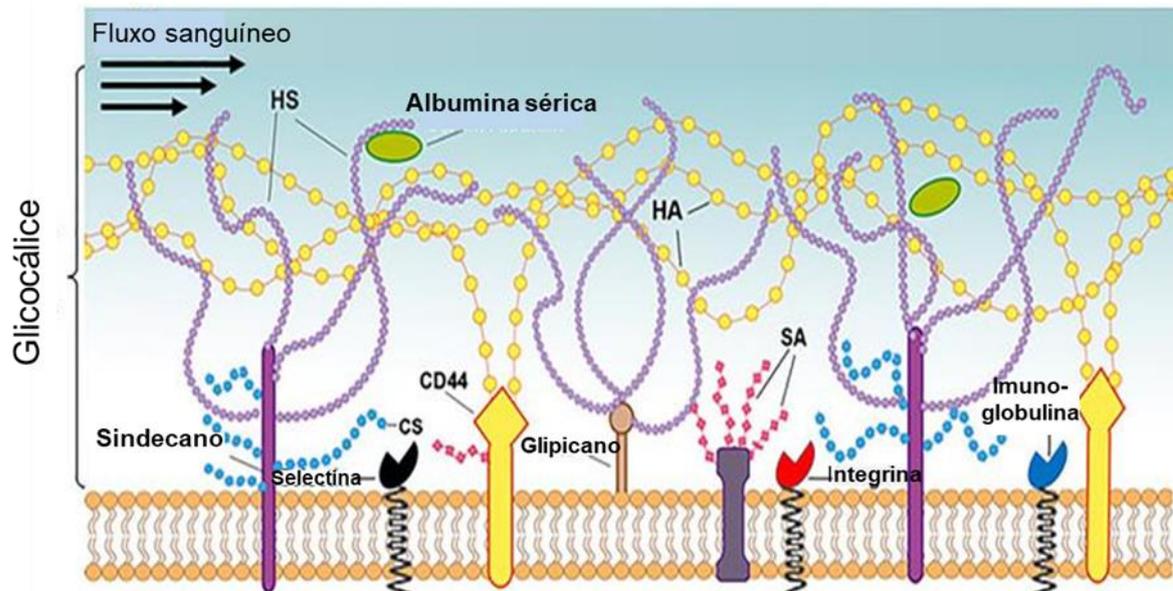


Figura 3: Esquema representativo mostrando a membrana glicocálice endotelial: heparan sulfato (HS), ácido hialurônico (HA), condroitina sulfato (CS), são glicosaminoglicanos que estão ligados proteínas ou receptores (glicosanos, sindecano, CD44). Resíduos de ácido siálico e proteínas solúveis como a albumina estão presentes. As selectinas, integrinas e imunoglobulinas são glicoproteínas presentes na base do glicocálice. Modificado de (HARDING et al., 2019).

Tal como apresentado na figura 4, além do heparan sulfato, evidências recentes sugerem que a molécula de adesão de plaquetas das células endoteliais (PECAM-1, ou CD31), uma proteína altamente glicosilada, também é importante na mecanotransdução das células endoteliais para controle do tônus (NEWMAN; NEWMAN, 2003). Está concentrada em regiões altamente suscetíveis aos efeitos do *shear stress* e também se colocaliza com a NO sintase na membrana celular (NEWMAN; NEWMAN, 2003; RUSSELL-PULERI et al., 2017; WEINBAUM et al., 2021). Além disso, foi descrito que na ausência dessa molécula de adesão, ocorre

também redução nos componentes mediados por hiperpolarização e pela ativação da ciclooxigenase na vasodilatação mediada por fluxo (LIU et al., 2006). Assim, esta glicoproteína PECAM-1 também é um componente candidato lógico da via de sinalização envolvida na vasodilatação.

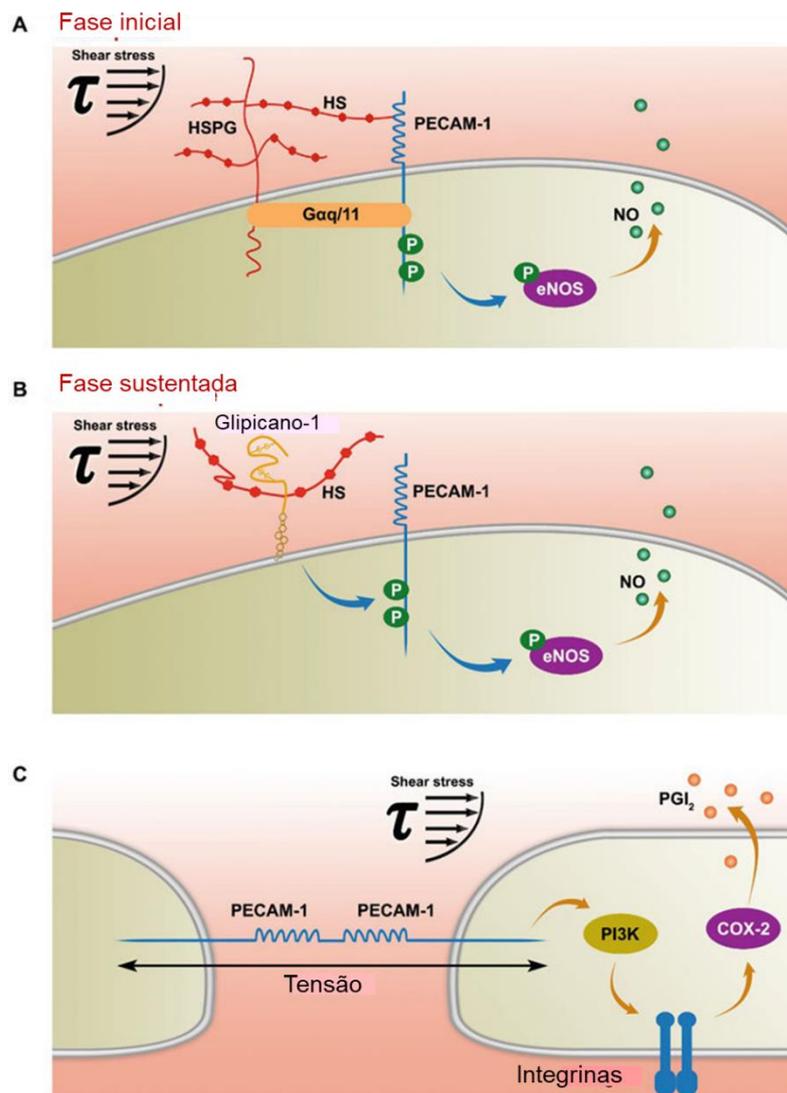


Figura 4: Esquema representativo proposto para a produção de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI₂) induzidos por *Shear stress* (tensão de cisalhamento). (A) Gαq/11/PECAM-1 ligado por heparan sulfato (HS) é o mecanossensor de fase inicial para produção de NO. (b) Glipicano-1 é o sensor de tensão de cisalhamento de fase sustentada que leva à ativação intracelular de PECAM-1 e à produção de NO. (c) A tensão induzida por cisalhamento em PECAM-1 induz a produção de PGI₂ através de uma via de sinalização que inclui PI3K-Integrins-COX-2. Modificado de (ZENG et al., 2018).

De fato, a integridade estrutural deste glicocálice e a qualidade dos seus componentes parece determinar seu papel sobre a função das células endoteliais, não só para inibição da via de coagulação e adesão de leucócitos ao endotélio, mas também para condução de vasodilatação mediata por fluxo ou por estiramento, contribuindo assim para proteção da parede vascular (UCHIMIDO; SCHMIDT; SHAPIRO, 2019; DOGNÉ; FLAMION, 2020; GOUVERNEUR et al., 2006). Ademais, é sugerido que o glicocálice endotelial apresente variações na estrutura e espessura nos diferentes leitos vasculares e ao longo de um mesmo vaso devido a variações locais de fluxo (DOGNÉ; FLAMION, 2020; GOUVERNEUR et al., 2006; KRÜGER-GENGE et al., 2019).

1.2.1.2. Mediadores endoteliais para vasodilatação

Dentre os efeitos vasodilatadores mediados pelo endotélio para o controle do tônus vascular, destacam-se aqueles produzidos pela ação do óxido nítrico (NO), da prostaciclina (PGI₂) e da hiperpolarização derivada do endotélio (EDH) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; VANHOUTTE et al., 2009).

1.2.1.3. Óxido nítrico

O NO é uma molécula gasosa, com elétron desemparelhado e curta meia-vida (4–8 segundos), que possui livre difusão nas membranas biológicas e exerce efeitos fisiológicos no sistema nervoso, imunológico e cardiovascular (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). Nos vasos, é certamente o principal mediador das funções endoteliais. Por exemplo, inibe a agregação plaquetária, sendo que substâncias derivadas de

plaquetas, quando ativadas, aumentam a atividade da enzima NO sintase (NOS) expressa no endotélio produzindo ainda mais NO; e também inibe a adesão de leucócitos na parede vascular ao diminuir a expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais (LENASI, 2018).

No endotélio, o NO é principalmente formado a partir do aminoácido L-arginina pela isoforma constitutiva da NOS aí presente (eNOS) (GODO; SHIMOKAWA, 2017), embora também possa ser produzido pelas isoformas induzível (iNOS) e neuronal (nNOS) desta enzima (LENASI, 2018; DUDZINSKI et al., 2006), todas expressas no sistema cardiovascular. A atividade da eNOS e consequente produção de NO pode ser iniciada por uma variedade de estímulos que incluem forças físicas e também a ação de cascatas intracelulares iniciadas por receptores ativados por ligantes tais como acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina e alguns hormônios (LENASI, 2018). É uma enzima que depende da calmodulina e precisa de co-fatores como cálcio, tetra-hidrobiopterina (BH₄), dinucleotídeo de flavina adenina, mononucleotídeo de flavina e protoporfirina de ferro (LENASI, 2018; ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). Além disso, a simples fosforilação da eNOS em diferentes locais é capaz de modular o fluxo ativo de elétrons na produção de NO e, assim, alterar (estimulando ou inibindo) a atividade desta enzima (SESSA, 2004). Dessa forma, estimulação da eNOS pode ser feita tanto por vias dependentes de cálcio (por ex: interação do complexo cálcio/calmodulina em domínios específicos da eNOS), quanto por vias independentes de cálcio (por ex: fosforilação por meio de vias dependentes de proteína-quinase A e proteína-quinase B ou Akt). (FÖRSTERMANN; XIA; LI, 2017). Após ser produzido, o NO estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) nas células do músculo liso vascular (MLV), induz a formação de 3,5-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e a consequente ativação da proteína

quinase G (PKG). A via GCs/GMPc/PKG é a principal via estimulada pelo NO para promover os efeitos observados nas células do MLV: redução do influxo de cálcio pela membrana e estimula a sua recaptação pelo retículo sarcoplasmático, e a abertura de canais para potássio para mediação da hiperpolarização destas células; embora tem-se a proposta que alguns efeitos possam ser exercidos diretamente na promoção do relaxamento (ZHAO; VANHOUTTE; LEUNG, 2015). Várias condições patológicas tais como hipertensão, diabetes, tabagismo, síndrome metabólica, hipercolesterolemia, obesidade e outras estão relacionadas à disfunção na produção e/ou biodisponibilidade de NO derivado do endotélio vascular e, conseqüentemente, à redução dos seus efeitos, o que tem sido descrito por aumentar o risco cardiovascular. Com isso, há algumas décadas, as vias de produção/degradação de NO assim como as vias relacionadas aos seus efeitos têm representado importantes alvos de estudo (LENASI, 2018).

1.2.1.4. Prostaciclina

A vasodilatação mediada por agonistas ou por estímulos mecânicos é dependente não só de NO, mas também da liberação da prostaciclina (prostaglandina I₂, PGI₂), um produto do metabolismo do ácido araquidônico pela enzima ciclooxigenase (AA-COX) nas células endoteliais. As enzimas ciclooxigenase 1 e 2 transformam o AA em tromboxano, prostaglandinas e prostaciclina (PGI₂) (BISWAS; KHAN, 2019), sendo a prostaciclina o principal metabólito nas células endoteliais (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009), e que apresentam atividades antitrombótica e vasodilatadora (VANE; CORIN, 2003) tanto em vasos de condutância quanto de resistência (FUJIWARA et al., 2012). Ao se difundir paracrinamente e atingir os receptores do tipo IP₁ nas células do MLV,

ocorre a ativação da proteína G e da enzima adenilato ciclase, com consequente aumento dos níveis de AMPc e da atividade da proteína-quinase A (PKA), o que reduz a atividade da cinase de cadeia leve de miosina (MLCK) induzindo assim o relaxamento (LENASI, 2018). É sabido que a prostaciclina é um dos fatores que podem compensar a vasodilatação vascular quando a ação do NO está comprometida (WIDMER; LERMAN, 2014).

