



Universidade Federal do Maranhão
Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DA LECTINA DE
Canavalia brasiliensis (ConBr) NO CONTROLE DE
*Haemonchus contortus***

KARLA LILIAN RODRIGUES BATISTA

CHAPADINHA

2018

KARLA LILIAN RODRIGUES BATISTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DA LECTINA DE
Canavalia brasiliensis (ConBr) NO CONTROLE DE
*Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza
Teixeira

CHAPADINHA

2018

KARLA LILIAN RODRIGUES BATISTA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DA LECTINA DE
Canavalia brasiliensis (ConBr) NO CONTROLE DE
*Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Ivo Alexandre Leme da Cunha
Examinador interno
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Samuel Vieira Brito
Examinador externo
Universidade Federal do Maranhão

“A persistência é o caminho do êxito.”
Charles Chaplin

Dedico este trabalho a minha mãe **Francisca Batista**, pelo esforço infinto em pro-
do melhor para mim. A minha irmã **Flávia Teles** *in memória*, pelos sete anos que
compartilhamos. A minha avó **Antonia Rodrigues** *in memória*, pelo exemplo de
mulher de fibra e por me proporcionar ótimas lembranças de cuidado e amor. A
minha tia **Maria Batista** pelo incentivo em todos os aspectos no meu crescimento
profissional e pessoal. Ao meu amado esposo **Yago Costa**, pela paciência e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo zelo por minha vida demonstrado em cuidado e amor todos os dias, por me dar forças para enfrentar um dia de cada vez na busca da concretização de meus objetivos.

À minha mãe Francisca Batista, mulher guerreira que não mede esforços para me ajudar, que saiu do conforto do seu lar para estar comigo desde a graduação em outro Estado, mesmo sem saber como iríamos viver, mas com uma fé sem igual de que Deus nos supriria, e assim aconteceu.

À minha amada família por toda a ajuda, cumplicidade, amor e incentivo de sempre.

À meu esposo, melhor amigo e cúmplice Yago Costa, por entender meus momentos de reclusão, pela paciência, por me incentivar a buscar meu crescimento profissional e acreditar no meu potencial.

Agradeço ao Prof. Dr. Claudener Teixeira por ser mais que um orientador, um amigo e uma inspiração. Sou grata pela ajuda em todos os aspectos, pela confiança, apoio, disponibilidade, compreensão e incentivo. Foi uma experiência maravilhosa, serei eternamente grata.

Aos professores Ivo Cunha e Samuel Brito por aceitarem compor minha banca examinadora.

Ao professor Marcos Bonfim pelos conselhos e incentivo na jornada acadêmica.

Aos professores Livio Costa-Júnior e Alexandra Soares e aluna Carolina Silva do Laboratório de Controle de Parasitas da Universidade Federal do Maranhão pela excelente contribuição e parceria com os ensaios parasitológicos.

À toda a querida equipe do Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular, ganhei amigos que vou levar pra vida, Ana, Valdenice, Rafael, Renato e Professora Daniele, e as colegas novates Helena, Larissa, Sheylla, Évelyn, sou grata por toda a ajuda, vocês são maravilhosos.

À todos os professores que participaram da minha jornada desde a graduação, sou grata pelos ensinamentos, que foram, são e serão muito importantes para a minha vida profissional e pessoal.

À todas as amigadas conquistadas no mestrado, em especial Elinalva, as “Hellens”, Nathaly, Mary, Ruan, os “Rafaels” e até o Aylpy.

À todos os meus amigos, que contribuem para deixarem meus dias mais leves, obrigada pela amizade e incentivo, é sempre bom contar com vocês.

À todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

Aos funcionários do FINEP e do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por facilitarem nosso dia-a-dia.

Aos órgãos de fomento, Capes, CNPq e FAPEMA pela disponibilidade de realizar esta pesquisa com apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por por me abrirem as portas.

Obrigada!

SUPORTE FINANCEIRO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

SUMÁRIO

	p.
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Haemoncose na ovinocaprinocultura.....	20
2.2 Ciclo biológico e características estruturais de <i>H.contortus</i>.....	22
2.3 Controle da verminose e resistência parasitária.....	24
2.4 Lectinas vegetais.....	27
2.4.1 Lectina das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).....	28
2.5 Glicanos de parasitas.....	30
2.6 Docking molecular.....	31
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objrtivos Específicos.....	33
Referências.....	34
CAPÍTULO II – Structural analysis and anthelmintic activity of <i>Canavalia brasiliensis</i> lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of <i>Haemonchus contortus</i>.....	45
1. Introduction.....	48
2. Material and Methods.....	49
2.1 <i>Protein purification</i>	49
2.2 <i>Hemagglutination activity and inhibition assays</i>	50
2.3 <i>Molecular docking</i>	50
2.4 <i>Biological assays</i>	51

2.4.1	<i>Obtaining nematodes</i>	51
2.4.2	<i>Egg hatch test</i>	52
2.4.3	<i>Larval exsheathment test</i>	52
2.4.4	<i>Larval development test</i>	53
2.5	<i>Data analysis</i>	53
3.	Results	53
3.1	<i>Purification and carbohydrate affinity</i>	53
3.2	<i>In vitro tests against H. contortus</i>	53
3.3	<i>Molecular docking</i>	53
4.	Discussion	54
	Conflict of interest.....	57
	Acknowledgments.....	57
	References.....	57
	FIGURE AND TABLE LEGENDS.....	65

LISTA DE ABREVIações

A.E.	Atividade específica
CIM	Concentração inibitória mínima
Cm	Centímetros
Con A	<i>Concanavalina A</i>
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i>
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
h	Horas
ITC	Microcalorimetria de titulação isotérmica
kDa	Kilodalton
L	Litros
Man	Manose
MDS	Simulação de dinâmica molecular
mg	Miligramas
mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitros
Min	Minutos
mL	Mililitros
mL min ⁻¹	Mililitros por minutos
NI	Não inibiu
nm	Nanômetros
PAGE	Eletroforese em gel e poliacrilamida
pH	Potencial de hidrogênio
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PI	Pico I
PII	Pico II
SDS	Dodecil sulfato de sódio
U.H.	Unidade de hemaglutinação
µg	Microgramas
µL	Microlitros

LISTA DE TABELAS

Capítulo I- Considerações Gerais

Tabela I. Principais princípios ativos de drogas anti-helmínticas comerciais e seus mecanismos de ação e de resistência em *H. contortus*.....22

Capítulo II- Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*.

Table I. Inhibitory effect of monosaccharides and disaccharides on ConBr hemagglutinating activity..... 65

Table II. Moldock score (MDS) and isothermal titration microcalorimetry (ITC) data of core trimannoside on ConBr and ConA lectins.....66

Table III. Polar contacts between ConBr and core trimannoside glycan of *Haemonchus contortus*.....66

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I- Considerações Gerais

Figura 1. Ciclo biológico e características estruturais de *H. contortus*.....24

Figura 2. Figura 1. Parte vegetativa de *Canavalia brasiliensis*, com flores e frutos e estrutura tridimensional em sua forma nativa. (A) *Canavalia brasiliensis*, (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae). (B) Estrutura tridimensional, da lectina ConBr.....26

Capítulo II- Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*.

Figura 1. ConBr purification by affinity chromatography (A) Chromatogram of *Canavaliabrasiliensis* crude extract in Sephadex G-50 column. (B) SDS-PAGE. Lane 1: Molecular mass markers (phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa and α -lactalbumin, 14.4 kDa); Lane 2: PII.....63

Figura 2. Inhibitory effect of ConBr on the development of *Haemonchus contortus*. The graph shows the inhibition of development of *H. contortus* larvae at different concentrations of ConBr. L1 and L3 stages were quantified relative to the respective untreated control. Bars represent the means of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviations. Half inhibition concentration (IC_{50}) in $mg mL^{-1}$, confidence limits (CL) and coefficient of determination (R^2) were added at the top of the graph.....64

Figura 3. Molecular docking of ConBr with core trimannoside glycan of *H. contortus*. (A) Representation of the carbohydrate recognition domain of ConBr (light blue) complexed with core trimannoside (green). (B) Prediction of H-bonds and van der Waals interactions in the carbohydrate recognition domain. Distances in Å.....64

Figura 4. Carbohydrate binding site structural alignment of ConA-like lectins. ConBr (light blue) structural alignment with ConA (PDB code 1CVN) (yellow) complexed

with core trimannoside. Green and yellow ligands are from the ConBr and ConA structures, respectively.....65

RESUMO

Entre as principais limitações para que a ovinocaprinocultura se torne autossustentável e comercialmente viável destacam-se as doenças parasitárias, controlar essas parasitoses com eficiência tem se tornado um desafio, visto que o fenômeno da resistência aos produtos químicos sintéticos comumente utilizados tem desfavorecido o controle efetivo dos parasitas, sendo os nematóides gastrintestinais os de maior importância por acarretarem inúmeros prejuízos econômicos. *Haemonchus contortus* é um dos parasitas economicamente mais importantes que infectam pequenos ruminantes em todo o mundo. Este nematóide mostrou uma grande capacidade de desenvolver resistência a drogas anti-helmínticas, exigindo o desenvolvimento de abordagens alternativas de controle. Como as lectinas reconhecem e se ligam a carboidratos específicos e estruturas de glicano presentes nos parasitas, elas podem ser consideradas como uma alternativa para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito anti-helmíntico da lectina das sementes *Canavalia brasiliensis* (ConBr) contra o *H. contortus* e avaliar uma possível interação do ConBr com glicanos desse parasita por meio de docking molecular. ConBr mostrou inibição significativa do desenvolvimento larval de *H. contortus* com IC₅₀ de 0,26 mg/mL. Ensaios de ancoragem molecular revelaram que glicanos contendo o núcleo tri-manosídeo Man (α 1-3) Man (α 1-6) Man de *H. contortus* interagem no domínio de reconhecimento de carboidratos de ConBr com um valor de interação de MDS = -248,77. Nossos achados sugerem que a inibição do desenvolvimento larval de *H. contortus* está diretamente relacionada ao reconhecimento do núcleo tri-manosídeo presente nos glicanos desses parasitas. Este trabalho é o primeiro a relatar as relações estrutura-função da atividade anti-helmíntica de lectinas de plantas, portanto, espera-se que essa abordagem possa colaborar como bases referenciais para trabalhos posteriores, quanto a caracterização e o comportamento da interação entre essas moléculas, além de poder auxiliar em uma possível elaboração de fármacos com efeitos antiparasitários.

Palavras-chave: Anti-helmíntico; parasita; acoplamento molecular; haemoncose.

ABSTRACT

Among the main limitations for sheep farming to become self-sustaining and commercially viable are parasitic diseases, controlling these parasites efficiently has become a challenge, since the phenomenon of resistance to the commonly used synthetic chemicals has disadvantaged the effective control of the parasites. parasites, being the gastrointestinal nematodes the most important because they entail numerous economic losses. *Haemonchus contortus* is one of the economically most important parasites that infect small ruminants around the world. This nematode showed a great capacity to develop resistance to anthelmintic drugs, requiring the development of alternative control approaches. As lectins recognize and bind to specific carbohydrates and glycan structures present in parasites, they can be considered as an alternative for the development of new antiparasitic drugs. In this sense, this work aimed to investigate the antihelminthic effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin against *H. contortus* and to evaluate a possible interaction of ConBr with glycans of this parasite by means of molecular docking. ConBr showed significant inhibition of larval development of *H. contortus* with IC₅₀ of 0.26 mg / mL. Molecular anchoring assays revealed that glycans containing the tri-mannoside core Man (α 1-3) Man (α 1-6) Man of *H. contortus* interact in the carbohydrate recognition domain of ConBr with an interaction value of MDS = -248, 77. Our findings suggest that the inhibition of the larval development of *H. contortus* is directly related to the recognition of the tri-mannosid nucleus present in the glycans of these parasites. This work is the first to report the structure-function relationships of the anthelmintic activity of plant lectins, so it is expected that this approach can collaborate as reference bases for later work, as the characterization and behavior of the interaction between these molecules, besides being able to aid in the possible elaboration of drugs with antiparasitic effects.

Keywords: Anti-helminth; parasite; molecular coupling; haemoncose.

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Entre as principais limitações para que a ovinocaprinocultura se torne autossustentável e comercialmente viável destacam-se as doenças parasitárias, controlar essas parasitoses com eficiência tem se tornado um desafio, visto que o fenômeno da resistência aos produtos químicos sintéticos comumente utilizados tem desfavorecido o controle efetivo dos parasitas, sendo os nematóides gastrintestinais os de maior importância por acarretarem inúmeros prejuízos econômicos (KUCHAI et al., 2012; ALEMU et al., 2014; MENGIST et al., 2014; NASAI et al., 2016). Entre estes nematoides, *Haemonchus contortus* destaca-se como o principal parasita, pela grande prevalência e patogenicidade devido à alta ingestão sanguínea no abomaso dos pequenos ruminantes, o que provoca sintomas como anemia, edema mandibular, podendo levar até a morte (VAN DEN BROM et al., 2013; MEDEROS et al., 2014; MENGIST et al., 2014; NASAI et al., 2016).

O controle de *H. contortus* depende principalmente da interrupção do ciclo de vida do parasita através da administração de anti-helmínticos químicos, que ao longo do tempo promovem resistência generalizada a essas drogas usadas com frequência (ALEMU et al., 2014; MELO et al., 2015).

Novas alternativas têm sido estudadas no sentido de promover métodos que auxiliem no controle dos nematóides gastrintestinais de pequenos ruminantes, entre elas, a utilização de compostos bioativos pode ser uma medida eficaz, além de ter caráter sustentável (GAÍNZA et al., 2015; GAÍNZA et al., 2016). Assim, tem sido ampla a atenção à identificação de metabólitos secundários e macromoléculas sintetizados pelas plantas (ALI-SHTAYEH et al., 2016; HERNÁNDEZ-VILLEGAS et al., 2011) tais como: compostos nitrogenados, terpenóides, fenóis, saponinas, alcalóides, inibidores de proteases e lectinas, os quais não estão diretamente envolvidos no crescimento, desenvolvimento ou reprodução vegetal, e que podem ser resíduos ou produtos de estresse ou mecanismos de defesa contra fitonematóides e insetos (SAVITHRAMMA et al., 2011).

