

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da interação entre galectina-1 e zinco e suas  
potenciais implicações estruturais e funcionais**

Willian Abraham da Silveira

Ribeirão Preto  
2011

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da interação entre galectina-1 e zinco e suas  
potenciais implicações estruturais e funcionais**

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia Aplicada a Farmácia para  
obtenção do Título de Mestre em  
Ciências

Área de Concentração: Biotecnologia  
Aplicada a Farmácia.

**Orientado:** Willian Abraham da Silveira

**Orientador:** Prof.Dr. Marcelo Dias Baruffi

Ribeirão Preto  
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silveira, Willian Abraham

Avaliação da interação entre Galectina-1 e Zinco e suas potenciais implicações estruturais e funcionais. Ribeirão Preto, 2011.  
127 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Dias-Baruffi, Marcelo

1.Galectina-1.2. Zinco.3. Complexação.4.Lectina. Ribeirão Preto.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do Aluno: Willian Abraham da Silveira

Título do trabalho: Avaliação da interação entre Galectina-1 e Zinco e suas potenciais implicações estruturais e funcionais.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas a Farmácia.

Orientador: Prof.Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a meu sobrinho, Gabriel Matos da Silveira, por me fazer lembrar a alegria infantil de se perguntar "Por quê?".*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao Prof.Dr. Marcelo Dias Baruffi, por abrir as portas de seu laboratório à mim, por permitir que reconhecesse e desenvolvesse meu perfil científico e por todo apoio nós últimos anos.

Agradeço também a todos os membros do Laboratório, Camillo Del Cistia Andrade, Karina Alves de Toledo, Thalita Bachelri Riul, Lilian Rodrigues Cataldi, Amanda Cristina Trabuco, Jennifer Michiko Chauca Yokoya , Francine Junta Bianchini, Bárbara Bastos , Barbara Oliveira e também aos que não fazem mais parte , Natália Koyama , Marlise Montes, Marcella Grando, Helder Pereira e Daniel Calejon. Não poderia deixar de agradecer ao Grupo da Prof.Dra. Regina Torqueti: Miriam Salvador, Michele Paulo, Helen Fumagalli, Bianca Stocco e Amanda Faria, agradeço a estes pelos momentos de camaradagem, por todo apoio e por me permitir ver como grupos de pesquisa se organizam.

Agradeço ao Prof.Dr.Richard John Ward, ao Prof.Dr. Antonio Caliri e ao Prof.Dr. Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva pela colaboração, assim como aos pós-graduandos Evandro Pizeta Semighini, Jonathan Resende de Almeida e um agradecimento especial ao graduando Leandro Bortot.

Agradeço a FCFRP, pela minha formação, tanto na graduação quanto na pós-graduação e agradeço também, especificamente, ao Serviço de Pós-Graduação desta unidade, sempre solícito.

Agradeço a CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço ao grupo AIKIUSP de Aikido e a Associação de Pós-Graduandos da USP do Campus de Ribeirão Preto (APG/USP-RP), por meu envolvimento com eles ter sido responsável pela ampliação de meus horizontes , tanto pessoais, quanto profissionais.

Agradeço ainda a todas as pessoas que passaram por minha vida neste período, ninguém trabalha só, ninguém vive só, ninguém aprende só e posso me considerar feliz por ter pessoas demais para nomear.

Esse agradecimento não estaria completo sem que citasse meus familiares, principalmente minha mãe e meu irmão, por me lembrarem sempre de onde vim e por me permitirem acreditar em meus sonhos.



**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

***“ Nada na biologia faz sentido, exceto a luz da evolução”***

Theodosius Dobzhansky

## RESUMO:

SILVEIRA, W.A. **Avaliação da interação entre Galectina-1 e Zinco e suas potenciais implicações estruturais e funcionais**. 2011. 127f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto 2011.

**Introdução:** A Galectina-1 (Gal-1) é uma proteína multifuncional capaz de reconhecer, de modo específico, glicanas compostas por resíduos de  $\beta$ -galactosídeos, por meio de domínios de reconhecimento de carboidrato (CRD). A Gal-1 é um homodímero de 14.900 daltons,  $pI = 5.6$ , apresenta uma topologia molecular do tipo "jelly-roll" composto por duas folhas- $\beta$  anti-paralelas. Além disso, esta proteína não apresenta peptídeo sinal e possui 6 cisteínas, 7 ácidos glutâmicos, 9 ácidos aspárticos e 4 histinas por monômero. A Gal-1 liga-se a diferentes moléculas biológicas contidas nas superfícies celulares, núcleo e componentes da matriz extracelular. O zinco é um importante metal em sistemas biológicos. Aproximadamente 10% do proteoma humano é potencialmente capaz de complexar zinco. Este íon exibe propriedades adequadas tanto para funções catalíticas, quanto estruturais em proteínas. Os sítios de ligação a zinco, nas proteínas, podem ser divididos em catalíticos, estruturais, co-catalíticos e sítios na interface protéica. Geralmente, os resíduos de cisteína, histidina, ácido glutâmico e ácido aspártico são alvos preferenciais de interação com Zn. Há na literatura dados que mostram a interação da Gal-1 humana com íons orgânicos, porém não há relatos sobre a interação Gal-1/Zn. **Objetivos:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar a existência e as implicações da interação entre o íon  $Zn^{2+}$  e a proteína Gal-1. **Materiais e Métodos:** Foi efetuada a produção, purificação e padronização do uso das formas dimérica e monomérica da Gal-1 recombinante humana. A interação Gal-1/Zn foi avaliada através de ensaios biofísicos e biológicos. A análise – *in vitro* e *in silico* – dos parâmetros biofísicos, foi feita através de espectrofluorimetria, de dicróismo circular, de ensaio de precipitação, do método GRID e por dinâmica molecular. A análise *in vitro* dos parâmetros biológicos, foi realizada por meio de ensaio de hemaglutinação e interação com laminina por ELISA. **Resultados e Discussão:** A adição de  $ZnCl_2$  numa solução de Gal-1 causa aumento da emissão por fluorescência do triptofano e uma alteração para o vermelho, altera o espectro de dicróismo circular e causa precipitação protéica da Gal-1. Estes eventos ocorreram de forma seletiva e dependente da concentração desse íon. As análises *in silico* indicam que o provável sítio de complexação Zn/Gal-1 é distinto do CRD e é formado pelos aminoácidos Glu-15, Asp-92 e Asp-134, assumindo a conformação trigonal bipiramidal e tendo número de coordenação igual a 5. **Conclusão:** As análises biofísicas *in vitro* e *in silico*, nos indicam que a Galectina-1 tem a capacidade de se complexar com o íon  $Zn^{2+}$ .

**Palavras Chave:** Galectina-1, Zinco, Complexação, Lectinas

## ABSTRACT

Silveira, W.A. **Evaluation of the interaction between Galectin-1 and Zinc and their potential structural and functional implications.** 127f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto 2011.

**Introduction:** Galectin-1 (Gal-1) is a multifunctional protein that specifically recognizes glycans with  $\beta$ -galactosides through carbohydrate recognition domains (CRD). Gal-1 is a homodimeric protein of 14.900daltons,  $pI=5.6$ , shows a jelly-roll molecular topology composed of two anti-parallel  $\beta$ - sheet, has no signal peptide and contains 6 cysteines, 7 glutamic acids, 9 aspartic acids and 4 histidines per monomer. This lectin binds to different biological molecules contained in the cell surface, nucleus and extracellular matrix components. Zinc is an important metal in biological systems because can participate in the maintenance of protein structure and biological activity. Usually, cysteine, histidine, glutamic acid and aspartic acid residues are preferential targets for interaction with Zn. Approximately 10% of the human proteome is potentially capable to forming complexes with Zn. The  $Zn^{2+}$  ion exhibits properties suitable for both catalytic and structural protein functions. Proteins zinc binding sites can be divided into catalytic, structural, co-catalytic and protein interface sites. There are reports in the literature that shows the interaction between galectin-1 and organic ions. However, were not found reports about Zn-Gal-1 complexes. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the existence and implications of the interaction between galectin-1 and  $Zn^{2+}$  ion. **Materials and Methods:** Human recombinant Gal-1 (monomer and dimer) was obtained and purified. Also, the conditions for the use of Gal-1 were standardized. The interaction Zn/Gal-1 was assessed by biophysical and biological procedures. The analysis – *in vitro* and *in silico* – was made by spectrofluorimetry, circular dichroism, precipitation test, method of GRID, and molecular dynamics. The *in vitro* analysis of biological parameters were performed by hemmagglutination and laminin binding (ELISA) tests. **Results and Discussion:** The addition of  $ZnCl_2$  in Gal-1 solution causes increased fluorescence emission of tryptophan-70 and a red shift, alters the circular dichroism spectrum and causes precipitation of Gal-1 protein. These events occurred in a selective manner dependent of Zinc concentration. The *in silico* analysis indicates that the probable site of Zn/Gal-1 complexation is distinct from the CRD and is formed by the amino acids Glu-15, Asp-92 and Asp-134, assuming trigonal bipyramidal conformation and with coordination number equal to 5. **Conclusion:** The biophysical *in vitro* and *in silico* findings suggests that Galectin-1 has the ability to complex with the  $Zn^{2+}$  ion.

