



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Seleção e caracterização de aptâmeros de DNA capazes de se ligar à galectina-1 humana recombinante e inibirem sua função *in vitro*

João Francisco Peinado Pereira

Ribeirão Preto
2017



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Seleção e caracterização de aptâmeros de DNA capazes
de se ligar à galectina-1 humana recombinante e inibirem
sua função *in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicada à Farmácia para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biotecnologia
Aplicada à Farmácia

Orientado: João Francisco Peinado Pereira

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Farmácia em 06/10/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2017

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.

Pereira, João Francisco Peinado

Seleção e caracterização de aptâmeros de DNA capazes de se ligar à galectina-1 humana recombinante e inibirem sua função *in vitro*.

Ribeirão Preto, 2017.

83p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, 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. Aptâmeros de DNA. 3.SELEX. 4 Inibidores de galectina-1

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: João Francisco Peinado Pereira

Título do trabalho: Seleção e caracterização de aptâmeros de DNA capazes de se ligar à galectina-1 humana recombinante e inibirem sua função *in vitro*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**“Conheço muitos que não puderam quando deviam, porque não quiseram
quando podiam.”**

François Rabelais

Dedicatória

“Aos meus avós, cujas escolhas tornaram minha jornada até aqui possível, e a meus pais, pela dedicação e apoio incondicional e irrestrito. Pois se enxerguei mais longe e cheguei até aqui foi porque me apoie nos ombros desses gigantes ”

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi que apostou na minha capacidade, e abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse aprender, aprimorar e desenvolver minhas habilidades como pesquisador. Obrigado pela orientação e apoio ao longo destes anos.

Aos colaboradores Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa e ao Prof. Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira pela disponibilização dos recursos laboratoriais para desenvolvimento de parte deste trabalho e colaboração acadêmico-científico. Muito obrigada!

Ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto por contribuir com a minha formação profissional.

Aos Pós-Doutores Camillo Del Cistia, Lilian Cataldi Rodrigues e Thalita Riul, muito obrigada por toda colaboração científica.

Aos colegas do laboratório de Glicoimunobiologia que estiveram comigo durante esses cinco anos, e que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

A minha irmã, pelo companheirismo e amizade de todas as horas.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional. Palavras jamais serão o suficiente.

*"Vem por aqui" - dizem-me alguns com os
olhos doces
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom que eu os ouvisse
Quando me dizem: "vem por aqui!"
Eu olho-os com olhos lassos,
(Há, nos olhos meus, ironias e cansaços)
E cruzo os braços,
E nunca vou por ali...
A minha glória é esta:
Criar desumanidades!
Não acompanhar ninguém.
— Que eu vivo com o mesmo sem-vontade
Com que rasguei o ventre à minha mãe
Não, não vou por aí! Só vou por onde
Me levam meus próprios passos...
Se ao que busco saber nenhum de vós
responde
Por que me repetis: "vem por aqui!"?
Prefiro escorregar nos becos lamacentos,
Redemoinhar aos ventos,
Como farrapos, arrastar os pés
sangrentos,
A ir por aí...
Se vim ao mundo, foi
Só para desflorar florestas virgens,
E desenhar meus próprios pés na areia
inexplorada!
O mais que faço não vale nada.
Como, pois, sereis vós
Que me dareis impulsos, ferramentas e
coragem
Para eu derrubar os meus obstáculos?...*

*Corre, nas vossas veias, sangue velho dos
avós,
E vós amais o que é fácil!
Eu amo o Longe e a Miragem,
Amo os abismos, as torrentes, os
desertos...
Ide! Tendes estradas,
Tendes jardins, tendes canteiros,
Tendes pátria, tendes tetos,
E tendes regras, e tratados, e filósofos, e
sábios...
Eu tenho a minha Loucura!
Levanto-a, como um facho, a arder na
noite escura,
E sinto espuma, e sangue, e cânticos nos
lábios...
Deus e o Diabo é que guiam, mais
ninguém!
Todos tiveram pai, todos tiveram mãe;
Mas eu, que nunca principio nem acabo,
Nasci do amor que há entre Deus e o
Diabo.
Ah, que ninguém me dê piedosas
intenções,
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: "vem por aqui!"
A minha vida é um vendaval que se soltou,
É uma onda que se alevantou,
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou
Sei que não vou por aí!"*
José Régio

RESUMO

PEREIRA, J. F. P. **Seleção e caracterização de aptâmeros de DNA capazes de se ligar à galectina-1 humana recombinante e inibirem sua função *in vitro***. 2017. 82f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A galectina-1 (Gal1) é uma lectina, altamente conservada, que reconhece β -galactosídeos, e está envolvida na regulação da tolerância da imunidade celular e na homeostase. Dados da literatura mostram que esta lectina endógena é amplamente expressa em locais de inflamação e na tumorigênese, participando diretamente dos processos de adesão celular, crescimento tumoral, metástase e angiogênese, ressaltando a relevância de sua detecção em amostras biológicas, e sugerindo que a inibição dirigida da Gal1 pode resultar em benefícios no tratamento de distúrbios inflamatórios e em novas estratégias terapêuticas antitumorais. Entretanto, ainda são escassos os dados sobre inibidores de Gal1 com real impacto terapêutico no bloqueio da atividade biológica dessa lectina. Os aptâmeros são oligonucleotídeos de cadeia simples (DNA ou RNA), que podem se ligar a uma vasta diversidade de alvos, tais como íons, peptídeos, proteínas, moléculas orgânicas e inorgânicas, com alta afinidade e especificidade. Os aptâmeros são selecionados a partir de bibliotecas com sequências randômicas de oligonucleotídeos fita simples (ssDNA) constituídos por uma região central variável, flanqueada por duas regiões de interação com *primers* para amplificação das sequências via PCR. Esse processo de seleção é denominado de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Neste trabalho foram selecionados e caracterizados aptâmeros de DNA que se ligam a Gal1 humana recombinante e inibem sua atividade lectínica. O processo de seleção dos aptâmeros foi feito através de uma variação da metodologia SELEX, desenvolvida neste trabalho e aqui denominada de “*single vial selection*” (SVS), na qual todas as etapas de seleção dos aptâmeros ocorreram em um único recipiente, de forma rápida e eficiente, evitando etapas cromatográficas, que geralmente são utilizadas no SELEX. Análises com a técnica de termofluór (TSA) e espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano permitiram confirmar que os aptâmeros, de fato, se ligam a Gal1, mas em um sítio afastado do CRD. Ensaio de hemaglutinação mostraram que os aptâmeros selecionados conseguiram inibir a ligação da Gal1 com as glicanas da superfície celular, bloqueando a atividade lectínica da proteína. Assim, esse conjunto de resultados mostram que foi possível o desenvolvimento de uma nova classe de inibidores da Gal1 baseada em aptâmeros de DNA, a partir de uma nova metodologia de SELEX, e que não atuam através dos mecanismos clássicos de bloqueio da atividade lectínica via CRD, abrindo nossas possibilidades no desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas envolvendo esta proteína.

Palavras-chave: 1. Galectina-1. 2. Aptâmeros de DNA. 3. SELEX. 4. Inibidores de galectina-1.

ABSTRACT

PEREIRA, J. F. P **Selection and characterization of DNA aptamers capable of binding to recombinant human galectin-1 and inhibiting its function *in vitro***. 2017. 82 p. Thesis (Ph.D.). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Galectin-1 (Gal1) is a highly conserved lectin that recognizes β -galactosides, involved in the regulation of cellular immunity tolerance and homeostasis. Data from the literature show that this endogenous lectin is widely expressed in sites of inflammation and tumorigenesis, directly participating in cell adhesion processes, tumor growth, metastasis and angiogenesis, highlighting the relevance of its detection in biological samples, and suggesting that its direct inhibition may result in benefits in the treatment of inflammatory disorders and in novel antitumor therapeutic strategies. However, data on Gal1 inhibitors with real therapeutic impact in blocking the biological activity of this lectin are still scarce. Aptamers are single-stranded oligonucleotides (DNA or RNA), which can bind to a wide variety of targets, such as ions, peptides, proteins, organic and inorganic molecules, with high affinity and specificity. The aptamers are selected from pools of random single-stranded oligonucleotide (ssDNA) sequences consisting of a variable central region, flanked by two sites of primers interaction for PCR amplification. This selection process is called Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX). In this work, DNA aptamers that bind to recombinant human Gal1 and inhibit their lectin activity have been selected and characterized. The aptamers selection process was done through a variation of SELEX methodology, developed in this work and here called "*single vial selection*" (SVS), in which all stages of aptamers selection occurred in a single container, quickly and efficient, avoiding chromatographic steps, which are usually used in SELEX. Analyzes by Thermofluor (TSA) method and intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy have confirmed that aptamers actually bind to Gal1, but at a site away from the CRD. Hemagglutination assay showed that selected aptamers succeeded in inhibiting the Gal1 binding to cell surface glycans, blocking the protein lectin activity. Thus, this set of results showed that it was possible to develop a new class of Gal1 inhibitors based on DNA aptamers and on a new SELEX methodology, that does not act through the classic blocking mechanisms of lectin activity via CRD, opening new possibilities for the development of diagnostic and therapeutic strategies involving this protein.

Keywords: 1. Galectin-1. 2. DNA aptamers. 3. SELEX. 4. Galectin-1 inhibitors.

RESUMEN

PEREIRA, J. F. P. **Selección y caracterización de aptámeros de ADN capaces de unirse a la galectina-1 humana recombinante e inhibir su función *in vitro***. 2017. 82 septies. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, de 2017.