Muitos parasitas helmintos produzem estruturas de glicanos complexos e proteínas de ligação a glicanos, as GBPs, que em geral são freqüentemente antigênicas e estão relacionadas a invasão do hospedeiro. A caracterização de glicanos de parasitas pode fornecer subsídios para a elaboração de vacinas, além de nortear novas formas de diagnóstico de doenças. Esses glicanos tem sido bastante estudado ao longo dos anos dada suas diversas estruturas e funções. Dentre os papéis desses componentes celulares, estudos de gliocobiologia mostram por exemplo seu envolvimento no dobramento, solubilidade e ainda na conformação do estado oligomérico de proteínas, bem como resistência a enzimas proteolíticas e anticorpos (VARKI et al., 2009), além de envolvimento na imunomodulação e imunidade protetora, como moléculas alvo para anticorpos antigênicos ou lectinas com efeitos antiparasitários (PASCHINGER; WILSON 2015).

Lectinas representam uma classe de proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente e especificamente a carboidratos ou a glicoconjugados (PEUMANS; VAN DAMME, 1998; NUNES et al., 2011). Estudos postulam que a capacidade dessas proteínas reconhecer e ligar-se a glicanos celulares está diretamente relacionado com o seu potencial nematicida (BUTSCHI et al., 2010).

Existem diferentes tipos de lectinas e são classificadas de acordo com sua estrutura geral- as merolectinas apresentam um único domínio de ligação a carboidratos, as hololectinas contém dois ou mais domínios, as quimerolectinas que consistem exclusivamente de um único domínio de ligação a carboidrato e por serem monovalente, são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995) e as superlectinas que consistem de no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 1996).

Entre as lectinas mais bem caracterizadas está a ConBr, uma lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), é uma lectina D-glicose/D-manose específica e suas atividade biológica estudadas tem sido averiguada em muitos modelos experimentais (CAVADA et al., 2001; SILVA et al., 2014) tais como, indução da produção de óxido nítrico por macrófagos (ANDRADE et al., 1999), indução de apoptose em linfócitos

(BARBOSA et al., 2001), atividade analgésica quando administrada via oral em camundongos (DE FREITAS PIRES et al., 2011), efeito neuroprotetor (VENSKE, 2014), podendo ser uma candidata no controle parasitário de pequenos ruminantes.

2. REFERENCIALTEÓRICO

2.1 Haemoncose na ovinocaprinocultura

A produção de pequenos ruminantes vem se intensificando ao longo dos anos nos países tropicais. No cenário brasileiro, o Nordeste destaca-se na exploração de ruminantes domésticos, principalmente na ovinocaprinocultura – produção de ovinos e caprinos a fim de obter carne, leite, couro e lã (JESUS JUNIOR; RODRIGUES; MORAES, 2010), sendo uma região de grande aptidão para este tipo de atividade econômica dada à adaptabilidade destes animais ao tipo de condições edafoclimáticas (MAIA et al., 2013).

Em números, a caprino e a ovinocultura nordestina compreendem aproximadamente 93% e 58% dos rebanhos nacionais respectivamente, o que de acordo com resultados preliminares do Censo Agropecuário publicado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) correspondem a 8,3 milhões de cabeças de caprinos e 13,7 milhões de cabeças de ovinos. Com base nesses dados, foi possível observar que o Nordeste tem se destacado como sendo a única região de crescimento simultâneo dos rebanhos de caprino e ovinos entre 2006 a 2017, onde o rebanho caprino apresentou um aumento de 13,38% passando de aproximadamente 6,4 milhões de cabeças para 7,6 milhões, e para ovinos um crescimento de 15,94%, ou seja, passando de 7,7 milhões de cabeças em 2006 para 9 milhões. Para o Estado do Maranhão, os rebanhos caprino e ovino correspondem cerca de mais de 356 mil e 276 mil cabeças respectivamente (IBGE, 2017).

O principal gargalo para a criação desses pequenos ruminantes tem sido o parasitismo por nematóides gastrointestinais, uma vez que, são responsáveis por ocasionar um grande impacto à produtividade o que leva a demanda de um alto custeio com medidas de controle (MOLENTO et al., 2013).

H. contortus pertence a Família Trichostrongylidae (MELO et al., 2003), este parasita é o nematóide de maior importância econômica em pequenos ruminantes, uma vez que além de ser de grande prevalência, apresenta alta patogenicidade. São responsáveis por elevadas taxas de mortalidade destes animais (MAIA et al., 2013).

A haemoncose consiste na doença adquirida pela ingestão de pasto contaminado com as larvas infectantes de terceiro estágio, as L3 (AMARANTE et al., 2014). O parasita instala-se no abomaso e realiza hematofagia por toda sua vida parasitária, podendo, em baixas infecções diminuir o desempenho produtivo e reprodutivo. Em contraste, as altas infecções causam anemia severa e hipoproteinemia, demonstradas por palidez das mucosas e edema da região submandibular, o que pode progredir até o óbito do seu hospedeiro (MAIA et al., 2013).

Esses problemas se agravam quando os animais são mantidos em pastagens super lotadas que, devido ao ciclo de desenvolvimento das larvas e ao manejo inadequado do local, geram contaminação massiva do solo pelas larvas (ANDRADE JÚNIOR, 2015) que são difíceis de controlar, principalmente na estação chuvosa, quando se recomenda, retirar os animais dos piquetes pela alta reinfecção parasitária (VOLTOLINI, 2011). Outro ponto a ser observado se refere ao uso indiscriminado de anti-helmínticos nos sistemas rotacionados no Brasil, o que favorece o fenômeno da resistência em função da deficiência de manejo correto, bem como a falta de conhecimento quanto a susceptibilidade destes helmintos à exposição as diferentes drogas (VIEIRA et al., 2010).

Os impactos da haemoncose se dão não só apenas no âmbito dos sistemas de produção pecuária tropical, mas também na segurança alimentar familiar incerta e perda de renda, além do que, determinadas doenças e as estratégias usadas para gerenciá-las tem impacto direto sob a saúde humana. Considerando os termos de mercado, o custeio das doenças é estimado em 35% a 50% do volume de negócios dentro do setor pecuário (BISPO, 2012), o que para o Brasil, chega a cerca de 600 milhões de dólares (MOLENTO, 2008).

2.2 Ciclo biológico e características estruturais de *H.contortus*

O ciclo é formado de duas fases: fase de vida livre e fase parasitária(fig.1). Na fase de vida livre, durante o desenvolvimento, o verme sofre estágios larvais em sequência L1, L2, L3 resultantes da eclosão dos ovos depositados junto às fezes no meio ambiente apresentando quatro ecdises até alcançar estágio adulto (ABRÃO et al., 2010).

Os estágios iniciais, que correspondem a larva de primeiro estágio (L1) e larva de segundo estágio (L2), ocorrem dentro do bolo fecal no ambiente. Nessa fase, as larvas se alimentam de microrganismos e matéria orgânica (AMARANTE, 2009, ABRÃO et al., 2010). Sob condições favoráveis de temperatura e umidade, as L2 se desenvolvem a L3, as larvas infectantes, que para completarem seu ciclo precisam entrar em contato com hospedeiros, ocasionando a infecção (ROBERTO et al., 2018).

De acordo com Abrão et al. (2010), a L3 representa a forma mais ativa e nos períodos de condições edafoclimáticas favoráveis, elas migram do solo e da base das touceiras para a parte superior das forrageiras, para serem ingeridas pelos animais durante o processo de desfolha no pastejo. Ao saírem nas fezes, as L3 migram para o pasto influenciadas pela intensidade e frequência das chuvas, temperatura e pelas características morfológicas das forrageiras (ROCHA et al., 2007, AMARANTE, 2009, LOPES et al., 2016). A medida que a temperatura aumenta elas migram para se protegerem, assegurando sua sobrevivência (ROGERS; SOMMERVILLE, 1960).

A fase parasitária se inicia após a ingestão das larvas infectantes (L3) no rúmen onde as larvas sofrem duas mudas a L4 e adulto. As L3 possuem cutículas ou bainhas duplas, onde a bainha externa garante uma proteção extra para as larvas no ambiente. Em contato com o líquido ruminal, essa bainha é perdida, o desembainhamento se dá em função de um conjunto de estímulos físico-químicos, tais quais, pH, presença de metano, CO₂ e temperatura (ROGERS; SOMMERVILLE, 1960; HERTZBERG et al., 2002). Dentro do hospedeiro, as larvas infectantes se instalam no órgão de predileção, onde se fixam e se desenvolvem a

L4 e em seguida para o indivíduo adulto (L5), apto a reprodução (Amarante et al., 2014).

Depois da cópula, as fêmeas iniciarão o processo de oviposição dando início a um novo ciclo biológico (MCDONALD, 2003; BAKKER et al., 2004; AMARANTE, 2009; ABRÃO et al., 2010). As fêmeas de *H. contortus* são ovíparas prolíferas (ONYAH; ARSLAN, 2005) e podem eliminar mais de 5.000 ovos a cada postura (UENO; GONÇALVES, 1998).

O ovo de *H. contortus* possui uma membrana formada por três camadas: vitelínica (externa), quitinosa (medial) além de uma porção basal lipoprotéica, que são digeridas durante a eclosão (MANSFIELD et al., 1992). Essa porção tem como principal constituinte estrutural o colesterol, que está relacionado com a fluidez e a permeabilidade da membrana (ROTHNIE et al., 2001).

Na evolução do desenvolvimento de *H. contortus*, certas alterações na membrana do ovo podem ocorrer com a finalidade de promover a liberação da larva. Geralmente, a eclosão se inicia por sinal adequado, o qual pode ser fomentado pelo hospedeiro ou pelo ambiente. Nos nematóides, o início do processo de eclosão se dá por meio de estímulos ambientais que resultam na liberação, pelo embrião, das chamadas enzimas de eclosão. Se acaso houver inibição de algumas destas enzimas culminará na diminuição da eclodibilidade ou mesmo inibição total (SOMMERVILLE; ROGERS, 1987). Encontradas no fluido de eclosão de *H. contortus* estas enzimas pertencem aos grupos das lipases, quitinases, proteases, leucinas aminopeptidases e α e β - glicosidases (ROGERS; BROOKS, 1977).

Nas larvas, uma cutícula forma o exoesqueleto (PAGE; JOHNSTONE, 2007). As L4, exibem uma cápsula bucal provisória, que fixa-se à mucosa abomasal para realizar hematofagia pela primeira vez (ALBA-HURTADO; MUÑOZGUZMÁN, 2013; EL-ASHRAM; SUO, 2017).

Os adultos podem ser facilmente identificados macroscopicamente por se instalarem em seu órgão de predileção, o abomaso. Seu tamanho, varia de 1,1 a 2,7 cm de comprimento. Microscopicamente, as fêmeas apresentam ovários brancos

enrolando-se em espiral envolta do intestino cheio de sangue, o macho possui um lobo dorsal sem simetria e espículos em ganchos. (LICHTENFELS, et al., 1994).

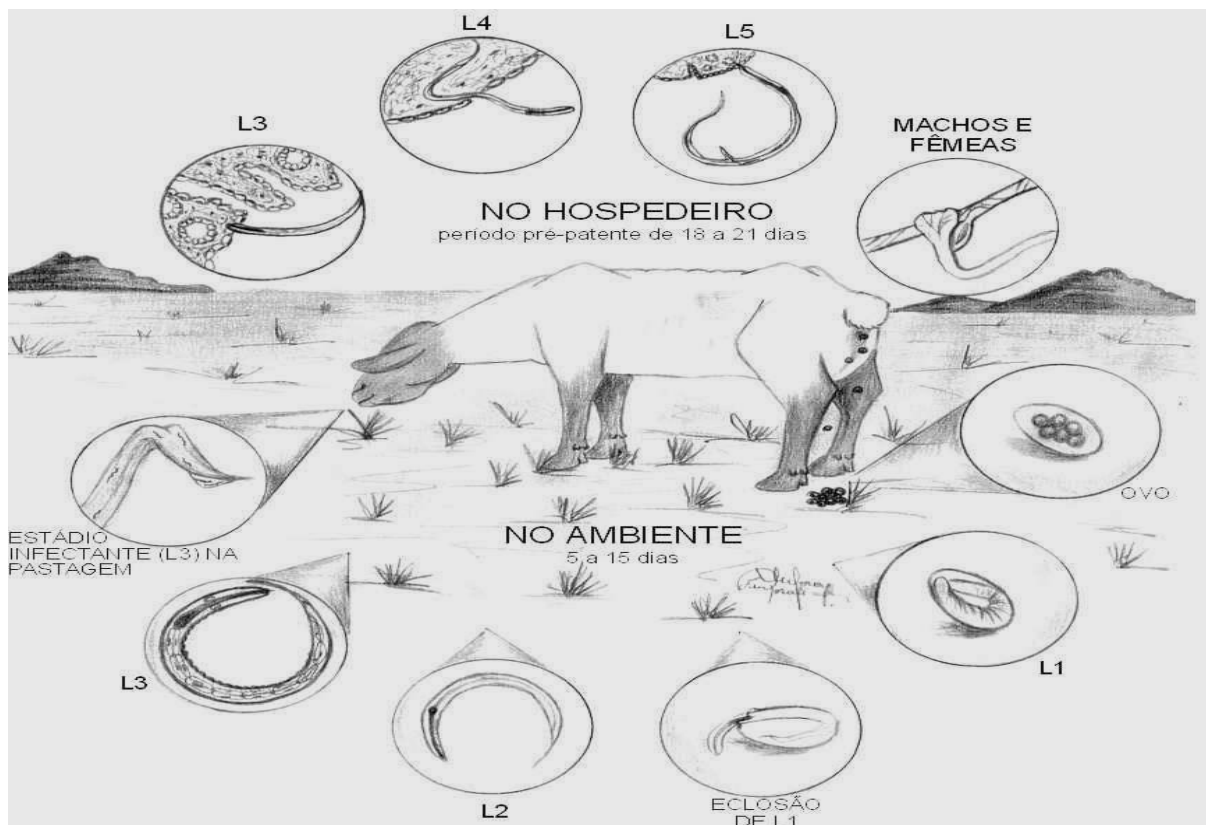


Figura 1. Ciclo biológico e características estruturais de *H. contortus*. Fonte: Moraes, 2002.

2.3 Controle da verminose e resistência parasitária

O principal método para o controle de nematóides parasitas, incluindo *Haemonchus contortus*, tem sido a administração de anti-helmínticos, entre os princípios ativos comumente utilizados estão os benzimidazóis, avermectinas, imidazotiazóis e salicilanilidas, em intervalos estáveis de 30 a 45 dias, ou então no auge da transmissão no verão, porém, o uso prolongado e irracional de anti-helmínticos levou ao desenvolvimento de resistência anti-helmíntica (FERNANDES et al., 2015; MELO et al., 2015; HOLSBACK et al., 2016). A resistência caracteriza-se pelo aumento na frequência de indivíduos que conseguem tolerar doses muito altas de droga quando comparado a uma população normal (BISPO; STEAR, 2003; VIEIRA, 2008).