**Keywords:** Galectin-1, Zinc, Complexation, Lectins.

## RESUMEN

SILVEIRA, W.A. **Evaluación de La interacción entre la Galectina-1 y el Zinc y sus potenciales implicaciones estructurales y funcionales.** 2011. 127f. Disertación (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto 2011.

**Introducción:** La Galectina-1 (Gal-1) es una proteína multifuncional capaz de reconocer, de modo específico glicanas compuestas por residuos de  $\beta$ -galactosídeos por medio de dominios de reconocimiento de carbohidrato (CRD). La Gal-1 es un homodímero de 14.900 dalton,  $pI = 5.6$ , que presenta una topología molecular del tipo "jelly-roll" compuesto de dos hojas- $\beta$  antiparalelas. Además, esta proteína no presenta péptido señal y posee 6 cisteínas, 7 ácidos glutámicos, 9 ácidos aspárticos y 4 histidinas por monómero. La Gal-1 se liga a diferentes moléculas biológicas contenidas en las superficies celulares, núcleo y componentes de la matriz extracelular. El zinc es un importante metal en sistemas biológicos. Aproximadamente 10% del proteoma humano es potencialmente capaz de acomplejar el zinc. Este ion exhibe propiedades adecuadas tanto para funciones catalíticas cuanto estructurales en proteínas. Los sitios de ligazón al zinc en las proteínas, pueden ser divididos en catalíticos, estructurales, cocatalíticos y sitios en la interfaz proteica. En general, los residuos de cisteína, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico son los blancos preferenciales de interacción con el Zn. En la literatura hay datos que muestran la interacción de la Gal-1 humana con los iones orgánicos, pero no hay reportes sobre la interacción Gal-1/Zn. **Objetivos:** El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la existencia y las implicaciones de la interacción entre el ion  $Zn^{2+}$  y la proteína Gal-1. **Materiales y Métodos:** Fue efectuada la producción, purificación y padronización del uso de las formas dimerica y monomérica de la Gal-1 recombinante humana. La interacción Gal-1/Zn fue evaluada por medio de ensayos biofísicos y biológicos. Los análisis – *in vitro* e *in silico* – de los parámetros biofísicos, fueron hechos por medio de espectrofluorimetría, de dicroísmo circular, de ensayo de precipitación, del método GRID y por dinámica molecular. El análisis *in vitro* de los parámetros biológicos, fue realizado por medio de ensayo de hemaglutinación e interacción con laminina por ELISA. **Resultados y Discusión:** El adición de  $ZnCl_2$  en una solución de Gal-1 causa aumento de la emisión por fluorescencia del triptófano y una alteración para el rojo altera el espectro de dicroísmo circular y ocasiona precipitación proteica de la Gal-1. Estos eventos ocurrieron de forma selectiva y dependiente de la concentración de ese ion. Los análisis *in silico* indican que el probable sitio de acomplejación Zn/Gal-1 es distinto del CRD y es formado por los aminoácidos Glu-15, Asp-92 y Asp-134, asumiendo la conformación trigonal bipyramidal y teniendo número de coordinación igual a 5. **Conclusión:** Los análisis biofísicos *in vitro* e *in silico* nos indican que la Galectina-1 tiene la capacidad de acomplejarse con el ion  $Zn^{2+}$ .

**Palabras Clave:** Galectina-1, Zinc, Acomplejación, Lectina

## LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b>	Clasificação das Galectinas em relação ao "CRD". Representação esquemática da divisão dos tipos de galectinas.....	3
<b>Figura 2:</b>	Representação estrutural do homodímero de Galectina-1 Humana com a lactose.....	6
<b>Figura 3:</b>	Características Químicas do Zinco.....	9
<b>Figura 4:</b>	As diferentes geometrias de coordenação do Zinco.....	10
<b>Figura 5:</b>	Influência dos metais no surgimento de proteínas dimericas.....	11
<b>Figura 6:</b>	Freqüência (%) de residuos protéicos que se ligam ao zinco participando de atividades catalíticas ou na manutenção da estrutura.....	12
<b>Figura 7:</b>	Perfis cromatográficos referentes à purificação de Gal-1 e à remoção de lactose e 2-ME das preparações de Gal-1.....	30
<b>Figura 8:</b>	Análise eletroforética do procedimento de obtenção da Gal-1 ativa e purificada.....	31
<b>Figura 9:</b>	Modificação da emissão do triptofano ( $W_{70}$ ) da galectina-1 pela interação com o íon $Zn^{2+}$ .....	34
<b>Figura 10:</b>	Avaliação do impacto da adição de íons no espectro obtido por dicroísmo circular, da Galectina-1.....	38
<b>Figura 11:</b>	Determinação do impacto do $ZnCl_2$ sobre atividade hemaglutinante da Galectina-1 Dimérica.....	42
<b>Figura 12:</b>	Determinação do impacto do $ZnCl_2$ sobre atividade hemaglutinante da C2SGal-1.....	43
<b>Figura 13:</b>	Avaliação por ELISA da ação do $ZnCl_2$ sobre a capacidade da Gal-1 de reconhecer laminina.....	45
<b>Figura 14:</b>	Visualização dos campos de interação molecular para a região ligante da galectina-1, calculados com o grupo de prova $Zn^{2+}$ , pelo software GRID.....	46
<b>Figura 15:</b>	Relaxamento da estrutura proteica.....	48
<b>Figura 16:</b>	Estabelecimento do equilíbrio da estrutura proteica no sistema, durante o relaxamento.....	49
<b>Figura 17:</b>	Sítios de Interação.....	51
<b>Figura 18:</b>	Visualização da Dinâmica Molecular do Sítio 1.....	53
<b>Figura 19:</b>	Avaliação do equilíbrio da estrutura proteica no sistema, durante a dinâmica molecular para o sítio 1.....	57

<b>Figura 20:</b>	Visualização da Dinâmica Molecular do Sítio 2". Visualização do sítio 2 para o complexo gal-1/Zn.....	59
<b>Figura 21:</b>	Avaliação do equilíbrio da estrutura proteica no sistema, durante a dinâmica molecular para o sítio 2.....	63
<b>Figura 22:</b>	Visualização da Dinâmica Molecular do Sítio 3". Visualização do sítio 3 para o complexo gal-1/Zn.....	65
<b>Figura 23:</b>	Avaliação do equilíbrio da estrutura proteica no sistema, durante a dinâmica molecular para o sítio 3.....	69
<b>Figura 24:</b>	Visualização da Dinâmica Molecular do Sítio 4.....	71
<b>Figura 25:</b>	Avaliação do equilíbrio da estrutura proteica no sistema, durante a dinâmica molecular para o sítio 4.....	75
<b>Figura 26:</b>	Visualização da Dinâmica Molecular do Sítio 5". Visualização do sítio 1 para o complexo gal-1/Zn.....	77
<b>Figura 27:</b>	Avaliação do equilíbrio da estrutura proteica no sistema, durante a dinâmica molecular para o sítio 5.....	81
<b>Figura 28:</b>	Comparação das distâncias entre o Zn e os aminoácidos presentes no sítio simulado.....	84
<b>Figura 29:</b>	Comparação das distâncias entre as Cisteínas 16 e 88.....	91
<b>Figura 30:</b>	Comparação entre os conteúdos de estrutura secundária das estruturas simuladas.....	96
<b>Figura 31:</b>	Comparação entre a superfície hidrofóbica exposta ao solvente da estrutura proteica.....	100
<b>Figura 32:</b>	Visualização da superfície acessível ao solvente, colorida de acordo com o perfil de potencial eletrostático, da face proteica onde ocorre a interação Gal-1/Zn.....	105
<b>Figura 33:</b>	Médias da energias potenciais das interações proteína-proteína para cada simulação.....	109
<b>Figura 34:</b>	Médias da energias potenciais das interações proteína-zinco para cada simulação.....	109

**LISTA DE TABELAS:**

<b>Tabela 1:</b>	Análise da preservação da atividade lectínica de preparações de gal-1 pura e sem conservante submetidas ou não a re-cromatografia de afinidade em agarose-lactose.....	32
<b>Tabela 2:</b>	Avaliação do impacto da adição de Íons na Precipitação da Galectina-1	40
<b>Tabela 3:</b>	Sítios de Interação.....	51
<b>Tabela 4:</b>	Comparação entre os sítios simulados.....	108