La galectina-1 (Gal1) es una lectina que reconoce β -galactosidos altamente conservada, además de involucrada en la regulación de la tolerancia de la inmunidad celular y la homeostasis. Los datos publicados muestran que esta lectina endógena es ampliamente expresada en lugares de inflamación y en la tumorigénesis, participando directamente de los procesos de adhesión celular, crecimiento tumoral, metástasis y angiogénesis, resaltando la relevancia de su detección en muestras biológicas, y sugiriendo que la inhibición dirigida De Gal1 puede resultar en beneficios en el tratamiento de disturbios inflamatorios y en nuevas estrategias terapéuticas antitumorales. Sin embargo, todavía son escasos los datos sobre inhibidores de Gal1 con real impacto terapéutico en el bloqueo de la actividad biológica de esa lectina. Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla (ADN o ARN), que pueden unirse a una amplia diversidad de dianas, tales como iones, péptidos, proteínas, moléculas orgánicas e inorgánicas, con alta afinidad y especificidad. Los aptámeros se seleccionan a partir de colecciones (bibliotecas) con secuencias aleatorias de oligonucleótidos cadena sencilla (ssDNA) constituidos por una región central variable, flanqueada por dos regiones de interacción con *primers* para la amplificación de las secuencias vía PCR. Este proceso de selección se denomina Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial (SELEX). En este trabajo fueron seleccionados y caracterizados aptámeros de ADN que se unen a la Gal1 humana recombinante e inhibe su actividad lectínica. El proceso de selección de los aptámeros fue hecho a través de una variación de la metodología SELEX, desarrollada en este trabajo y aquí denominada "*single vial selection*" (SVS), en la cual todas las etapas de selección de los aptámeros ocurrieron en un solo recipiente, de forma rápida y eficiente, evitando etapas cromatográficas, que generalmente se utilizan en el SELEX. Los análisis con la técnica de termofluor (TSA) y la espectroscopia de fluorescencia intrínseca del triptófano permitieron confirmar que los aptámeros, de hecho, se unen a Gal1, pero en un sitio alejado del CRD. Los ensayos de hemaglutinación mostraron que los aptámeros seleccionados lograron inhibir la unión de la Gal1 con las glicanas de la superficie celular, bloqueando la actividad lectínica de la proteína. Así, ese conjunto de resultados mostró que fue posible el desarrollo de una nueva clase de inhibidores de la Gal1 basada en aptámeros de ADN ya partir de una nueva metodología de SELEX, que no actúan a través de los mecanismos clásicos de bloqueo de la actividad lectínica vía CRD, abriendo nuevas posibilidades en el desarrollo de estrategias diagnósticas y terapéuticas envolviendo esta proteína.

Palabras clave: 1. La galectina-1. 2. Los aptámeros de ADN. 3. SELEX. 4. Los inhibidores de la galectina-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação das galectinas de mamíferos
Figura 2 -	Galectina-1 ligada à lactose, PDB ID 1GZW
Figura 3 -	Representação esquemática das etapas da metodologia SELEX.
Figura 4 -	Ilustração da atividade hemaglutinante das galectinas
Figura 5 -	Comparação da capacidade adsorção da Gal1 em placas de PS e tubos de PP
Figura 6 -	Efeito das diferentes temperaturas de anelamento nos produtos de PCR (gel agarose)
Figura 7 -	Efeito das diferentes temperaturas de anelamento nos produtos de PCR (gráfico de barras)
Figura 8 -	Efeito das diferentes concentrações de íons magnésio sobre o rendimento dos produtos de PCR (gel agarose)
Figura 9 -	Efeito das diferentes concentrações de íons magnésio sobre o rendimento dos produtos de PCR (gráfico de barras)
Figura 10 -	Efeito das diferentes proporções entre <i>primers</i> F e R na eficiência dos produtos ssDNA e ds DNA na APCR (gel agarose)
Figura 11 -	Efeito das diferentes proporções entre <i>primers</i> F e R na eficiência dos produtos ssDNA e ds DNA na APCR (gráfico de barras)
Figura 12 -	Efeito dos diferentes números de ciclos de amplificação APCR na geração de ssDNA (gel agarose)
Figura 13 -	Efeito dos diferentes números de ciclos de amplificação APCR na geração de ssDNA (gráfico de barras)
Figura 14 -	Efeito da digestão enzimática com lambda exonuclease
Figura 15 -	Influência do tempo na digestão enzimática da dsDNA com lambda exonuclease
Figura 16 -	Perfil das curvas de meting dos produtos de PCR após 4 rodadas de SELEX

Figura 17 -	Sequências dos aptâmeros anti-Gal1 obtidos após 4 rodadas de SELEX
Figura 18 -	Predição da estrutura secundária do aptâmero 4, feita com o servidor online Mfold
Figura 19 -	Predição da estrutura secundária do aptâmero 9, feita com o servidor online Mfold
Figura 20 -	Representação esquemática da alquilação do resíduo de cisteína livre pela iodoacetamida
Figura 21 -	Testes de hemaglutinação em diferentes concentrações de proteínas
Figura 22 -	Cálculo da concentração inibitória mínima (CIM) da lactose
Figura 23 -	Teste de hemaglutinação com concentração de proteína constante a 5 μ M e com titulação dos aptâmeros 4 e 9
Figura 24 -	Medidas da intensidade de fluorescência em função da temperatura para o aptâmero 4 e Gal1 não alquilada
Figura 25 -	Medidas da intensidade de fluorescência normalizadas em função da temperatura para o aptâmero 4 e Gal1 não alquilada
Figura 26 -	Medidas da intensidade de fluorescência em função da temperatura para o aptâmero 9 e Gal1 não alquilada
Figura 27 -	Medidas da intensidade de fluorescência normalizadas em função da temperatura para o aptâmero 9 e Gal1 não alquilada
Figura 28 -	Variações na temperatura de desnaturação causadas pelo aptâmero 4
Figura 29 -	Variações na temperatura de desnaturação causadas pelo aptâmero 9
Figura 30 -	Espectros de Fluorescência do triptofano para Gal1 humana recombinante nativa, em diferentes concentrações e com titulação de lactose
Figura 31 -	Espectros de Fluorescência do triptofano para Gal1 humana recombinante nativa, em diferentes concentrações do aptâmero 4
Figura 32 -	Espectros de Fluorescência do triptofano para galectina-1 humana recombinante alquilada em diferentes concentrações do aptâmero 4
Figura 33 -	Determinação das características de ligação entre a galectina-1 humana recombinante nativa e o aptâmero 4

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
2-ME	2-β mercaptoetanol
CD	Complexo de Diferenciação
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
DO	Densidade Óptica
dsDNA	DNA de cadeia dupla
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
Gal1	Galectina-1
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil β-D-1-thiogalactopiranosideo
Kd	Constante de dissociação
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
PBS	Solução de Fosfato Tamponada
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SELEX	Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial
ssDNA	DNA de cadeia simples
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Lectinas	1
1.2 Aplicações biotecnológicas das lectinas	2
1.3 Galectinas	3
1.3.1 Galectina – 1 (gal1): estrutura	5
1.3.2 Galectina – 1 (gal1): uma molécula multifuncional	7
1.3.3 Galectina – 1 (gal1) e processos tumorais	9
1.4 Potencial terapêutico dos inibidores da gal1	11
1.5 Aptâmeros	12
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	18
3.1 Obtenção e purificação da galectina-1 humana recombinante (Gal1)	18
3.2 Variação da metodologia SELEX: protocolo “single-vial-selection” de seleção dos aptâmeros	19
3.2.1 Imobilização da galectina-1 no tubo de polipropileno para seleção dos aptâmeros	20
3.2.2 Produção dos oligonucleotídeos fita simples (ssDNA): PCR simétrica e assimétrica (APCR)	20
3.2.3 Otimização dos parâmetros da PCR assimétrica (APCR)	22

3.3 Avaliação da variabilidade nas sequências dos aptâmeros através da análise da curva de reMelting após cada rodada de seleção	23
3.4 Análise das sequências dos aptâmeros, estruturas secundárias e energias livre (ΔG)	23
3.5 Análise da atividade lectínica e de sua inibição, por ensaio de hemaglutinação	24
3.6 Avaliação da interação da galectina-1 humana recombinante com aptâmeros por Termoflúor	25
3.7 Avaliação da interação da galectina-1 humana recombinante com o aptâmero 4, através da fluorescência intrínseca do triptofano	27
3.8 Reagentes e soluções	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Padronização da imobilização da Gal1 nos tubos de polipropileno (PP) para seleção dos aptâmeros	29
4.2 Otimização dos parâmetros da PCR assimétrica (APCR)	30
4.2.1 Efeito da temperatura de anelamento	31
4.2.2 Efeito da concentração de cátions magnésio (Mg^{2+})	32
4.2.3 Efeito da proporção entre primers forward (F) e reverse (R) na PCR assimétrica (APCR)	34
4.2.4 Efeito do número de ciclos na amplificação de ssDNA na PCR assimétrica (APCR)	35
4.3 Utilização da PCR assimétrica (APCR) em associação com digestão enzimática para aumento do rendimento na produção de ssDNA	37
4.3.1 Otimização do tempo de digestão da fita dupla de DNA (dsDNA) com lambda exonuclease	39
4.4 Avaliação da curva de melting via qPCR para o acompanhamento da variabilidade das sequências dos aptâmeros durante o processo de SELEX	40
4.5 Análise das sequências, estruturas secundárias e energia livre (ΔG) dos aptâmeros selecionados após a 4ª rodada de SELEX	42
4.6 Análise da atividade lectínica e de sua inibição, por ensaio de hemaglutinação	46
4.7 Avaliação da interação da Gal1 com aptâmeros por Termoflúor	50
4.8 Avaliação da interação da galectina-1 humana recombinante com o aptâmero 4, através da fluorescência intrínseca do triptofano	58
5. CONCLUSÃO.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. Introdução