1.2.1.5. Hiperpolarização derivada do endotélio (EDHF)

A vasodilatação residual que é notada após o bloqueio da síntese de NO e da COX, e que desaparece após remoção do endotélio, indica a existência de um evento endotélio-dependente que foi posteriormente identificado como mediador de hiperpolarização de células do MLV, e que pode ser bloqueado por inibidores de canais de potássio (BRYAN et al., 2005). De maneira interessante, enquanto no início pensava-se em um agente ou fator hiperpolarizante, atualmente já foram identificados vários fatores ou candidatos capazes de promover aquilo que se passou a denominar “hiperpolarização endotélio-dependente” (*endothelium-dependent hyperpolarization*, ou simplesmente EDH). Além do próprio íon potássio, que após seu efluxo pode atuar em células vizinhas estimulando a hiperpolarização via ativação da Na⁺,K⁺-ATPase (GARLAND, 2003; NELLI et al., 2003), várias outras moléculas liberadas pelas células endoteliais estimulam a vasodilatação através da hiperpolarização das células musculares lisas vasculares a partir da abertura de canais para potássio ou da ativação da Na⁺,K⁺-ATPase, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o monóxido de carbono (CO), sulfeto de hidrogênio (H₂S), derivados do citocromo P450 e também metabólitos do AA-COX, (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; LENASI, 2018). De fato, a própria prostaciclina liberada pelo endotélio pode estimular a abertura de canais para potássio

e atuar como fator hiperpolarizante (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Finalmente, também a hiperpolarização das células endoteliais pode ser transmitida para as células musculares lisas vasculares acoplamento elétrico de junções mioendoteliais (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Especialmente nos pequenos vasos, os quais mais participam do controle da resistência vascular periférica, a EDH tem participação de destaque na regulação do tônus vascular e consequente controle do fluxo sanguíneo (BRYAN et al., 2005). Além disso, a EDH é responsável por aproximadamente metade da resposta vasodilatadora em artérias mesentéricas com diâmetro inferior a 500 μm , e na comparação entre as contribuições individuais das principais vias de vasodilatação endotélio-dependente, a hiperpolarização aumenta quando o diâmetro do vaso diminui, enquanto a ação do NO se comporta ao contrário (KÖHLER; HOYER, 2007). Outro fato relevante é que, assim como para o NO, há estudos que mostram que modificações na EDH também participam da disfunção endotelial presente em várias doenças (LENASI, 2018), o que inclui também esse evento como algo de estudos promissores.

1.2.2. O controle local do tônus em diferentes tipos de artérias

Como já mencionado para o glicocálice endotelial e a constituição das camadas da parede vascular, e também para os principais mediadores da vasodilatação endotélio-dependente, as diferenças nas características de cada artéria determinam também os processos e fatores relacionados ao controle local do tônus. De uma maneira geral, as artérias e arteríolas regulam a pressão e o fluxo sanguíneos para os tecidos. Artérias de condutância, como a aorta, possuem a túnica média com maior quantidade relativa de fibra elástica, múltiplas camadas do que músculo liso em comparação aos demais tipos de vasos, uma característica que facilita sua distensibilidade e

elasticidade em resposta ao fluxo pulsátil gerado pela bomba cardíaca. A aorta é dividida em 5 segmentos principais: raiz aórtica, segmento ascendente, arco aórtico, segmento descendente torácico, e segmento abdominal, e funciona como um canal e reservatório. Devido a sua distensibilidade, em condições normais até 50% do volume sistólico é armazenado na aorta, o que mantém certo nível de fluxo sanguíneo e pressão arterial mesmo na fase de diástole do ciclo cardíaco (GOLDSTEIN et al., 2015).

Já nas pequenas artérias, de resistência, a túnica média possui pouca elastina e maior camada de células musculares lisas, tendo uma relação entre espessura da camada média e o seu lúmen maior do que as artérias de condutância, garantindo assim um importante papel no controle da impedância vascular às custas de mudanças no raio interno (BROWN et al., 2019). Os pequenos ramos das artérias mesentéricas são, por exemplo, considerados vasos de resistência. Esses pequenos vasos fazem parte da circulação esplâncnica, a qual recebe até 60% do débito cardíaco e participa consideravelmente tanto da resistência periférica total, quanto da capacitância vascular total (SOUSA; DINIZ, 2017).

Em relação à circulação coronariana, como as artérias coronárias epicárdicas, maiores contribuem apenas com 5% da resistência vascular desse leito, a regulação do fluxo coronariano em condições fisiológicas depende principalmente da resistência coronariana determinada pelas pequenas artérias e arteríolas intramiocárdicas, com diâmetro abaixo ou próximo a 300 μm . A resistência coronariana é sensivelmente modulada pela taxa metabólica do tecido a sua volta, mas também por fatores neuro-humorais, regulação miogênica e endotelial, em maior ou menor proporção conforme a região do leito coronariano em questão (CESENA; CHAGAS, 2001).

1.3. Mecanismos de vasodilatação das lectinas de leguminosas

Como citado, a configuração do DRC determina a atividade biológica das lectinas, incluindo o efeito vasodilatador que é descrito para algumas lectinas de leguminosas (BATISTA DA NÓBREGA et al., 2012). De fato, dentre as várias lectinas da Subtribo *Diocleinae* com potencial vasodilatador (ASSREUY et al., 2009; BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016; BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; GADELHA et al., 2005), os estudos demonstram que em sua maioria têm seu efeito ao menos parcialmente inibido se co-incubadas com seus carboidratos específicos, mostrando a importante participação do DRC, por exemplo, para a ativação da eNOS nas células endoteliais (CAVADA, Benildo S. et al., 2019). O estudo de Asseury et al. (2009), também em aorta de ratos, mostrou que a vasodilatação mediada pela lectina isolada da ConBr é totalmente bloqueado pelo inibidor da NOS, L-NAME, e parcialmente bloqueado pelo o inibidor inespecífico da COX, a indometacina, demonstrando participações do NO e PGI₂, mas não da EDH, já que não obteve resultados com uso de um bloqueador de canais para potássio (ASSREUY et al., 2009). Outra lectina da semente de uma planta da mesma Subtribo, *Canavalia maritima* (ConM), também possui um relaxamento fortemente dependente de NO (GADELHA et al., 2005). Outras lectinas, como as encontradas na *Dioclea violacea* (DVL) e na *Dioclea virgata* (DvirI), que apresentam diferenças no DRC, também promovem relaxamento vascular em segmentos de aorta de ratos, mas com diferentes intensidades. Nesse contexto, o DRC é sugerido como determinante na indução de NO pelas lectinas *Diocleinae* (ROCHA et al., 2015). A lectina de DRL, com um DRC mais largo e mais raso, promove relaxamento com a participação de NO, prostaciclina e EDHF em aortas de ratos, com mais intensidade em relação a outras lectinas *Diocleinae*. De maneira importante, foi demonstrado o

relaxamento mediado pela DRL é totalmente dependente do endotélio e da ligação da lectina com carboidratos (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013).

1.4. Justificativa e hipótese

Os mecanismos propostos para o efeito relaxante induzido por lectinas isoladas de diferentes leguminosas, incluindo DRL, são através de uma ação dependente do endotélio, seja pela liberação de substâncias vasoativas tais como o NO e PGI₂, seja pela indução da hiperpolarização do MLV, efeitos determinados principalmente pela interação do DRC das lectinas com glicanos presentes nas células endoteliais (GADELHA et al., 2005; ASSREUY et al., 2009; BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; BARROSO-NETO, Ito Liberato et al., 2014; BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016). Como os poucos estudos reportados até o momento foram realizados em aorta de ratos, e diante da hipótese de que as diferenças nas artérias de condutância e resistência poderia significar diferentes resposta induzidas pelas lectinas, escolhemos a lectina de DRL, devido sua capacidade vasodilatadora, para investigar as principais vias envolvidas na vasodilatação induzida em segmentos arteriais de ratos isolados de diferentes locais (aorta e artérias coronárias e mesentéricas de resistência). Além disso, com base na sequência de aminoácidos, estrutura cristalográfica e especificidade para manose, glicose e açúcares derivados já descritas para a DRL (DE OLIVEIRA et al., 2008), também realizamos estudos “*in silico*” de docking molecular da DRL com vários glicanos e glicosaminoglicanos presentes na membrana das células endoteliais que poderiam suportar tal diversidade de vias estimuladas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito vasodilatador da lectina de *Dioclea rostrata* em artérias de condutância e resistência e avaliar suas possíveis interações com glicanos presentes na membrana do endotélio vascular.

2.2. Objetivos específicos

Testar a participação do óxido nítrico na resposta vasodilatadora induzida pela DRL em segmentos de aorta, artéria mesentérica e artéria coronária.

Testar a participação de produtos da ciclooxigenase na resposta vasodilatadora induzida pela DRL em segmentos de aorta, artéria mesentérica e artéria coronária.

Testar a participação da hiperpolarização na resposta vasodilatadora induzida pela DRL em segmentos de aorta, artéria mesentérica e artéria coronária.

Analisar as interações da DRL frente aos seus ligantes específicos e potenciais glicanos ou glicoproteínas de membrana por ancoragem molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo “in vitro” dos efeitos vasodilatadores da DRL

3.1.1. Obtenção e preparação da lectina de semente da DRL

A lectina de sementes de *Dioclea rostrata* foi isolada e purificada no Laboratório do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) por cromatografia de afinidade em Sefadex G-50 conforme detalhado previamente (CAVADA, Benildo Sousa et al., 1996), e gentilmente cedida pelo professor Benildo Souza Cavada.

3.1.2. Animais experimentais e obtenção das artérias de diferentes tipos

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar, com aproximadamente três meses de idade e pesando entre 250 e 350g, foram fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. Os animais eram mantidos em gaiolas coletivas na sala de experimentação do Laboratório de eletromecânica Cardíaca e Reatividade Vascular, sob condições de controle de temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à ração e água. Os protocolos experimentais foram previamente analisados e aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA-UFES) sob protocolo 39/2017 antes do início das atividades.

3.1.2.1. Reatividade vascular em aorta

Os animais foram anestesiados com mistura de ketamina (90 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg), aplicada intraperitonealmente. Em seguida, foi realizada uma incisão na pele do abdome até o tórax, que permitiu expor a camada muscular. Por meio de toracotomia mediana e visualização dos órgãos da cavidade torácica, o coração e a aorta foram removidos e acondicionados em uma placa de Petri contendo solução de Krebs composta por (em mM: NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂.2H₂O 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 5; EDTA 0,01). A aorta torácica descendente foi separada para a retirada dos tecidos aderentes e para divisão em segmentos cilíndricos com aproximadamente 4mm. Nesses segmentos foram transpassados através do lúmen, dois triângulos de fios de aço inoxidável, para que ficassem paralelos. Um triângulo foi fixado à parede do banho de órgãos/cuba e o outro conectado a um transdutor de tensão isométrica que ficava suspenso na cuba para órgão contendo 5 mL a mesma solução de Krebs Henseleit a 37°C, continuamente aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Os segmentos foram mantidos sob tensão basal de 1g de força. As alterações do tônus dos segmentos eram captadas pelo transdutor de força conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA), e este a um computador (Figura 5).

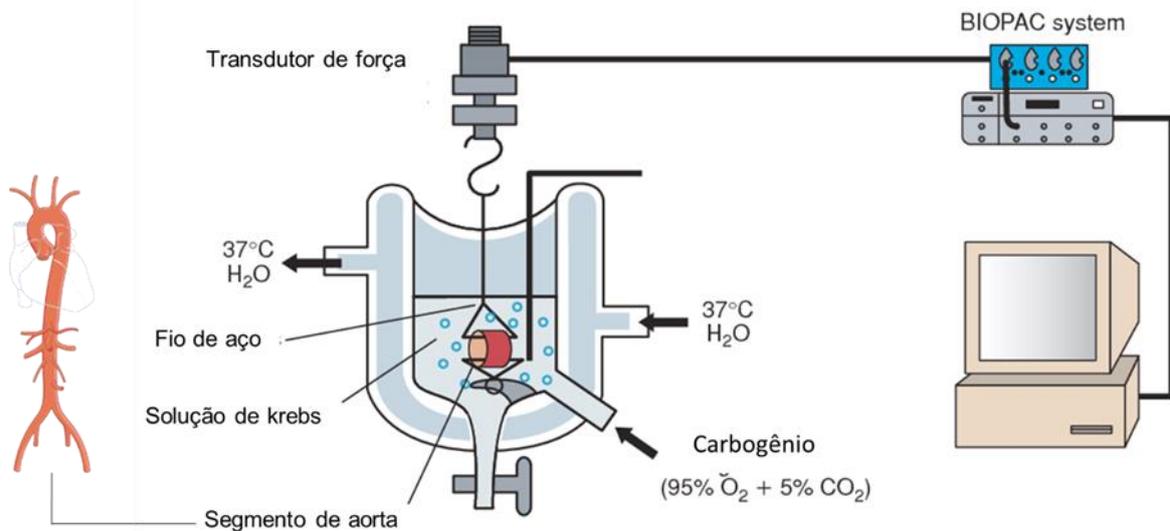


Figura 5: Preparação dos segmentos isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro (modificado de MUSTAFA; ANSARI; ABEBE, 2009).