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:**

**μ** - micro

**°C** – graus Celsius

**2ME** – β-mercaptoetanol

**Arg** – Arginina

**As** – Arsênico

**Asp** – Ácido Aspártico

**Ca** – Cálcio

**cal** - calorias

**Cd** – Cádmiio

**Células NK** - Células "*Natural Killer*"

**Cl** - Cloro

**CRD** - *carbohydrate-recognition domains*, domínios de reconhecimento de carboidrato

**Cu** – Cobre

**Cys** – Cisteína

**Da** - Daltons

**DNP** – 2,4-Dinitrophenol

**EDTA** - *Ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilendiamino tetra-acético,

**ELISA** - Enzyme-linked immunosorbent assay, ensaio imunoenzimático

**EUA** – Estados Unidos da América

**Fe** – Ferro

**g** – grama

**g** – gravidade

**Gal- 1** - Galectina-1

**Glu** – Ácido Glutâmico

**HCl** – Ácido clorídrico

**HEPES** - (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* )

**IPTG** – isopropil  $\beta$ -D-tiogalacto-piranozideo

**J** – Joules

**k** – kilo

**L** – litros

**m** – mili

**M** – molar

**MIF** – Molecular Interaction Field – Campos de Interação Molecular

**min** – minuto

**mm** – milímetro

**Mn** – Manganês

**n** – nano

**N** – Normal

**nm** – nanômetro

**p** – pico

**PBS** – *Phosphate Buffered Saline*

**PDB** – *Protein Data Bank*

**pH** – potencial hidrogênico

**RMSD** – Root Mean Square Deviation

**Tris** - 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

**UK** – *United Kingdom*, Reino Unido

**V** – Volts

**Zn** – Zinco

**$\beta$ Gal** -  $\beta$ -galactosídeo

**LISTA DE SIMBOLOS**

$\Sigma$  - somatório

$\sqrt{\quad}$  - raiz quadrada

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de figura</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de símbolos</b>	<b>ix</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Galectinas.....	2
1.1.1 Galectinas: Considerações Gerais.....	2
1.1.2 A Galectina-1.....	4
1.1.3 Galectina-1: Informações Estruturais.....	5
1.2 O Íon Zinco.....	7
1.2.1 Metais: Importância biológica.....	7
1.2.2 - Zinco: Aspectos Químicos e Biológicos.....	8
1.2.3 - Evolução da vida e o Zinco.....	10
1.2.4 Sítios Protéicos de Ligação a Zinco.....	12
1.2.5 - Zinco no organismo.....	13
1.2.6 Zinco: aspectos imunológicos e celulares.....	13
1.3. Galectina-1 e Interações com Íons.....	14
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>17</b>
3.1 Obtenção e purificação de prepações de galectina-1 recombinante humana (dimérica e monomérica).....	18
3.2 Controle do nível de preservação da propriedade lectínica de Gal-1.....	19
3.3 Avaliação da existência da interação $Zn^{2+}$ e Galectina-1 através de Fluorescência a 325nm.....	19
3.4 Avaliação do impacto da adição de íons na estrutura secundária da Gal-1, por difração circular.....	20
3.5 Determinação da Capacidade do $ZnCl_2$ de causar a Precipitação da Galectina-1.....	20
3.6 Avaliação do efeito do Zinco na atividade Hemaglutinante das formas Monomérica e Dimerica da Galectina-1.....	21
3.7 Avaliação da ação do Zinco sobre a capacidade da Gal-1 de reconhecer laminina, por ELISA.....	22

3.8 Utilização do método GRID para seleção de possíveis sítios de interação entre Zinco e Galectina-1.....	23
3.9 Avaliação <i>in silico</i> da interação Zinco/Galectina-1 pelo uso de Simulações de Dinâmica Molecular.....	24
3.9.1 Grandezas calculadas.....	26
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>28</b>
4.1 Obtenção de preparações purificadas de galectina-1 recombinante humana dimérica.....	29
4.2 Determinação do nível de preservação do caráter lectínico de gal-1 purificada e sem conservantes.....	31
4.3 Avaliação do impacto da adição de íons no espectro, obtido por Fluorimetria, da Galectina-1.....	32
4.4 Avaliação do impacto do Zinco na estrutura secundária da Galectina-1, por dicroísmo circular.....	37
4.5 Avaliação do impacto da adição de Íons na Precipitação da Galectina-1.....	39
4.6 Avaliação da Atividade Lectínica da Galectina-1 (Monomérica e Dimerica), por Hemaglutinação.....	41
4.7 Avaliação da ação do ZnCl <sub>2</sub> sobre a capacidade da Gal-1 de reconhecer laminina, por ELISA.....	44
4.8 Utilização do método GRID para o “Screening” de possíveis sítios de interação entre Zn e Galectina-1.....	45
4.9 Simulação de Dinâmica Molecular.....	46
4.10 Sumário da Discussão e questões em aberto.....	110
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>113</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>115</b>

## INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Galectinas

#### 1.1.1 Galectinas: Considerações Gerais

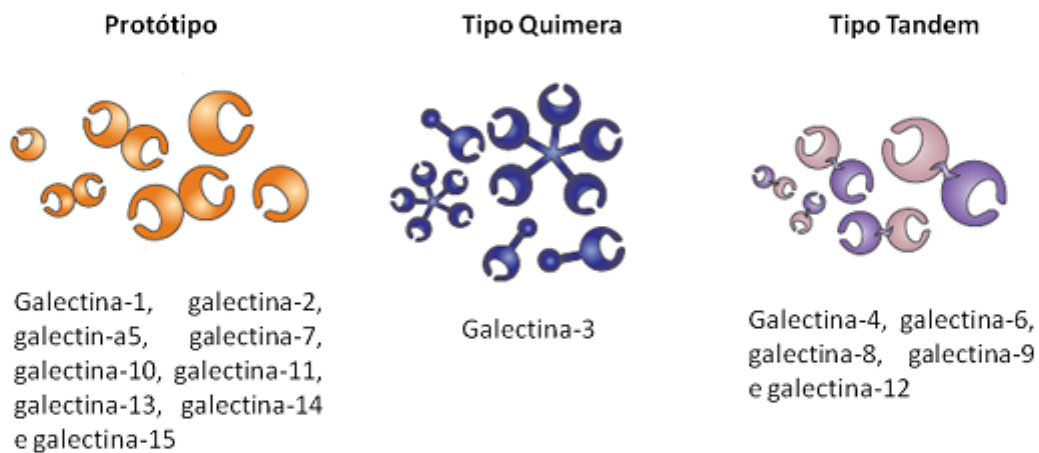
Carboidratos conjugados a proteínas e lipídeos formam glicoconjugados que podem codificar diversas informações biológicas (SHARON & LIS, 2004, VARKI *et al.*, 2009). Os glicoconjugados estão expressos na superfície de todas as células de mamíferos, matriz extracelular e moléculas solúveis. A decodificação das informações contidas nos glicoconjugados pode ser efetuada por uma grande variedade de proteínas que reconhecem especificamente carboidratos, conhecidas como Lectinas, incluindo as galectinas (SHARON, 2007; VARKI *et al.*, 2009). Dados da literatura indicam que a glicosilação diferencial de proteínas da superfície celular e o reconhecimento dessas glicanas podem controlar importantes processos imunológicos, incluindo ativação de células T, migração e apoptose progressão tumoral (LOWE, 2001; BANH *et al.*, 2011).

As galectinas são proteínas que reconhecem  $\beta$ -galactosídeos que contêm preferencialmente seqüências de N-acetilactosaminas sendo que os resíduos terminais  $\beta$ Gal e o tamanho da cadeia de polilactosamina são requerimentos críticos para a capacidade de reconhecimento de carboidratos dessas lectinas (GABIUS, 2002; STOWELL *et al.*, 2004). Essas proteínas contêm domínios de reconhecimento de carboidrato (*carbohydrate-recognition domains*, **CRDs**) de aproximadamente 130 aminoácidos (BARONDES *et al.*, 1994). Até agora, 15 galectinas provenientes de mamíferos foram identificadas (LIU & RABINOVICH, 2005).

Os membros da família das galectinas possuem seqüências conservadas em seus CRDs e podem ser encontradas em tecidos de vários animais, desde de invertebrados inferiores, como esponjas, até humanos (BARONDES *et al.*, 1994). A origem desta família data do período pré-cambriano (HIRABAYASHY & KASAI, 1993).

Com base na estrutura química, as galectinas foram classificadas por HIRABAYASHY e KASAI em 1993 como:

- galectinas tipo modelo ou protótipo (galectinas-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15), que se apresentam como monômeros ou homodímeros não-covalentes, sendo que cada monômero contém um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD);
- galectina tipo químera (galectina-3), composta por um domínio não-lectínico ligado ao CRD;
- galectinas tipo "Tandem" (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) consistindo de dois diferentes CDRs ligados a uma única cadeia polipeptídica (HIRABAYASHY & KASAI, 1993; BARONDES *et al.*, 1994, RABINOVICH & TOSCANO, 2009). Como visto na figura 1.



**Figura 1:** Classificação das Galectinas em relação ao "CRD". Representação esquemática da divisão dos tipos de galectinas. (modificado de RABINOVICH & TOSCANO, 2009)

Diferentes galectinas tem especificidade para carboidratos distintos, como elas diferem em sua habilidade de acomodar certas glicanas ligadas a galactose, podem formar conjuntos ordenados de complexos quando se ligam a gliconjugados multivalentes (RABINOVICH & TOSCANO, 2009). As galectinas podem se ligar tanto bivalentemente quanto multivalentemente e mediar a formação de ligações cruzadas entre gliconjugados da superfície celular, podendo desencadear uma cascata de eventos intracelulares (LIU & RABINOVICH, 2005, DAM & BREWER, 2010). Através deste mecanismo, galectinas podem modular uma grande variedade de processos imunológicos,



incluindo apoptose de células T (PERILLO *et al.*, 1995, TOSCANO *et al.*, 2007) , fagocitose e homeostase leucocitária (DIAS-BARUFFI *et al.* 2003; STOWELL *et al.*, 2007) adesão celular e secreção de citocinas (RABINOVICH *et al.*, 2002, STOWELL *et al.*, 2008).