1.1 Lectinas

Peter Hermann Stillmark, no ano de 1888, durante a investigação do grau de toxicidade de extratos de semente de mamona (*Ricinus communis*), relatou que uma toxina presente nesses extratos promovia a aglutinação de eritrócitos. Estudos detalhados isolaram e caracterizaram essa aglutinina a partir desses extratos, a qual foi denominada ricina. Outras aglutininas foram descobertas em seguida, em extratos de outras espécies de plantas venenosas e, em meados do século XX essas moléculas se tornaram membros importantes de uma classe geral de proteínas ligantes de glicanas, denominadas lectinas. (BOYD; SHAPLEIGH, 1954)

Embora tenham sido descobertas há mais de um século, a denominação lectina, derivada do latim *lectus* (selecionado, escolhido), só passou a ser empregada a partir de 1954, por William Boyd e Elizabeth Shapleigh, para identificar um novo grupo de proteínas que possuíam a propriedade em comum de aglutinarem seletivamente grupos sanguíneos e determinados tipos celulares específicos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954) (BARONDES et al., 1988). Atualmente as lectinas são definidas como um grupo diverso de proteínas e glicoproteínas que possuem a capacidade de se complexarem reversível e especificamente com glicanas, não possuindo função enzimática nem sendo de origem imunológica. Glicana é o termo genérico usado para se referir aos carboidratos, ou conjunto destes, estando livres ou ligados em outra categoria de moléculas, como proteínas (glicoproteínas) ou lipídeos (glicolipídeos). A atividade de reconhecimento de carboidratos das lectinas é frequentemente associada a uma região polipeptídica distinta nessas proteínas, denominada CRD (do inglês *carbohydrate recognition domain*). (SHARON, 1993; DODD; DRICKAMER, 2001; VARKI et al., 2009a).

Diversas são as classificações das lectinas, desde de suas sequências de aminoácidos e homologia estrutural de seus CRDs, até suas especificidades em relação ao reconhecimento de carboidratos terminais, presentes nas cadeias das glicanas (BARONDES et al., 1988, KENNEDY et al., 1996, SHARON et al., 1990), embora existam pesquisadores que prefiram outros critérios, tais como sua origem evolutiva (BERTOZZI et al., 2009). Essa classe proteica é encontrada desde vírus e bactérias, até animais e vegetais, sendo ainda hoje um dos principais métodos de detecção dessas estruturas os ensaios de hemaglutinação (VARKY et al., 2009b).

A primeira lectina de origem animal foi descrita em 1952, por WATKINS & MORGAN, e apresentava especificidade para L-fucose. A primeira lectina de mamífero, de origem hepática, foi isolada em 1974, por GILBERT ASHWELL e ANATOL G. MORELL, nos estudos dos mecanismos de controle da meia vida de glicoproteínas na circulação sanguínea (HUDGIN et al, 1974; STOCKERT; MORELL; SCHEINBERG, 1974). Já o primeiro membro da família das lectinas β -galactose-específicas, a *electrolectin*, atualmente denominada galectina-1 (Gal1) foi isolado por TEICHBERG e colaboradores em 1975, a partir do peixe enguia elétrica (BARONDES et al., 1994).

1.2 Aplicações biotecnológicas das lectinas

As funções biológicas exercidas pelas lectinas continuam sendo foco de pesquisas científicas (VARKI (a) et al., 2009). Seus genes foram altamente conservados no processo evolutivo, além de haver homologias genéticas de lectinas extraídas tanto do reino animal quanto do vegetal (Cavada et al., 1996, KILPATRICK et al., 2002, LORIS et al., 2002, GABIUS et al., 2002) reforçando o fato de que essas proteínas têm importantes funções na manutenção da vida.

Por possuírem ampla capacidade de reconhecimento juntamente com a possibilidade de conjugação com diversos marcadores, estas proteínas podem atuar como sondas, localizando distintas configurações morfológicas de carboidratos. Assim, sua aplicação como reagentes no isolamento de glicoconjugados, bem como sua utilização no monitoramento de mudanças na superfície celular em decorrência de processos fisiopatológicos ou de diferenciação tem sido vastamente explorada (FREEZE et al., 2009, CUMMINGS et al., 2009). Aplicações em tipagem sanguínea; caracterização de diferentes estágios do desenvolvimento de protozoários e vermes de interesses médico (*Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni*); desenvolvimento de matrizes inertes para purificação de glicoconjugados; investigação de disfunções no tecido epitelial associadas a transformações neoplásicas; vetores para o mapeamento de estruturas celulares cerebrais, em doentes com Mal de Alzheimer (ZAMBENEDETTI et al., 1998); acompanhamento da progressão, diagnóstico e tratamento de processos inflamatórios (RABINOVICH et al., 2002a).

Dentre as lectinas de grande interesse biotecnológico, destaca-se uma importante família de origem animal, cujos domínios de reconhecimento de

carboidratos (CRD) têm afinidade específica por beta-galactosídeos, as galectinas. Estas encontram-se amplamente distribuídas em células normais e neoplásicas de diferentes organismos e são foco de estudos por se envolverem em uma vasta diversidade de eventos celulares, tais como apoptose, embriogênese, adesão celular, defesa contra agentes patogênicos, regulação imunológica, metástase tumoral, angiogênese, distúrbios de auto-imunidade e processos inflamatórios. (DUMIC *et al.* 2006).

1.3 Galectinas

A família das galectinas foi inicialmente classificada como do tipo-S, em função da dependência dos grupos sulfidrílicos nas cisteínas livres nessas moléculas. O estado de oxidação destes aminoácidos é crucial na determinação da solubilidade e atividade lectínica destas proteínas (BARONDES *et al.*, 1994; CUMMINGS; LIU, 2009). As galectinas são solúveis, não possuem peptídeo sinal, estão presentes nos compartimentos citosólicos e sua liberação para o meio extracelular se dá por um mecanismo secretório não convencional (COOPER; BARONDES, 1990; SATO *et al.*, 1993). Até o momento já foram descritas 15 galectinas de mamíferos, divididas em três categorias com base nas estruturas primárias dessas proteínas e na similaridade estrutural de seus CRDs (COOPER e BARONDES, 1999; YANG *et al.*, 2008). Estas podem se apresentar como monômeros ou homodímeros não covalentes, com um único tipo de CRD (galectina-1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15); como forma quimérica composta por um CRD ligado em um domínio denominado não lectínico (galectina-3); ou como repetições em série (*in tandem*) de dois CRDs diferentes numa única cadeia polipeptídica (galectina-4, 6, 8, 9 e 12) (HIRABAYASHI *et al.*, 2002), conectados por um peptídeo (*linker*) de 5 a 50 resíduos de aminoácidos (CUMMINGS; LIU, 2009; BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011). (Figura 1).




Classificação	Estrutura
<p>Prototipo Galectina-1, 2,5,7,10,11,13,14 e 15</p>	 <p>1 CRD que pode dimerizar</p>
<p>Quimérico Galectina-3</p>	 <p>1 CRD conectado a um domínio não lectínico</p>
<p>Repetição em série (tanden) Galectina-4, 6,8,9 e 12</p>	 <p>2 CRDs distintos</p>

Figura 1. Classificação das galectinas de mamíferos. As galectinas são classificadas em 3 grupos de acordo com suas características estruturais: prototipo, quimérica e de repetição em série (*tandem repeat*). Os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) das galectinas apresentam aproximadamente 130 resíduos de aminoácidos, sendo que apenas alguns desses resíduos interagem diretamente com os carboidratos livres ou constituintes das glicana. Os CRDs das galectinas estão representados por cores diferentes de acordo com cada grupo. A galectina do tipo quimérica, galectina-3, pode oligomerizar-se ,como representado em azul. Adaptado de Rabinovich; Toscano, 2009

As galectinas são expressas por diversos tipos celulares, sendo sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos e desempenham diferentes funções intracelulares se presentes no citosol ou no núcleo (LIU *et al.*, 2002; HSU e LIU, 2004; NORLING *et al.*, 2009). É importante destacar que a atuação intracelular dessas proteínas não se mostra dependente de sua habilidade de ligação aos carboidratos (LIU *et al.*, 2002; NAKAHARA e RAZ, 2006).

Mesmo não possuindo uma sequência sinalizadora clássica para sua secreção, estas proteínas quando secretadas exercem outras funções, sejam extracelulares, autócrinas ou parácrinas e que são dependentes das proteínas de superfície presentes na célula (HSU e LIU, 2004; ELOLA *et al.*, 2007). No espaço extracelular, a interação dessas lectinas com glicanas das superfícies celulares do sistema imunológico pode promover a modulação da produção de citocinas e mediadores, adesão celular, apoptose, quimiotaxia e endocitose (CUMMINGS; LIU, 2009; LIU; RABINOVICH, 2010, BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011). Já a capacidade de se ligar e promover o agrupamento (formação de *cluster*) de receptores de superfície da célula, ativando-os e desencadeando a sinalização intracelular, bem

como a interação com moléculas da matriz extracelular é dependente da ligação dos carboidratos ao CRD das galectinas (OCHIENG *et al.*, 2004; HE e BAUM, 2006a; ELOLA *et al.*, 2007; RABINOVICH *et al.*, 2007a).

Destaco nesta oportunidade, que a galectina-1 humana (Gal1) é foco deste estudo e, portanto, esta molécula foi mais detalhadamente descrita.

1.3.1 Galectina – 1 (Gal1): Estrutura

A Gal1 humana é codificada pelo gene LSGALS1, de 4397 pares localizados no cromossomo 22, região q12 (CHIARIOTTI *et al.*, 2004). O transcrito de 600b resulta do *splicing* de 4 exons e codifica uma proteína de 135 aminoácidos (CHIARIOTTI *et al.*, 2004).