Após período de estabilização de 30 minutos, foi adicionado à solução das cubas, KCl 75 mM para avaliar a atividade contrátil do MVL induzida por despolarização. Quando atingiam uma variação de um grama de força em relação ao valor basal, os segmentos eram lavados em solução de Krebs-Henseleit padrão até retornar ao basal. Após mais 30 minutos de estabilização, uma nova incubação com KCl 75 mM era adicionada aguardando-se 30 minutos, que permitia alcançar a contração máxima do segmento. Na sequência, os segmentos eram lavados três vezes para retorno ao valor basal, e após 30 minutos, esses eram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio. Para confirmar a integridade do endotélio, os segmentos arteriais eram contraídos com fenilefrina (agonista alfa-adrenérgico) a partir da concentração de 10^{-6} M e aumentando-se caso necessário para produzir 50% da contração promovida por KCl. Após um platô de contração, uma única aplicação de acetilcolina (ACh, concentração final de 10^{-5} M) era adicionado para estimular o relaxamento

dependente do endotélio. Aqueles segmentos que alcançassem relaxamento igual ou superior a 80% em relação à pré-contracção eram considerados com endotélio funcional.

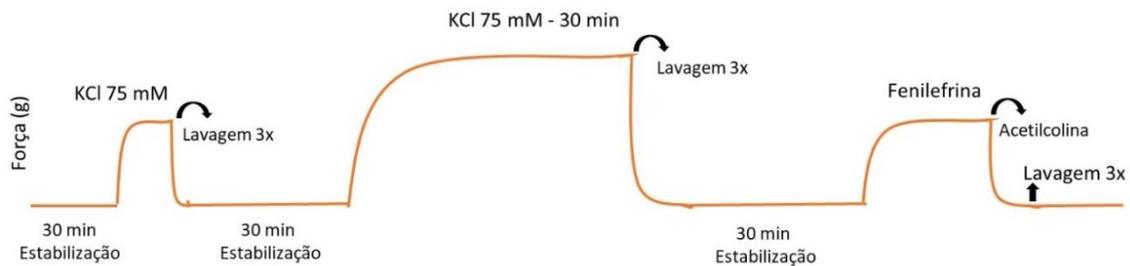


Figura 6: Registro apresentando o protocolo experimental para segmentos de aorta. O protocolo se inicia com a estabilização dos segmentos nas preparações de órgão isolado. Após período de estabilização foi adicionado ao banho KCl 75 mM, gerando uma reposta contrátil. Essa contração é mantida até atingirem a variação de 1g em relação ao basal, em seguida foram lavados três vezes com solução. Na sequência, outro período de estabilização, e novamente é adicionado ao banho KCl 75mM para permanecer por 30 minutos, e após, lavagem dos segmentos com solução. Um novo período de estabilização. Após, foi realizado o teste do endotélio com uma contração com fenilefrina. Ao atingir um platô de contração é adicionado ao banho acetilcolina para estimular um relaxamento. Após, as preparações são lavadas três vezes seguido de um novo tempo de estabilização para a realização dos protocolos experimentais.

A seguir, os segmentos eram novamente lavados e passavam por um período de estabilização para a realização de curva concentração-resposta cumulativa à DRL (0,01-100 µg/ml).

3.1.2.2. Reatividade vascular em artéria mesentérica de resistência

Com os animais anestesiados, o leito mesentérico era removido e colocado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs- Henseleit gelada (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 5). Com o auxílio de pinças e lupa, era retirado o tecido perivascular em

volta dos vasos, expondo os ramos arteriais de primeira, segunda e terceira ordem a partir da artéria mesentérica superior. As artérias mesentéricas formadas pela 3ª ramificação (consideradas de resistência) foram dissecadas, sendo removidos o tecido adiposo e conectivo. Em seguida, foram seccionadas em segmentos de 2 mm de comprimento e montadas em um miógrafo de arame (W. HALPERN; WARSHAW, 1978). Para isso, foram utilizados fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) transpassados através do lúmen dos segmentos. Em uma câmara do miógrafo para pequenos vasos (Danish Myo Tech, Modelo 410A e 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) contendo 5 mL de solução de Krebs, as extremidades do primeiro fio eram conectadas a dois parafusos do mesmo lado da câmara do miógrafo, que se refere a um transdutor de tensão. Um segundo fio de tungstênio foi cuidadosamente inserido no lúmen da mesma artéria e preso aos parafusos do miógrafo do lado oposto, que se refere a um micrômetro que permite o estiramento das artérias. O miógrafo era conectado a um sistema para a aquisição de dados (Powerlab/800 ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Austrália) e este um computador para registro das variações de tensão isométrica (Figura 7). As preparações eram mantidas em solução de Krebs-Henseleit com temperatura controlada a 37°C e areada com mistura carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂ para manutenção do pH constante em 7,4.

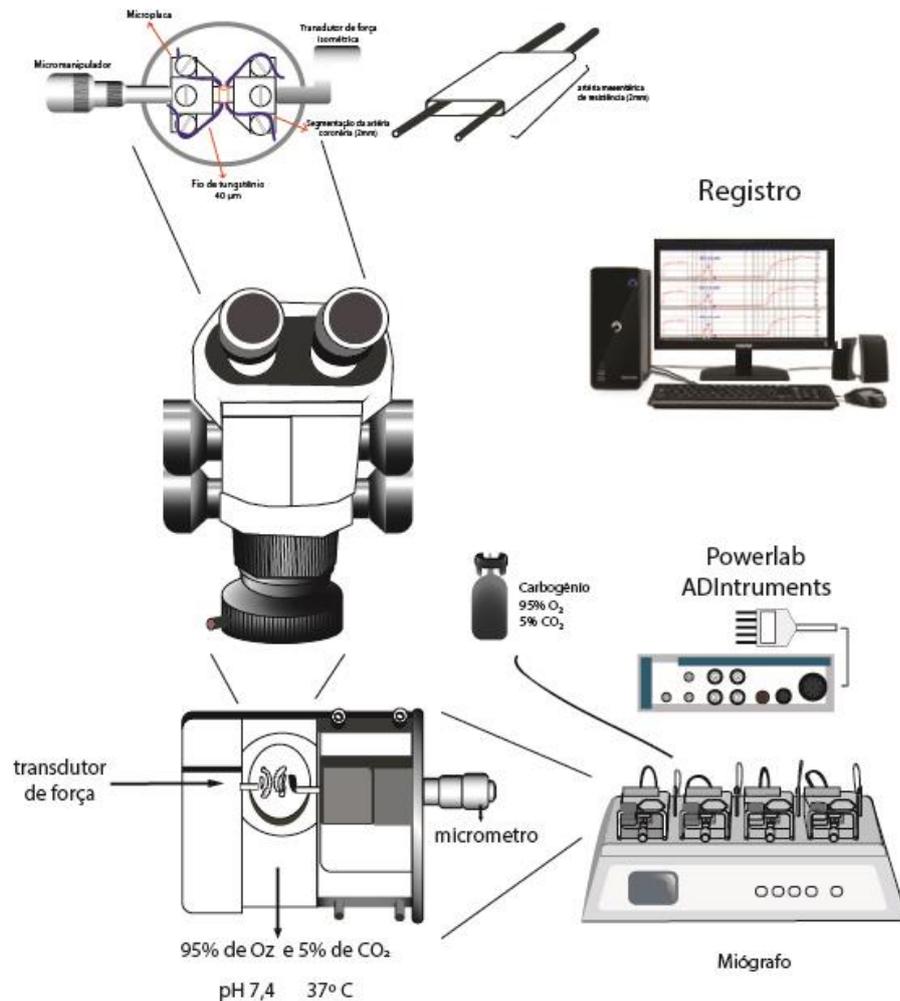


Figura 7: Esquema representando a preparação experimental dos segmentos de artéria mesentérica e segmentos de artéria coronária *in vitro* (Fonte: modificado de Nunes, 2018).

Seguindo-se a um período de estabilização de 30 minutos, foi realizada a curva estiramento-tensão para normalização da condição experimental dos segmentos. Os segmentos foram estirados a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para cada segmento, a relação tensão/diâmetro foi calculada pela circunferência interna que corresponde à pressão transmural de 100 mmHg, que equivale a 13,3 kPa, para um vaso relaxado *in situ* (L_{100}), com um software para normalização de artéria de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). Nos experimentos, os segmentos arteriais foram mantidos com uma

circunferência interna L_1 , calculado pela fórmula $L_1 = 0.90 \times L_{100}$ (W. HALPERN; WARSHAW, 1978). Após estabilização, os segmentos de artéria mesentérica foram distendidos de forma gradativa e a leitura do micrômetro e da força aplicada foram registrados em cada ponto. Os valores são convertidos em valores de circunferência interna (μm) e de tensão na parede vascular (mN/mm). É formada uma curva através da plotagem da tensão de parede do segmento contra a circunferência interna. Circunferência na qual o desenvolvimento de força é máximo.

Após um período de estabilização, os segmentos foram estimulados com alta concentração de potássio (KCl 120 mM), com a finalidade de avaliar a integridade funcional do MVL induzida por despolarização. Quando atingiu um platô na contração, período de 30 minutos, os segmentos foram lavados três vezes com solução para retornar ao basal. Para confirmar a integridade do endotélio, os segmentos foram contraídos com fenilefrina suficiente para produzir 50% da contração promovida por KCl e uma única aplicação de acetilcolina (ACh na concentração final de 10^{-5} M) foi adicionado para estimular o relaxamento e verificar a presença do endotélio intacto. Os segmentos que alcançaram um relaxamento igual ou superior a 80% em relação à contração induzida por fenilefrina eram considerados com endotélio funcional. Então, os segmentos eram novamente lavados e passavam por um período de estabilização para a realização da curva cumulativa com DRL (0,01-100 $\mu\text{g/ml}$).

3.1.2.3. Reatividade vascular em artéria coronária

Como descrito anteriormente, após anestesia e toracotomia, coração foi removido e colocado em uma placa de Petri contendo solução de Krebs- Henseleit gelada (composição em mM: NaCl 115; NaHCO_3 25; KCl 4,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; CaCl_2 2,5;

KH₂PO₄ 1,2; Glicose 5; EDTA 0,01). Durante o procedimento de dissecação, o ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda era isolado com o auxílio de um microscópio de dissecação, e cortado em segmentos (de 1.6 a 2.0 mm de comprimento). Os segmentos eram montados como descrito anteriormente para artéria mesentérica no mesmo miógrado de arame.

Após os 30 minutos de estabilização, os segmentos eram estimulados com alta concentração de potássio (KCl 120 mM) para avaliar a integridade funcional do MLV, e para confirmar a integridade do endotélio, os segmentos eram contraídos com serotonina (5- Hidroxitriptamina, 5-HT) suficiente para produzir 50% da contração promovida por KCl. Após um platô de contração, uma única aplicação de acetilcolina (ACh na concentração final de 10⁻⁵ M) era adicionada para estimular o relaxamento e verificar a integridade do endotélio. Os segmentos que alcançassem relaxamento igual ou superior a 50% em relação à contração induzida por fenilefrina eram considerados como tendo endotélio funcional. Os segmentos eram então novamente lavados e passando-se um período de estabilização, era iniciada a curva cumulativa com DRL (0,01-100 µg/ml).

3.1.3. Principais mecanismos de vasodilatação nas artérias de diferentes tipos

3.1.3.1 Papel da liberação de óxido nítrico

Segmentos das diferentes artérias foram utilizados para identificar a participação do NO como mediador do relaxamento induzido pela DRL. Para isso, durante 30 minutos, o inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME (100 µM) foi adicionado ao banho. Após isso, foi promovida uma contração com fenilefrina ou serotonina (dependendo do tipo

de artéria), e ao atingir um platô contrátil, foram adicionadas as mesmas concentrações crescentes e cumulativas de DRL (Figura 8).

3.1.3.2. Papel da hiperpolarização do músculo liso vascular

Para avaliar participação da hiperpolarização na mediação do efeito vasodilatador da DRL nas três diferentes artérias, os segmentos foram incubados com potássio alto (KCl 60 mM) a fim de promover uma pré-contração despolarizante. E ao atingirem uma estabilização desta contração, foram expostas as mesmas concentrações crescentes e cumulativas de DRL (Figura 8).

3.1.3.3. Papel da prostaciclina derivada da ciclooxigenase

Os segmentos das três artérias também foram incubados durante 30 minutos com o inibidor não seletivo da COX, a indometacina (10 μ M). Em seguida, os segmentos eram estimulados com fenilefrina ou serotonina (na dependência do tipo de artéria) e, ao atingirem um platô de contração, eram expostos às mesmas concentrações crescentes e cumulativas de DRL (Figura 8).

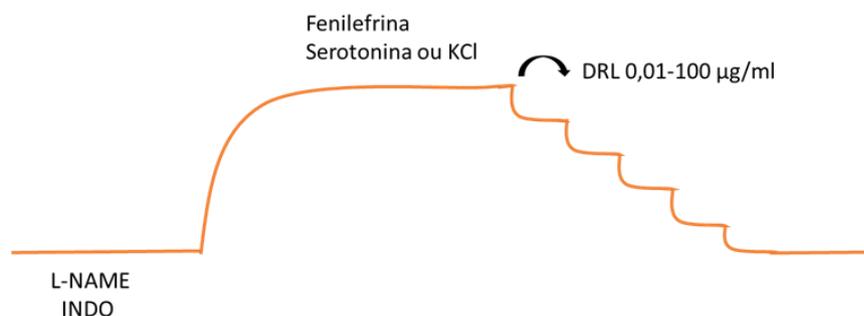


Figura 8: Esquema representativo mostrando incubação de 30 minutos com L-NAME e indometacina (INDO). Após contração com fenilefrina para segmentos de aorta ou mesentérica, serotonina para segmentos de artéria coronária ou contração com KCl 60 mM, e na sequência, curva cumulativa com lectina de DRL.