### 1.1.2 A Galectina-1

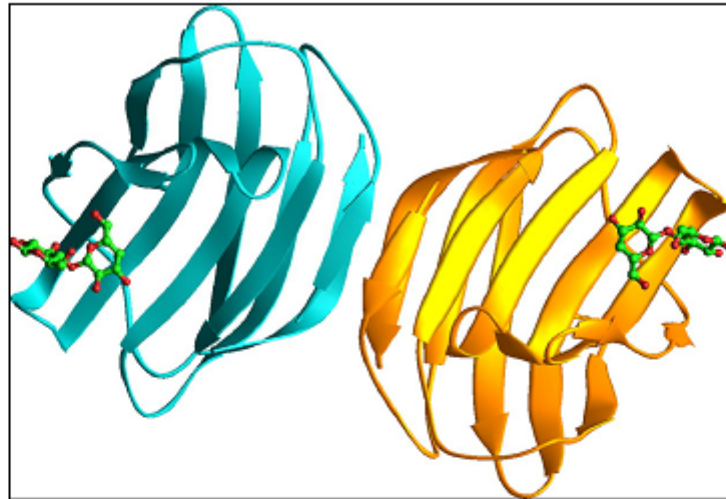
A Gal-1 está presente tanto no meio extracelular como no meio intracelular, é expressa diferentemente por diversos tecidos, tanto normais como patológicos, e participa de vários processos biológicos (CAMBY *et al.*, 2006). Dentre estes processos pode-se citar o controle da adesão celular, a sinalização celular, a proliferação e ciclo celular, apoptose, regeneração tecidual, doenças degenerativas, gênese de tumores, fagocitose, processos alérgicos, interações patógeno–hospedeiro, homeostase de célula T, diferenciação hematopoiética, embriogênese e ciclo menstrual (PERILLO *et al.*, 1995; RABINOVITCH *et al.*, 1997; RABINOVITCH *et al.*, 1999; DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2005; CAMBY *et al.*, 2006; STOWELL *et al.*, 2007; CERRI *et al.*, 2008; STOWELL *et al.*, 2010).

A Gal-1 é considerada uma molécula importante na modulação da resposta imunológica inata e adaptativa. As ações imunomodulatórias da Gal-1 podem envolver a indução de apoptose de leucócitos (PERILLO *et al.* 1995) ou não (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007; STOWELL *et al.*, 2008). Curiosamente, a Gal-1 pode modular a resposta imune por induzir a fagocitose de leucócitos sem provocar a apoptose dessas células (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; STOWELL *et al.*, 2007; STOWELL *et al.*, 2008). De modo interessante, células associadas a linfomas de Hodgkin, podem promover o escape da resposta imunológica antitumoral desses linfomas, por expressar grandes quantidades de Gal-1 (JUSZCZYNSKI *et al.*, 2007). Os pesquisadores têm sugerido que a Gal-1 é um novo alvo molecular promissor para o desenvolvimento de tratamentos terapêuticos novos e originais para patologias de origem imunológica e tumoral (CAMBY *et al.*, 2006, SALATINO *et al.*, 2008, LIU *et al.*, 2011). Além disso, a Gal-1 parece estar envolvida na homeostase do tecido muscular em doenças degenerativas, como a Distrofia Muscular de

Duchenne ou em processos inflamatórios (RABINOVICH *et al.*, 2000; CERRI *et al.*, 2008, DIAS-BARUFFI *et al.*, 2010).

### 1.1.3 Galectina-1: Informações Estruturais

O gene da galectina-1 é denominado *LGALS-1* e está localizado na região q12-q13.1 do cromossomo 22 humano (BALDINI *et al.*, 1993). A Gal-1 é uma proteína ácida, com N-terminal acetilado, possui cisteínas livres e não apresenta peptídeo sinal (CAMBY *et al.*, 2006; COOPER & BARONDES, 1999). Esta lectina reconhece  $\beta$ -galactosídeos e é expressa como um monômero, que se associa de modo não-covalente e forma um homodímero (Kd  $\sim$  7 $\mu$ M) de peso molecular de aproximadamente 29 kDa (CHO & CUMMINGS, 1995; COOPER & BARONDES, 1999). Apresenta uma topologia molecular do tipo "jelly-roll" composto por duas folhas- $\beta$  anti-paralelas, **figura 2** (LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004). A forma monomérica e dimérica podem, ou não, apresentar as mesmas propriedades biológicas (CAMBY *et al.*, 2006). A integridade deste dímero é mantida principalmente por interações entre os monômeros na interface destes e através de uma altamente conservada região hidrofóbica, um fator que explica a estabilidade observada do dímero, em termos moleculares (LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004). No entanto, uma das principais características do homodímero de Galectina-1 é que este se dissocia espontaneamente em baixas concentrações, assumindo uma forma monomérica que ainda é capaz de se ligar a carboidratos (CHO & CUMMINGS, 1995), porém com uma afinidade menor (LEPPANEN *et al.*, 2005). Entretanto, a manifestação de algumas propriedades biológicas da galectina-1 ocorrem apenas na forma dimérica dessa lectina (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003).



**Figura 2** - Representação estrutural do homodímero de Galectina-1 Humana com a lactose (adaptado de VARKI *et al*, 2009).

A oxidação dos grupos tiol das cisteínas presentes na galectina-1, pode provocar impactos biológicos importantes nesta molécula, como a perda de sua capacidade lectínica (VARKI *et al*, 2009) e promover o reparo de lesão neuronal (KADOYA *et al*, 1995; KURIHARA *et al*, 2010).

A estrutura cristalográfica da galectina-1, a mostra como um dímero simétrico (LOPEZ-LUCENDO *et al*, 2004). E experimentos de equilíbrio e velocidade de sedimentação mostram que, até  $21\mu\text{M}$ , a galectina-1 se apresenta dimerica em solução (MORRIS *et al*, 2004). Porém, em temperatura de denaturação as formas tetramérica e octamérica – um dímero de dímeros e um tetrâmero de dímeros - foram encontradas (SUROLIA *et al*, 1997; SCHWARZ *et al*, 1998). Recentemente, a construção de uma Galectina-1 “tandem repeat” – por meio de ligação covalente entre seus monômeros, via pepetídio ligador – resultou na formação de múltimeros desta proteína, este aumento em sua valência favoreceu suas atividades biológicas (EARL & BAUM, 2011).

Na literatura há ao menos um relato de um membro da família das Galectinas, a Galectina-CGL2 do fungo *Coprinopsis cineria*, uma galectina protótipo relacionada a galectina-2 humana, que possui estrutura tetramérica – formada como um dímero de dímeros – (código PDB: 1UL9), essencial para a sua função (WALSER *et al*, 2004).

## 1.2 O Íon Zinco

### 1.2.1 Metais: Importância biológica

Os metais assumem importantes papéis em sistemas biológicos. Além de suas propriedades como íons independentes e carreadores de cargas, podem agir como componentes estruturais – mantendo estruturas complexas unidas de forma geometricamente específicas – e compondo centros de catálise. Os metais têm uma participação importante em muitas reações químicas essenciais para a vida. É reconhecida a importância do ferro como carreador de oxigênio na hemoglobina e a importância do cobalto na vitamina B12, no entanto estes são apenas dois notáveis exemplos de uma gama muito maior. (BRAUMAN, 1993).

Uma notável característica dos íons metálicos complexados a proteína é que, um mesmo íon, pode afetar uma grande variedade de funções protéicas, dos quais alterações no potencial redox, na especificidade pelo substrato e na velocidade das reações em enzimas, são alguns exemplos. Este refinamento nas funções protéicas pode se dar tanto diretamente – pela coordenação de diferentes cadeias laterais dos aminoácidos de caráter ácido presentes na proteína – ou indiretamente – pela modulação da hidrofobicidade, ligações de hidrogênio ou da constante dielétrica local nas adjacências do sítio de ligação. Nesse sentido, alguns dos núcleos metálicos em proteína podem ser interpretados como “chips” bioinorgânicos, cujas funções podem ser moduladas pelas necessidades do sistema (BRAUMAN, 1993).

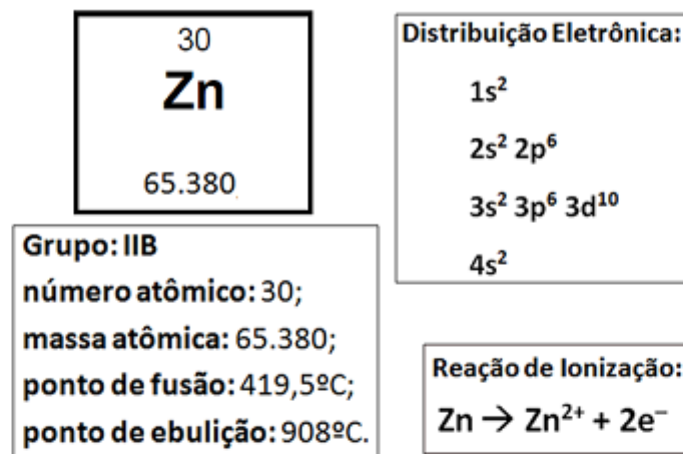
Cátions metálicos bivalentes tem alta afinidade a ligantes protéicos aniônicos, como as cadeias laterais deprotonadas do Ácido Aspártico e do Ácido Glutâmico, através das fortes interações carga-carga e conseqüente ganho de energia livre do sistema pela ligação do metal em uma meio com baixa constante dielétrica e inacessível ao solvente (FRAUSTO DA SILVA & WILLIAMS, 2001). Outros ligantes protéicos, porém neutros, como Asparagina, Glutamina, Histidina, Serina, Treonina e o oxigênio carbonílico do “backbone” protéico, podem auxiliar na estabilidade do complexo metálico, no entanto o ganho em energia livre é menor que da ligação as cadeias laterais do Aspartato e Glutamato (FRAUSTO DA SILVA & WILLIAMS, 2001). Estes ligantes

executam um importante papel na montagem e na modulação fina da geometria do sítio de ligação, para que a proteína possa seqüestrar seletivamente um metal particular dos fluídos celulares (DUDEV & LIM, 2003).