A Gal1 é uma proteína ácida (pI 5.6) que não apresenta peptídeo de sinal, com o N-terminal acetilado e resíduos de cisteínas livres. Sua topologia molecular é do tipo *jelly-roll* composto por duas folhas- β anti-paralelas, padrão estrutural típico das galectinas (LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004). Os monômeros de Gal1 possuem massa molecular aparente de aproximadamente 14,5kDa, associando-se por interações não covalentes, com uma dependência temporal (~20h) e de concentração (Kd~7 μ M) na reversibilidade do equilíbrio entre as formas diméricas e monoméricas desta galectina (SALOMONSSON *et al.*, 2010) sendo que essas formas podem ou não apresentar as mesmas propriedades biológicas (CAMBY *et al.*, 2006).

A caracterização estrutural da galectina-1 forneceu base para a melhor compreensão das distintas formas de interação com diferentes glicanas, bem como facilitou a concepção racional de possíveis inibidores. A estrutura da Gal1, formada por duas folhas beta anti-paralelas de cinco (F1-F5) e seis (S1-S6) cadeias beta, formando estas últimas o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (Figura 2A) (LOPEZ-LUCENDO *et al.*, 2004). Quando ligada à lactose, ocorre o empilhamento do anel piranosídico da galactose com o resíduo conservado de Trp68, e os grupamentos hidroxila nas posições C4 e C6 da galactose e C2 e C3 da glucose formam ligações de hidrogênio com os resíduos His44, Arg48, Asn61 e Glu71 (Figura 2B). His52 do laço formado pelas cadeias beta S4-S5, único para a galectina-1, está posicionado na vizinhança da molécula de lactose. Os CRDs estão posicionados nas extremidades opostas do dímero da Gal1, com os N e C terminais de cada monômero se aproximando pela interface de dimerização em uma rede de

ligações de hidrogênio (Figura 2A e C). A formação do dímeros permite interações bivalentes com as glicanas das superfícies celulares, resultando em um aumento geral da afinidade, permitindo o *crosslink* e a formação de malhas de glicanas-galectina-1 (SACCHETTINI et al., 2001, FRED et al., 2002).

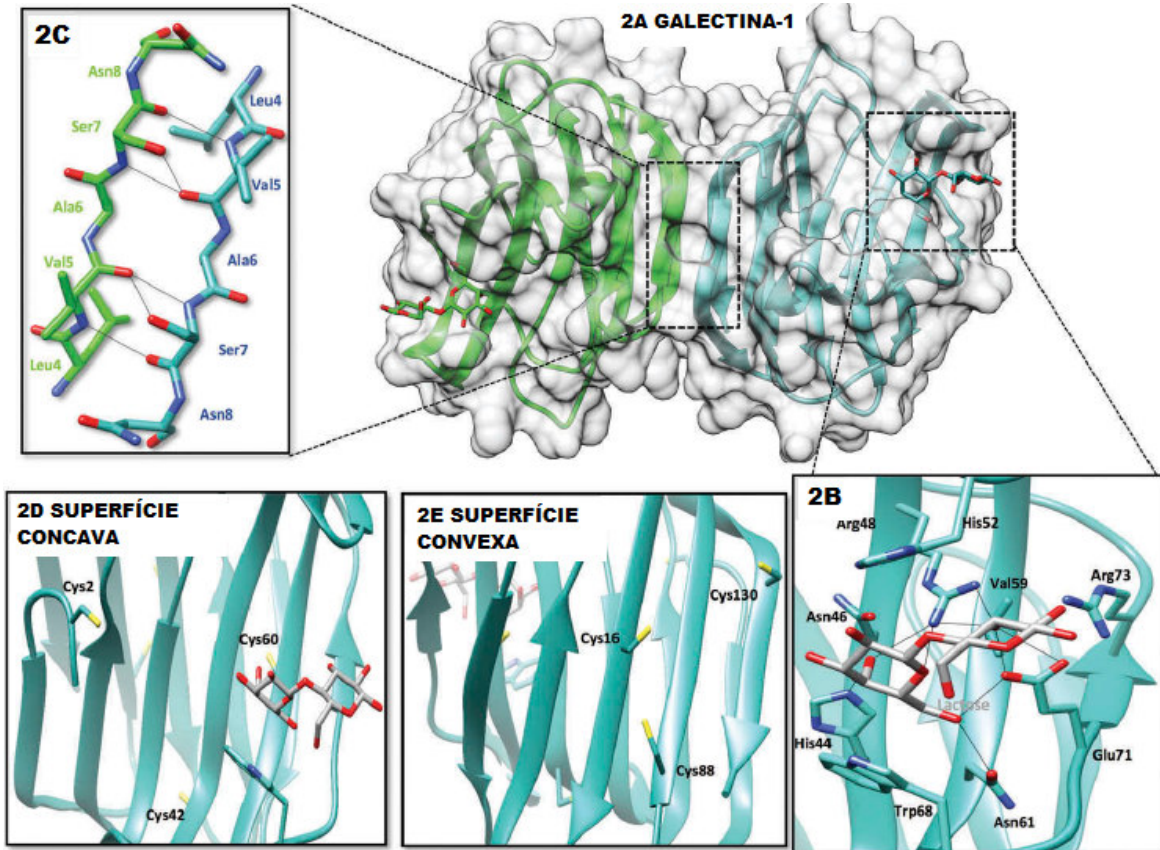


Figura 2. Galectina-1 ligada à lactose, PDB ID 1GZW (Lopez-Lucendo et al., 2004).

A) Representação com a superfície transparente da forma dimérica da galectina-1 juntamente com lactose ligada (bastão). B) Aminoácidos representados (bastões em cor azul ciano, nitrogênio em azul escuro e oxigênio em vermelho) envolvidos nas ligações de hidrogênio (linhas finas e pretas) com lactose (bastões cinzentos). C) Resíduos envolvidos nas ligações de hidrogênio na interface de dimerização. D) e E) Resíduos de cisteína (bastão, enxofre em amarelo) presentes na galectina-1 na superfície convexa e côncava do CRD. A lactose e o triptofano conservado são apresentados para referência. Adaptado de Lopez-Lucendo et al., 2004

Um crescente número de relatos sugere que a forma dimérica de Gal1 é mais prevalente e que sua natureza dimérica contribui para uma maior afinidade geral em relação às glicanas, quando comparado com a sua forma monomérica (Leppanen et al., 2005, Cho et al., 1996). Como já mencionado, as galectinas foram originalmente denominadas de lectinas do tipo S devido à dependência da galectina-1 de condições redutoras do meio para exercer suas atividades de lectinas (Kasai et al., 1996). Isto se dá pela presença de seis resíduos de cisteína nessa proteína, que

podem, após reorganização estrutural, formar ligações dissulfeto num ambiente não redutor (KADOYA et al., 2005, PANDE et al., 2003). Na galectina-1 em sua forma reduzida, Cys130, Cys16, Cys88, estão presentes na superfície convexa da molécula, enquanto Cys2, Cys42, Cys60 estão presentes no lado côncavo (Figura 2D e E). Proteínas mutantes com Cys2Ser e Cys60Ser apresentaram uma capacidade de ligação reduzida por lactosil-Sepharose em 40% e 80%, respectivamente, e o mutante Cys2Ser e Cys130Ser permaneceu suscetível à oxidação. O potencial redox do ambiente governa o estado redox da galectina-1 (GUARDIA et al., 2014). Em geral, as funções pró-apoptóticas e imunomoduladoras estão associadas à forma reduzida de galectina-1, enquanto os efeitos proliferativos, como a regulação da regeneração axonal após lesão do nervo, estão associados à sua forma oxidada (Horie et al., 2004). Um estudo recente (YU et al., 2015) relatou que a galectin-1 na sua forma reduzida interage com farnesil de forma carboidrato independente. A interação com farnesil parece ocorrer num local distante do CRD da Gal1, envolvendo pelo menos alguns resíduos hidrofóbicos no N-terminal e o aminoácido Lys28. Esta descoberta é corroborada por um estudo anterior que propunha a ligação do farnesil em uma cavidade da Gal1 reduzida, formada pelos resíduos hidrofóbicos L9, L11, L17, F30, L32 e I128, situados nos N e C terminais (ELAD-SFADIA et al., 2002, Rotblat et al., 2004).

1.3.2 Galectina – 1 (Gal1): Uma molécula multifunctional

Análises das estruturas cristalográficas da Gal1 ligadas a glicanas (DIAS-BARUFFI et al., 2002; LÓPEZ-LUCENDO et al., 2004), e estudos de ligação desta galectina com glicoproteínas imobilizadas (STOWELL et al., 2004) e glicoconjugados de superfície celular (PATNAIK et al., 2006), mostram que esta lectina é capaz de reconhecer resíduos de galactose terminal e que essas interações são sensíveis às condições oxidorreduzidoras do meio, bem como às complexidades estruturais dos ligantes (glicanas). Dados mostram a presença citoplasmática dessa proteína, com expressão da Gal1 em células epiteliais do timo (BAUM et al., 1995), células T primadas com antígeno (BLASER et al., 1998), macrófagos ativados (RABINOVICH et al., 1996), células B ativadas (ZUÑIGA et al., 2001) e células endoteliais (LA et al., 2003).

A Gal1 também foi detectada no núcleo (VYAKARNAM et al., 1998), e evidências apontam que a Gal1 e conjunto com galectina-3, estão envolvidas no *splicing* de pré-mRNA, dado que o extrato nuclear depletado de ambas perdeu a capacidade de realizar *splicing*, sendo que após adição de uma ou outra galectina recombinante tal atividade foi restaurada (VYAKARNAM et al., 1997).