O primeiro relato de resistência a anti-helmínticos utilizados contra nematóides gastrintestinais de ovinos foi com o tiabendazol (DRUDGE et al., 1964). Logo a resistência disseminou-se pelo mundo inteiro (WALLER et al. 1995; WALLER et al., 1996; CHARTIER et al., 1998). Para o Brasil, o primeiro trabalho de resistência a anti-helmínticos foi em ovinos no Rio Grande do Sul, ao tiabendazole (DOS SANTOS; GONÇALVES, 1967). Atualmente a resistência tem sido comprovada a demais anti-helmínticos de largo espectro, como a ivermectina, moxidectina, albendazol, levamisol, closantel, monepantel, trichlorfon, salicilanilidas e substitutos fenólicos (ALMEIDA et al., 2010; CHANDRAWATHANI et al., 2013; MOLENTO et al., 2013; VAN DEN BROM et al., 2015).

Tabela I: Principais princípios ativos de drogas anti-helmínticas comerciais e seus mecanismos de ação e de resistência em *H. contortus*.

Grupos de anti-helmínticos	Mecanismos de ação	Mecanismos de resistência	Referência Bibliográfica
Benzimidazóis (tiabendazol, albendazol, febendazol, mebendazol, oxfendazol, oxibendazol) e pró-benzimidazóis (febantel, tiofanato, netobimim)	Inibe a formação de microtúbulos do parasito.	Está associada com a seleção de alelos específicos de um ou dois isótipos diferentes da β -tubulina	Martin, (1997); Jasmer et al, (2000); Bruce, (1987).
Imidotiazóis (tetramisol e levamisol)	agonistas de receptores de acetilcolina e provocam contração muscular e paralisia	Alteração farmacológica dos receptores de acetilcolina	Sangster, (1999); Lanusse, (1996); Köhler, (2001)
Tetrahidopirimidinas (pirantel e morantel)	agonistas de receptores de acetilcolina e provocam contração muscular e paralisia	Alteração farmacológica dos receptores de acetilcolina	Lanusse, (1996); Martin, (1997); Köhler, (2001)
Salicilanilidas (rafozanida, oxiclozamida e closantel)	desacoplador da fosforilação oxidativa,	Não encontrado	Martin, (1997);
Lactonas microcíclicas (nemadectina, moxidectina, abamectina, ivermectina e doramectina)	Causam paralisia deletéria ao abrir os canais de cloro com portão glutamato. Outro efeito é a supressão dos processos reprodutivos.	Pode estar associada à mudanças fisiológicas no sítio de ligação desta droga no músculo faringeal. Outro fator. as P-glicoproteínas.	Sangster; Gill, (1999); Martin, (1997); Sangster, (1999); Campbell et al., (1983).
Organofosforados (triclorfon e haloxon)	Inibição da acetilcolinesterase do parasito.	Maior atividade ou produção de esterases inespecíficas e diminuição da sensibilidade da acetilcolinesterase.	Bracco et al. (1997).

Visando diminuir ou sanar os problemas da resistência parasitária, é importante o uso de práticas de manejo integradas e controle estratégico (GOUVEIA et al., 2013) como exemplo, o método seletivo de controle, o FAMACHA®, refere-se a um cartão que apresenta cinco cores, que correspondem ao grau de coloração da mucosa ocular, tem como finalidade de identificar animais anêmicos inaptos a tolerar a haemoncose (MOLENTO et al., 2013), esse grupo será tratado, deixando sem tratamento aqueles que não apresentam anemia clínica. Assim, a pressão de seleção para a resistência aos anti-helmínticos será menos intensa (VAN WYK et al., 1997; VATTA et al., 1999).

Outras alternativas de controle utilizadas são: a fitoterapia, que consiste na utilização de compostos bioativos com propriedades anti-helmínticas (MOLENTO et al., 2013); a homeopatia, que mesmo muitas não controlando a população de parasitas, torna-os mais tolerantes à infecção (VERÍSSIMO, 2008); também o controle biológico, por fungos nematófagos (ASSIS et al., 2005; MELO et al. 2003); o pastejo alternado e rotacionado de pequenos ruminantes e bovinos, partindo do princípio da especificidade parasitária dos nematoides e seus hospedeiros, no qual grande parte das larvas infectantes para caprinos e ovinos quando ingeridas por bovinos não conseguem estabelecer infecção (FERNANDES et al., 2004) e mais recentemente a utilização de vacinas, seja por antígenos naturais oriundos do próprio parasita (ARUNKUMAR, 2012; SCHALLIG; VAN LEEUWEN; HENDRIKX, 1994), ou antígenos ocultos, ou seja, que não interagem com o sistema imune do hospedeiro (KNOX et al., 2003), como o complexo H11 (uma proteína aminopeptidase), H-gal-Gp (molécula nativa com peso molecular estimado em cerca de 1.000 kDa composta por vários peptídeos), e a Barbervax® que é a primeira vacina de subunidade disponível comercialmente (KABAGAMBE et al., 2000).

2.4 Lectinas vegetais

O estudo com lectinas de plantas datam de 1888 quando Stillmark descreveu o efeito tóxico de sementes de *Ricinus communis* (Ricina), conhecida popularmente como mamona. Stillmark associou a capacidade hemaglutinante ao fator proteico tóxico da ricina (SHARON; LIS, 2004).

Embora sua abundância em muitas plantas, as lectinas vegetais não apresentam seu verdadeiro papel fisiológico claramente definido. Entre algumas funções propostas estão: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição do crescimento de fungos (SHARON & LIS, 1989) e atividade inseticida (TRIGUEROS et al., 2003). Essas proteínas têm sido amplamente estudadas, compreendendo as famílias, Leguminosae, Gramineae, Algae, Euphorbiaceae, entre outras, onde a família Leguminosae, apresenta a maior quantidade de proteínas isoladas, principalmente das sementes (PRAKASHKUMAR et al., 1998; LORIS et al., 1998; OLSNES, 2004).

As lectinas mostram efeito tóxico em relação à nematóides gastrointestinais podendo então ser uma adição útil às estratégias de controle destes parasitas (GRANT, 1999). Em trabalhos realizados por Ríos-de-Álvarez et al., (2012), foi observado que as Lectinas, fitoemaglutinina E3L, aglutinina de gérmen de trigo e a concanavalina A foram capazes de inibir a alimentação das larvas dos nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos *Teladorsagia circumcincta*, *H. contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*.

Estudos demonstram que algumas lectinas vegetais se mantêm ativas mesmo após o processo de digestão dos ruminantes (GRANT, 1999). Logo, elas podem apresentar efeito antiparasitário sobre as larvas em desenvolvimento nas fezes, uma vez que é maior o tempo de contato entre a lectina e o parasita. Assim, o uso de lectinas vegetais com tais propriedades pode complementar ou substituir o uso de anti-helmínticos (RÍOS-DE-ALVAREZ et al, 2012).

2.4.1 Lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A ConBr é uma lectina extraída da *Canavalia brasiliensis* (conhecida popularmente como “Feijão-bravo-do-Ceará”), uma leguminosa da flora brasileira (Foto 1), pertence a subtribo Diocleinae, é composta por uma lectina com especificidade para manose/glicose e apresenta 99% da seqüência de aminoácidos idêntica a seqüência de *Canavalia ensiformis* (ConA), a lectina mais bem descrita literatura. (CAVADA et al., 2001).

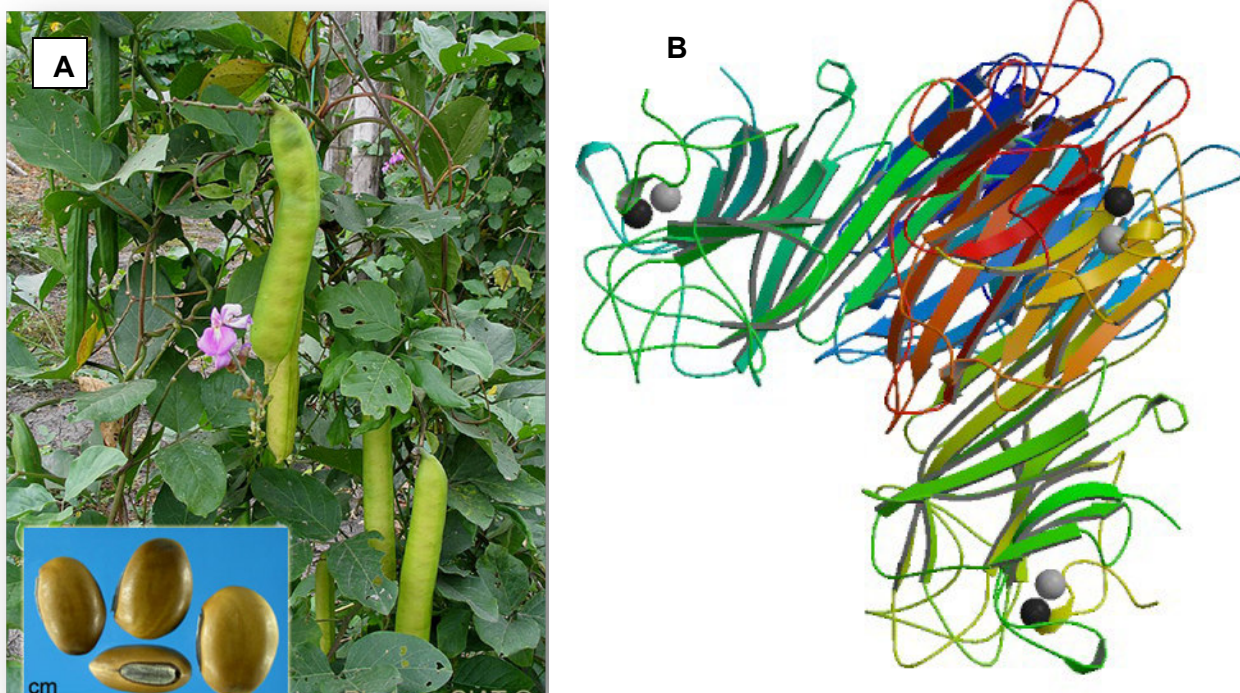


Figura 2. Parte vegetativa de *Canavalia brasiliensis*, com flores e frutos e estrutura tridimensional em sua forma nativa. (A) *Canavalia brasiliensis*, (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae). Fonte: http://indonesia.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Canavalia_brasiliensis.htm. (B) Estrutura tridimensional, da lectina ConBr. Fonte: <http://www.rcsb.org/structure/1AZD>.

Essa lectina pode ser isolada por cromatografia de afinidade, usando uma coluna com matriz de Sephadex G-50. Apresenta sua estrutura tridimensional na sua forma nativa (fig.2) e complexada com diversos ligantes descrita e depositada no *Protein Data Bank* (PDB). Suas atividades biológicas têm sido investigadas em diversos modelos experimentais (CAVADA et al., 2001). Dentre essas atividades estão, a redução do tamanho de lesões em camundongos BALB/c infectados por leishmaniose, e a indução na produção de IFN- γ (BARRALNETO et al., 1996), produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE et al., 1999) e indução de apoptose celular (BARBOSA et al., 2001).

A ConBr também apresenta efeito na indução de células Th1 para um antígeno específico de imunização contra *Leishmania amazonensis*. Em um trabalho utilizando mais duas lectinas, a PAA (*Pisum arvense*) e KM+ (*Artocarpus interifoliga*), verificou-se redução no número de parasitas e alta resposta inflamatória (TEXEIRA et al., 2006). Outro trabalho mostrou que a ConBr é capaz induzir a síntese de proteases com atividade colagenolítica no processo de cicatrização das lesões

cutâneas, assim, interferindo no processo cicatricial (SILVA et al., 2009). Batista et al. 2017 observaram que a ConBr e a CFL (*Cratylia argentea*) apresentam propriedades imunomoduladoras benéficas no controle de células infectadas por *Salmonella enterica*.

Até o momento, ainda são poucos os estudos voltados à análise de propriedades anti-helmínticas contra nematóides gastrintestinais nas lectinas vegetais, mais precisamente, apenas cerca de cinco trabalhos foram encontrados na literatura, (SALLES et al., 2014; LIÉNARD et al., 2011; RÍO-DE-ALVAREZ et al., 2012a; RÍO-DE-ALVAREZ et al., 2012b; SILVA et al., 2018) nessa perspectiva é relevante avaliar a ação da lectina ConBr sobre *H. contortus*, uma vez que além de auxiliar na compreensão acerca dos mecanismos de ação, poderá colaborar na elaboração de produtos com efeitos antiparasitários, podendo ser adotado como novo método de controle deste nematóide.

2.5 Glicanos de parasitas (colocar imagens e flar mais de interação)

São muitos os trabalhos que relatam a presença de glicanos nas superfícies de nematóides gastrointestinais, utilizando lectinas marcadas (BONE; BOTTJER, 1985 ; PALMER; McCOMBE, 1996 ; JURASEK et al., 2010 ; HILLRICHS et al., 2012). Nestes trabalhos, as lectinas, Concanavalina A (ConA), a aglutinina *Lens culinaris* (LCA), aglutinina *Maclura pomifera* (MPA), aglutinina de amendoim (PNA) e aglutinina *Pisum sativum* (PSA) foram ligadas à superfície dos ovos de nematoides tricostrongilídeos, sugerindo a presença de glicanos contendo glicose, manose e galactose (SALLES et al., 2014). De acordo com Reason et al, (1994), os parasitos sintetizam esses glicanos para servir de mecanismo de defesa e sobrevivência, assim, conseguem regular e suprimir a resposta imune do hospedeiro.

A caracterização dos glicanos de parasitas tem sido alvo de inúmeras pesquisas, com intuito de que tais informações possam servir para nortear a elaboração de vacinas e novos meios de diagnosticar essas doenças. A exemplo, larvas de nematóides parasitas como *Toxocara canis* e *T. cati* possuem glicoconjugados antigênicos, esses glicanos são trissacarídeos O-metilados com resíduos 2-O-metil fucosil e galactosil. *Trichinella spiralis* , um nematóide intestinal,

produz muitas glicoproteínas imunogênicas que possuem um glicano incomum, o Tivelose (3,6-didesoxi-D-arabino- hexose), é antigênico identificado pelos anticorpos de animais infectados. A alta imunidade a essa molécula, confere imunidade protetora, que conseqüentemente resulta na eliminação das larvas invasoras do intestino. O mesmo é observado para *H.contortus*, a imunidade protetora por anticorpos contra antígenos de glicanos ainda não caracterizados dessa espécie (VARKI et al., 2009).