O número de coordenação de um dado complexo metálico é ditado por três fatores: a constante dielétrica do meio ou a acessibilidade ao solvente, as propriedades do metal (principalmente sua habilidade de aceitar cargas de seus ligantes) e as características químicas dos ligantes. Particularmente, a razão pelo qual o zinco hidratado pode mudar seu número de coordenação de seis para quatro, quando ligado a aminoácidos numa cavidade protéica, enquanto o magnésio não o faz, está relacionado a presença de orbitais livres que podem aceitar a carga de seus ligantes. A especificidade dos sítios de ligação a metais, se mostra inversamente correlacionada com a abundância natural do metal em questão nas células. Sendo assim, sítios que ligam magnésio não são muitos específicos para este metal, uma vez que este é o cátion bivalente mais abundante nos fluídos corporais, sendo parcamente protegidos contra outros cofatores metálicos, particularmente, o zinco. No entanto, sítios de ligação que evoluíram utilizando metais que são encontrados em baixas concentrações no organismo, são mais específicos, permitindo assim que a proteína ligue seletivamente um tipo de íon metálico mesmo encontrando-se em concentrações muito maiores de que outros metais. Para as interações específicas proteína-metal, o número de coordenação que ele é capaz de adotar, as interações com a cadeia lateral, assim como a carga e o formato da cavidade protéica, governam a especificidade do sítio de ligação. (DUDEV & LIM, 2003).

### **1.2.2 Zinco: Aspectos Químicos e Biológicos**

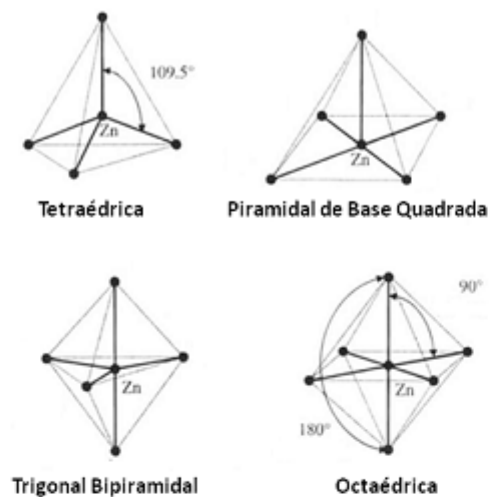
O zinco faz parte do grupo IIB da tabela periódica; seu número atômico é 30; sua massa atômica, 65.380; seu ponto de fusão, 419,5°C e seu ponto de ebulição, 908°C, Figura 3. Trata-se de um metal sólido, branco-azulado e em sua forma metálica, praticamente insolúvel em álcool e água, mas solúvel em ácidos diluídos (CANTERO, 1989).



**Figura 3:** Características Químicas do Zinco (Adaptado de DUDEV & LIM, 2003)

O zinco tem um papel essencial em sistemas biológicos, sendo que as proteínas que ligam este metal tem uma grande variedade de funções. Aproximadamente 10% do proteoma humano é potencialmente capaz de complexar zinco *in vivo*, sendo as proteínas “zinc-fingers” a classe mais abundante de metaloproteínas (ANDREINI *et al.*, 2005).

O íon  $Zn^{2+}$  exibe propriedades adequadas tanto para funções catalíticas, quanto estruturais em proteínas. Entre estas propriedades temos a grande estabilidade frente a reações de oxido-redução; uma configuração eletrônica “d10” que permite que a geometria de coordenação, que varia de quatro a seis (Fig 4), não dependa de estabilização do campo ligante; uma polarizabilidade intermediária que permite a coordenação com átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio e um caráter de ácido de Lewis (WILLIAMS, 1987; PARKIN, 2004; LIPSCOMB & STRATER, 1996).



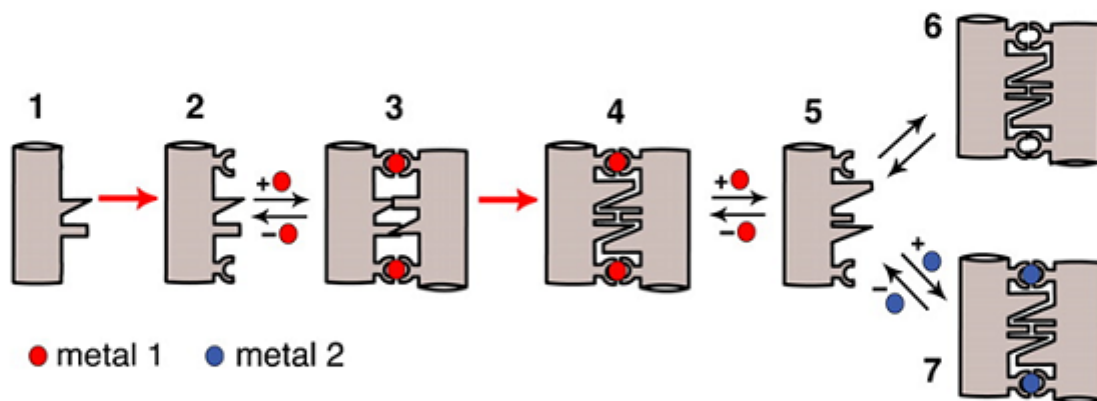
**Figura 4:** As diferentes geometrias de coordenação do Zinco. (Adaptado de Alberts et al, 1998)

### 1.2.3 Evolução da vida e o Zinco

É interessante notar que a disponibilidade de zinco no ambiente aumentou em paralelo com o aumento da disponibilidade de oxigênio, aumento esse que ocorreu em duas etapas. Sendo que essas etapas ocorreram muito próximas a duas etapas de evolução dos organismos, de 2.5 a 2.0 e de 1.0 a 0.5 bilhão de anos atrás. O segundo período foi o de maior aumento para o Zinco e coincidiu com o aparecimento dos organismos multicelulares. Uma maior complexidade dos organismos cria uma necessidade de melhorias nos sistemas de sinalização intra e intercelulares e deve-se notar que proteínas “zinc-finger” são fatores de transcrição muito importantes para a síntese de hormônios. (DECARIA *et al.*, 2010). De modo interessante, o surgimento de membros da família das galectinas com capacidade de formar dímeros, ocorreu a cerca de 0.5 bilhão de anos (HOUZENLSTEIN *et al.*, 2004).

A concentração de metal nas células de organismos complexos é fortemente regulada e a disponibilidade de íons de metais de transição é baixa (FINNEY & O’HALLORAN, 2003). No entanto, no início da evolução de proteínas enoveladas este mecanismo não existia (SALGADO *et al.*, 2010). Sendo que as interações entre proteínas e metais estavam sob controle termodinâmico e governadas pelas concentrações ambientais de íons solúveis de metais de transição (FRAUSTO DA SILVA & WILLIAMS, 2001). Nestas

condições seria impossível para qualquer cadeia polipeptídica evitar se associar com íons metálicos, um dos possíveis resultados dessa associação metal/polipeptídeo seria a precipitação. No entanto algumas dessas associações, culminaram em estruturas solúveis formadas ao redor de um núcleo de coordenação do metal, Figura 5. Se esta estrutura então formada gerasse algum benefício ao organismo, poderia passar pela seleção natural e evoluir para uma estrutura mais estável e/ou para aperfeiçoamento em suas funções. Sendo assim é factível que superfícies protéicas não auto-associantes, se agreguem em arquiteturas complexas através de poucas mutações, que permitam a coordenação com metais. Uma vez que o custo entrópico da associação tenha sido superado, a interface não covalente resultante pode ser otimizada através de mutações adicionais tornando a estrutura dimérico mais estável, que poderá se formar até na ausência do metal de coordenação (SALGADO *et al*, 2010).



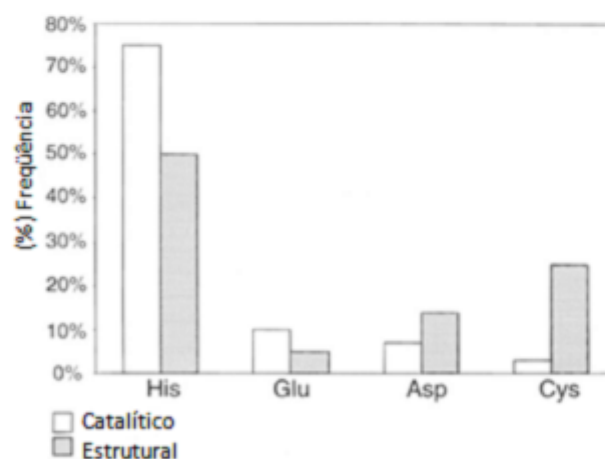
**Figura 5: Influência dos metais no surgimento de proteínas dimericas.** Representação gráfica de uma dada proteína monomérica. As setas vermelhas representam passos evolucionários hipotéticos. As esferas vermelhas e azuis representam metais de transição com diferentes preferências em suas geometrias de coordenação. 1 – Proteína não contendo superfície capaz de se auto-associar; 2 – A estrutura do passo 1 sofre mutação que a dota de regiões capazes de coordenar metal 1; 3 – Modelo inicial “Complexo proteico/Metal 1” contendo interface proteica não-complementar. 4 – “Complexo proteico/Metal 1” otimizado com interface proteica complementar. 5 – Proteína contendo superfície capaz de se auto-associar; 6 – Complexo proteico metal-independente, porém capaz de se ligar ao metal-1. 7 – Complexo proteico com geometria de coordenação alterada para interação com o metal 2. (Adaptado de Salgado et al, 2010).