Receptores para Gal1 em células T já foram descritos, incluindo CD2, CD7, CD43 e CD45 (PACE et al., 1999; 2000; HERNANDEZ et al., 2006). A ligação de Gal1 com células T desencadeia diversos eventos de transdução de sinal, tais como ZAP-70 e ERK-2, fosforilação da tirosina de fosfolipase C γ -1 (PC γ -1), influxo de cálcio, ativação de fatores de transcrição como AP-1 e NF- κ B e redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2, importante para a fisiologia e a sobrevivência de célula T (VESPA et al., 1999; RABINOVICH et al., 2000a; TOSCANO et al., 2011).

Observou-se também que a Gal1 consegue promover a apoptose de células T produtoras da citocinas pró-inflamatória IL-17 (T_H17) mas não de células T_H2 produtoras de IL-10 e TGF- β (citocinas com caráter anti-inflamatório) (TOSCANO et al., 2007). Células associadas a linfomas de Hodgkin promovem o escape da resposta imune antitumoral com a expressão de grandes quantidades de Gal1 (JUSZCZYNSKI et al., 2007). Segundo esses autores, a Gal1 viabiliza o escape imunológico por favorecer a secreção de citocinas T_H2 (MOTRAN et al., 2008) e a expansão de células T reguladoras do tipo CD4+, CD25+(*high*) e FOXP3+.

Diversos trabalhos também mostram a participação da Gal1 na resposta imunológica inata e em processos inflamatórios. A Gal1 inibe tanto a liberação do ácido araquidônico (AA) e da prostaglandina E2 no modelo de edema de pata causado pela injeção de fosfolipase A₂ (PLA₂) de veneno de abelha (RABINOVICH et al., 2000b), quanto a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de NO sintetase indutível (iNOS) em macrófagos estimulados com LPS (CORREA et al., 2003). Nesta mesma linha, monócitos humanos tratados com essa lectina apresentam redução da fagocitose via receptores da classe Fc γ RI e inibição da expressão de MHCII, com conseqüente redução da apresentação de antígenos a células T (BARRIONUEVO et al, 2007).

A administração *in vivo* da Gal-1 tem sido usada com sucesso na prevenção da instalação da inflamação crônica em modelos experimentais de encefalomielite autoimune (OFFNER et al., 1990), colite (SANTUCCI et al., 2003), pancreatite crônica (WANG et al., 2000) e artrite reumatoide, em que a administração de Gal-1

aboliu a resposta autoimune. Importante observar que, no último caso, o efeito terapêutico foi acompanhado por mudança de resposta de citocinas para padrão T_H2 (RABINOVICH *et al.*, 1999).

A redução na produção de IFN- γ também foi observada em modelo de hepatite induzida por concanavalina A (Con-A) (SANTUCCI *et al.*, 2000), uveíte autoimune experimental (TOSCANO *et al.*, 2006) e reação de enxerto versus hospedeiro (BAUM *et al.*, 2003). Nesta linha, camundongos deficientes de Gal-1 produzem mais IFN- γ e IL-17 em modelo de neuroinflamação autoimune experimental (TOSCANO *et al.*, 2007).

Portanto, esses estudos realizados em vários modelos experimentais têm estabelecido que a Gal1 tem atividade anti-inflamatória e imunorreguladora, estando essa modulação da resposta imunológica relacionada ao efeito benéfico do uso de Gal-1 no tratamento de diversas doenças autoimunes e inflamatórias experimentais (LIU; RABINOVICH, 2010).

1.3.3 Galectina – 1 (Gal1) e processos tumorais

É importante destacar que pela característica de ligar-se em glicanas presentes na superfície celular, a função exercida por essa proteína varia de acordo com o repertório de glicosilação exposto pelas células. Esta exposição, por sua vez, pode sofrer variações de acordo com o estado de diferenciação e/ou grau de ativação celular (RABINOVICH *et al.*, 2002). Assim, essa lectina apresenta propriedades que podem, aparentemente, parecer paradoxais e que variam em função da linhagem celular, concentração desta no meio e de sua localização (SCOTT e WEINBERG, 2004).

A expressão da Gal1 é amplamente distribuída no organismo, sendo expressa por diferentes tipos de célula, como epiteliais do timo, endoteliais, tímicas estromais, da medula óssea, macrófagos, linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ (PERILLO *et al.*, 1995; BLASER *et al.*, 1998; GAUTHIER *et al.*, 2002; HE e BAUM, 2004; BAUM e REN, 2008) além de tecidos imunoprivilegiados (RABINOVICH, 1999a; DETTIN *et al.*, 2003; ISHIDA *et al.*, 2003). Já a expressão anormalmente aumentada dessa lectina foi documentada em algumas classes de neoplasias, como no câncer de cólon, mama, bexiga, carcinomas de ovário e de próstata (DANGUY *et al.*, 2002).

A galectina-1 desempenha diversos papéis importantes na biologia do câncer, na medida em que interage com as principais vias de sinalização envolvidas na biologia celular tumoral (CAMBY et al., 2006), como a p21 e p27 (FISCHER et al., 2005), vias relacionadas com o receptor do gangliosídeo GM1 (ANDRE et al., 2005), Ras, Raf e PI3-K (ELAD-SFADIA et al., 2002), sendo que o PI3-K está diretamente envolvido na resistência das células à apoptose e, especialmente, no caso dos glioblastomas (LEFRANC et al., 2005).

A galectina-1 tem expressão aumentada em adenocarcinomas de ductos pancreáticos quando comparada com tecido normal e pancreatite (GRUTZMANN et al., 2004 e SHEN et al., 2004). A expressão de Gal1 também foi observada nos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) e bem como nos compartimentos invasivos desses tumores (GILLENWATER et al., 1996) relacionando-se à sua agressividade (CHOUFANI et al., 1999). Pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC), incluindo adenocarcinomas, geralmente são positivos para expressão aumentada de Gal1 (GABIUS et al., 2002 e SZOKE et al., 2005). A expressão de Gal1 tende a se elevar com a progressão maligna da neoplasia do NSCLC, sendo um fator desfavorável independente no prognóstico desse tipo de tumor, o que aparenta estar relacionado com a atividade proliferativa das células tumorais (GABIUS et al., 2002 e SZOKE et al., 2005). Observou-se também, que a adição extracelularmente de Gal1 recombinante às células de melanoma, induz um aumento dose-dependente na adesão celular à laminina ou fibronectina (VAN DEN BRULE et al., 1995). Além disso, enquanto as paredes dos vasos sanguíneos no tecido linfóide normal não expressam Gal1, as paredes dos vasos nos linfomas expressam essa proteína em proporção direta à densidade vascular (D'HAENE et al., 2005).

O acúmulo de alterações na adesão, proliferação, resposta a apoptose e migração em células normais resulta em transformações neoplásicas e consequentemente no desenvolvimento de tumores (HANAHAN e WEINBERG, 2000). É importante destacar aqui que os impactos funcionais da galectina-1 abrangem todos esses processos fisiológicos supracitados (LIU e RABINOVICH, 2005).

Em 1998 o *National Institutes of Health Biomarkers Definitions Working Group* definiu biomarcador como sendo algo característico, objetivamente mensurável e avaliado como um indicador de um processo biológico normal, de um processo

patogênico ou de uma resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (BIOMARKERS., 2001). Diante dos dados previamente expostos, fica notório que a galectina-1 é um potencial biomarcador, principalmente de processos de progressão tumoral, sendo a quantificação de sua expressão aumentada um importante dado a ser usado como fator preditivo no prognóstico de pacientes. Além disso, a Gal1 é um importante alvo terapêutico a ser explorado na aplicação clínica, e o desenvolvimento de inibidores eficientes desta molécula torna-se uma área de pesquisa de imprescindível atuação.

1.4 Potencial terapêutico dos Inibidores da Gal1

A Inibição de galectina-1 (Gal1), bem como a inibição de galectinas de modo geral, tem sido buscada, basicamente, com 3 diferentes classes de inibidores: análogos de β -galactosídeos (incluindo os glicomiméticos), os glicodendrimeros e os peptídeos e peptídeos miméticos. Como essa lectina é ligante para gactosídeos, uma categoria de inibidores são os antagonistas das galectinas análogos de β -galactosídeos e glicomiméticos, e visam, logicamente a interação com o CRD. A maior parte destes compostos foi concebida como antagonistas das galectinas 1, 3, 7, 8 e 9 (TEJLER et al., 2005 e GIGUERE et al., 2006) como por exemplo, um composto baseado em um esteroide bilactosilado (INGRASSIA et al., 2006) e derivados de dilactoseaminas espaçados por polimetilenos (RABINOVICH et al., 2006). A propensão da Gal1 em se dimerizar bem como sua propriedade de reconhecimento de grandes complexos de glicanas também foi explorado através do desenho de glicodendrimeros sintéticos e complexos de glicanas modificados.

Embora alguns destes compostos baseados em carboidratos se liguem a várias galectinas *in vitro* com valores de Kd da ordem de μM com um único dígito, a maioria se liga de forma bastante fraca com Kd maiores do que $100 \mu\text{M}$. Além disso, a especificidade de qualquer um deles com relação a uma ou outra galectina permanece uma questão de discussão significativa, devido, fundamentalmente, à homologia estrutural conservada dos CRDs na família das galectinas. Outro ponto, é que poucos destes compostos foram testados *in vivo*, e possuem certas desvantagens para aplicações clínicas, como baixa biodisponibilidade, suscetibilidade à hidrólise por glicosidases, além de um rápido *clearance*. No que diz respeito à inibição de galectinas, somente um inibidor baseado em galactosídeos (DAVANAT™) chegou em fase de testes clínicos, não tendo superado fase 1 até o

momento. Atualmente, o único tipo de pequenas moléculas inibidoras não baseados em carboidratos, desenvolvidos para da Gal1, são peptídeos e peptídeos miméticos (BLANCHARD et al., 2014, MAYO et al., 2001, WANG et al., 2012) os quais incluem os aminoácidos não naturais funcionalizados e multivalentes (TEJLER et al., 2006). Até o momento a descoberta de pequenas moléculas inibidoras da função lectínica da Gal1, diferentes dessas 3 classes de compostos supracitadas, ainda não foi documentada.