Estudar a interação lectina-glicano é extremamente relevante e muito do que se sabe sobre a estrutura e biossíntese de glicanos de nematóide, não vem de espécies parasitas, mas do modelo do nematóide do solo, *Caenorhabditis elegans* (PASCHINGER, et al. 2008), estudos revelam que, a ligação à glicanos da superfície do epitélio intestinal de *C. elegans*, causa inibição no desenvolvimento larvar podendo levar à morte do nematóide (BUTSCHI et al., 2010). Segundo Paschinger e Wilson (2015), algumas estruturas de glicanos desse nematóide, também foram encontrados em *H. contortus*, sugeriram através de análise por HPLC a presença de glicanos tricofucosilados.

Nesse contexto, diante da susceptibilidade dos nematóides à proteínas, aumentam-se as chances de as lectinas ou anticorpos anti-glicanos possam servir como potentes agentes antiparasitários (BUTSCHI, et al., 2010; SCHUBERT, et al.; 2012), o que é relevante para a engenharia de linhas celulares capazes de imitar N-glicanos de parasitas por meio de docking molecular na elaboração de proteínas recombinantes como candidatos a vacina.

2.6 Docking molecular

Docking ou modelagem molecular, é uma ferramenta computacional, para construir e manipular elementos estudados. Consiste na reprodução estrutural mais próxima do que se acredita ser o real, tem por base um conjunto de cálculos, assim, aliando a química teórica representada por algoritmos matemáticos com a computação gráfica para o manuseio dos resultados obtidos, facilitando a compreensão da ligação entre a estrutura e bioatividade (BIELSKA et al., 2011).

A docagem tornou-se ferramenta essencial na elaboração de protocolos distintos para o desenvolvimento de fármacos, sendo um método bastante tradicional em pesquisas de química medicinal (YURIEV; RAMSLAND, 2013; KELLENBERGER et al., 2004).

Essa ferramenta é extremamente útil para modelar a interação entre pequenos ligantes e uma proteína no nível atômico, dessa forma, permitindo compreender as características e o comportamento dessas moléculas, além de como se dá essa relação, e esclarecer mecanismos bioquímicos essenciais (MCCONKEY; SOBOLEV, 2002).

São muitos os trabalhos que se utilizam dessa ferramenta computacional e exibem sucesso. Por exemplo, foi verificado com auxílio de docking molecular a elucidação de interações entre o ácido indol-3-acético (AIA) com uma lectina de sementes de *Canavalia maritima*, exibindo uma nova função para as lectinas em fisiologia vegetal (DELATORRE et al., 2013). Em outro trabalho utilizando a docagem foi possível observar que lectinas relacionadas com a aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA) como *Yucca filamentosa* e *Polygonatum cyrtoneum*, poderiam atuar como drogas que previnem a infecção pelo vírus H1N1 via ligação competitiva (XU et al., 2012). Abrante, et al., 2013, mostrou por docking molecular que uma lectina de *Acacia farnesiana* apresenta um possível mecanismo antiinflamatório na inflamação induzida pela interação com carragenina.

Nesse contexto, é relevante verificar o efeito anti-helmíntico da lectina *Canavalia brasiliensis* (ConBr) contra o *H. contortus* e avaliar uma possível ligação da ConBr com os glicanos desse parasita por meio de docking molecular, assim, auxiliando como bases referenciais para trabalhos posteriores, caracterizando o comportamento da interação entre essas moléculas, além de poder auxiliar em uma possível elaboração de fármacos com efeitos antiparasitários.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito anti-helmíntico da lectina das sementes *Canavalia brasiliensis* (ConBr) contra o *H. contortus* e avaliar uma possível interação da ConBr com glicanos desse parasita por meio de docking molecular.

3.2 Objetivos Específicos

- Purificar a lectina das sementes de *C. brasilienses*.
- Realizar a inibição da atividade hemaglutinante.
- Avaliar o efeito da lectina na eclodibilidade de ovos, desembainhamento e desenvolvimento de *H. contortus*.
- Realizar docking molecular da lectina com glicanos de *H. contortus*.

REFERÊNCIAS

Abrão, C.A.; Abrão, S.; Viana, C.H.C.; Valle, R.C. 2010. Utilização do método Famacha no diagnóstico clínico individual de hemoncose em ovinos no Sudeste do Estado de Minas Gerais, *Revista Brasileira de Parasitologia veterinária*, v.19, n.1, p.6870.

Alba-Hurtado F., Muñoz-Guzmán M.A. 2013. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *BioMed Research International*. p. 11.

Alemu, Z., Kechero, Y., Kabede, A. and dan Muhammed, A. 2014. Comparison of the in vitro inhibitory effect of doses of tannin rich plant extract and ivermectin on egg hatchability, larvae development, and adult Mortality of *Haemonchus contortus*. *Acta Parasitol. Glob.*, v. 5n. 3, p. 160-168.

Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R.M., Salameh, N.M.Y., Jamous, R. M., Hamadeh, A. M.A. 2016. Complementary and alternative medicine use among cancer patients in Palestine with special reference to safety-related concerns, v.187,p. 104–122.

Ali-Shtayeh, M.S.; Jamous, R.M.; Jamous, R.M. 2016. Traditional Arabic Palestinian ethnoveterinary practices in animal health care: A field survey in the West Bank (Palestine). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 182, p. 35–49.

Amarante, A. F. T. 2014. Os parasitas de ovinos. São Paulo: Editora UNESP, 264 p.

Amarante, A. F. T. Nematoides gastrintestinais em ovinos. In: Cavalcante, A. C. R.; Vieira, L. S.; Chagas, A. C. S.; Molento, M. B. (Ed.). 2009. Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle. Brasília, DF: Embrapa, p. 17- 62.

Andrade Júnior A.L.F., Silva F.C., Coutinho R.M.A., Bezerra L.A.P., Difante G.S., Vieira L.S. & Zaros L.G. 2015. Desempenho de ovinos às infecções por nematoides gastrintestinais em diferentes cultivares de gramíneas forrageiras tropicais. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, São Luis. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, p.93. (Resumo PH015).

Andrade, J.L, Arruda, S. , Barbosa, T. , Paim, G. , Ramos, M.V. , Cavada, B.S. , Barral-Neto, M.1999. Lectin-induced NO production. *Cellular Immunology*, v.194, p.98-102.

Arunkumar, S. 2012. Immunoprotection in sheep against *Haemonchus contortus* using its thiol-purified excretory/secretory proteins. *Veterinary Research Forum*, v. 3, n. 4, p. 239–244.

Bakker, N. Vervelde, L., Kanobana, K., Knox, DP, Cornelissen, AWCA, de Vries, E & Yatsuda 2004. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine*, v. 22, n. 5-6, p. 618–628.

Bakker, N., Vervelde, L., Kanobana, K., Knox, D.P., Cornelissen, A. W. C. A., Vries, E. D., Yatsuda, A. P. 2004. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES) *Vaccine*. V.22, n.5–6, p. 618–28.

Barbosa, T., Arruda, S., Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., Freitas, L.A.R., Barral-Netto, M. 2001. Ativação in vivo de linfócitos e apoptose por lectinas da subtribo *Diocleinae*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, p.673-678.

Barral-Netto, M.; Von Sohsten, R. L.; Teixeira, M.; Conrado Dos Santos, W. L.; Pompeu, M. L.; Moreira, R. A.; Oliveira, J. T. A.; Cavada, B. S.; Falcoff, E.; Barral, 1996. A. In vivo protective effect of the lectin from *canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *leishmania amazonensis*. *Acta Trop*, v. 60, n. 4, p. 237-50.

Batista J.E.C., Ralph, M.T., Vaz, R.V., Souza, P.F.C., Silva, A.B., Nascimento, D.C.O., Souza, L.T., Ramos, M.V., Mastroeni P., Lima-Filho, J.V. 2017. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Phytomedicine*, v.25, p.52-60.

Bielska, E.; Lucas, X.; Czerwoniec, A.; Kasprzak, J. M.; Kaminska, K. H.; Bujnicki, J. M.; 2011. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications, *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, v. 92, n. 3, p. 249-264.

Bielska, E.; Lucas, X.; Czerwoniec, A.; Kasprzak, J. M.; Kaminska, K. H.; Bujnicki, J. M. 2011. Virtual screening strategies in drug design – methods and applications, *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, v. 92, n. 3, p. 249-264.

Bishop, S.C., Stear, M. J. 2003. Modeling of host genetics and resistance to infectious diseases: understanding and controlling nematode infections. *Parasitology Veterinary*, v.115, p.147 – 166.

Bispo, S. 2012. Possibilidades de se produzir resistência a infecções por parasitas nematóides em pequenos ruminantes em sistemas de produção tropical. *Animal*, v.6 n.5, p. 741-747.

Bone, L.W., Bottjer, W.K.P., Gill, S.S. 1985. *Trichostrongylus colubriformis*: Egg lethality due to *Bacillus thuringiensis crystal* toxin. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 60, p. 314-322.

Bracco J. E.; M. Dalbon; O. Marinotti & J. M. S. Barata. 1997. Resistência a inseticidas organofosforados e carbamatos em população de *Culex quinquefasciatus*. Revista de Saúde Pública 31: 182–3.

Bruce, J. I. 1987. New anthelmintics. International Journal for Parasitology, v.17, p.483-491.

Butschi A, Titz A, Wälti M, V Olieric, Paschinger K, Nöbauer K, Guo X, Seeberger PH, Wilson IBH, Aebi M, Hengartner M, O; Künzler, M. 2010. *Caenorhabditis elegans* N-glycan core beta-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. PLoS Pathogens, v. 6,p.1.

Campbell, W. C.; Fisher, M. H.; Stapley, E. O., et al. 1983. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. Science, v.221, p.823-828.

Cavada, B. S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T. B.; Barral Netto, M. 2001. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potencial biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe lectins. Current Protein and Peptide Sciences, v. 2(2), p. 123-135.

De Freitas Pires, A. Assreuy, A.M., Lopes, E.A., Celedonio, N.R., Soares, C.E., Rodrigues, N.V., Sousa, P.L., Benevides, R.G., Nagano, C.S., Cavada, B.S., Leal-Cardoso, J.H., Coelho-de-Souza, A.N., Santos, F.C.2011. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. Fundam Clin. Pharmacol.v.27, p.201-9.

Delatorre, P., Silva-Filho, J. C., Rocha, B. A. M., Santi-Gadelha, T., Nóbrega, R. B., Gadelha, C. A. A., Nascimento, K. S., Nagano, C. S., Sampaio, A. H., Cavada, B. S., 2013. Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology, Biochimie, v.95, n.9, p. 1697-1703.

El-Ashram, S., Suo, X. 2017. Exploring the microbial community (microflora) associated with ovine *Haemonchus contortus* (macroflora) field strains, Scientific Reports. 7, n. 70 DOI: 10.1038/s41598-017-00171-2.

Fernandes, M.A.M., Gilaverte, S., Buzatti, A., Sprenger, L.K., Silva, C.J.A., Peres, M.T.P., Molento, M.B., Monteiro, A.L.G. 2015. Método FAMACHA para detectar anemia clínica causada por *Haemonchus contortus* em cordeiros lactentes e ovelhas em lactação. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 35, n. 6, p. 525-530.

Gaínza Y. A., Domingues, L. F, Perez O. P, Rabelo, M. D, López, E. R e Chagas, A. C. S., 2015. Atividade anti-helmíntica in vitro de *Citrus* óleo essencial de *sinensis* e *melaleuca quinquenervia* de Cuba em *Haemonchus contortus* . Industrial Colheitas e Produtos. v.76, p. 647-652.

Gaínza, Y.A., Fantatto, R. R., Chaves, F. C. M., Bizzo, R. H., Esteves, S.

N, Chagas, A. C. S., 2016. *Piper aduncum* contra isolados de *Haemonchus contortus*: resistência cruzada e a pesquisa de compostos bioativos naturais. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária v.25, p.383 - 393.

Grant, G., 1999. Plant lectins. In: Caygill, J.C., Mueller-Harvey, I. (Eds.), Secondary Plant Products. Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 87–110.

Hernández-Villegas MM, Borges-Argáez R, Rodriguez-Vivas RI, TorresAcosta JFJ, Méndez-Gonzalez M, Cáceres-Farfan M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. V. 179 n.1-3, p. 100-106.

Hernández-Villegas, M. M.; Borges-Argáez, R.; Rodriguez-Vivas, R. I.; Torres-Acosta, J.F.J.; Méndez-Gonzaleza, M.; Cáceres-Farfan, M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. Veterinary parasitology, v. 179, n. 1-3, p. 100–6.

Hertzberg, H., Huwyler, U., Kohler, L., Rehbein, S., Wanner, M. 2002. Cinética do limite de larvas infecciosas de ovin e bovino in vivo e in vitro Parasitologia, v.125, pp. 65 – 70.

Hillrichs, K., Schnieder, T., Forbes, A.B., Simcock, D.C., Pedley, K.C., Simpson, H.V. 2012. Use of fluorescent lectin binding to distinguish *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* eggs, third-stage larvae and adult worms. Parasitol Res.; v.110 n.1, p.449-58.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Pecuária 2015. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=ma&tema=pecuaria2015>. Acesso em 15 set, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Preliminares, Censo Agropecuário 2017 IBGE. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro2017>. Acesso em: 13 set, 2018.

Jasmer, D. P.; Yao, C.; Rehman, A., 2000. Multiple lethal effects induced by benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. Molecular and Biochemical Parasitology, v.105, p.81-90.

Junior, C.J.;Rodrigues, L. S.; Moraes, V. E. G. Ovinocaprinocultura de Corte– A Convivência dos Extremos., BNDES Setorial Agroindústria, Rio de Janeiro, n. 31, p. 281-320, 2010.

Jurasek ME, Bishop-Stewart JK, Storey BE, Kaplan RM, Kent ML.2010. Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. Vet. Parasitol.; v.169(1-2) p.209-13.