### 1.2.4 Sítios Protéicos de Ligação a Zinco

Os sítios de ligação a zinco nas proteínas podem ser divididos em catalíticos, estruturais, co-catalíticos e sítios na interface protéica (AULD, 2001). Os sítios catalíticos possuem uma molécula de água coordenada com o zinco que é capaz de ser rapidamente trocada, como nas hidrolases (TURNER, 2003). Os sítios estruturais, contém apenas resíduos protéicos na esfera de coordenação, tendo como efeito a criação ou manutenção de uma estrutura secundária, ou terciária, adequada – como ocorre com as proteínas “zinc-fingers” (LAITY *et al.*, 2001). Nos sítios co-catalíticos o íon  $Zn^{2+}$  é ligado a um segundo metal, normalmente por um único aminoácido e uma molécula de água, podendo o segundo metal ser o próprio zinco, como na  $\beta$ -Lactamase, ou outro metal, como o cobre na Cu,Zn-superoxido dismutase (AULD, 2001). Finalmente, um quarto tipo de sítio é também reconhecido, o sítio de zinco na interface protéica, que influencia a estrutura quaternária de proteínas, os resíduos de coordenação para este tipo de sítio são supridos por duas proteínas, com ocorre na óxido nítrico sintetase e nos superantígenos (AULD, 2001).

Os aminoácidos que mais comumente encontrados se ligando ao zinco nos sítios de interação são: Histidina, Ácido Glutâmico, Ácido Aspártico e Cisteína, **figura 6** (AULD, 2001).



**Figura 6:** Frequência (%) de resíduos protéicos que se ligam ao zinco participando de atividades catalíticas ou na manutenção da estrutura (adaptado de ALBERTS *et al.*, 1998)

### 1.2.5 - Zinco no organismo

O corpo humano contém entre 1,5 e 2,5 g de zinco, sendo que um adulto com peso de 70 kg possui cerca de 2 a 3 g do íon, que é primariamente intracelular: 80% concentram-se no citosol e o restante, no núcleo. As maiores concentrações corporais estão na musculatura esquelética (57%), ossos (29%), pele (5%), cérebro (1,5%), rins (0,7%), coração (0,4%), cabelo (0,1%) e plasma sanguíneo (0,1%). Sendo que a maioria dos tecidos contém entre 100µg a 200µg/g de peso em zinco (KING, 2000). A concentração de zinco plasmático normalmente varia de 12 a 20 µmol/L (TASMAN-JONES, 1992). Sendo considerado o segundo elemento-traço mais prevalente no organismo (WEISS *et al.*, 2001).

O zinco é carregado, em sua maioria, por proteínas nos tecidos. No plasma, seu principal carreador é a albumina, seguido pela  $\alpha$ -2-Macroglobulina, e apenas 2% apresentam-se na forma livre no organismo. (FOOTE & DELVES, 1984; WAHID *et al.*, 1988).

### 1.2.6 Zinco: aspectos imunológicos e celulares.

O Zinco é um elemento importante na prevenção da formação de radicais livres, na proteção de estruturas biológicas contra danos e na correção de funções imunes. Mais especificamente, o zinco é um elemento essencial para as funções do timo, por meio de um hormônio tímico dependente de zinco, a timulina, requerida para a maturação e diferenciação de células T (GOLDSTEIN, 1984; MOCCHIGIANI *et al.*, 2000). Curiosamente, a galectina-1 pode participar da maturação de células T (PERILLO *et al.*, 2005).

A deficiência de zinco diminui a resposta quimiotática de neutrófilos e, *in vitro*, a presença de zinco mostrou-se quimiotática para tais células (HUJANEN *et al.*, 1995). Além disso, as funções principais das células do sistema imune inato ficam prejudicadas quando há uma deficiência de zinco: Atividade de células NK (Natural Killer), fagocitose de macrófagos e neutrófilos e formação do *burst* oxidativo (KEEN & GERSHWIN 1990, ALLEN *et al.*, 1983). Um certo número de efeitos, *in vitro*, relacionados a monócitos está ligado ao zinco,  $Zn^{+2}$

induz ativação e produção de citocinas em monócitos isolados e em linhagens celulares de monócitos (HEROLD *et al*, 1993; DRIESSEN *et al*, 1994; WELLINGHAUSEN *et al*, 1997).

### 1.3. Galectina-1 e Interações com Íons

O monômero Galectina-1 humana possui 6 cisteínas, 7 ácidos glutâmicos, 9 ácidos aspárticos e 4 histinas. O grupo tiol, presente na cisteína, pode se ligar fortemente a íons metálicos como  $\text{Fe}^{+2/+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+}$  (KAIM *et al*, 1991). O enxofre pode acomodar um grande número de ligações (através de mudanças no estado de oxidação) em diversos ângulos, resultando em estruturas diversas mesmo se tratando de um mesmo metal (STROP *et al*, 2001).

Há na literatura dados que mostram a interação de cisteínas da Galectina-1 humana com o íon Arsenito ( $\text{AsIII}$ ), esta ligação protege parcialmente a oxidação da proteína, com um pequena perda de seu caráter lectínico (LIN *et al*, 2006). Esta interação também se mostra como um possível mecanismo da regulação da concentração de  $\text{As(III)}$  intracelular (LIN *et al*, 2006; CHANG *et al*, 2011).

Considerando que a Galectina-1 é uma molécula multi-funcional e que seu uso terapêutico tem sido preconizado em várias patologias (CAMBY *et al*, 2006; LIU *et al*, 2011). Se faz importante a avaliação do espectro de interações e efeitos que esta lectina pode ter em diversos tecidos e/ou eventos. Tendo isto em vista, este projeto teve como objetivo ampliar o conhecimento dos mecanismos pelo qual a galectina-1 atua.

## CONCLUSÕES

---

## 5. CONCLUSÕES

A Galectina-1 é capaz de complexar com o íon  $Zn^{2+}$ , tal complexação é independente de seu "CRD" e provavelmente envolve os aminoácidos Glu-15, Asp -92 e Asp-134; assumindo um número de coordenação 5 e estrutura trigonal bipiramidal e é passível de ocorrer *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

---

## 6. REFÊRENCIAS

ALBERTS, I.L.; KADASSY, K. WODAK, S.J. Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. **Protein science : a publication of the Protein Society**. Woodbury, v. 7, p. 1700-16, Aug. 1998.

ALLEN, J.I. PERRIM R.T.MCCLAIN C.J. KAY, N.E. Alterations in human natural killer cell activity and monocyte cytotoxicity induced by zinc deficiency. **The Journal of laboratory and clinical medicine**. New York, v. 102(4), p. 577- 589, Oct. 1983.

ANDREINI, C.; BANCI, L.; BERTINI, I.; ROSATO, A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. **Journal of proteome research**. Washington, v. 5, p. 196–201, Jan. 2005.

AULD, D.S., Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**. Oxford, v. 14, p. 271-313, Sep.-Dec. 2001.

AVERY, R.A., BETTGER, W.J. Zinc deficiency alters the protein composition of the membrane skeleton but not the extractability or oligomeric form of spectrin in rat erythrocyte membranes. **The Journal of nutrition**. Philadelphia, v. 122, p. 428–434. Mar. 1992.

BALDINI, A.; GRESS, T.; PATEL, K.; MURESU, R.; CHIARIOTTI, L.; WILLIAMSON, P.; BOYD, Y.; CASCIANO, I.; WELLS, V.; BRUNI, C.B. Mapping on human and mouse chromosomes of the gene for the beta-galactoside-binding protein, an autocrine-negative growth factor. **Genomics**. San Diego, v. 15(1), p. 216-8. Jan. 1993.

BANH, A.; ZHANG, J.; CAO, H.; BOULEY, D.M.; KWOK, S.; KONG, C.; GIACCIA, A.J.; KOONG, A.C.; LE, Q.T. Tumor galectin-1 mediates lung cancer growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis. **Cancer research**. Chicago, May 2011.

BARONDES, S.H.; CASTRONOVO, V.; COOPER, D.N.; CUMMINGS, R.D; DRICKAMER, T.; FELZI, T.; GITT, M.A.; HIRABAYASHI, J.; HUGHES, C.; KASAI, K., LEFFLER, H.; LIU, F.; LOTAN, R.; MERCURIO, A.M.; MONSIGNY, M.; PILLAI, S.; POIRER, F.; RAZ, A.; RIGBY, P.W.J.; RINI, J.M.; WANG, J.L. Galectins: A family of animal betagalatósíde-binding lectins. *Cell*. Cambridge, v. 76, p. 597-98. Feb. 1994.

BLANUSA M, VARNAI VM, PIASEK M, KOSTIAL K. Chelators as antidotes of metal toxicity: therapeutic and experimental aspects. *Current medicinal chemistry*. Schiphol, v. 12(23), p. 2771-94. 2005.