Apesar dos avanços relacionados às proteínas recombinantes e aos anticorpos para suas aplicações clínicas como moléculas de função inibitória, existem desvantagens significativas no desenvolvimento de inibidores de galectinas baseados nestes compostos, como por exemplo, a imunogenicidade advinda de seu uso crônico e por serem produtos biológicos têm altos custos de produção, resultando em tratamentos dispendiosos aos pacientes.

Dessa forma, os aptâmeros de DNA, oligonucleotídeos sintéticos, simples fita e de cadeias curtas, surgem como uma nova classe de moléculas com potencial aplicação tanto no desenvolvimento de inibidores terapêuticos para Gal1, bem como para o desenvolvimento de dispositivos (*nano devices*) para detecção desta proteína em amostras biológicas. Os aptâmeros se apresentam como uma alternativa com metodologia de simples seleção, baixo custo de síntese e de fácil otimização para adaptação na aplicação *in vivo* (Ellington et al., 1990).

1.5 Aptâmeros

Atualmente, a química combinatorial é uma das ferramentas mais promissoras à disposição da indústria farmacêutica, principalmente quando se trata do desenvolvimento de novas moléculas com fins terapêuticos. De forma simplificada, sua aplicação constitui-se de três etapas: a síntese de uma biblioteca molecular com aleatoriedade entre seus componentes, a seleção frente a um alvo específico e finalmente a caracterização do complexo alvo-ligante formado.

Nesse sentido, os ácidos nucleicos são compostos de vasto potencial de aplicação neste campo, não apenas pela versatilidade de suas estruturas secundárias e terciárias bem definidas, mas também pela facilidade de síntese. Recentemente, uma série de avanços tecnológicos permitiu o desenvolvimento de métodos de evolução pressionada *in vitro* que viabilizaram a descoberta de

pequenas sequências de oligonucleótidos capazes de ligarem-se a uma grande variedade de alvos (de íon à célula) (SHAMAH et al., 2008 e GOLD et al., 2012).

Em 1990, Tuerk, Gold, Ellington e Szostak desenvolveram as bases de uma técnica que permitiu a seleção de moléculas de ácidos nucleicos a partir de uma biblioteca sintética com mais de 10^{15} sequências. Essa técnica foi denominada de SELEX, do inglês *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment* (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial) e a nova classe de ligantes gerados por esta técnica, derivada dos ácidos nucleicos de cadeia curta, foi denominada de aptâmero (do latim *aptus* –apto, que encaixa e do grego *meros* – parte, pedaço), também conhecidos como "anticorpo sintético" (ELLINGTON et al., 1990 e TUERK et al., 1990).

A técnica SELEX já viabilizou a seleção de aptâmeros com alta especificidade e seletividade para diferentes classes de alvos, desde moléculas pequenas como ATP (ELLINGTON et al., 1990), e proteínas, como os príons (MERCY et al., 2006), até moléculas maiores, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (HARLEEN KAUR et al., 2012) e até mesmo células inteiras (MOON et al., 2015). No entanto, não há um protocolo padrão de seleção para todos os alvos, e a elaboração do procedimento SELEX pode variar conforme as características do alvo, do próprio aptâmero que se pretende selecionar, da biblioteca de oligonucleotídeos, bem como da aplicação final da molécula.

O ponto de partida para a técnica SELEX é o desenho e a síntese de uma biblioteca de oligonucleotídeos de cadeia simples (ssDNA), na qual cada sequência (molécula candidato a aptâmero) tem uma região central com sequência aleatória, contendo de 25 a 50 bases em média, flanqueadas por duas regiões com sequência de nucleotídeos constantes, as quais são fundamentais durante o processo de amplificação da biblioteca durante os sucessivos rounds de seleção.

Inicialmente essa biblioteca sintética de oligonucleotídeos contendo diversas sequências de candidatos a aptâmeros é aquecida e deixada resfriar lentamente para que os aptâmeros adotem suas conformações tridimensionais mais estáveis antes de entrarem em contato com o alvo. Após esta etapa as moléculas são colocadas em contato com o alvo por um período de incubação, de modo a selecionar as sequências que constituem os aptâmeros desejados. O procedimento SELEX envolve rodadas repetitivas de dois processos principalmente:

Os aptâmeros são uma classe única de moléculas, que podem ser selecionadas para ligarem-se a uma diversidade de alvos, com elevada sensibilidade, seletividade e especificidade, principalmente devido à sua forma tridimensional, que reconhece o alvo topograficamente. Assim essa nova classe de ligantes, se apresenta como potencial ferramentas de pesquisa tanto para o diagnóstico como para aplicações terapêuticas (JAYASENA et al., 1999, FERREIRA et al., 2007, PASTOR et al., 2013). Apesar do reconhecimento como "anticorpo sintético", os aptâmeros têm vantagens relevantes em relação à sua contrapartida. Além da seleção *in vitro*, sem imunização animal, são sintetizados quimicamente com elevado grau de pureza sem variação entre lotes durante a produção, em um processo facilmente escalonável e com custos relativamente baixo. Os aptâmeros podem sofrer desnaturação reversível em altas temperaturas, uma característica versátil na aplicação de carreadores em *drug delivery*. Além disso, os aptâmeros provocam mínima ou nenhuma imunogenicidade em aplicações terapêuticas, mesmo quando administrados em doses elevadas (MARTIN et al., 2002, FOY et al., 2007, ZHU et al., 2012). Os aptâmeros também são suscetíveis à modificação química, como a conjugação de sondas ou com grupos funcionais (amino, tiol, etc) para imobilização em diversas matrizes, para montagem de biossensores (LIM et al., 2009). Algumas aplicações diagnósticas dos aptâmeros envolveram a detecção de citocinas e fatores de crescimento (VICENS et al., 2005 e LAI et al., 2007), bem como para detecção de trombina, a última protease envolvida na cascata de coagulação, e que possui importante relação com diversas doenças cardiovasculares (GE et al., 2011). Na última década, os aptâmeros anti-trombina estão entre os mais pesquisados, com grande número de publicações relacionadas a detecção desta proteína (XIAO et al., 2005 e MIR et al., 2006). A aplicação dos aptâmeros em estudos proteômicos também tem sido explorada, além do desenvolvimento de ensaios bioanalíticos (BOCK et al., 2004), de inibição enzimática e de receptores (SURUGIU et al., 2005 e PESTOURIE et al., 2005) e no desenvolvimento de ribozimas e aptazimas (DAVIDSON et al., 2005), além de terapia genética e *drug delivery* (PATIL et al., 2005)

Os aptâmeros geralmente são artificialmente selecionados a partir de um grande conjunto de sequências aleatórias, mas alguns autores também reconhecem a existência de aptâmeros naturais, os riboswitches, que são complexos domínios enovelados de RNA mensageiros que servem como receptores para metabólitos

específicos e atuam no controle da expressão gênica (MANDAL et al., 2004; COPPINS et al. 2007; ROTH et al., 2009). Estes podem ser utilizados tanto em pesquisas de base como para fins terapêuticos, como fármacos macromoleculares. Além disso, podem ser combinados com ribozimas para se auto clivarem na presença de seus alvos, gerando sinais (CHELSEA et al., 2016). Os aptâmeros não modificados são rapidamente eliminados da corrente sanguínea, com uma meia-vida da ordem de minutos a horas, principalmente devido à ação de endonucleases e ao clearance renal, resultado das pequenas massas moleculares dos aptâmeros (ULRICH, 2009). Aptâmeros formados por nucleotídeos não modificados podem ser aplicados no tratamento de condições transitórias, como coagulação sanguínea, por exemplo. A rápida depuração do organismo, bem como a elevada seletividade e afinidade dessas moléculas para com seus alvos, também representa vantagens na aplicação em diagnóstico por imagens *in vivo*. Um exemplo é a utilização do aptâmero anti-tenascina-C (TTA1), uma proteína da matriz extracelular de expressão aumentada em tumores de mama, pulmão, cólon, próstata, glioblastoma e linfoma, desenvolvido pela Schering AG para aquisição de imagens de tumores (GERMER et al., 2013). Um outro exemplo é um aptâmero de RNA com especificidade pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), que auxilia no diagnóstico e prognóstico do glioblastoma multiforme (GERMER et al., 2013).

É indiscutível que os aptâmeros se tornaram ferramentas extremamente promissoras no tratamento de várias patologias (NIMJEE et al., 2005) e é crescente o número dessas moléculas que atualmente estão passando por ensaios pré-clínicos e clínicos (SUNDARAM et al., 2013, XU et al., 2015, SOLDEVILLA et al., 2016).

No presente trabalho, desenhou-se uma biblioteca de DNA com uma região variável de 49 nucleotídeos para se aplicar a técnica SELEX utilizando a galectina-1 humana recombinante como nosso alvo. Esse estudo ressalta que os compostos anti-galectina baseados na tecnologia de aptâmeros podem representar uma nova ferramenta diagnóstica e terapêutica, principalmente no tratamento de tumores, devido à magnitude das características apresentadas por essas moléculas versáteis.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo selecionar e caracterizar aptâmeros de DNA que se liguem à galectina-1 humana recombinante (Gal1) em sua forma nativa e inibam a atividade lectínica desta proteína

2.2 Objetivos Específicos

- I – Validação de uma nova metodologia de seleção (SELEX) de aptâmeros de DNA contra proteínas recombinantes.
- II – Avaliação da interação dos aptâmeros selecionados contra a Gal1 humana recombinante em sua forma nativa e alquilada.