- Jurasek, M.E., Bishop-Stewart, J.K., Storey, B.E., Kaplan, R.M., Kent, M.L. 2010. Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. *Vet. Parasitol.*; v.169, n.1-2, p.209-13.
- Kabagambe, E. K., S. J. Wells, L. P. Garber, M. D. Salman, B. Wagner, P. J. Fedorka-Cray. 2000. Risk factors for fecal shedding of *Salmonella* in 91 U. S. dairy herds in 1996. *Preventive Veterinary Medicine* 43:177–194.
- Kellenberger, E.; Rodrigo, J.; Muller, P.; Rognan, D. 2004. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins*, v.57, p.225–242.
- Knox, D. P., Redmond, D.L. , Newlands, G.F., Skuce, P.J., Pettit, D., Smith, W.D. 2003. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*, v. 33, n. 11, p. 1129–1137.
- Köhler, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, v.31. p.336-345.
- Kuchai, J.A., Ahmad, F., Chishti, M.Z., Tak, H., Ahmad, J.A.S. and Razool, M. 2012. A study on morphology and morphometry of *Haemonchus contortus*. *Pak. J. Zool.*, v. 44, n. 6, p.1737-1741.
- Lanusse, C. E. 1996. Farmacologia dos compostos antihelmínticos. In: Controle dos nematódeos gastrintestinais. Terezinha Padilha, p.1-44.
- Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Hoberg, E.P. 1994. Novos caracteres morfológicos para a identificação de espécimes individuais de *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) e uma chave para espécies em ruminantes da América do Norte . *J. Parasitol.*, V . 80, p.107-119.
- Liénard, E.; Foucras, G.; Prévot, F.; Grisez, C.; Bergeaud, J.P.; François, D.; Bouvier, F. and Jacquiet, P. 2011. Comparison of gene expression profiles between resistant and susceptible ovine breeds to *Haemonchus contortus*. 23rd World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires. Argentina.
- Lopes, S. G., Barros, L. B. G, Louvandini, H., Abdalla, A. L., Costa-Junior, L. M., 2016. Effect of tanniniferous food from *Bauhinia pulchella* on pasture contamination with gastrointestinal nematodes from goats. *Parasit Vectors* 9(102) 1-7.
- Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L. 1998. Legume lectin structure. *Biochim. Biofísica Acta*, v.1383, p.9-36.
- Maia, D.; Moraes, F.R.; Sotomaior, C.S. 2013. revisão da literatura – o método FAMACHA® como tratamento seletivo de pequenos ruminantes. *Veterinária Notícia* v.19. n. 1, p. 41-66.

Mansfield, L.S., Gamble, H.R., Fetterer, R.H., 1992. Characterization of the egg shell of *Haemonchus contortus* - I. Structural components. *Comp Biochem. Physiol B.*; 103 (3): 681-686.

Martin, R. J. 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, v.154, p.11-34.

Martin, R. J.; Robertson, A P.; Bjorn, H. 1997. Target sites of anthelmintics. *Parasitology*, v.114, p.111-124.

McConkey, B.J., Sobolev, V., Edelman, M. 2002. The performance of current methods in ligand-protein docking. *Current Science*; v.83: p. 845–855.

Mcdonald V. 2003. Parasitas no trato gastrointestinal. *Parasite Immunol.*; v.25, n. 5 p. 231-4.

Mederos, A.E; Ramos, Z.; Banchemo, G.E. 2014. First report of monepantel *Haemonchus contortus* resistance on sheep farms in Uruguay. *Parasites & Vectors*. v.7, p.598.

Melo, A. C. F. L.; Reis, I. F.; Bevilaqua, C. M. L.; Vieira, L. S.; Echevarria, F. A. M.; Melo, L. M. 2003. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, v. 33, n. 2, p. 339-344.

Melo, V. F. P., Pinheiro, R.L S. B., Homem Junior, A. C., Américo, J. H. P., Santos, V. C., Rosestolato, L. L. R. 2015. Manejo de anti-helmínticos no controle de infecções gastrintestinais em cabras. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.16, n.4, p. 916-924.

Mengist, Z., Abebe, N., Gugsu, G. and Kumar, N. 2014. Assesment of small ruminant haemonchosis and its associated risk factors in and around Finote selam, Ethiopia. *IOSR JAVS*, 7(12): 36-41.

Molento, M. B. 2008. Método Famacha: Tratamento seletivo no controle do *Haemonchus contortus*. In: VERÍSSIMO, C.J (Ed.). *Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes*. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia. Cap. 2., p.25-26.

Molento, M.B., Veríssimo, C.J., Amarante, A.T., Van Wik, J.A., Chagas, A.C.S., Araújo, J.V., Borges, F.A. 2013. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Arquivo Inst. Biológico*, v.80, n.2, p.253-263.

Nasai, N.B., Abba, Y., Abdullah, F.F.J., Marimuthu, M., Tijjani, A., Sadiq, M.A., Mohammed, K., Chung, E.L.T. and Omar, M.A.B. 2016. In vitro larvicidal effects of ethanolic extract of *Curcuma longa* Linn. On *Haemonchus* larval stage. *Vet. World*, v. 9, n.4, p. 417-420.

Nunes, E.S., Aranda-Souza, M.A., Vaz, A.F.M., Santana, G.M.S., Gomes, F.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., Lira-da-Silva, R.M., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L.V., Guarnieri, M.C., Correia, M.T.S. 2011. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 159, p. 57–63.

Olsnes, S. *Toxicon*. 2004. Official journal of the International Society on Toxinology, ISSN: 0041-0101, V. 44, n. 4, p. 361-70.

Onyiah, L.C.; Arslan, O. 2005. Simulating the development period of a parasite of sheep on pasture under varying temperature conditions. *Journal of Thermal Biology*, v.30, p.203-211.

Page, A.P., Johnstone, I.L. The cuticle. 2007, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.138.1, <http://www.wormbook.org>.

Palmer, D.G., McCombe, I.L. 1996. Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *Int. J. Parasitol.*; v.26, n.4, p.447-50.

Palmer, D.G., McCombe, I.L. 1996. Coloração de lectina de ovos de nematoides trichostrongilídeos de ovinos: identificação rápida de ovos de *Haemonchus contortus* com aglutinina de amendoim. V.26 n.4, p.447-50.

Paschinger K, Gutternigg M., Rendić D, Wilson IBH. 2008. O padrão de N-glicosilação de *Caenorhabditis elegans*. *Pesquisa de carboidratos*. V.343 : p.2041–2049.

Paschinger K, Wilson IBH. 2015. Two Types Of Galactosylated Fucose Motifs Are Present On N-Glycans Of *Haemonchus Contortus*. *Glycobiology*.;v.25n.6,p.585-590.

Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v.109, p.347-352.

Peumans, W.J. E Van Damme, E.J. 1998. Plants lectins: Specific tools for the identification, isolation and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* v. 33, p.209-258.

Prakashkumar, R., M. Mathew, P., Ravindran, P. 1998. Studies on the allergenicity of nine tropical pollen allergens. *Grana*.v. 37,p. 185-188.

Purwo Widiarso, Budi & Kurniasih, Kurniasih & Prastowo, Joko & Nurcahyo, Wisnu. 2018. Morphology and morphometry of *Haemonchus contortus* exposed to *Gigantochloa apus* crude aqueous extract. *Veterinary World*. v.11, p.921-925. 10.14202/vetworld.921-925.

Reason.A.J., Elhs.L.A., AppletonJ.A., Wisnewski, N., Grieve.R.B., McNeil, M., Wassom.D.L., Morris, H.R. and Della (1994) Novel tyvelosecontaining tri- and tetra-antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*, v.4, p.593— 603.

Rieger, D. K., Costa, A. P., Budni, J., Moretti, M., Barbosa, S. G. R., Nascimento, K.S, Teixeira, E. H., Cavada, B. S., Rodrigues, A. L. S., Leal, R. B. Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system. 2014. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v. 122, p. 53 – 60.

Rios de Alvarez, L.; Jackson, F.; Greer, A.; Bartley, Y.; Bartley, DJ; Grant, G.; Huntley, JF, 2012. Triagem in vitro de lectinas de plantas e extratos de plantas tropicais para propriedades anti-helmínticas. *Veterinario. Parasit.*, 186: 390-398.

Ríos-de Álvarez, L., Jackson, F., Greer, A., Bartley, Y., Bartley, D.J., Grant, G..2012a In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet. Parasitol.*; v.186 n.3-4, p.390-8.

Ríos-de Álvarez, I.; F. Jackson, F.; Greer, A. W.; Grant, G.; Jackson,E.; Morrison, A. A.; Huntley, J.F.; 2012b. Direct anthelmintic and immunostimulatory effects of oral dosing semi-purified phytohaemagglutinin lectin in sheep infected with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*, *Veterinary Parasitology*, Volume 187, Issues 1–2, Pages 267-274, ISSN 0304-4017.

Roberto, F. F.S., Difante, G S., Zaros, L. G., Gurgel, A. L. C. 2018. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. *Pubvet.* V.12 p. 1-12.

Rocha, R. A., Bricarello, P. A., Rocha, G. P. Amarante, A. F. T. 2007. Recuperação de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* em diferentes estratos de *Brachiaria decumbens* e *Panicum maximum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16, 77-82.

Rogers, W. P., and R. I. Sommerville. 1960. The physiology of the second ecdysis of parasitic nematodes. *Parasitology* v.50, p. 329-348.

Rogers, W.P., Brooks, F., 1977. The mechanist of hatching of' eggs of *Haemonchus contortus*. *International Journal of Parasitology*, 7, 61-65.

Rothnie, A., Theron, D., Soceneantu, G., Martin, C., Traikia, H., Berridge, L., Higgins, C.F., Devaux, P.F., Callaghan, R. 2001.The importance of cholesterol in maintenance of P-glycoprotein activity and its membrane perturbing influence. *Eur. Biophys. J.*, v.30, p. 430–442.

Salles, H.O., Braga, A.C., Nascimento, M.T., Sousa, A.M., Lima, A.R., Vieira, L. da S., Cavalcante, A.C., Egito, A.S., Andrade, L.B.2014. Lectina, hemolisina e inibidores de protease em frações de sementes com atividade ovicida contra *Haemonchus contortus*. *Rev Bras Parasitol Vet.*v.23 (2) p.136-43.

Sangster, N. C. 1999. Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycin. *Veterinary Parasitology*, v.85, p.189-204.

Sanz-Aparício, J.; Hermoso, J.; Granjeiro, T.B.; Calvete, J.J.; Cavada, B.S. 1997. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, v 405, p. 114-118.

Savithramma, N., Linga Rao, M. Suhrulatha, D. 2011. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East J. Sci. Res.*, v.8, pp. 579-584.

Schallig, H. D. F. H.; Van Leeuwen, M. A. W.; Hendriks, W. M. L. 1994. Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, v. 108, n. 03, p. 351–357.

Schubert,, M., Bleuler-Martinez, S., Butschi, A., Walti, M.A., Egloff, P., Stutz, K., Yan, S., Wilson, I.B.H., Hengartner, M.O., Aebi, M., Allain, F.H., Künzler, M., Malho, J.M. , Collot, M. 2012. Plasticity of the beta-Trefoil Protein Fold in the Recognition and Control of Invertebrate Predators and Parasites by a Fungal Defence System. *Plos Pathog.* v.8, p.5.

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

Silva, F. O., Araújo, R. V.S., Schirato, G. V., Teixeira, E. H., Melo Júnior, M. R., Cavada, B. S., Lima-Filho, J. L., Carneiro-Leão, A. M.A, Porto, A. L. F. 2009. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. *Ciência Rural*, 39(6), 1808-1814.

Silva, F.O, Santos, P.N., Figueirôa, E.O., Melo, C.M.L., Neves, J. K. A. L., Arruda, F. V. S., Cajazeiras, J. B., Nascimento, K. S., Teixeira, E. H., Cavada, B. S., Porto, A.L.F., Pereira, V.R.A. 2014. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells, *Research in Veterinary Science*, v. 96, n.2, p. 276-282.

Silva, M.T. de O.; Maia, M.A. C., Silva, M. D. C., Torres, T.M., Pereira, J. C. S., Araújo, J. R.; C. 2018. Anthelmintic effect of Cassia fistula and Combretum leprosum protein fractions against goat gastrointestinal nematodes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*.

Sommerville, R. I., Rogers, W. P. 1987. The Nature and Action of Host Signals, Editor(s): J.R. Baker, R. Muller, *Advances in Parasitology*, Academic Press, v. 26,p. 239-293.

Teixeira, E. H. Napimoga, M.H, Carneiro, V.A., Oliveira de Oliveira, Cunha, R.M., Havt A., Martins, J.L., Pinto, V.P., Gonçalves, R.B., Cavada, B.S. 2006. In vitro inhibition of *Streptococci* binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 1, p. 111–116, 2006.

Trigueros, V.; Lougarre, A.; Ali-Ahmed, D.; Rahbé, Y.; Guillot, L.C.; Fournier, D.; Paquereau, L. 2003. *Xerocomus chrysesteron* lectin: identification of new pesticidal protein. *Biochimica and Biophysica Acta*, v 1621, p. 292-298.

Ueno., P., Gonçalves, C. P. 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency.

Van Breedam, W., Pöhlmann, S., Favoreel, H. W., Groot, R. J. Nauwynck, H. J. 2014, Bitter-sweet symphony: glycan–lectin interactions in virus biology. *FEMS Microbiol Rev*, v.38, p.598-632.

Van den Brom, R., Moll, L., Borgsteede, FHM., Van Doorn, DCK., Lievaart-Peterson, K., Dercksen, DP., Vellema, P. 2013. Multiple anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus*, including a case of moxidectin resistance, in a Dutch sheep flock *Veterinary Record*. doi: 10.1136/vr.101700.

Van Wyk, J. A.; Malan, F. S.; Bath, G. F. 1997. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? In: Managing anthelmintic resistance in endoparasites. Van Wyk; Van Schalkwyk editors. Workshop held at the 16^a International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Sun City, p. 51-63.

Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. 2009. *Essentials of Glycobiology*, Second Edition (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Vatta, A. F.; Letty, B. A. Van Der Linden, M. 1999. Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. in goats farmed under resourcepoor conditions in South África using na eye colour chart developed for sheep. *Veterinary Parasitology*, v. 80, p. 239-249.

Venske, D. K. R. 2014. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis.p.164.

Vieira, L.S., Benvenuti, C. L.; Neves, M. R. M. das, 2010. Resistência parasitária e método Famacha© como alternativa de controle de *Haemonchus Contortus* em pequenos ruminantes no Nordeste brasileiro. Documentos 100, Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 28p.

Voltolini T.V. 2011. Produção de caprinos e ovinos no semiárido. Embrapa Semi-Árido, Petrolina, PE. p. 553.

Wanderley, L. F., Batista, K. L.R., Carvalho, J. F., Lima, A. S., Landulfo, G. A., Soares, A. M. S., Costa Junior, L. M. 2017. The first assessment of the stress inducible defense of *Leucaena leucocephala* with acaricidal potential effect against

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.26, n.2, p.171-176.

Wilson IBH, Paschinger K. 2012. Galactosylated fucose epitopes in nematodes: increased expression in a *Caenorhabditis* mutant associated with altered lectin sensitivity and occurrence in parasitic species. J Biol Chem, v. 287 p.28276-28290.

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

Yuriev, E.; Ramsland, P.A. 2013. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *J. Mol. Recognit.*, v.26, p. 215–239.

CAPÍTULO II

Este capítulo apresenta o artigo “**Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus***”, doi: 10.1016 / j.molbiopara.2018.09.002, publicado no periódico Molecular & Biochemical Parasitology.