BLOIS, S.M., ILARREGUI, J.M., TOMETTEN, M., GARCIA, M., ORSAL, A.S., CORDO-RUSSO, .R, TOSCANO, M.A., BIANCO, G.A., KOBELT, P., HANDJISKI, B., TIRADO, I., MARKERT, U.R., KLAPP B.F., POIRIER, F., SZEKERES-BARTHO, J., RABINOVICH, G.A., ARCK, P.C. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Natural Medicine*. New York, v.13(12), p. 1450-7. Dec. 2007.

BRAUMAN, J.I. Bioinorganic chemistry. *Science*. Washington, v. 6;261(5122), p. 663. Aug. 1993.

CAMBY, I. LE MERCIER, M. LEFRANC, F. KISS, R. Galectin-1: A Small Protein with Major Functions. *Glycobiology*. Oxford, v. 16 (11), p.137-157. Nov. 2006.

CANTERO; B.B. Estudio sobre el mecanismo de acción del zincum metalico. *La Homeopatía de México*. México, v. 525, p. 2-14. May. 1989.

CERRI, D.G.; RODRIGUES, L.C.; STOWELL, S.R.; ARAUJO, D.D.; COELHO, M.C.; OLIVEIRA, S.R.; BIZARIO, J.C.; CUMMINGS, R.D.; DIAS-BARUFFI, M.; COSTA, M.C. Degeneration of dystrophic or injured skeletal muscles induces high expression of Galectin-1. *Glycobiology*. Oxford,v.18(11), p. 842-50. Nov. 2008.



CHANG, Y.Y.; CHIANG, M.C.; KUO, T.C.; CHI, L.L.; KAO, Y.H.; HUANG, R.N. The down-regulation of galectin-1 expression is a specific biomarker of arsenic toxicity. **Toxicol Lett.** Amsterdam, May 2011.

CHO, M.; CUMMINGS, R.D. Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. II. Localization and biosynthesis. *The Journal of biological chemistry.* Baltimore, v. 10;270(10), p. 5207-12. Mar. 1995.

COOPER, D.N.; BARONDES, S.H. God must love galectins; he made so many of them. **Glycobiology.** Oxford, v. 9(10), p. 979-84. Oct. 1999.

DAM, T.K.; BREWER, C.F. Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. **Glycobiology.** Oxford. v. 20(3), p. 270-9. Mar. 2010.

D'AURIA, S.; PETROVA, L.; JOHN, C.; RUSSEV, G.; VARRIALE, A.; BOGOEVA, V. Tumor-specific protein human galectin-1 interacts with anticancer agents. **Molecular bioSystems.** Cambridge, v. 5(11), p. 1331-6. Nov. 2009.

DECARIA, L.; BERTINI, I.; WILLIAMS, R.J. Zinc proteomes, phylogenetics and evolution. **Metalomics : integrated biometal science.** Cambridge, v. 1;2(10), p. 706-9. Oct. 2010.

DIAS-BARUFFI, M., ZHU, H., CHO, M., KARMAKAR, S., MCEVER, R. P., CUMMINGS, R.D. Dimeric galectin-1 induces surface exposure of phosphatidylserine and phagocytic recognition of leukocytes without inducing apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry,** Baltimore, v. 278(42), p. 41282-41293, Oct. 2003.

DIAS-BARUFFI, M.; STOWELL, S.R.; SONG, S.C.; ARTHUR, C.M.; CHO, M.; RODRIGUES, L.C.; MONTES, M.A.; ROSSI, M.A.; JAMES, J.A.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Differential expression of immunomodulatory galectin-1 in peripheral leukocytes and adult

tissues and its cytosolic organization in striated muscle. **Glycobiology**. Oxford, v. 20(5), p. 507-20. May 2010.

DRIESSEN, C.; HIRV, K.; RINK, L.; KIRCHNER, H. Induction of cytokines by zinc ions in human peripheral blood mononuclear cells and separated monocytes. **Lymphokine and cytokine research**. New York, v. 13(1), p.15-20. Feb. 1994.

DUDEV, T.; LIM, C. Principles governing Mg, Ca, and Zn binding and selectivity in proteins. **Chemical reviews**. Washington, v. 103(3), p. 773-88. Mar. 2003.

FEYMMAN, R.P.; LEIGHTON, R.B.; SANDS, M. **The Feynman Lectures on Physics**. v.1, p.3-6. Addison-Wesley. 1963.

FINNEY, L.A.; O'HALLORAN, T.V. Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. **Science**. Washington, v. 300, p. 931-936. May 2003.

FOOTE, J.W.; DELVES, H.T. Albumin bound and alpha 2-macroglobulin bound zinc concentrations in the sera of healthy adults. **Journal of Clinical Pathology**. London. v. 37(9), p. 1050-4. Sep. 1984.

FRAUSTO DA SILVA; J.J.R.; WILLIAMS, R.J.P. **The Biological Chemistry of the Elements**. Oxford Univ Press, Oxford. 2001.

GABIUS, H.J. Animal Lectins: structure, function and molecular evolution. **Biochimica Biophysica Acta**. Amsterdam 1572:163-434. 2002.

GAO, J.; TRHULAR, D.G. Quantum Mechanical Methods for Enzyme Kinetics. **Annual review of physical chemistry**. Palo Alto, v. 53, p. 467-505. Oct. 2002.

GOLDSTEIN, A.L. Thymic hormones and lymphokines. **Plenum Press**, New York. 1984.

- GOODFORD, P.J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **Journal of medicinal chemistry**. Washington, v. 28(7), p. 849-57. Jul. 1985.
- GU, M.; WANG, W.; SONG, W.K.; COOPER, D.N.; KAUFMAN, S.J. Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. **Journal of cell science**. Cambridge, v. 107 (Pt 1), p. 175-81. Jan. 1994.
- HAMBIDGE M. Human zinc deficiency. **The Journal of Nutrition**. Philadelphia, v.130, p. 1344S–9S. May 2000.
- HEROLD, A.; BUCURENCI, N.; MAZILU, E.; SZEGLI, G.; SIDENCO, L.; BAICAN, I. Zinc aspartate in vivo and in vitro modulation of reactive oxygen species production by human neutrophils and monocytes. **Roumanian archives of microbiology and immunology**. Bucuresti, v. 52(2), p. 101-8. Apr. – Jun. 1993.
- HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution function and molecular evolution. **Glycobiology**. Oxford, v. 3(4). p. 297-304, Aug. 1993.
- HOUZELSTEIN D, GONÇALVES IR, FADDEN AJ, SIDHU SS, COOPER DN, DRICKAMER K,LEFFLER H, POIRIER F. Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. **Molecular biology and evolution**. Chicago, v.21(7), p.1177-87. Jul. 2004.
- HUJANEN E.S.; SEPPÄ, S.T.; VIRTANEN, K. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro. **Biochimica et biophysica acta**. Amsterdam, v. 1245(2), p. 145-52. Oct. 1995.
- IBS, K.H.; RINK, L. Zinc-Altered Immune Function. **The Journal of Nutrition**. Philadelphia v. 133, p.1452S-1456-S, May 2003.

JUSZCZYNSKI, P.; OUYANG, J.; MONTI, S.; RODIG, S.J.; TAKEYAMA, K.; ABRAMSON, J.; CHEN, W.; KUTOK, J.L.; RABINOVICH, G.A.; SHIPP, M.A. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 7;104(32), p. 13134-9. Aug. 2007.

KADOYA, T.; OYANAGI, K.; KAWAKAMI, E.; HASEGAWA, M.; INAGAKI, Y.; SOHMA, Y.; HORIE, H. Oxidized galectin-1 advances the functional recovery after peripheral nerve injury. **Neuroscience Letters**. Limeric. 380(3):284-8. 2005

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. The bioinorganic chemistry of the quintessentially toxic metals. In: G.N.A. Meyer, Editor, **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**, John Wiley and Sons, Chichester, 330–350 . 1991.

KARPUS, M.; PETSKO, G.A. Molecular Dynamics Simulations on **Biology**. **Nature**. London, v. 347(6294), p. 631-9, Oct. 1990.

KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Zinc deficiency and immune function. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 10, p. 415–431, 1990.

KING, J.C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, p. 1334-43, May 2000.

KURIHARA, D.; UENO, M.; TANAKA, T.; YAMASHITA, T. Expression of galectin-1 in immune cells and glial cells after spinal cord injury. **Neuroscience Research**, Limerick, v. 66(3), p. 265-70, Mar. 2010.

LAITY, J.; LEE, B.M., WRIGTH, P. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity, **Current Opinion on Structural Biology**, London, v. 11, p. 39–46. Feb. 2001.

LELLA, S.D.; MARTI, M.A.; CROCI, D.O.; GUARDIA, C.M.A.; DÍAZ-RICCI, J.C.; RABINOVICH, G.A.; CAMELO, J.J.; ESTRIN, D.A. Linking the Structure and Thermal Stability of  $\beta$ -Galactoside-Binding Protein Galectin-1 to Ligand Binding and Dimerization Equilibria. **Biochemistry**, Washington, v. 49, p. 7652-7658, Sep. 2010.

LEPPANEN, A.; STOWELL, S.; BLIXT, O.; CUMMINGS, R.D. Dimeric galectin-1 binds high affinity to alpha 2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, p. 5549-5562, Feb. 2005.

LIN, C.; HUANG C.; CHEN, W.; CHANG, Y.; DING, W.; LIN, M.; WU, S.; HUANG, R. Characterization of the Interactions of Galectin-1 with Sodium Arsenite. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, p. 469-474, Mar. 2006.