5. Conclusões

O foco principal desta tese foi selecionar aptâmeros funcionais para a galectina-1 humana recombinante capazes de se ligar nesta proteína e de inibir sua função *in vitro*, através de uma metodologia de SELEX simples, rápida e eficiente. O racional envolvido nesse objetivo baseia-se no fato desta lectina ser um potencial biomarcador da progressão tumoral e, portanto, a quantificação de sua taxa de expressão pode ser usada no acompanhamento em diversas fases da progressão patológica como fator preditivo no prognóstico de pacientes oncológicos. Além disso, a Gal1 também é um potencial candidato como alvo terapêutico, principalmente devido ao seu envolvimento nos processos de metástase, angiogênese e escape do sistema imune na tumorigênese, observado em diversos modelos *in vivo*.

Neste trabalho, foi descrito em detalhes o processo de seleção e caracterização de aptâmeros ant-Gal1, definindo-se suas sequências nucleotídicas, motivos de maiores frequências, bem como suas estruturas secundárias teóricas preditas. Identificou-se com sucesso dois aptâmeros de DNA capazes de interagirem e bloquearem a atividade lectínica, *in vitro*, da Gal1. Esses resultados foram obtidos pela avaliação da inibição da aglutinação de hemácias mediada por galectina-1, em um ensaio de hemaglutinação. Ambos aptâmeros demonstraram capacidade inibitória, em baixas concentrações (micromolar), para a galectina em sua forma nativa, mas não inibiram a Gal1 derivatizada com agente alquilante iodoacetamida, mesmo esta permanecendo com uma estrutura altamente similar a Gal1 nativa.

O ensaio de termoflúor confirmou que ambos aptâmeros se ligam tanto à Gal1 nativa quanto à derivatizada com agente alquilante, porém de maneiras distintas, dada suas influências opostas com relação a variação da temperatura de *melting*. A queda nas intensidades de fluorescência observada nos ensaios de espectroscopia possibilitou a quantificação da constante de dissociação (K_d), que está na faixa de nanomolar (32 nM), entre o aptâmero 4 e Gal1, calculada pela equação de Stern-Volmer.

Baseado no que foi previamente descrito, conclui-se que os objetivos pré-estabelecidos para este trabalho foram alcançados com sucesso, tanto no que diz respeito a validação de uma nova metodologia de seleção (SELEX), bem como na confirmação das capacidades inibitórias, *in vitro*, dos aptâmeros selecionados em relação as atividades lectínica da galectina-1 humana recombinante.

6. Referências Bibliográficas

ANDRE, S. et al. Anti-galectin compounds as potential anti-cancer drugs. *Curr Med Chem*, v. 13, n. 29, p. 3513-3527. 2006.

BAILEY, T. L. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*, v. 37, n. Web Server issue, p. W202-208. 2009.

BAILEY, T. L.; ELKAN, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, v. 2, n., p. 28-36. 1994.

BERTOZZI, C. R.; RABUKA, D. Structural Basis of Glycan Diversity. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., FREEZE, H. H., STANLEY, P., BERTOZZI, C. R., HART, G. W. ETZLER, M. E. *Essentials of Glycobiology*, v., 2009

BLANCHARD, H.; BUM-ERDENE, K.; HUGO, M. W. Inhibitors of Galectins and Implications for Structure-Based Design of Galectin-Specific Therapeutics. *Australian Journal of Chemistry*, v. 67, n. 12, p. 1763-1779. 2014.

BLASER, C. et al. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol*, v. 28, n. 8, p. 2311-2319. 1998.

BOCK, C. et al. Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis. *Proteomics*, v. 4, n. 3, p. 609-618. 2004.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*, v. 119, n. 3091, p. 419. 1954.

CAMBY, I. et al. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, v. 16, n. 11, p. 137R-157R. 2006.

CAVADA, B. S. et al. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. v. v. 8, n., p. 1996.

CHARLTON, J.; SMITH, D. Estimation of SELEX pool size by measurement of DNA renaturation rates. *RNA*, v. 5, n. 10, p. 1326-1332. 1999.

CHOUFANI, G. et al. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical

aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer*, v. 86, n. 11, p. 2353-2363. 1999.

CITARTAN, M. et al. Asymmetric PCR for good quality ssDNA generation towards DNA aptamer production. 2012. 125-131 p.

CUMMINGS, R. D.; ETZLER, M. E. Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. In: VARKI, A. *Essentials of Glycobiology*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v., 2009, p.784

D'HAENE, N. et al. The Differential Expression of Galectin-1 and Galectin-3 in Normal Lymphoid Tissue and Non-Hodgkin's and Hodgkin's Lymphomas. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, v. 18, n. 3, p. 431-443. 2005.

DAVIDSON, E. A.; ELLINGTON, A. D. Engineering regulatory RNAs. *Trends in Biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 109-112.

DETTIN, L. et al. Regulated expression and ultrastructural localization of galectin-1, a proapoptotic beta-galactoside-binding lectin, during spermatogenesis in rat testis. *Biol Reprod*, v. 68, n. 1, p. 51-59. 2003.

DI LELLA, S. et al. Characterization of the galectin-1 carbohydrate recognition domain in terms of solvent occupancy. *J Phys Chem B*, v. 111, n. 25, p. 7360-7366. 2007.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLOGEL, M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*, v. 1760, n. 4, p. 616-635. 2006.

ELAD-SFADIA, G. et al. Galectin-1 augments Ras activation and diverts Ras signals to Raf-1 at the expense of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, v. 277, n. 40, p. 37169-37175. 2002.

ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, v. 346, n. 6287, p. 818-822. 1990.

FENG, X.-Z. et al. Investigation of the interaction between acridine orange and bovine serum albumin. *Talanta*, v. 47, n. 5, p. 1223-1229. 1998.

FERREIRA, C. S. M.; MISSAILIDIS, S. Aptamer-based therapeutics and their potential in radiopharmaceutical design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n., p. 63-76. 2007.

FISCHER, C. et al. Galectin-1 interacts with the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem*, v. 280, n. 44, p. 37266-37277. 2005.

FOY, J. W. et al. Local tolerance and systemic safety of pegaptanib sodium in the dog and rabbit. *J Ocul Pharmacol Ther*, v. 23, n. 5, p. 452-466. 2007.

FRED BREWER, C. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1572, n. 2-3, p. 255-262. 2002.

FREEZE, H. H.; SCHACHTER, H. Genetic Disorders of Glycosylation. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D. AL, E. *Essentials of Glycobiology*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v., 2009

FUKUSAKI, E.-I. et al. SELEX for Tubulin Affords Specific T-Rich DNA Aptamers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 11, n. 22, p. 2927-2930. 2001.

GABIUS, H.-J. et al. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1572, n. 2, p. 165-177. 2002.

GAUTHIER, L. et al. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 20, p. 13014-13019. 2002.

GE, J. et al. Qualitative and quantitative thrombin analysis in serum using aptamers and gold nanoparticles through progressive dilution. *Analytical Biochemistry*, v. 413, n. 1, p. 75-77. 2011.

GERMER, K.; LEONARD, M.; ZHANG, X. RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 4, n. 1, p. 27-40. 2013.

GIGUÈRE, D. et al. Aryl O- and S-galactosides and lactosides as specific inhibitors of human galectins-1 and -3: Role of electrostatic potential at O-3. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 6, p. 1668-1672. 2006.

GILLENWATER, A. et al. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, v. 18, n. 5, p. 422-432. 1996.

GOLD, L. et al. Aptamers and the RNA world, past and present. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 4, n. 3, p. 2012.

GRUTZMANN, R. et al. Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia*, v. 6, n. 5, p. 611-622. 2004.

GUARDIA, C. M. et al. Structural basis of redox-dependent modulation of galectin-1 dynamics and function. *Glycobiology: Oxford University Press*. 24: 428-441 p. 2014.

HE, C.-Z. et al. Single-primer-limited amplification: A method to generate random single-stranded DNA sub-library for aptamer selection. *Analytical Biochemistry*, v. 440, n. 1, p. 63-70. 2013.

HE, J.; BAUM, L. G. Presentation of galectin-1 by extracellular matrix triggers T cell death. *J Biol Chem*, v. 279, n. 6, p. 4705-4712. 2004.

HORIE, H. et al. Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci*, v. 24, n. 8, p. 1873-1880. 2004.

HULL, C. M.; ANMANGANDLA, A.; BEVILACQUA, P. C. Bacterial Riboswitches and Ribozymes Potently Activate the Human Innate Immune Sensor PKR. *ACS Chemical Biology*, v. 11, n. 4, p. 1118-1127. 2016.

INGRASSIA, L. et al. A lactosylated steroid contributes in vivo therapeutic benefits in experimental models of mouse lymphoma and human glioblastoma. *J Med Chem*, v. 49, n. 5, p. 1800-1807. 2006.

ISHIDA, K. et al. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm*, v. 11, n. 2, p. 91-105. 2003.

JAMES, W. Aptamers. In: MEYERS, R. A. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*: Wiley-Blackwell, v., 2000, p.4848–4871

JAYASENA, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 1628-1650. 1999.

JOHNSON, A. E. Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. *Traffic*, v. 6, n. 12, p. 1078-1092. 2005.

KADOYA, T.; HORIE, H. Structural and functional studies of galectin-1: a novel axonal regeneration-promoting activity for oxidized galectin-1. *Curr Drug Targets*, v. 6, n. 4, p. 375-383. 2005.

KANG, J.; LEE, M. S.; GORENSTEIN, D. G. The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *J Biochem Biophys Methods*, v. 64, n. 2, p. 147-151. 2005.

KAUR, H.; YUNG, L. Y. Probing high affinity sequences of DNA aptamer against VEGF165. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e31196. 2012.

KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*, v. 26, n. 3, p. 219-230. 1995.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta*, v. 1572, n. 2-3, p. 187-197. 2002.