Structural analysis and anthelmintic activity of *Canavalia brasiliensis* lectin reveal molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and glycans of *Haemonchus contortus*

Karla L.R. Batista^a, Carolina R. Silva^b, Valdenice F. Santos^a, Rafael C. Silva^a, Renato R. Roma^a, Ana L.E. Santos^a, Raquel O. Pereira^a, Plínio Delatorre^c, Bruno A.M. Rocha^d, Alexandra M.S. Soares^e, Livio M. Costa-Júnior^b, Claudener S. Teixeira^{a*}

^a Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha, Maranhão, Brazil

^b Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

^c Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

^d Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^e Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

*Correspondence to: Claudener S. Teixeira, Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, LaBEM, Campus do Chapadinha S/N, 655000-000, Chapadinha, Maranhão, Brazil. E-mail: claudener@gmail.com

Abstract

Haemonchus contortus is one of the most economically important parasites infecting small ruminants worldwide. This nematode has shown a great ability to develop resistance to anthelmintic drugs, calling for the development of alternative control approaches. Because lectins recognize and bind to specific carbohydrates and glycan structures present in parasites, they can be considered as an alternative to develop new antiparasitic drugs. Accordingly, this work aimed to investigate the anthelmintic effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin against *H. contortus* and to evaluate a possible interaction of ConBr with glycans of this parasite by molecular docking. ConBr showed significant inhibition of *H. contortus* larval development with an IC_{50} of 0.26 mg mL^{-1} . Molecular docking assays revealed that glycans containing the core trimannoside [Man(α 1-3) Man(α 1-6)Man] of *H. contortus* interact in the carbohydrate recognition domain of ConBr with an interaction value of $MDS = -248.77$. Our findings suggest that the inhibition of *H. contortus* larval development is directly related to the recognition of the core trimannoside present in the glycans of these parasites. This work is the first to report on the structure-function relationships of the anthelmintic activity of plant lectins.

Keywords: ConBr; molecular docking; core trimannoside; parasite; anthelmintic activity.

1. Introduction

Haemonchus contortus, a common nematode infecting small ruminants, is considered one of the most economically important parasites worldwide [1,2]. In recent years, the resistance of these parasites to anthelmintic drugs has increased, owing to the continuous use of the same drug and use of anthelmintics in suboptimal doses [3].

Therefore, the anthelmintic resistance in *H. contortus* increases the need to develop new intervention strategies. Insights into the biological processes of *H. contortus* at the molecular level might identify key molecules as new drug targets, contributing to the development of alternative control drugs [4,5].

In this context, the glycans of parasites have attracted attention by their unusual structures and their potential roles in immunomodulation and protective immunity, as target molecules for antiglycan antibodies or lectins with antiparasitic effects [6].

Lectins are carbohydrate-binding glyco/proteins that are capable of agglutinating cells without enzymatic activity toward carbohydrate or glycoconjugates [7]. Thus, lectins play a role in immunology and glycobiology where they are used to agglutinate cells and identify complex carbohydrates and glycoconjugates, but lectins have also been shown to mediate diversified biological functions like cytotoxicity, complement activation, cell-to-cell and host-pathogen communications, innate immune responsiveness, and cell-to-cell signaling [8].

The binding of lectins to carbohydrates is noncovalent and reversible, involving hydrogen bonds, hydrophobic, electrostatic and van der Waals interactions and dipole attraction [9]. The binding of monosaccharides (i.e. mannose, glucose, and galactose) and disaccharides (sucrose and lactose) to a lectin is relatively weak, with dissociation constants

in the millimolar or micromolar range. On the other hand, interactions of multivalent lectins with complex, branched carbohydrates (i.e. fetuin, asialofetuin, mucin and high-mannose glycans) containing multiple epitopes result in high-avidity binding with nanomolar or even picomolar dissociation constants [10]. This makes these proteins ideal molecular tools for the study of protein-glycan interaction of various parasites [11].

ConBr is a lectin with an affinity for mannose/glucose isolated from the Brazilian bean *C. brasiliensis*. ConBr shares primary carbohydrate recognition specificity with other legume plant lectins from the genus *Canavalia*, and the amino acid sequence displays 99% homology with ConA, the lectin of *Canavaliaensiformis* seeds [12,13]. Despite the structural similarity among these lectins, ConBr exerts biological effects different from those of ConA [14]. Therefore, further studies are needed to better understand the action of these lectins on different cell surfaces.

This work aimed to investigate the anthelmintic effect of *Canavaliabrasiliensis* (ConBr) lectin against *H. contortus* and to evaluate a possible interaction of ConBr with glycans of this parasite by molecular docking.

2. Material and Methods

2.1. Protein purification

Seeds from *C. brasiliensis* were ground to a fine powder in a coffee mill, and the soluble proteins were extracted at 25 °C by continuous stirring with 0.15 M NaCl [1:10 (w:v)] for 4 h, followed by centrifugation at 10,000 x g at 4 °C for 20 min. Protein purification was carried out by the affinity chromatography protocol, as previously described by Moreira and

Cavada [15], using a Sephadex G-50 column (2 x 10 cm). This fraction (*C. brasiliensis*lectin - ConBr) was freeze-dried and purity-tested by SDS-PAGE [16].

2.2. Hemagglutination activity and inhibition assays

Hemagglutination assays were carried out as described elsewhere [17] using serial dilutions with rabbit erythrocytes, either native or treated with proteolytic enzymes (trypsin or papain). Results were expressed in hemagglutinating units (HU), with one HU being defined as the smallest amount (mg) of protein per mL capable of inducing visible agglutination. Lectin carbohydrate-binding specificity was defined as the smallest sugar concentration capable of fully inhibiting agglutination. Two-fold serial dilutions (initial concentration: 100 mM) of D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-fucose, L-rhamnose, α -lactose, β -lactose and saccharose were prepared in 150 mMNaCl. Lectin (4 HU) was added to each dilution.

2.3. Molecular docking

The crystal structure of ConBr monomer (PDB code 3JU9) [18] and ConA monomer (PDB 1CVN) [19] were used for all docking simulations. The three-dimensional structure of the core trimannoside [Man(α 1-3)] Man(α 1-6) Man of the *H. contortus* glycan was drawn using the online software PRODRG [20]. Molecular docking analysis was performed with Molegro using the MolDock method [21]. MolDock is based on a search algorithm combining differential evolution with a cavity prediction algorithm. The program takes hydrogen bond directionality into account as an additional term in the docking scoring function. A re-ranking procedure was added to increase docking accuracy. A MolDock Score (MDS) was calculated using the scoring function. Grid resolution was 0.30 Å with radius of 15 Å. The search algorithm used was MolDock Optimizer with default settings. The number of runs was 10, and the maximum number of interactions was 2000. The population size and maximum

number of poses were 200 and 10, respectively. Protein–ligand interaction energy was expressed in the form of the MDS in arbitrary units. A more negative value reflects a stronger interaction. The MDS was calculated with the following equation: $MDS = E_{inter} + E_{intra}$, where E_{inter} is the ligand–protein interaction energy [21].

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

Polar interactions were analyzed with the CCP4 software CONTACT [21], adopting the cutoff distances of 3.2 Å. All figures and superposition were performed with the PyMOL program [23].

2.4. Biological assays

2.4.1 Obtaining nematodes

A strain of *H. contortus* was maintained in sheep which were fed with hay, 2% live weight of balanced ration (20% of protein), and water ad libitum. This experiment was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of UFMA, Brazil under protocol number 23115.005443/2017-51.

Fresh feces from sheep artificially infected with *H. contortus* were macerated, washed with distilled water and passed through 1 mm, 105 µm, 55 µm and 25 µm graduated screens. The eggs were suspended in saturated saline and then washed with distilled water [24].

To obtain *H. contortus* L3 larvae, feces from lambs artificially infected were macerated, placed in glass beakers and incubated at 27°C for 15 days. After that, the beakers were then filled with warm water, the contents poured into a Petri dish, the L3 larvae allowed to migrate, and storage set at 6°C [25, 26].

2.4.2. Egg hatch test

ConBr was diluted in PBS (pH 7.2) with six serial dilutions at 50% and 1.2 mg mL⁻¹ as initial concentration. Approximately 100 eggs well⁻¹ were placed in 96-well plates with different concentrations (four replicates) and incubated for 48 hours (27 °C, relative humidity > 80%). For the control, eggs were incubated with the same buffer used to dissolve ConBr. Eggs and larvae were counted in an inverted microscope [27].

2.4.3. Larval exsheathment test

ConBr was diluted in PBS (pH 7.2) with six serial dilutions at 50% and 1.2 mg mL⁻¹ as initial concentration, followed by the addition of *H. contortus* L3 and incubation at 21 °C for 3 hours. Initially, *H. contortus* larvae (L3) were subjected to the exsheathment process by contact with sodium hypochlorite solution (2%). After sieving, the larvae were centrifuged in distilled water for 5 minutes at 407 x g, and the supernatant was removed. The larvae were resuspended in distilled water and centrifuged. This process was repeated twice, until all sodium hypochlorite solution was removed. L3 exsheathment was counted. The same buffer used to dissolve ConBr was also used for the control [28].

2.4.4. Larval development test

H. contortus eggs were obtained, as previously described. One hundred eggs well⁻¹ (100 µL) were added to a 96-well plate and incubated at 27 °C for 24 hours to obtain first-stage larvae (L1). Forty µL of solution containing *Escherichia coli* (autoclaved *E. coli*) 0.11 mg mL⁻¹, NaCl 2.24 mg mL⁻¹, yeast extract 2.8 mg mL⁻¹, amphotericin B (Sigma A2942) 0.018 mg mL⁻¹ and 2.8% of Earle's solution (Sigma E7510) were added in all wells. ConBr was diluted in PBS (pH 7.2) with six serial dilutions at 50% and 0.5 mg mL⁻¹ as initial

concentration. Four replicates of each concentration were added in all wells and incubated at 27 °C for six days. After that, L1 and L3 were counted under an inverted microscope [29].

2.5 Data analysis

The data were initially transformed to Log(X) and normalized, followed by calculation of nonlinear regression to get the IC₅₀ (50% inhibition concentration) and confidence limits (CLs) of each compound in the egg hatch test (EHT), larval development test (LDT), and larval exsheathment test (LET), using GraphPad Prism 7.0 software [30].

3. Results

3.1. Purification and carbohydrate affinity

ConBr was purified, as described by Moreira and Cavada [15]. The chromatogram showed two peaks, the first (PI) corresponding to unbound protein fraction and the second (PII) corresponding to the retained protein fraction (Fig. 1A). In SDS-PAGE, PII showed three bands (Fig. 1B), the first band corresponding to α -chain (25.5 kDa), the second to β -chain (14 kDa), and the third to γ -chain (12 kDa) of ConBr.

The inhibition of hemagglutinating activity showed that the lectin has an affinity for glucose and mannose with minimum inhibitory concentrations of 50 and 25 mM, respectively, and that no affinity was presented for the other carbohydrates tested, as described in Table I.

3.2. In vitro tests against *H. contortus*

ConBr at the concentration of 1.2 mg mL⁻¹ did not inhibit *H. contortus* egg hatch or larval exsheathment. However, it did show significant inhibition of *H. contortus* larval development with an IC₅₀ of 0.26 mg mL⁻¹ (Fig. 2).

3.3. Molecular docking

After molecular docking, a possible interaction of ConBr with the core trimannoside Man(α 1-3) Man(α 1-6) Man present in the glycan (Man₃GlicNac₃fuc₃) of *H. contortus* was verified. The ligand anchored in the carbohydrate recognition domain (CRD) giving an interaction value of MDS = -248.77 (Fig. 3A, Table II), which indicates favorable energy for the binding of the core trimannoside in the CRD of ConBr.

The core trimannoside presented interactions with amino acid residues that comprise the CRD of ConBr. The Man(α 1-3) residue showed polar interactions with the amino acid residues Pro13, Thr15 and Asp16. The Man(α 1-6) residue showed polar interactions with the amino acid residues Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 and Arg228, and the Man residue showed interactions with the amino acid residues Tyr12 and Asp12 (Fig. 3B). All distances from the interactions are described in Table III. The superposition analysis of ConBr CRD obtained in docking revealed a high structural similarity with the crystal structure of ConA complexed with trimannoside (PDB code 1CVN) (Fig 4).

4. Discussion

Lectins are proteins that present biological activities against various organisms, including viruses [31], bacteria [32], fungi [33], insects [34] and parasites [8]. To elicit these biological responses, it is necessary that lectins selectively bind carbohydrate moieties of the glycoprotein exposed at the cell surface [35].

In recent years, many studies have reported on the potential antiparasitic property of plant lectins [8]. ConBr, in addition to presenting activity against *H. contortus*, as described in this study, also has a protective effect *in vivo* against *Leishmania amazonensis* [36], indicating that this lectin is important in the study of parasitic diseases.

Other lectins have also been described to have potential antiparasitic properties against *H. contortus*. For example, Heim and coworkers [37] demonstrated that lectins from the fungi *Coprinopsis cinerea* (GlcNAc- β 1,4-Fuc- α 1,3-binding), *Aleuria aurantia* (fucose-binding) and *Marasmius oreades* (Gal α 1,3Gal/GalNAc-binding) all inhibited the development of *H. contortus*. In addition to fungi, other studies have described the effect of plant lectins, including *Phaseolus vulgaris* (GlucNac-binding), *Canavalia ensiformis* (Gluc/Man-binding), *Dolichos biflorus*, and *Triticum vulgare* (GlucNac-binding), against the development and infection *in vivo* and *in vitro* of *H. contortus*, *Schistosoma mansoni*, and *Eimeria tenella*, respectively [38-40].

All biological activities described for lectins are directly related to lectin-carbohydrate recognition of the glycans of cell surfaces [35]. ConBr presented higher affinity for mannose carbohydrate, which is the major residue present in glycans of some nematode, such as *Caenorhabditis elegans* and *H. contortus* [41,42], suggesting that the effect of ConBr on the inhibition of *H. contortus* development may be related to the recognition and interaction of this carbohydrate in the parasite. Haslam and coworkers [43] described the structure of an *H. contortus* N-glycan (Man₃GlcNAc₂Fuc₁₋₃) containing one core formed by the three mannose molecules Man(α 1-3)Man(α 1-6)Man. Therefore, the susceptibility of nematodes to proteins targeting epitopes containing carbohydrate, together with the elucidation of glycan structures, suggests that lectins may be effective against nematodes [6].

Molecular docking was performed to evaluate the binding of ConBr to the *H. contortus* core trimannoside, and the results indicated interaction of the parasite glycan with the amino acid residues of the CRD of ConBr (Fig. 3). *In silico* studies of the lectin-

carbohydrate interaction pattern have been used to describe possible mechanisms of action of plant lectins in several study models [44-47].