3.2. Estudo “*in silico*” da interação entre DRL e glicanos/carboidratos de membrana

3.2.1 Ancoragem ou “*Docking*” Molecular

O *docking* molecular, também denominado ancoragem ou acoplamento molecular foi o método de bioinformática utilizado para prever possíveis interações intermoleculares que estabilizam o “ligante” com seu sítio de ligação (receptor). Com seus algoritmos, é possível realizar previsões quantitativas de energia de ligação. Para isso, é necessário que o programa avalie vários modos de ligações potenciais e, além disso, uma previsão da energia de interação em cada uma dessas ligações (FERREIRA et al., 2015). O programa usa funções de pontuação para estimar a energia de ligação entre ligante e receptor. É uma variação de energia dada pela constante de dissociação (K_D) e pela energia de Gibbs (ΔGL)(FERREIRA et al., 2015). Esta análise foi feita em colaboração com o grupo de pesquisa do prof. Benildo Souza Cavada.

Considerando possíveis interações entre a DRL e vários oligossacarídeos presentes em *N*-glicanos de glicoproteínas encontradas na membrana das células endoteliais, vários glicanos foram selecionados, e suas estruturas foram construídas para o módulo construtor de carboidratos do GLYCAM-Web Carbohydrate Builder (<http://glycam.org>) com minimização de energia como pós-processamento. A estrutura tridimensional da DRL foi obtida do Protein Data Bank (PDB) sob o id: 2ZBJ (DE OLIVEIRA et al., 2008), e foi submetida 1.000 etapas de minimização de energia com

Chimera v.1.14 (programa de visualização de estruturas moleculares) (PETTERSEN et al., 2004) antes do acoplamento. Os glicanos foram aplicados como ligantes para ancoragem, e as preparações dos ligantes foram tratadas com remoção de moléculas de solvente, adição de átomos de hidrogênio ausentes e correções de ligação usando software Hermes (v. 2020.1). As simulações de ancoragem foram realizadas com o software GOLD v. 2020.2 (CCDC, Cambridge, Inglaterra), que utilizava um algoritmo semiflexível de acoplamento de ligantes nos sítios de ligação para permitir resultados mais realistas devido a flexibilidade parcial do receptor (JONES et al., 1997). A região de acoplamento foi definida como o centro do DRC com todos os átomos em um raio de 12 Å, também incluídos no cálculo. Os parâmetros escolhidos foram: função de pontuação ChemScore (ELDRIDGE et al., 1997), tamanho da população de 100, pressão de seleção de 1.1, número de operações de 10.000, número de ilhas de 5, tamanho de nicho de 2, frequência de cruzamento de 95, e número de poses de 20. As melhores poses (orientações do ligante), foram escolhidas por uma combinação de pontuação de acoplamento, violações da geometria do ligante, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas esperadas. A DRL em complexo com D-manose foi usada para comparação, e as figuras foram geradas em PyMol (Schrodinger).

3.3. Drogas e soluções utilizadas

- 5- Hidroxitriptamina, serotonina (5-HT) (Sigma)
- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Neon)
- Cloreto de cálcio diidratado (Merck)
- Cloreto de magnésio (Merck)

- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Neon)
- Glicose (Merck)
- Fenilefrina (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Indometacina (Sigma)
- Fenilefrina (Sigma)
- N-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)

3.4. Análise estatística

Os resultados encontram-se expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de “n” significam o número de animais. As respostas vasoconstritoras à fenilefrina e à serotonina foram normalizadas em função da resposta máxima induzida por KCl do respectivo segmento, sendo expressas em porcentagem desta. As respostas de relaxamento induzidas pela DRL são expressas como porcentagem de relaxamento em relação a contração prévia. A análise estatística foi realizada com análise de variância (ANOVA) duas vias seguida por pós-teste de Bonferroni, e os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$. Para análise dos resultados e testes estatísticos foram utilizados os programas Microsoft Office Excel e GraphPad Prism Software 6.0 (San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 A lectina *Dioclea rostrata* induz vasodilatação em artérias de condutância e resistência

O efeito vasodilatador da DRL foi avaliado utilizando concentrações cumulativas nos segmentos arteriais dos três leitos vasculares. A DRL produziu relaxamento de forma concentração-dependente na aorta, artéria mesentérica e artéria coronária, embora com algumas características diferentes (interação entre fatores DRL e tipo de artéria $p < 0,0001$). Em segmentos de aorta, o efeito vasodilatador da lectina seguiu uma modelagem sigmoide, com $-\log EC_{50}$ em $0,75 \pm 0,11$ e efeito máximo (R_{max}) a $60,1 \pm 4,6\%$ de relaxamento (Figura 9). Já em segmentos de artéria mesentérica de resistência, a resposta à DRL foi bifásica, ou seja, com uma fase vasorrelaxante inicial atingindo $55,2 \pm 5,6\%$ de relaxamento máximo, seguida por um aumento concentração-dependente do tônus vascular em uma fase posterior, sendo a transição entre as fases em uma concentração de aproximadamente $10 \mu\text{g/mL}$ de DRL (Figura 9). Comparativamente, a DRL apresentou fraca capacidade de relaxamento nos segmentos de artéria coronária ($31,3 \pm 4,9\%$ do relaxamento máximo) (Figura 9).

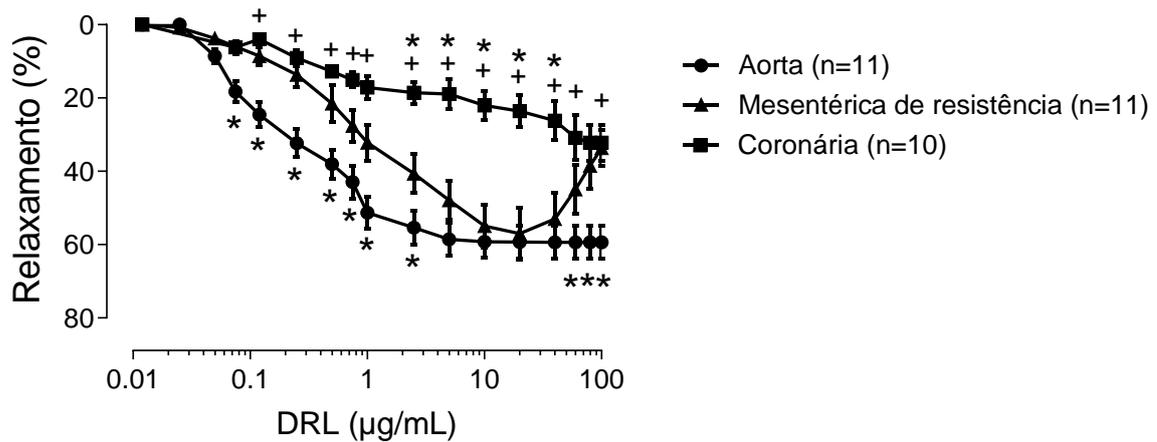


Figura 9: Relaxamento vascular induzido por lectina isolada de sementes de *Dioclea rostrata* (DRL) em segmentos da aorta, artéria mesentérica de resistência e artéria coronária. Os resultados são expressos como média \pm EPM. + indica $p < 0,05$ vs. aorta; * indica $p < 0,05$ vs. artéria mesentérica, por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.

Além disso, realizamos experimentos em segmentos de aorta onde o endotélio foi removido mecanicamente com uma haste metálica (Figura 10), e observamos que a DRL não foi capaz de promover vasodilatação significativa, corroborando outros estudos que indicam que o efeito vasodilatador promovido por lectinas isoladas de plantas da subtribo *Diocleinae* depende total ou quase totalmente da presença do endotélio (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; GADELHA et al., 2005; Bezerra et al., 2009; Nobre et al 2011; Nagano et al., 2012).

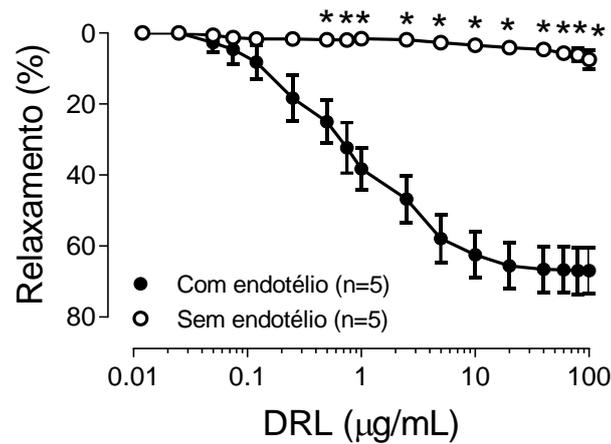


Figura 10: Efeito remoção endotelial no relaxamento vascular induzido por DRL na aorta. Os resultados são média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.

4.2 Papel do óxido nítrico na vasodilatação mediada pela DRL

Na presença de L-NAME, a vasodilatação induzida por DRL Nos segmentos aórticos foi completamente abolida (Figura 11A). Embora o bloqueio da NO sintase não tenha abolido por completo os efeitos do DRL nas artérias mesentéricas de resistência (R_{max} : $12,1 \pm 1,8\%$ de relaxamento), este relaxamento foi significativamente reduzido (Figura 11B). No entanto, como mostrado na figura 11C, o L-NAME não alterou a vasodilatação mediada por DRL nas artérias coronárias.

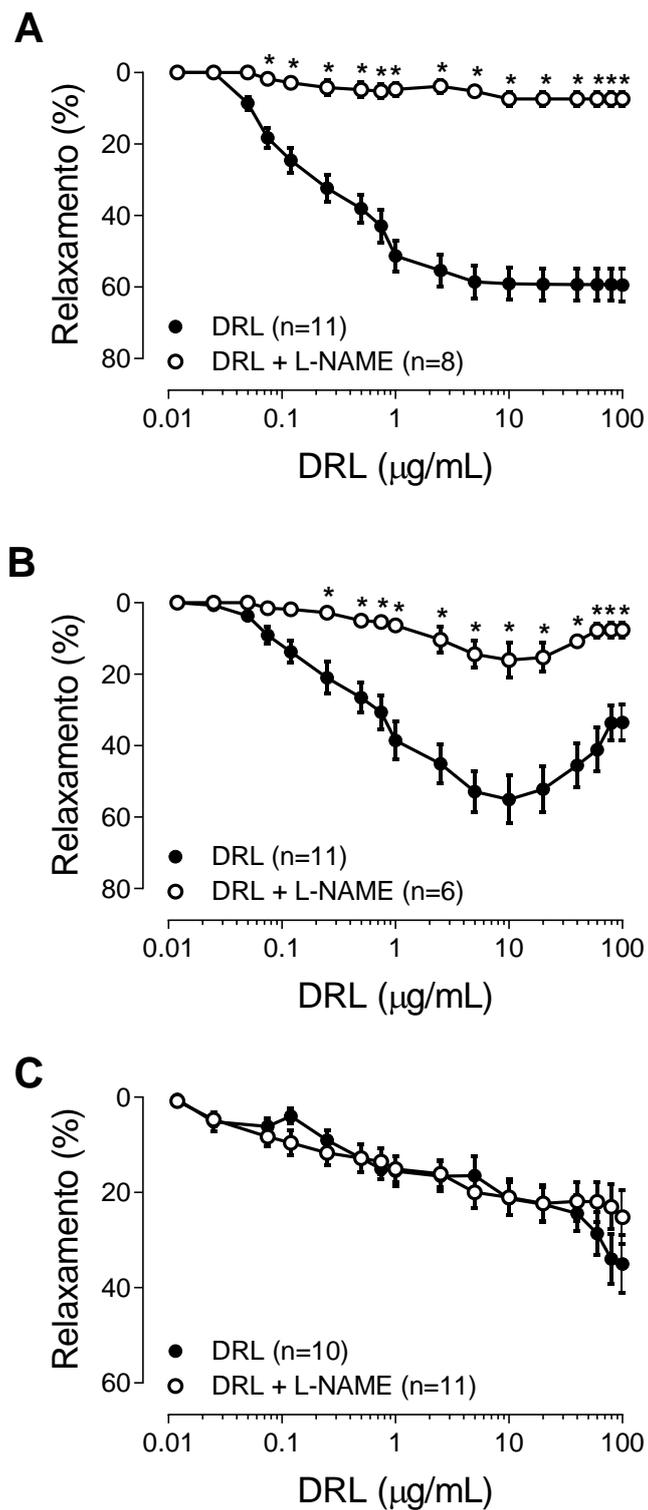


Figura 11: Efeitos da inibição da NO sintase pela incubação prévia com L-NAME 100 µM no relaxamento vascular induzido por DRL aorta (A), artéria mesentérica de resistência (B) e artéria coronária (C). Os resultados são média ± EPM. *p <0,05 vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.

4.3. Papel da hiperpolarização na vasodilatação mediada pela DRL

A concentração despolarizante de KCl impediu completamente a vasodilatação para DRL em aortas (R_{\max} : $4,9 \pm 2,2\%$ de relaxamento) e também nas artérias mesentéricas de resistência (R_{\max} : $8,5 \pm 2,1\%$ de relaxamento) (Figura 12A e 12B, respectivamente). Todavia, essa pré-contração com KCl alto apenas reduziu parcialmente a vasodilatação da DRL nas artérias coronárias, que ainda exibiram um efeito residual ($14,6 \pm 3,5\%$ de relaxamento) (Figura 12C).