LAI, R. Y.; PLAXCO, K. W.; HEEGER, A. J. Aptamer-based electrochemical detection of picomolar platelet-derived growth factor directly in blood serum. *Anal Chem*, v. 79, n. 1, p. 229-233. 2007.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press. 1983

LEFRANC, F.; BROTCCHI, J.; KISS, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol*, v. 23, n. 10, p. 2411-2422. 2005.

LEPPANEN, A. et al. Dimeric galectin-1 binds with high affinity to alpha2,3-sialylated and non-sialylated terminal N-acetyllactosamine units on surface-bound extended glycans. *J Biol Chem*, v. 280, n. 7, p. 5549-5562. 2005.

LIM, Y. C.; KOUZANI, A. Z.; DUAN, W. Aptasensors Design Considerations. In: CAI Z., L. Z., KANG Z., LIU Y. *Computational Intelligence and Intelligent Systems*. ISICA. Communications in Computer and Information Science. Berlin, Heidelberg: Springer, v. 51, 2009

LOPEZ-LUCENDO, M. F. et al. 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. *J Mol Biol*, v. 343, n. 4, p. 957-970. 2004.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1572, n. 2-3, p. 198-208. 2002.

MANDAL, M.; BREAKER, R. R. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, n. 6, p. 451-463. 2004.

MARIMUTHU, C. et al. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst*, v. 137, n. 6, p. 1307-1315. 2012.

MARSHALL, K. A.; ROBERTSON, M. P.; ELLINGTON, A. D. A biopolymer by any other name would bind as well: a comparison of the ligand-binding pockets of nucleic acids and proteins. *Structure*, v. 5, n. 6, p. 729-734.

MARSHALL, K. A.; ROBERTSON, M. P.; ELLINGTON, A. D. A biopolymer by any other name would bind as well: a comparison of the ligand-binding pockets of nucleic acids and proteins. *Structure*, v. 5, n. 6, p. 729-734. 1997.

MATULIS, D. et al. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry*, v. 44, n. 13, p. 5258-5266. 2005.

MAYO, K. H.; VAN DER SCHAFT, D. W.; GRIFFIOEN, A. W. Designed beta-sheet peptides that inhibit proliferation and induce apoptosis in endothelial cells. *Angiogenesis*, v. 4, n. 1, p. 45-51. 2001.

MERCEY, R. et al. Fast, reversible interaction of prion protein with RNA aptamers containing specific sequence patterns. *Arch Virol*, v. 151, n. 11, p. 2197-2214. 2006.

MIR, M.; VREEKE, M.; KATAKIS, I. Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor. *Electrochemistry Communications*, v. 8, n. 3, p. 505-511. 2006.

MISSAILIDIS S, THOMAIDOU D, BORBAS KE, PRICE MR. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J Immunol Methods*. v. 296, n. 1-2, p. 45-62. 2005.

MOON, J. et al. Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of *Staphylococcus Aureus*-Specific DNA Aptamers. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 15, n. 4, p. 8884-8897. 2015.

NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*, v. 10, n. 2, p. 267-275. 2005.

NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc*, v. 2, n. 9, p. 2212-2221. 2007.

OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*, v. 19, n. 7-9, p. 527-535. 2002.

PANDE, A. H. et al. Oxidation of goat hepatic galectin-1 induces change in secondary structure. *Protein Pept Lett*, v. 10, n. 3, p. 265-275. 2003.

PANTOLIANO, M. W. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen*, v. 6, n. 6, p. 429-440. 2001.

PASTOR, F. et al. CD28 aptamers as powerful immune response modulators. *Mol Ther Nucleic Acids*, v. 2, n., p. e98. 2013.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G.; BURGESS, D. J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: a comprehensive review. *AAPS J*, v. 7, n. 1, p. E61-77. 2005.

PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*, v. 378, n. 6558, p. 736-739. 1995.

PESTOURIE, C.; TAVITIAN, B.; DUCONGE, F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie*, v. 87, n. 9-10, p. 921-930. 2005.

PHILLIPS, K.; DE LA PENA, A. H. The combined use of the Thermofluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. *Curr Protoc Mol Biol*, v. Chapter 10, n., p. Unit10 28. 2011.

PRIVALOV, P. L. Stability of proteins: small globular proteins. *Adv Protein Chem*, v. 33, n., p. 167-241. 1979.

RABINOVICH, G. A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ*, v. 6, n. 8, p. 711-721. 1999.

RABINOVICH, G. A. et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*, v. 23, n. 6, p. 313-320. 2002.

RABINOVICH, G. A. et al. Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. *Glycobiology*, v. 16, n. 3, p. 210-220. 2006.

RABINOVICH, G. A.; RUBINSTEIN, N.; TOSCANO, M. A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1572, n. 2-3, p. 274-284. 2002.

RASOULZADEH, F. et al. Fluorescence quenching study of quercetin interaction with bovine milk xanthine oxidase. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 72, n. 1, p. 190-193. 2009.

ROTBLAT, B. et al. Galectin-1(L11A) predicted from a computed galectin-1 farnesyl-binding pocket selectively inhibits Ras-GTP. *Cancer Res*, v. 64, n. 9, p. 3112-3118. 2004.

ROTH, A.; BREAKER, R. R. The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem*, v. 78, n., p. 305-334. 2009.

SACCHETTINI, J. C.; BAUM, L. G.; BREWER, C. F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry*, v. 40, n. 10, p. 3009-3015. 2001.

SALOMONSSON, E. et al. Monovalent interactions of galectin-1. *Biochemistry*, v. 49, n. 44, p. 9518-9532. 2010.

SCHMID, F. X. *Protein Structure: A Practical Approach*. England: Irl Press at Oxford University Press. 1990

SCHÜTZE, T. et al. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO—a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 4, p. e23-e23. 2010.

SCOTT, K.; WEINBERG, C. Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation. *Glycoconj J*, v. 19, n. 7-9, p. 467-477. 2002.

SHAMAH, S. M.; HEALY, J. M.; CLOAD, S. T. Complex target SELEX. *Acc Chem Res*, v. 41, n. 1, p. 130-138. 2008.

SHEN, J. et al. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res*, v. 64, n. 24, p. 9018-9026. 2004.

SOLDEVILLA, M. M.; VILLANUEVA, H.; PASTOR, F. Aptamers: A Feasible Technology in Cancer Immunotherapy. *J Immunol Res*, v. 2016, n., p. 1083738. 2016.

SONG, K. M.; LEE, S.; BAN, C. Aptamers and their biological applications. *Sensors (Basel)*, v. 12, n. 1, p. 612-631. 2012.

SUNDARAM, P. et al. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials. *Eur J Pharm Sci*, v. 48, n. 1-2, p. 259-271. 2013.

SURUGIU-WARNMARK, I. et al. Selection of DNA aptamers against rat liver X receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 332, n. 2, p. 512-517. 2005.

SZOKE, T. et al. Prognostic significance of endogenous adhesion/growth-regulatory lectins in lung cancer. *Oncology*, v. 69, n. 2, p. 167-174. 2005.

TEJLER, J.; LEFFLER, H.; NILSSON, U. J. Synthesis of O-galactosyl aldoximes as potent LacNAc-mimetic galectin-3 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 15, n. 9, p. 2343-2345. 2005.

TUERK, C.; GOLD, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, v. 249, n. 4968, p. 505-510. 1990.

ULRICH, H.; WRENGER, C. Disease-specific biomarker discovery by aptamers. *Cytometry A*, v. 75, n. 9, p. 727-733. 2009.

VARKI, A.; FREEZE, H. H.; GAGNEUX, P. 19. Evolution of Glycan Diversity. In: VARKI, A. CHRISPEELS, M. J. *Essentials of Glycobiology*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v., 1999

VARKI, A.; SHARON, N. Historical Background and Overview. In: VARKI, A. CHRISPEELS, M. J. *Essentials of Glycobiology*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v., 1999

VENKATESAN, V. et al. Optimisation of an asymmetric polymerase chain reaction assay for the amplification of single-stranded DNA from *Wuchereria bancrofti* for electrochemical detection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 6, p. 804-807. 2013.

VICENS, M. C. et al. Investigation of molecular beacon aptamer-based bioassay for platelet-derived growth factor detection. *Chembiochem*, v. 6, n. 5, p. 900-907. 2005.

WANG, C. et al. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *J Biotechnol*, v. 102, n. 1, p. 15-22. 2003.

WANG, J. B. et al. Advances and prospects of anginex as a promising anti-angiogenesis and anti-tumor agent. *Peptides*, v. 38, n. 2, p. 457-462. 2012.

WU, X. et al. Aptamers: active targeting ligands for cancer diagnosis and therapy. *Theranostics*, v. 5, n. 4, p. 322-344. 2015.

XI, J. et al. Optimization of conditions for amplification of chronic myeloid leukemia ssDNA aptamer by PCR. 2013. 422-424+429 p.

XIAO, Y. et al. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angew Chem Int Ed Engl*, v. 44, n. 34, p. 5456-5459. 2005.

YU, X. et al. Redox state influence on human galectin-1 function. *Biochimie*, v. 116, n., p. 8-16. 2015.

ZAMBENEDETTI, P.; GIORDANO, R.; ZATTA, P. Histochemical Localization of Glycoconjugates on Microglial Cells in Alzheimer's Disease Brain Samples by Using *Abrus precatorius*, *Maackia amurensis*, *Momordica charantia*, and *Sambucus nigra* Lectins. *Experimental Neurology*, v. 153, n. 1, p. 167-171. 1998.

ZHENG, J. et al. In Vitro Selection of Oligonucleotide Acid Aptamers Against Pathogenic *Vibrio Alginolyticus* By SELEX. 2010. 1456-1462 p.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, v. 31, n. 13, p. 3406-3415. 2003.