Crystallographic structures of some plant lectins complexed with dimannosides, trimannosides and oligosaccharides of interest were solved in order to better understand some biological activities of lectins [48-50]. The lectin extracted from the *Canavalia ensiformis* seeds (ConA) is an example of a lectin, the structure of which, when complexed with trimannoside, shows activity against *H. contortus*, as well as other gastrointestinal nematodes, such as *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* [38]. Performing a superposition analysis of ConBr structure obtained in molecular docking with ConA (PDB code 1CVN) [19], it was observed that the orientation of the binding of the core trimannoside in the CRD of ConBr is similar to that obtained in the ConA crystal structure (Fig. 4) and K_a values for ConA and ConBr–coretrimannoside interaction is about 10^{-4} M^{-1} (Table II) [51], thus corroborating with our results obtained in molecular docking.

The interactions of the O4 and O6 atoms in the Man(α 1-6) residue with the Asp208 residue of ConBr (Table III) are indispensable for the formation of the first binding in the CRD of ConA-like lectins [52]. Despite that, all N-glycans share a common carbohydrate core: $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3) \quad \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr}$. These molecules have variations in their structures and are classified into three types: (1) oligomannose, in which only mannose residues are attached to the core; (2) complex, in which “antennae” initiated by N-acetylglucosaminyltransferases (GlcNAcTs) are attached to the core; and (3) hybrid, in which only mannose residues are attached to the Man α 1–6 arm of the core, and one or two antennae are on the Man α 1–3 arm [10].

In conclusion, our findings revealed that *C. brasiliensis* lectin (ConBr) inhibits *H. contortus* development *in vitro*, and through the *in silico* approach, we suggest that the inhibition of development is directly related to the recognition of the core trimannoside present in the N-glycans of these parasites. Consequently, these data are important with respect to the preparation of recombinant proteins able to interact with N-glycans of *H. contortus*.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was partly funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) with referencetothe Research Productivity grant of Bruno Anderson Matias da Rocha andLivio Martins Costa Júnior.

References

- [1] D.L. Emery, P.W. Hunt, Le L.F. Jambre, *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here?, *Int J Parasitol.* 46 (2016) 755-769.
- [2] E.P. Hoberg, D.S. Zarlenga, Evolution and biogeography of *Haemonchus contortus*: Linking faunal dynamics in space and time, *AdvParasitol.* 93 (2016) 1-30.

- [3] A.C.Kotze, R.K. Prichard, Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis, *AdvParasitol.* 93 (2016) 397-428.
- [4] C. Wang, F. Li, Z. Zhang, X. Yang, A.A. Ahmad, X. Li, A. Du, M. Hu, Recent research progress in China on *Haemonchus contortus*, *Front Microbiol.* 24 (2017) 1509.
- [5] C. Britton, B. Roberts, N.D. Marks, Functional genomics tools for *Haemonchus contortus* and lessons from other helminths, *AdvParasitol.* 93 (2016) 599-623.
- [6] K. Paschinger, I.B. Wilson, Two types of galactosylated fucose motifs are present on N-glycans of *Haemonchus contortus*, *Glycobiology.* 25 (2015) 585-589.
- [7] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectin: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (1998) 575-692.
- [8] F. Iordache, M. Ionita, L.I. Mitrea, C. Fafaneata, A. Pop, Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins, *Curr Pharm Biotechnol.* 16 (2015) 152-61.
- [9] C.S. Teixeira, H.C. Silva, T.R. Moura, F.N. Pereira-Júnior, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, P. Delatorre, B.A. Rocha, B.S. Cavada, Crystal structure of the lectin of *Camptosemapedicellatum*: implications of a conservative substitution at the hydrophobic subsite, *J. Biochem.* 152 (2012) 87-98.
- [10] A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler, *Essentials of glycobiology*, 2nd ed., New York, 2009.

- [11] A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N.H. Packer, J.H. Prestegard, R.L. Schnaar, P.H. Seeberger, *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed., New York, 2017.
- [12] B.S. Cavada, T. Barbosa, S. Arruda, T.B. Grangeiro, M. Barral-Netto, Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins, *Curr.Protein.Pept.Sci.* 2 (2001) 123-35.
- [13] J. Sanz-Aparicio, J. Hermoso, T.B. Grangeiro, J.J. Calvete, B.S. Cavada, The crystal structure of *Canavaliabrasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A, *FEBS Lett.* 405 (1997) 114-118
- [14] S.C. Barauna, M.P. Kaster, B.T. Heckert, K.S. Nascimento, F.M. Rossi, E.H. Teixeira, B.S. Cavada, A.L. Rodrigues, R.B. Leal, Antidepressant-like effect of lectin from *Canavaliabrasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice, *Pharmacol.Biochem.Behav.* 85 (2006) 160-169.
- [15] R.A. Moreira, B.S. Cavada, Lectin from *Canavaliabrasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination, *Biol. Plant.* 26 (1984) 113-120.
- [16] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680-685.
- [17] R.A. Moreira, J.C. Perrone, Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiology.* 59, (1977) 783-787.

- [18] E.H. Bezerra, B.A. Rocha, C.S. Nagano, G.A. Bezerra, T.R. Moura, M.J. Bezerra, R.G. Benevides, A.H. Sampaio, A.M. Assreuy, P. Delatorre, B.S. Cavada, Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation, *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 20 (2011) 566-570.
- [19] J.H. Naismith, R.A. Field, Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A, *J. Biol. Chem.* 12 (1996) 972-976.
- [20] A.W. Schüttelkopf, D.M.F. Van Aalten, PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes, *ActaCrystallogr. Sect. D.* 60 (2004) 1355–1363.
- [21] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315–3321.
- [22] Collaborative Computational Project, Number 4, The CCP4 suite: programs for crystallography, *ActaCrystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 50 (1994) 760-763.
- [23] W.L. Delano, ThePymol Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, 2002.
- [24] G.C. Coles, C. Bauer, F.H.M. Borgsteede, S. Geerts, T.R. Klei, M.A. Taylor, P.J. Waller, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance, *Vet. Parasitol.* 44 (1992) 35–44.
- [25] F.H.S. Roberts, J.P. O`Sullivan, Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infection the gastro-intestinal tract of cattle, *Australian Agriculture Research.*1 (1950) 99-192.

- [26] H. Ueno, P.C. Gonçalves, Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Japan International Cooperation Agency. (1998) 144.
- [27] *In vitro* Screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies, Dordrecht, 2010.
- [28] D. Bahuaud, C.M.O. De Montellano, S. Chauveau, F. Prevot, F. Torres-Acosta, I. Fouraste, H. Hoste, Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes, *Parasitology*. 132 (2006) 545-554.
- [29] J. Demeler, U. Küttler, A. El-Abdellati, K. Stafford, A. Rydzik, M. Varady, F. Kenyon, G. Coles, J. Höglund, F. Jackson, J. Vercruyse, G. von Samson-Himmelstjerna, Standardization of the larval migration inhibition test for detection of resistance to ivermectin into gastro intestinal nematoids of ruminants, *Vet.Parasitol.*174 (2010) 58-64.
- [30] GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.
- [31] W. Zhang, K.M. Bouwman, S.J. van Beurden, S.R. Ordonez, M. van Eijk, H.P. Haagsman, M.H. Verheije, E.J.A. Veldhuizen, Chicken mannose binding lectin has antiviral activity towards infectious bronchitis virus, *Virology*. 509 (2017) 252-259.
- [32] S. Nunes-Edos, M.A. Souza, A.F. Vaz, G.M. Santana, F.S. Gomes, L.C. Coelho, P.M. Paiva, R.M. Silva, R.A. Silva-Lucca, M.L. Oliva, M.C. Guarnieri, M.T. Correia, Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothropsleucurus* snake venom, *Comp.Biochem. Physiol. B.Biochem. Mol. Biol.* 159 (2011) 57-63

- [33] G. Chandrasekaran, Y.C. Lee, H. Park, Y. Wu, H.J. Shin, Antibacterial and antifungal activities of lectin extracted from fruiting bodies of the korean cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassislatifolia*(Agaricomycetes), *Int J Med Mushrooms*. 18 (2016) 291-299.
- [34] V. Triguéros, M. Wang, D. Père, L. Paquereau, L. Chavant, D. Fournier, Modulation of a lectin insecticidal activity by carbohydrates, *Arch. Insect.Biochem.Physiol.* 45 (2000) 175-179.
- [35] K. Kiran-Kumar, K. Lalith Prakash Chandra, J. Sumanthi, G. Sridhar Reddy, P. ChadraShekar, B.V.R. Reddy, Biological role of lectins: A review. *J. Orofac.Sci.*4 (2012) 20–25.
- [36] M. Barral-Netto, R.L. Von Sohsten, M. Teixeira, W.L. Santos, M.L. Pompeu, R.A. Moreira, J.T. Oliveira, B.S. Cavada, E. Falcoff, A. Barral. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavaliabrasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmaniaamazonensis*, *Acta.Trop.* 60 (1996) 237-50.
- [37] C. Heim, H. Hertzberg, A Butschi, S. Bleuler-Martinez, M. Aebi, P, Deplazes M. Künzler, S. Štefanić, Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins, *Parasit.Vectors*. 19 (2015) 425
- [38] L. Ríos-de Álvarez, F. Jackson, A. Greer, Y. Bartley, D.J. Bartley, G. Grant, J.F. Huntley, *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties, *Vet.Parasitol.* 25 (2012) 390-398.
- [39] C.M. Melo, A.L. Lima, E.I. Beltrão, C.C. Cavalcanti, M.R. Melo-Júnior, S.M. Montenegro, L.C. Coelho, M.T. Correia, A.M. Carneiro-Leão, Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*, *Acta Trop.*118 (2011) 152-158.

- [40] A.L. Fuller, L.R. McDougald, Lectin-binding by sporozoites of *Elmeriatenella*. Parasitol. Res. 88 (2002) 118-125.
- [41] J.F. Cipollo, C.E. Costello, C.B. Hirschberg. The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans, J. Biol. Chem. 20 (2002) 49143-49157
- [42] S.M. Haslam, G.C. Coles, A.J. Reason, H.R. Morris, A. Dell, The novel core fucosylation of *Haemonchus contortus* N-glycans is stage specific, Mol. Biochem. Parasitol. 15 (1998) 143-147.
- [43] S.M. Haslam, G.C. Coles, E.A. Munn, T.S. Smith, H.F. Smith, H.R. Morris, A. Dell, *Haemonchus contortus* glycoproteins contain N-linked oligosaccharides with novel highly fucosylated core structures, J. Biol. Chem. 29 (1996) 30561-30570.
- [44] C.S. Teixeira, A.M.S. Assreuy, V.J.S. Osterne, R.M.F. Amorim, L.A.C. Brizeno, H. Debray, C.S. Nagano, P. Delatorre, A.H. Sampaio, B.A.M. Rocha, B.S. Cavada, Mannose-specific legume lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive processes in mice, Process Biochemistry. 49 (2014) 529-534.
- [45] R.F. Carneiro, C.S. Teixeira, A.A. Melo, A.S. Almeida, B.S. Cavada, O.V. Sousa, B.A.M. Rocha, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, L-Rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: Amino acid sequence and molecular modeling, Int. J. Biol. Macromol. 78 (2015) 180-188.
- [46] P.A.C. Maranhão, C.S. Teixeira, B.L. Sousa, I.L. Barroso-Neto, J.E. Monteiro-Júnior, A.V. Fernandes, M.V. Ramos, I.M. Vasconcelos, J.F.C. Gonçalves, B.A.M. Rocha, V.N. Freire, T.B. Grangeiro, cDNA cloning, molecular modeling and docking calculations of L-

typelectins from *Swartzia simplex* var. *grandiflora* (Leguminosae, Papilionoideae), a member of the tribe Swartzieae, *Phytochemistry*. 139 (2017) 60-71.

[47] I.L. Barroso-Neto, P. Delatorre, C.S. Teixeira, J.L. Correia, J.B. Cajazeiras, R.I. Pereira, K.S. Nascimento, E.P. Laranjeira, A.F. Pires, A.M. Assreuy, B.A. Rocha, B.S. Cavada, Structural analysis of a *Diocleasclerocarpa* lectin: Study on the vasorelaxant properties of Dioclealectins, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 464-70.

[48] D.A. Rozwarski, B.M. Swami, C.F. Brewer, J.C. Sacchettini. Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates, *J. Biol. Chem.* 4 (1998) 32818-32825.

[49] R.G. Benevides, G. Ganne, R.C. Simões, V. Schubert, M. Niemietz, C. Unverzagt, V. Chaz. alet, C. Breton, A. Varrot, B.S. Cavada, A. Imberty, A lectin from *Platypodium elegans* with unusual specificity and affinity for asymmetric complex N-glycans, *J. Biol. Chem.* 27 (2012) 26352-26364.

[50] A.C. Almeida, V.J. Osterne, M.Q. Santiago, V.R. Pinto-Junior, J.C. Silva-Filho, C.F. Lossio, F.L. Nascimento, R.P. Almeida, C.S. Teixeira, R.B. Leal, P. Delatorre, B.A. Rocha, A.M. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Structural analysis of *Centrolobium tomentosum* seed lectin with inflammatory activity, *Arch. Biochem. Biophys.* 15 (2016) 73-83.

[51] T.K. Dam, B.S. Cavada, T.B. Grangeiro, C.F. Santos, F.A. Sousa, S. Oscarson, C.F. Brewer, Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J. Biol. Chem.* 15 (1998) 12082-12088.

[52] P. Delatorre, B.A. Rocha, C.A. Gadelha, T. Santi-Gadelha, J.B. Cajazeiras, E.P. Souza, K.S. Nascimento, V.N. Freire, A.H. Sampaio, W.F. Azevedo Jr, B.S. Cavada, Crystal structure of a lectin from *Canavaliamaritima* (ConM) in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins, J. Struct. Biol. 154 (2006) 280-286.

FIGURE AND TABLE LEGENDS:

Table I. Inhibitory effect of monosaccharides and disaccharides on ConBr hemagglutinating activity.

Table II. Moldock score (MDS) and isothermal titration microcalorimetry (ITC) data of core trimannoside on ConBr and ConA lectins.