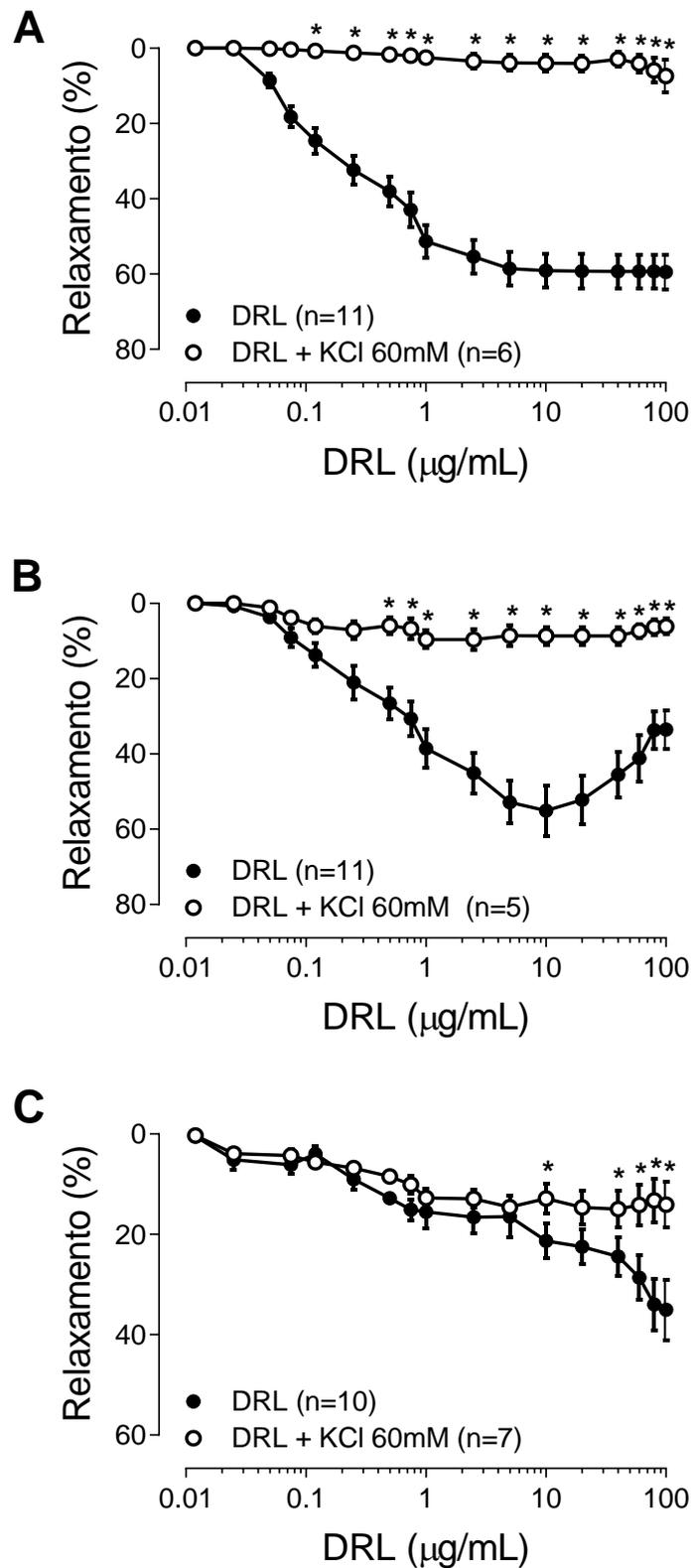


Figura 12: Efeitos da solução despolarizante com altas concentrações de KCl no relaxamento vascular induzido por DRL em segmentos de aorta (A), artéria de resistência mesentérica (B) e artéria coronária (C). Os resultados são média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.

4.4. Papel dos derivados da ciclooxigenase na vasodilatação mediada pela DRL

A indometacina não interferiu na vasodilatação da DRL aorta (Figura 13A). Interessantemente, o bloqueio dos metabólitos derivados de AA-COX não apenas impediu a fase posterior de vasoconstrição à DRL identificada nas artérias mesentéricas de resistência, mas ainda potencializou a vasodilatação induzida pela lectina, atingindo $90,9 \pm 4,8\%$ do efeito máximo (Figura 13B). Finalmente, o efeito vasorrelaxante da DRL nos segmentos da artéria coronária foi apenas parcialmente inibido pela indometacina (R_{\max} : $14,5 \pm 1,5\%$ de relaxamento) (Figura 13C).

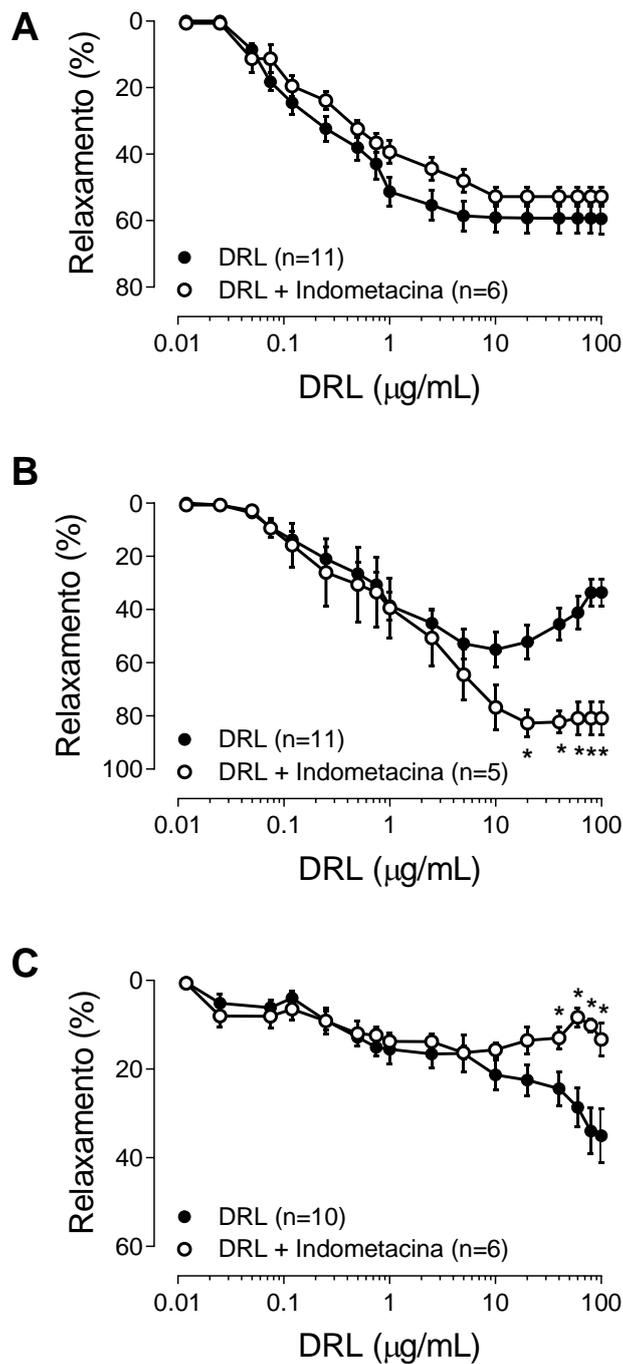


Figura 13: Efeitos da inibição da COX pela incubação prévia com indometacina sobre o relaxamento vascular induzido por DRL em segmentos de aorta (A), artéria de mesentérica (B) e artéria coronária (C). Os resultados são média ± EPM. * p < 0,05 vs. DRL apenas, avaliado por ANOVA de 2 vias seguida por pós-teste de Bonferroni.

4.5. Interação entre DRL e carboidratos/glicanos por Ancoragem Molecular

Foi feito estudo de predição das interações entre DRL e 10 carboidratos, incluindo 2 monossacarídeos, 10 *N*-glicanos (5 deles sendo estruturas encontradas na PECAM-1) e 1 glicosaminoglicano (heparan sulfato). A DRL interagiu com quase todos os principais tipos de *N*-glicanos por meio de resíduos de manosil, mas não com MAN9 e COMP2. As simulações sugeriram uma ligação favorável não apenas com os oligossacarídeos testados, incluindo aqueles *N*-glicanos encontrados na estrutura da PECAM-1, mas também com o glicosaminoglicano heparan sulfato. Os resultados estão resumidos na Figura 12, e o complexo previsto entre DRL e heparan sulfato está representado na Figura 13.

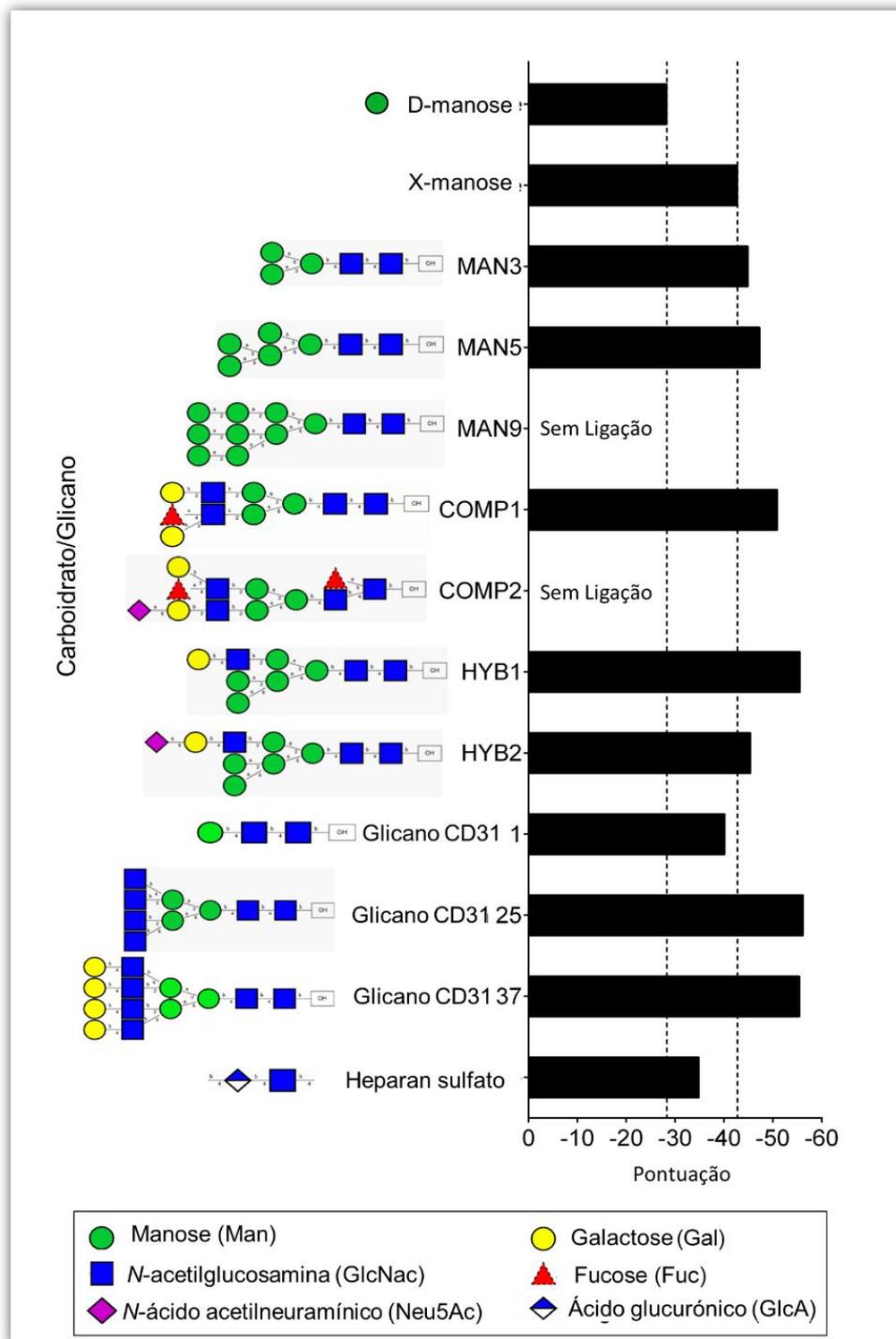


Figura 14: Resultados de docking molecular da DRL com glicanos representativos encontrados em glicoproteínas presentes na superfície membrana celular. A pontuação de docking foi obtida, e a ligação favorável (barras escuras) foi considerada quando as pontuações foram mais negativas do que aquelas de D-manose e X-manose (linhas pontilhadas), ligantes nativos conhecidos e conhecidos como aplicados na cristalização de DRL, respectivamente.