LIPSCOMB, W.N.; STRATER, N. Recent advances in zinc enzymology. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, p. 2375-2433. Nov. 1996.

LIU, F.T.,RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews. Cancer**, London, v.5 p. 29-41, Jan. 2005.

LIU, S.; LEE, S.; ZAVA A.L.; MOTRAN, C.; HAHN, B.; MICELI, M. Galectin-1-induced down-regulation of T lymphocyte activation protects (NZB x NZW) F1 mice from lupus-like disease. **Lupus**, London, v. 20(5), p. 473-84, 2011.

LÓPEZ-LUCENDO MF, SOLÍS D, ANDRÉ S, HIRABAYASHI J, KASAI K, KALTNER H, GABIUS HJ, ROMERO A. Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. **The Journal of Molecular Biology**, Oxford, v. 343(4), p. 957-70. Oct. 2004.

LOWE, J.B. Glycosylation, immunity, and autoimmunity. **Cell**, Cambridge, v. 104, p. 809-12, Mar. 2001.

MOCHEGANI, E.; BERTONI-FREDDARI, C.; MARCELLINI, F.; MALAVOLTA, M. Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability. **Progress in Neurobiology**, Oxford, v. 75, p. 367–390, Apr. 2005.

MOCHEGANI, E.; MUZZIOLI M.; GIACCONI, R. Zinc and immunoresistance to infections in aging: new biological tools. **Trends in Pharmacological Sciences**, Barking, v. 21, p. 205–208, Jun. 2000.

MORRIS, S.; AHMAD, N.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; GABIUS, H.J.; BRENOWITZ, M.; BREWER, F. Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. **Glycobiology**, Oxford, v. 14(3), p. 293-300, Mar. 2004.

NESMELOVA, I.V.; ERMAKOVA, E.; DARAGAN, V.A.; PANG, M.; MENÉNDEZ, M.; LAGARTERA, L.; SOLÍS, D.; BAUM, L.G.; MAYO, K.H. Lactose binding to galectin-1 modulates structural dynamics, increases conformational entropy, and occurs with apparent negative cooperativity. **Journal of Molecular Biology**, Oxford, v. 397(5), p. 1209-30. Apr. 2010.

OTEIZA, P.I.; MACKENZIE, G.G. Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 26, p. 245-255, Aug-Oct. 2005

PARKIN, G. Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. **Chemical Reviews**, Washington, v. 104, p. 699–767, Feb. 2004.

PATTERSON, R.J.; WANG, W.; WANG, J.L. Understanding the biochemical activities of galectin-1 and galectin-3 in the nucleus. **Glycoconjugate Journal**, Norwell, v. 19(7-9), p. 499-506, 2004.

PERILLO, N.L.; PACE, K.E.; SEILHAMER, J.J.; BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, London, v. 378, p. 736-9, Dec. 1995.

RABINOVICH, G.A.; ARIEL, A.; HERSHKOVIZ, R.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.I.; LIDER, O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1. **Immunology**, Oxford, v. 97(1), p. 100-6, May 1999.

RABINOVICH, G.A.; SOTOMAYOR, C.E.; RIERA, C.M.; BIANCO, I.; CORREA, S.G. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 30(5), p. 1331-9, May 2000.

RABINOVICH, G.A.; BAUM, L.G.; TINARI, N.; PAGANELLI, R.; NATOLI, C.; LIU, F.T. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or turners of inflammatory response. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, p. 313-20, Jun. 2002.

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 9(5), p. 338-52, May 2009.

RINK, L.; GABRIEL, P. Extracellular and immunological actions of zinc. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, Dordrecht, v. 14, p. 367-383, Sep-Dec. 2001.

SALATINO, M.; CROCI, D.O.; BIANCO, G.A.; ILARREGUI, J.M.; TOSCANO, M.A.; RABINOVICH, G.A. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 8(1), p. 45-57, Jan. 2008.

SCHWARZ, F.P.; AHMED, H.; BIANCHET, M.A.; AMZEL, L.M.; VASTA, G.R. Thermodynamics of bovine spleen galectin-1 binding to disaccharides: correlation with structure and its effect on

oligomerization at the denaturation temperature. **Biochemistry**, Washington, v. 37(17), p. 5867-77, Apr. 1998.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford, v. 14(11), p. 53R-62R, Nov. 2004.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282(5), p. 2753-64, Feb. 2007.

STOWELL, S.R.; DIAS-BARUFFI, M.; PENTTILA, L.; RENKONEN, O.; NYAME, A.K.; CUMMINGS, R.D. Human galectin-1 recognition of poly-N-acetyllactosamine and chimeric polysaccharides. **Glycobiology**, Oxford, v. 14(2), p. 157-67, Feb. 2004.

STOWELL, S.R.; KARMAKAR, S.; STOWELL, C.J.; DIAS-BARUFFI, M.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS R.D. Human galectin-1, -2, and -4 induce surface exposure of phosphatidylserine in activated human neutrophils but not in activated T cells. **Blood**, Washington, v. 109(1), p. 219-27, Jan. 2007.

STOWELL, S.R.; QIAN, Y.; KARMAKAR, S.; KOYAMA, N.S.; DIAS-BARUFFI, M.; LEFFLER, H.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 180(5), p. 3091-102, Mar. 2008.

STOWELL, S.R.; CHO, M.; FEASLEY, C.L.; ARTHUR, C.M.; SONG, X.; COLUCCI, J.K.; KARMAKAR, S.; MEHTA, P.; DIAS-BARUFFI, M.; MCEVER, R.P.; CUMMINGS, R.D. Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284(8), p. 4989-99, Feb. 2009.

STOWELL, S.R.; ARTHUR, C.M.; DIAS-BARUFFI, M.; RODRIGUES, L.C.; GOURDINE, J.P.; HEIMBURG-MOLINARO, J.; JU, T.; MOLINARO, R.J.; RIVERA-MARRERO, C.; XIA, B.;



SMITH, D.F.; CUMMINGS, R.D. Innate immune lectins kill bacteria expressing blood group antigen. **Nature Medicine**, London, v. 16(3), p. 295-301, Mar. 2010.

STROP, P.; TAKAHARA, P.M.; CHIU, H.J.; ANGOVE, H.C.; BURGESS, B.K.; REES D.C. Crystal structure of the all-ferrous 4Fe-4S (0) form of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Biochemistry**, Washington, v. 40, p. 651–656, Jan. 2001.

SUROLIA, A.; SWAMINATHAN, C.P.; RAMKUMAR, R.; PODDER, S.K. Unusual structural stability and ligand induced alterations in oligomerization of a galectin. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 409(3), p. 417-20, Jun. 1997.

TASMAN-JONES C. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos. In: WYNGAARDEN JB, SMITH LH, BENNETT JC, editors. **Cecil – Tratado de Medicina Interna**. 19ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, v. 1, p. 1204-7, 1992.

TOSCANO, M.A.; BIANCO, G.A.; ILARREGUI, J.M.; CROCI, D.O.; CORREALE, J.; HERNANDEZ, J.D.; ZWIRNER, N.W.; POIRIER, F.; RILEY, E.M.; BAUM, L.G.; RABINOVICH, G.A. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. **Nature Immunology**, London, v. 8(8), p. 825-34, Aug. 2007.

TURNER, A. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 31, p. 723–727, Jun. 2003.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN BUUREN, A.R.; APOL, E.; MEULENHOF, P.J.; TIELEMAN, D.P.; SIJBERS, A.L.T.M.; FEENSTRA, K.A.; VAN DRUNEN, R.; BERENDSEN, H.J.C. **Gromacs User Manual** version 4.5, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org). 2010.

VARKI, A., CUMMINGS, R.D., ESKO, J., HART, G., MARTH, J. **Essentials of Glycobiology**. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Inc., Boston, 2009.

WAHID, M.A.; FATHI, S.A.H.; ABOUL-KHAIR, M.R. Zinc in human health and disease. **La Ricerca in Clinica e in Laboratorio**, Milano, v. 18, p. 9-16, Jan-Mar. 1988.

WALKER, J.M. **Protein Protocols Handbook**. 2nd edition. Humana Press. Totowa, New Jersey. 2002.

WALSER, P.J.; HAEBEL, P.W.; KÜNZLER, M.; SARGENT, D.; KÜES, U.; AEBI, M.; BAN, N. Structure and functional analysis of the fungal galectin CGL2. **Structure**, Cambridge, v. 12(4), p. 689-702. Apr. 2004.

WANG, L.; FRIESS, H.; ZHU, Z.; FRIGERI, L.; ZIMMERMANN, A.; KORC, M.; BERBERAT, P.O.; BÜCHLER, M.W. Galectin-1 and galectin-3 in chronic pancreatitis. **Laboratory Investigation: a journal of technical methods and pathology**, Hagerstown, v. 80(8), p. 1233-41, Aug. 2000.

WEISS, J.H.; SENSI, S.L.; KOH, J.Y.  $Zn^{2+}$ : a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, Barking, v. 21, p. 395-401, Oct. 2001.

WELLINGHAUSEN, N.; KIRCHNER, H.; RINK, L. The immunobiology of zinc. **Immunology Today**, Barking, v. 18(11), p. 519-21, Nov. 1997.

WILLIAMS, R.J.P. The Biochemistry of Zinc. **Polyhedron**, Oxford, v. 6(1), p. 61-69, 1987.