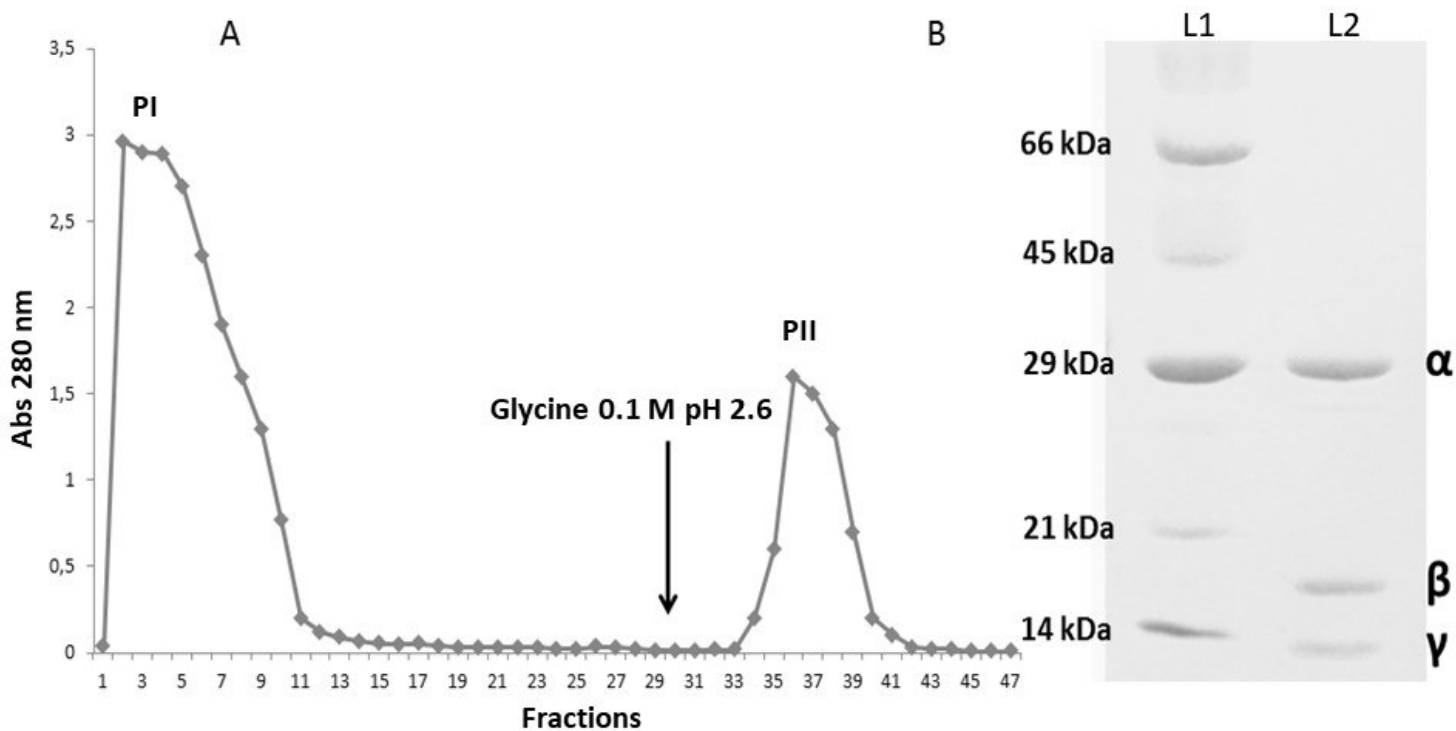
Table III. Polar contacts between ConBr and core trimannoside glycan of *Haemonchus contortus*.

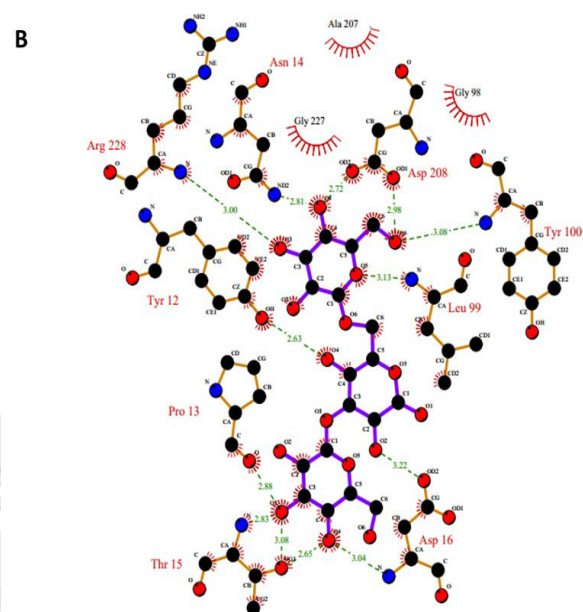
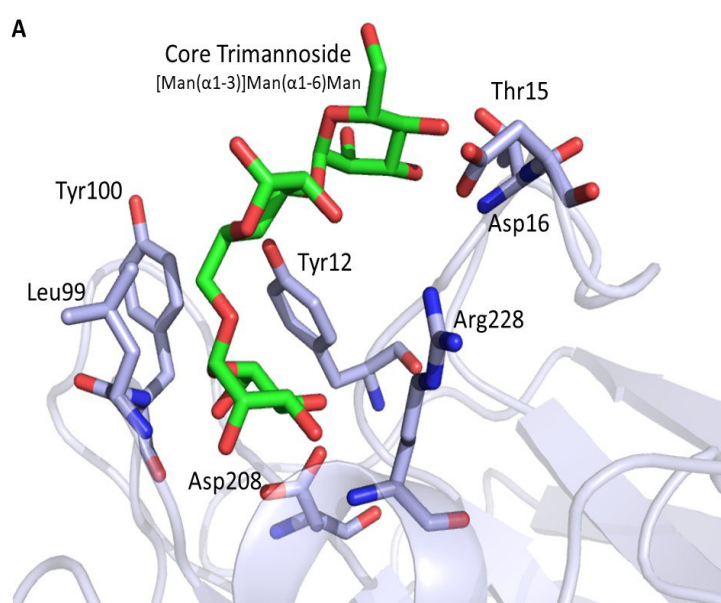
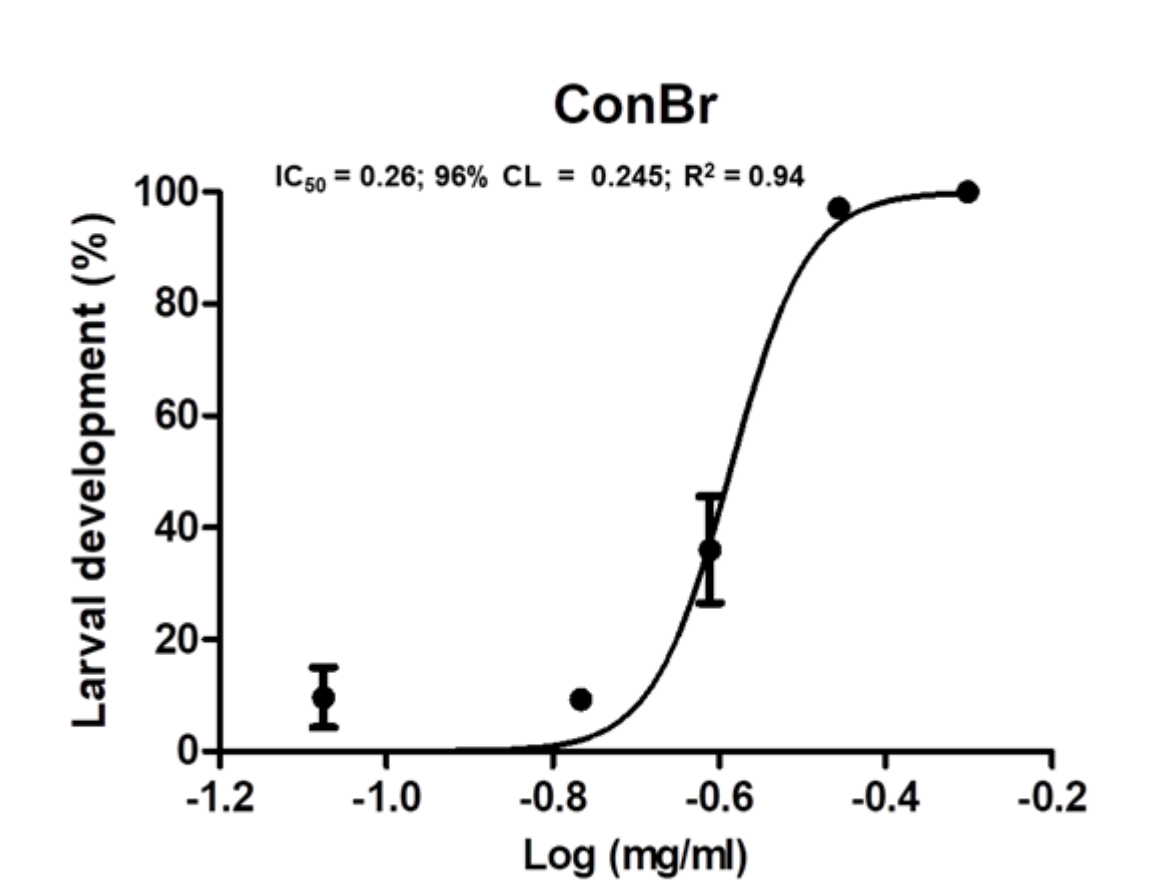
Fig. 1. ConBr purification by affinity chromatography (A) Chromatogram of *Canavaliabrasiliensis* crude extract in Sephadex G-50 column. (B) SDS-PAGE. Lane 1: Molecular mass markers (phosphorylase b, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa and α -lactalbumin, 14.4 kDa); Lane 2: PII.

Fig. 2. Inhibitory effect of ConBr on the development of *Haemonchus contortus*. The graph shows the inhibition of development of *H. contortus* larvae at different concentrations of ConBr. L1 and L3 stages were quantified relative to the respective untreated control. Bars represent the means of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviations. Half inhibition concentration (IC_{50}) in $mg\ mL^{-1}$, confidence limits (CL) and coefficient of determination (R^2) were added at the top of the graph.

Fig. 3. Molecular docking of ConBr with core trimannoside glycan of *H. contortus*. (A) Representation of the carbohydrate recognition domain of ConBr (light blue) complexed with core trimannoside (green). (B) Prediction of H-bonds and van der Waals interactions in the carbohydrate recognition domain. Distances in Å.

Fig. 4. Carbohydrate binding site structural alignment of ConA-like lectins. ConBr (light blue) structural alignment with ConA (PDB code 1CVN) (yellow) complexed with core trimannoside. Green and yellow ligands are from the ConBr and ConA structures, respectively.





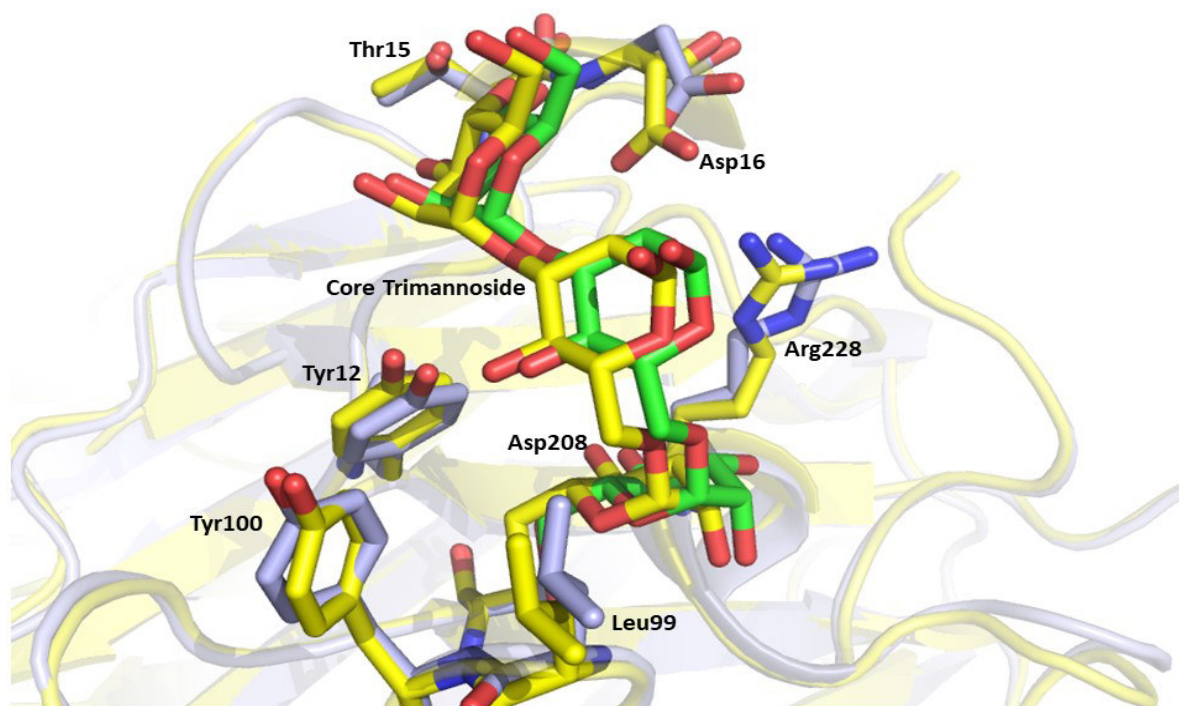


Table I. Inhibitory effect of monosaccharides and disaccharides on ConBr hemagglutinating activity.

Carbohydrates	MIC (mM) ^a
D-Mannose	25
D-Glucose	50
D-Galactose	NI ^b
L-Rhamnose	NI
L-Fucose	NI
<i>N</i> -acetyl-D-glucosamine	NI
α -Lactose	NI
β -Lactose	NI
Saccharose	NI

^aMIC, minimum inhibitory concentration;

^bNI, carbohydrate not inhibitory below a concentration of 100 mM.

Table II. Moldock score (MDS) and isothermal titration microcalorimetry (ITC) data of core trimannoside on ConBr and ConA lectins.

Lectins	MDS ^a	ITC ^b K_a ($M^{-1} \times 10^{-4}$)
ConBr	-248.77	36.6
ConA	-296.14	49.0

^aMoldock Score (MDS) = $E_{inter} + E_{intra}$ where E_{inter} is the ligand protein interaction energy:

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

^bIsothermal titration microcalorimetry of ConBr and ConA [52]

Table III. Polar contacts between the ConBr and core trimannoside glycan of *H. contortus*.

Amino acids	Trimannoside	Distances(\AA)*
Man(α1-6)		
Asn14 ND2	O4	2.81
Leu99 N	O5	3.13
Tyr100 N	O6	3.08
Asp208 OD1	O6	2.98
Asp208 OD2	O4	2.72
Arg228 N	O3	3.00
Man		
Tyr12 OH	O4	2.63
Asp16 OD2	O2	3.20
Man(α1-3)		
Pro13 O	O3	2.88
Thr15 OG1	O3	3.08
Thr15 N	O3	2.83
Asp16 N	O4	3.04

*Polar contacts with cutoff between 2.2 and 3.2 \AA .