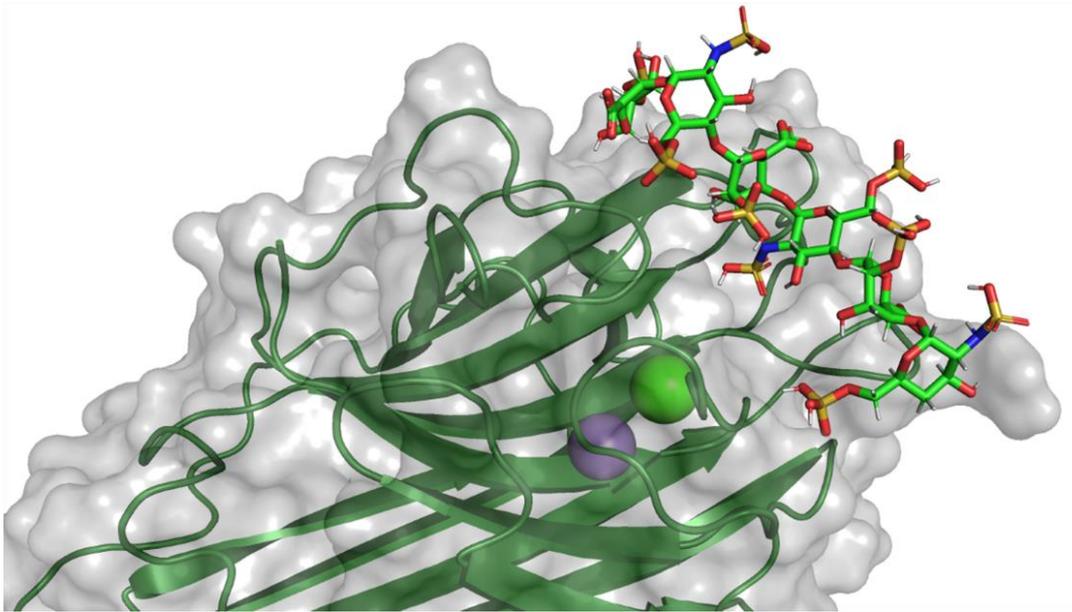


Figura 15: Ilustração demonstrando a melhor pose da DRL no complexo formado com heparan sulfato. A DRL é representada em verde com a representação da sua superfície em cinza. O heparan sulfato pode ser visto na representação em bastão. O cálcio e o manganês são representados pelas esferas verdes e roxas, respectivamente.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que a lectina extraída das sementes de *Dioclea rostrata* tem efeito vasodilatador não só na aorta, tal como descrito anteriormente (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013), mas também nas artérias mesentérica de resistência e coronárias, indicando uma capacidade vasorrelaxante tanto em vasos de condutância quanto nos vasos de resistência. Na verdade, várias lectinas de leguminosas foram testadas anteriormente para efeitos vasculares em anéis aórticos, e foi proposto que as glicoproteínas presentes na superfície de células endoteliais podem funcionar como receptores de lectinas para promover relaxamento vascular, com NO desempenhando um importante papel (BEZERRA, Eduardo Henrique Salviano et al., 2011; BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; GADELHA et al., 2005). No entanto, o presente estudo se destaca por apontar a heterogeneidade dos fatores endoteliais envolvidos no relaxamento induzido pela DRL entre os diferentes tipos de artérias. Além disso, essa diversidade de efeitos, especialmente o efeito duplo encontrado nas artérias mesentéricas de resistência (ou seja, vasodilatação seguida de vasoconstrição), também sugere estímulos simultâneos de diferentes vias intracelulares ou mesmo diferentes receptores/moléculas presentes na superfície da membrana envolvidos na ação da DRL. Embora o endotélio seja essencial na regulação do tônus vascular por diversos fatores vasoativos, sabe-se que a participação relativa desses fatores difere de um leito vascular para outro (BOEGEHOLD, 1998). O NO é o principal vasodilatador em grandes artérias como a aorta (FUJIWARA et al., 2012), mas a resposta ao EDHF, por exemplo, apesar de também possui um importante papel nessas grandes artérias, é maior em pequenas artérias tal como na mesentérica do que em vasos de condutância (GARLAND, 2003;

KRÜGER-GENGE et al., 2019). A prostaciclina também possui uma participação importante na homeostase vascular em vasos de condutância e resistência, além de potencialmente ser capaz de atuar como um fator promotor de EDH (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009; FUJIWARA et al., 2012; KRÜGER-GENGE et al., 2019), sendo também mais relevante para vasos de menor calibre, tais como as artérias mesentéricas e coronárias que utilizamos aqui (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009).

Nossos dados indicam que a participação do NO para o relaxamento induzido pela DRL depende mesmo do tipo/origem da artéria. Embora essa vasodilatação tenha sido completamente abolida pela inibição da NO sintase com a incubação de L-NAME nos anéis de aorta torácica, nas artérias mesentéricas de resistência ainda notamos um efeito residual da DRL, o que indica a possível participação de outros mediadores não dependentes do NO. Na verdade, enquanto a vasodilatação mediada pelo endotélio em artérias de condutância, tal como a aorta, é essencialmente dependente de NO, já é sabido que outros fatores derivados do endotélio também estão envolvidos no relaxamento de pequenas artérias de resistência (HILGERS; TODD; WEBB, 2006), como o terceiro ramo da artéria mesentérica utilizado neste estudo. Outra importante relação é a diminuição da expressão da eNOS que se nota de acordo com na medida em que se estuda artérias de menores diâmetros, o que reforça a sugestão que quanto menor a artéria, menor a participação do NO na mediação das funções endoteliais (GARLAND, 2003).

Como mencionado, usamos ramos de terceira ordem da artéria mesentérica, que são considerados vasos de resistência, com base em seus diâmetros internos 200-400 μm e nas suas características estruturais e funcionais (CHRISTENSEN; MULVANY, 2001). Da mesma forma, os segmentos coronários tinham diâmetro interno inferior a 400 μm , representando artérias que majoritariamente controlam a resistência do leito

coronário (DUNCKER; BACHE, 2008). Assim, nossos resultados não apenas confirmam a participação predominante do NO na resposta da DRL na aorta e estendem esses dados para artérias de resistência, como a artéria de mesentérica, mas também chamam a atenção para a artéria coronária onde o NO parece não desempenhar um papel nesses efeitos da DRL.

Levando em consideração a importância da hiperpolarização do MLV no relaxamento dependente do endotélio (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009), buscamos identificar o papel da hiperpolarização nas respostas da DRL. Na presença de solução despolarizante com KCl em altas concentrações, o efeito vasorrelaxante mediado pela hiperpolarização é eliminado. Em nossos estudos, o bloqueio da hiperpolarização inibiu o relaxamento da DRL dos segmentos aórticos em magnitude semelhante ao observada com o L-NAME, tal como relatado anteriormente (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013). Como o NO endotelial pode, de fato, ativar canais de potássio presentes no MLV, podemos especular que a DRL é capaz de induzir uma hiperpolarização intermediada pelo NO, o que leva vasodilatação dessa artéria de condutância.

No entanto, observamos que KCl alto aboliu completamente o relaxamento na artéria de resistência mesentérica, de forma ainda mais eficiente do que L-NAME, indicando que talvez outro mediador além do NO poderia ser responsável pela hiperpolarização induzida por DRL. Na verdade, nas artérias de resistência, a hiperpolarização derivada do endotélio pode ser atribuída a vários fatores, como ácidos epoxieicosatrienoico (EETs), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S) e peptídeo natriurético tipo C (CNP) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Nas artérias coronárias, o KCl elevado reduziu apenas parcialmente o relaxamento, sugerindo que a DRL está agindo, pelo menos em parte, por intermédio de hiperpolarização. Isso também parece

ser verdadeiro para a liberação de prostaciclina (PGI₂) derivada da via AA-COX, uma vez que a pré-incubação com indometacina também causou apenas uma inibição incompleta do efeito vasodilatador da DRL nas artérias coronárias. São fatores, que juntos, melhoram a perfusão miocárdica e participam da regulação da tônus vascular coronariano. Em pessoas com doença arterial coronariana, por exemplo, a vasodilatação por hiperpolarização derivada do endotélio é aumentada quando comparado com pessoas sem a doença. Quando qualquer mecanismo é inibido, os outros fatores têm o papel de compensar a regulação do fluxo (ELLINSWORTH et al., 2016; GOODWILL et al., 2018). É sabido que a regulação do fluxo sanguíneo ocorre de acordo com as demandas metabólicas do miocárdio e envolve vários fatores, incluindo a participação desses e outros fatores endoteliais. Além disso, o glicocálce disfuncional pode estar relacionado com síndromes coronárias, pois a vasodilatação dependente do endotélio fica prejudicada (PILLINGER; KAM, 2017). Uma doença como a hipertensão arterial sistêmica provoca alterações estruturais e funcionais nos vasos provocando a inibição da regulação normal do fluxo sanguíneo coronário. As consequências da inibição desses mecanismos endoteliais de regulação do tônus e fluxo vascular, envolvem eventos isquêmicos, angina e insuficiência cardíaca. Estudos sobre esses fatores podem promover novas abordagens terapêuticas no tratamento e diagnóstico de doenças coronarianas (CESENA; CHAGAS, 2001; GUTIÉRREZ et al., 2013). Embora uma série de estudos já tenham mostrado que lectinas de leguminosas, incluindo DRL, são capazes de induzir vasodilatação da aorta de ratos pela liberação de diferentes mediadores derivados do endotélio (ASSREUY et al., 2009; BARROSO-NETO, Ito L. et al., 2016; BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013; GADELHA et al., 2005; OSTERNE et al., 2014) os seus efeitos sobre a vasculatura coronariana permaneciam completamente desconhecidos até agora.

Foi evidente que a inibição de AA-COX não modificou o efeito da DRL nos segmentos aórticos, visto que a reposta deste vaso após previa incubação com indometacina foi semelhante àquela obtida só pela administração da lectina sozinha. Isso, por sua vez, sugere que o PGI₂ não deve desempenhar um papel significativo, apesar de relatos anteriores demonstrarem que a indometacina, mesmo em menor grau do que o L-NAME, foi capaz de reduzir o relaxamento da aorta pela DRL (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013). Por enquanto, nós não temos nenhuma explicação definitiva para resolver esse dado conflitante. No entanto, é importante mencionar que Bezerra et al. (2013) realizaram ensaios "*in vitro*" com DRL com segmentos aórticos sob uma tensão basal de 2g (aproximadamente o dobro do usado no presente estudo). Nesse sentido, uma breve revisão da literatura indica que os trabalhos que usam este método têm utilizado na sua grande maioria valores mais baixos, isto é, 1g, para a tensão basal de aortas torácicas de rato (ALMENARA et al., 2013; MARQUES, Vinicius Bermond et al., 2015; NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2020; ZHANG et al., 2017). Considerando que a isoforma COX-1 está presente nos vasos sanguíneos em condições fisiológicas (CARVALHO; CARVALHO; RIOS-SANTOS, 2004), podemos especular que o alongamento excessivo da parede no estudo acima citado poderia ter, na verdade, estimulado a COX, independentemente da presença da DRL.

Embora a DRL tenha produzido de fato uma redução no tônus vascular da artéria mesentérica após a pré-contração com fenilefrina, houve um duplo efeito dependente da concentração (redução inicial seguida de recuperação parcial do tônus vascular). Em relação a isso, os dados indicam que a DRL também poderia estar estimulando algum vasoconstritor derivado da COX nessas artérias, uma vez que a pré-incubação com indometacina não apenas impediu essa fase tardia e constritora da DRL, mas também potencializou o relaxamento geral. Assim, enquanto sob concentrações mais

baixas de DRL, a dilatação inicial das artérias mesentéricas envolveria NO e hiperpolarização, sob concentrações mais altas também podem estimular vasoconstritores derivados de AA-COX, diminuindo assim o efeito anterior. Além disso, como as isoformas COX-1 e COX-2 estão presentes nos vasos sanguíneos mesmo em condições fisiológicas (VANE; CORIN, 2003), poderíamos especular que a DRL estaria preferencialmente estimulando a produção de prostanóides vasoconstritores, tais como tromboxano e prostaglandinas pela artéria mesentérica de resistência, em comparação com o vasodilatador prostaciclina liberado pela aorta e artéria coronária.

Os efeitos biológicos das lectinas, incluindo a vasodilatação, estão intimamente relacionados à sua conexão com os carboidratos. Na verdade, a maioria dessas atividades é mediada por interações com glicanos encontrados em glicoconjugados na superfície celular (ABUSAMRA; ARGÜESO, 2018; ACOSTA; LEPENIES, 2019).

Assim, no presente estudo, os possíveis mecanismos envolvidos na vasodilatação induzida pela DRL também foram previstos por simulações de docking molecular desta lectina com alguns glicoconjugados candidatos encontrados na superfície da membrana celular. Nossos resultados a respeito das previsões de ligação sugeriram que a DRL poderia interagir com todos os principais tipos de *N*-glicanos por meio de resíduos de manosil, embora algumas exceções surpreendentes tenham sido identificadas, tal como MAN9, um glicano de alto teor de manose.

As *N*-glicosilações geralmente compartilham uma estrutura básica que consiste em $\text{Man}\alpha 1-6$ ($\text{Man}\alpha 1-3$) $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$, e podem ser divididas em três tipos de acordo com os resíduos anexados a este núcleo. MAN3, MAN5, MAN9 e o glicano 1 do CD31 são oligomanosídeos, nos quais apenas resíduos de manose estão ligados ao núcleo. Eles são precursores de vários outros glicanos e

podem ser encontrados em uma ampla gama de glicoproteínas, por exemplo, receptores de membrana e moléculas de adesão celular (por exemplo, o CD31 ou PECAM-1). As pontuações (scores) de docking da interação entre DRL e MAN3 foram -44,92, -47,31 para MAN5, ambos indicativos de uma ligação favorável quando comparada com D-manose, um ligante conhecido, e X-manose, um ligante forte aplicado na cristalização de DRL. No entanto, a interação de DRL com MAN9 foi classificada como improvável, o que foi surpreendente, dado que algumas lectinas intimamente relacionadas exibem interações muito favoráveis com este glicano (CAVADA, Benildo Sousa et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2017). Este resultado parece ser causado por impedimento estérico no local de ligação devido ao grande tamanho do MAN9, e diferenças na afinidade da lectina já foram atribuídas a pequenas diferenças no nível de sequência com pequenas mudanças no local de ligação (CAVADA, B. et al., 2001).

O segundo conjunto de glicanos testados, os *N*-glicanos complexos, apresenta ramos de *N*-acetilglicosamina (GlcNAc) ligados ao núcleo MAN3 com subsequente adição de galactose, formando estruturas de *N*-acetilactosamina (LacNAc). A formação de GalNAc β 1-4GlcNAc também pode ocorrer em alguns glicanos complexos (STANLEY et al., 2010). A DRL parece interagir favoravelmente ao glicano COMP1 com uma pontuação de -50,94, mas não com COMP2, o que pode ser explicado pela presença de um ácido siálico em sua estrutura, como visto também para ensaios com outras lectinas vegetais (CAVADA, Benildo Sousa et al., 2018; MARQUES, Gabriela F.O. et al., 2017).

O terceiro grupo de *N*-glicanos testados foi do tipo híbrido, que além de possuir propriedades dos tipos anteriores, também apresenta LacNAc e ramos oligomanosídicos (ACOSTA; LEPENIES, 2019). A DRL parece interagir muito bem

com os glicanos híbridos testados, apresentando pontuações de -55,57 e -45,41 para HYB1 e HYB2, respectivamente. A pontuação mais baixa de HYB2 pode ter sido causada pelo ácido siálico, mas a ligação era possível. Tomados em conjunto, essas afinidades diferenciais da DRL por carboidratos e glicanos sabidamente presentes na membrana das células endoteliais poderiam explicar a diversidade de seus efeitos, em decorrência de sua estabilidade e da forma como essa proteína poderia interagir com os glicanos na parede vascular.

É sabido que vários fatores (físicos e químicos) podem ser transmitidos através de glicanos e outras estruturas que constituem a face externa das membranas das células de uma maneira geral. O estresse de cisalhamento do sangue contra a parede dos vasos, por exemplo, é transmitido para as proteínas do glicocálice e também para junções intercelulares e placas de adesão basal anexas ao endotélio (TARBELL; PAHAKIS, 2006). Além disso, é sugerido que o glicocálice da célula endotelial varia em estrutura e espessura também em função dos diferentes leitos vasculares devido a diferenças locais na resposta a esses estímulos mecânicos e químicos (GOUVERNEUR et al., 2006; WEINBAUM et al., 2021). O glicocálice endotelial é importante para a modulação vascular, pois sua degradação por diferentes fatores pode levar à disfunção endotelial, redução da perfusão microvascular e lesão vascular (WEINBAUM et al., 2021). Essa rica estrutura é composta de glicoproteínas de membrana e glicosaminoglicanos que se ligam aos proteoglicanos através de cadeias de heparan sulfato (COSGUN; FELS; KUSCHE-VIHROG, 2020). Ademais, estudos recentes mostraram um papel para a molécula de adesão de células endoteliais plaquetária (PECAM-1 ou CD31) no mecanismo de mecanotransdução da superfície da célula endotelial para regular positivamente a COX-2 e a liberação associada de PGI₂ (RUSSELL-PULERI et al., 2017). Assim, como a indometacina foi capaz de

modular o relaxamento da DRL “*in vitro*”, muito provavelmente liberando um derivado vasodilatador (PGI₂) da COX nas artérias coronárias e na aorta, a probabilidade de ligação da DRL e do CD31 foi testada, considerando a interação com alguns glicanos encontrados nesta glicoproteína (NEWTON et al., 1999). Além de MAN3 e MAN5, que também podem ser encontrados no CD31 e se ligam favoravelmente a DRL, outros glicanos do CD31 (1, 25 e 37) testados também mostraram boas pontuações: -40,17, -56,19 e -55,47, respectivamente. Embora os glicanos 25 e 37 do CD31 sejam fucosilados, a fucose parece não ter tido efeito na ligação. E como citado anteriormente, a PECAM-1 promove papel modulador na dilatação mediada por fluxo em artéria coronária, sugerindo ser um resultado que se estende para os outros vasos.

Apesar da relação entre o glicocálice endotelial e a expressão do canais de potássio (dessa sob ativação poderia conduzir à hiperpolarização) e a sinalização da COX-2 (que por sua vez conduziria à liberação de PGI₂) possam explicar parcialmente uma vasodilatação “mecanotransduzida” (PAHAKIS et al., 2007; RUSSELL-PULERI et al., 2017; WEINBAUM et al., 2021), a principal via bioquímica dessa resposta da superfície da célula endotelial é a ativação da eNOS (PAHAKIS et al., 2007; WEINBAUM et al., 2021). Como já foi sugerido previamente que o heparan sulfato poderia atuar como um sensor da tensão de cisalhamento para essa liberação endotelial de NO (EBONG et al., 2014; FLORIAN et al., 2003), uma possível interação entre DRL e heparan sulfato também foi avaliada. A interação da DRL com o heparan sulfato apresentou uma pontuação de -34,88, sugerindo uma ligação provável, se comparado a D-manose. Rocha et al. (2015) também exploraram essa interação entre o heparan sulfato e a lectina de *Cymbosema roseum* na tentativa de explicar a mediação endotelial para liberação de NO por meio dessa lectina, e verificaram a presença de um domínio conservado em sua estrutura que poderia se ligar ao heparan

sulfato, o que poderia então ser expandido para outras lectinas dessa subtribo *Diocleinae*. Na verdade, esses autores também sugeriram que algumas lectinas de leguminosas parece exibir um mecanismo duplo de ativação da NOS: via interação com receptores de membrana ou via interação com o glicosaminoglicano heparan sulfato. Assim, de acordo com nossos experimentos com as amostras de artérias e os dados de simulação computacional baseada na sequência de aminoácidos, estrutura cristalina e especificidade para manose, glicose e açúcares derivados, também poderíamos sugerir que a ligação da DRL com heparan sulfato poderia levar à liberação de NO, que por sua vez poderia ser independente de alguma estimulação do receptor de membrana.

Para confirmar a absoluta dependência da presença de um endotélio íntegro para os efeitos vasorelaxantes da DRL em segmentos de aorta de ratos, alguns segmentos tiveram seu endotélio removido mecanicamente com auxílio de uma haste metálica, e não observamos efeito vasorelaxante da DRL, o que corrobora com estudos prévios de (BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al., 2013). Entretanto, por questões de dificuldade técnica, não fizemos protocolos com remoção mecânica do endotélio dos segmentos de artéria mesentérica e coronária, e por isso não podemos assegurar se esse efeito exclusivamente dependente do endotélio também se aplica para essas artérias.

5.1. Conclusão

Em resumo, pela primeira vez, foram descritos os efeitos vasculares "in vitro" de uma lectina de leguminosa em artérias de condutância e resistência. De maneira interessante, além da diversidade da capacidade vasorrelaxante da DRL entre esses tipos de artérias, as vias moleculares envolvidas também são diferentes o que pode estar associado a diversidade de interações possíveis com o glicocálice das células endoteliais (figura 16). Finalmente, consideramos que a avaliação das respostas vasculares à DRL em pequenas artérias de resistência é importante porque as respostas das grandes artérias (condutância) e de resistência a inúmeros compostos vasoativos podem de fato diferir tanto quantitativa quanto qualitativamente e, assim, influenciar diferencialmente a função endotelial e o controle do tônus vascular. Vale destacar que este é um estudo pioneiro, mas também preliminar, e estudos futuros ainda serão necessários para investigar um papel potencial da DRL seja terapêutico, seja como modelo para desenho farmacêutico de drogas vasoativas.

Diversidade de efeitos vasculares da lectina de *Dioclea rostrata*

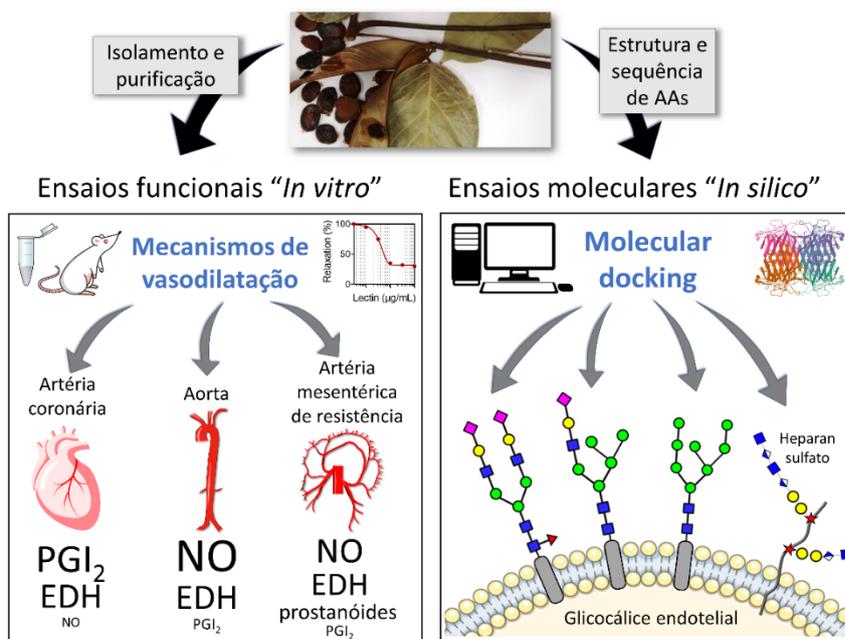


Figura 16: Resumo gráfico do estudo.

6. REFERÊNCIAS

- ABUSAMRA, Dina B.; ARGÜESO, Pablo. Lectin-glycan interactions in corneal infection and inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, p. 1–7, 2018.
- ACOSTA, Mariano Prado; LEPENIES, Bernd. Bacterial glycans and their interactions with lectins in the innate immune system. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 6, p. 1569–1579, 2019.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 919–922, 2005.
- ALMENARA, Camila C.P. et al. Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.
- AMBROSI, Moira; CAMERON, Neil R.; DAVIS, Benjamin G. Lectins: Tools for the molecular understanding of the glycode. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 1593–1608, 2005.
- ASSREUY, Ana Maria Sampaio et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009.
- BARROSO-NETO, Ito L. et al. Structural analysis of a *Dioclea sclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of *Dioclea* lectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 464–470, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.052>>.
- BARROSO-NETO, Ito Liberato et al. Vasorelaxant activity of *Canavalia grandiflora* seed lectin: A structural analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 543, p. 31–39, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2013.12.006>>.
- BATISTA DA NÓBREGA, Raphael et al. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 900–906, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.009>>.
- BEZERRA, Eduardo Henrique Salviano et al. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 4, p. 566–570, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.061>>.
- BEZERRA, Maria Júlia Barbosa et al. Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 4, p. 807–815, Abr. 2013.
- BOEGEHOLD, Matthew A. **Heterogeneity of endothelial function within the circulation. Current Opinion in Nephrology and Hypertension**. [S.l.: s.n.], 1998
- BRINDA, K. V.; SUROLIA, Avadhesh; VISHVESHVARA, Sarawathi. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: A case study of lectins. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 1, p. 1–15, 2005.

- BRYAN, R.M. Jr.; YOU, J.; GOLDING, E.M.; MARRELLI, S.P. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a cousin to nitric oxide and prostacyclin. *Anesthesiology*. 2005 Jun;102(6):1261-77. doi: 10.1097/00000542-200506000-00028. PMID: 15915041. BROWN, Isola A M et al. Resistance Arteries in Hypertension : **VSMC in hypertension**. v. 38, n. 9, p. 1969–1985, 2019.
- CARVALHO, Wilson Andrade; CARVALHO, Rosemary Duarte Sales; RIOS-SANTOS, Fabrício. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448–464, 2004.
- CAVADA, B. et al. Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.
- CAVADA, Benildo S. et al. ConA-like lectins: High similarity proteins as models to study structure/biological activities relationships. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 1, 2019.
- CAVADA, Benildo Sousa et al. Canavalia bonariensis lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 369–378, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.023>>.
- CESENA, Fernando Henpin Yue; CHAGAS, Antônio Carlos Palandri. A circulação coronária na hipertensão arterial sistêmica e na insuficiência cardíaca conseqüente. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 4, p. 431–439, 2001.
- CHRISTENSEN, Kent L.; MULVANY, Michael J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2001.
- COSGUN, Zülfü Cem; FELLS, Benedikt; KUSCHE-VIHRIG, Kristina. Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx: From Structure to Function. **American Journal of Pathology**, v. 190, n. 4, p. 732–741, 2020.
- DE OLIVEIRA, T. M. et al. Crystal structure of Dioclea rostrata lectin: Insights into understanding the pH-dependent dimer-tetramer equilibrium and the structural basis for carbohydrate recognition in Diocleinae lectins. **Journal of Structural Biology**, v. 164, n. 2, p. 177–182, 2008.
- DOGNÉ, Sophie; FLAMION, Bruno. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding. **American Journal of Pathology**, v. 190, n. 4, p. 768–780, 2020.
- DUDZINSKI, David M. et al. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 46, n. June, p. 235–276, 2006.
- DUNCKER, Dirk J.; BACHE, Robert J. Regulation of coronary blood flow during exercise. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 3, p. 1009–1086, 2008.
- EBONG, Eno E. et al. Shear-induced endothelial NOS activation and remodeling via heparan sulfate, glypican-1, and syndecan-1. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 6, n. 3, p. 338–347, 2014.
- ELDRIDGE, M.D.; MURRAY, C.W.; AUTO, T.R.; PAOLINI, G.V.; MEE, R.P. Empirical

- scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **J Comput Aided Mol Des**.11(5):425–45, 1997.
- ELLINSWORTH, David C. et al. Endothelium-Derived Hyperpolarization and Coronary Vasodilation: Diverse and Integrated Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids, Hydrogen Peroxide, and Gap Junctions. **Microcirculation**, 23(1):15-32, 2016.
- FÉLÉTOU, Michel; VANHOUTTE, Paul M. EDHF: An update. **Clinical Science**, v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.
- FERREIRA, Leonardo G. et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. [S.l: s.n.]. v. 20, 2015.
- FLORIAN, Jeffry A. et al. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. **Circulation research**, v. 93, n. 10, 2003.
- FÖRSTERMANN, Ulrich; XIA, Ning; LI, Huige. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 120, n. 4, p. 713–735, 2017.
- FUJIWARA, Hiroki et al. Endothelium-derived relaxing factor-mediated vasodilation in mouse mesenteric vascular beds. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 118, n. 3, p. 373–381, 2012.
- GADELHA, Carlos Alberto De Almeida et al. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **Journal of Structural Biology**, v. 152, n. 3, p. 185–194, 2005.
- GARLAND, C. J. Role of endothelial cell ion channels in the resistance artery function. **Neurophysiology**, v. 35, n. 3–4, p. 161–168, 2003.
- GAUDETTE, Sarah; HUGHES, Dez; BOLLER, Manuel. The endothelial glycocalyx: Structure and function in health and critical illness. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 30, n. 2, p. 117–134, 2020.
- GODO, Shigeo; SHIMOKAWA, Hiroaki. Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 109, n. December 2016, p. 4–10, 2017.
- GOLDSTEIN, Steven A. et al. Multimodality imaging of diseases of the thoracic aorta in adults: From the American society of echocardiography and the european association of cardiovascular imaging: Endorsed by the society of cardiovascular computed tomography and society for cardiova. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 28, n. 2, p. 119–182, 2015.
- GOMES, Bruno Severo et al. Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 770–778, 2012.
- GOODWILL, Adam G et al. Regulation of Coronary Blood Flow HHS Public Access. **Compr Physiol**, v. 7, n. 2, p. 321–382, 2018.
- GOUVERNEUR, M. et al. Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: Effects of fluid shear stress. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 4, p. 393–400, 2006.
- GUTIÉRREZ, Enrique et al. Endothelial dysfunction over the course of coronary

artery disease. **European Heart Journal**, v. 34, n. 41, p. 3175–3181, 2013.

HARDING, Ian C. et al. Endothelial barrier reinforcement relies on flow-regulated glycocalyx, a potential therapeutic target. **Biorheology**, v. 56, n. 2–3, p. 131–149, 2019.

HILGERS, Rob H.P.; TODD, Joseph; WEBB, R. Clinton. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: Role of calcium-activated K⁺ channels. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 1, p. 216–222, 2006.

KRÜGER-GENGE, Anne et al. Vascular endothelial cell biology: An update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

KÖHLER, R.; HOYER, J. The endothelium-derived hyperpolarizing factor: Insights from genetic animal models. **Kidney International**, v. 72, n. 2, p. 145–150, 2007.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R.C.; LEACH, A.R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J Mol Biol.** 1997;267(3):727–48.

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

LENASI, Helena (October 24th 2018). Endothelium at a Glance, Endothelial Dysfunction - Old Concepts and New Challenges, Helena Lenasi, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81286. Available from: <https://www.intechopen.com/books/endothelial-dysfunction-old-concepts-and-new-challenges/endothelium-at-a-glance>.

LIU, Yanping et al. Peroxynitrite reduces the endothelium-derived hyperpolarizing factor component of coronary flow-mediated dilation in PECAM-1-knockout mice. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. 57–65, 2006.

MACEDO, Maria Lígia R.; OLIVEIRA, Caio F.R.; OLIVEIRA, Carolina T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014–2033, 2015.

MARQUES, Gabriela F.O. et al. Contribution of the carbohydrate-binding ability of Vatairea guianensis lectin to induce edematogenic activity. **Biochimie**, v. 140, p. 58–65, 2017.

MARQUES, Vinicius Bermond et al. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. **Life Sciences**, v. 143, p. 89–97, 2015.

MISHRA, Abtar et al. Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, n. June, p. 110827, 2019.

MUSTAFA, S. Jamal; ANSARI, Habib R.; ABEBE, Worku. P1 (adenosine) purinoceptor assays. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 1, n. SUPPL. 45, p. 1–13, 2009.

NASCIMENTO, Kyria Santiago et al. Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin:

A C6 cells apoptosis-inducing protein. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 92, n. August, p. 79–89, 2017.

NELLI, Silvia et al. Evaluation of potassium ion as the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in the bovine coronary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 5, p. 982–988, 2003.

NEWMAN, Peter J.; NEWMAN, Debra K. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: New roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 6, p. 953–964, 2003.

NEWTON, Justin P. et al. CD31 (PECAM-1) exists as a dimer and is heavily N-glycosylated. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 261, n. 2, p. 283–291, 1999.

NUNES, Karolini Zuqui et al. Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: The role of hydrogen peroxide. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2015.

NUNES, Dieli Oliveira. Ácido Linoleico Reduz a Reatividade Vascular e Melhora a Disfunção Vascular de Artérias Mesentéricas de Ratos Hipertensos. 2018. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2018.

OSTERNE, Vinicius J.S. et al. Purification, partial characterization, and CNBr-Sepharose immobilization of a vasorelaxant glucose/mannose lectin from *Canavalia virosa* seeds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 7, p. 3342–3353, 2014.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PIETRZYK-BRZEZINSKA, Agnieszka J.; BUJACZ, Anna. H-type lectins – Structural characteristics and their applications in diagnostics, analytics and drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 735–747, 2020.

PILLINGER, N. L.; KAM, P. C.A. Endothelial glycocalyx: Basic science and clinical implications. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 45, n. 3, p. 295–307, 2017.

REILY, Colin et al. Glycosylation in health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 346–366, 2019.

REITSMA, Sietze et al. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 454, n. 3, p. 345–359, 2007.

ROCHA, Bruno A.M. et al. CRLI induces vascular smooth muscle relaxation and suggests a dual mechanism of eNOS activation by legume lectins via muscarinic receptors and shear stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 565, p. 32–39, 2015.

RUSSELL-PULERI, Sparkle et al. Fluid shear stress induces upregulation of COX-2

and PGI2 release in endothelial cells via a pathway involving PECAM-1, PI3K, FAK, and p38. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 312, n. 3, p. H485–H500, 2017.

SANZ-APARICIO, Julia et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114–118, 1997.

SESSA, William C. eNos at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 12, p. 2427–2429, 2004.

SOUSA, Joana; DINIZ, Carmen. Vascular Sympathetic Neurotransmission and Endothelial Dysfunction. **Endothel. Dysfunct.** - Old Concepts New Challenges. [S.l.: s.n.], 2018. .

SPROVIERI, P.; MARTINO, G. The role of the carbohydrates in plasmatic membrane. **Physiological Research**, v. 67, n. 1, p. 1–11, 2018.

STANLEY, P.; SCHACHTER, H.; TANIGUCHI, N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2010.

TARBELL, J. M.; PAHAKIS, M. Y. Mechanotransduction and the glycocalyx. **Journal of Internal Medicine**, v. 259, n. 4, p. 339–350, 2006.

TEIXEIRA, Rafaela et al. Inhibit Vasopressor Tonus in Rat Thoracic Aorta. v. 2, n. Figure 1, p. 1–10, 2020.

U. SYED, Arsalan et al. Ion Channels and Their Regulation in Vascular Smooth Muscle. **Basic and Clinical Understanding of Microcirculation**, 2020.

UCHIMIDO, Ryo; SCHMIDT, Eric P; SHAPIRO, Nathan I. Glucocalyx/Sepsis. **Critical Care**, p. 1–12, 2019.

VAN HOLLE, Sofie; VAN DAMME, J. M. Signaling through plant lectins: modulation of plant immunity and beyond. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 2, p. 217–233, 2018.

VANE, J.; CORIN, Robert E. Prostacyclin: A vascular mediator. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 26, n. 6, p. 571–578, 2003.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193–222, 2009.

W. HALPERN, M. J. Mulvany; WARSHAW, D. M. Mechanical Properties of Smooth Muscle Cells in the. **J. Physiol.**, n. 275, p. 85–101, 1978.

WEINBAUM, Sheldon et al. The Glycocalyx and Its Role in Vascular Physiology and Vascular Related Diseases. **Cardiovascular Engineering and Technology**, v. 12, n. 1, p. 37–71, 2021.

WIDMER, R Jay; LERMAN, Amir. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease Endothelial + dysfunction + and + cardiovascular + disease +. 2014.

ZENG, Ye et al. The role of endothelial surface glycocalyx in mechanosensing and transduction. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1097, n. January, p. 1–27, 2018.

ZHANG, H. T. et al. Effect of tobacco smoke on hydrogen sulfide-induced rat thoracic aorta relaxation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 2, p. 1–7, 2017.

ZHAO, Yingzi; VANHOUTTE, Paul M.; LEUNG, Susan W.S. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 129, n. 2, p. 83–94, 2015.

Received: 8 February 2021 | Revised: 22 April 2021 | Accepted: 8 May 2021

DOI: 10.1111/bcpt.13614

ORIGINAL ARTICLE



Differential vasodilator effect of *Dioclea rostrata* lectin in conductance and resistance arteries: Mechanisms and glycoconjugate binding relationships

Tatiani Botelho¹ | Vinicius J.S. Osterne^{2,3} | Vanir R. Pinto-Junior^{2,4} | Messias V. Oliveira² | Benildo S. Cavada² | Kyria S. Nascimento² | Leonardo dos Santos¹

¹Department of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

³Department of Nutrition, State University of Ceará, Fortaleza, Brazil

⁴Department of Physics, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

Correspondence

Leonardo dos Santos, Health Sciences Centre, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, 29043-090, Vitória, ES, Brasil. Email: leodossantos@hotmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Grant/Award Number: CAPES—Finance code 001; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 303077/2017-4 CNPq 2018-20; Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo, Grant/Award Number: 80707483 FAPES 03/2017; Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Abstract

Lectins are proteins that recognize specific carbohydrates, and the vasorelaxant effect of legume lectins has been previously reported, for example the *Dioclea rostrata* lectin (DRL). This study evaluated major pathways of DRL-induced relaxation in different artery segments and the possible molecular interactions involved. Rat thoracic aorta, coronary and mesenteric resistance arteries were tested “in vitro” with concentration-response curves to DRL (0.01–100 µg/mL). L-NAME, indomethacin and high KCl were used to evaluate nitric oxide, cyclooxygenase and hyperpolarization-dependent effects. DRL promoted relaxation of all vessels throughout different mechanisms. L-NAME blunted DRL-induced effects only in the aorta and mesenteric resistance artery. By the use of depolarizing KCl solution, vasodilation was reduced in all arteries, while incubation with indomethacin indicated a role of cyclooxygenase-derived factors for DRL effects in mesenteric and coronary arteries, but not in the aorta. Molecular docking results suggested interactions between DRL and heparan sulphate, CD31 and other glycans present on the membrane surface. These data indicate that the mechanisms involved in DRL-mediated vasodilation vary between conductance and resistance arteries of different origins, and these effects may be related to the capacity of DRL to bind a diversity of glycans, especially heparan sulphate, a proposed mechanoreceptor for nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation.

KEYWORDS

arteries, endothelium, glycans., lectins, resistance artery, vasodilatation

1 | INTRODUCTION AND BACKGROUND

Lectins are proteins, or glycoproteins, of non-immune origin and widely found in all organisms, which bind reversibly and specifically to carbohydrates via a carbohydrate recognition domain (CRD).^{1,2} The ability to recognize carbohydrate

residues on cell membranes³ allows several biological effects, such as cell-cell communication,⁴ antimitotic or antineoplastic,^{5,6} and antiviral and antifungal activities.^{7,8} In addition, several legume lectins induce vasorelaxation of rat aorta preparations “in vitro”.^{9–11} However, despite the similar chemical and physicochemical properties, this vascular effect differs in terms of potency. In this regard, it is proposed

© 2021 Nordic Association for the Publication of BCPT (former Nordic Pharmacological Society). Published by John Wiley & Sons Ltd