

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DA LECTINA
DAS SEMENTES DE *Dioclea violacea* E O ANTIBIÓTICO
GENTAMICINA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

VALDENICE FERREIRA DOS SANTOS

SÃO LUÍS, MA

2021

VALDENICE FERREIRA DOS SANTOS

**ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DA LECTINA
DAS SEMENTES DE *Dioclea violacea* E O ANTIBIÓTICO
GENTAMICINA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito necessário para a obtenção do título de mestra em ciências da saúde.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

Coorientador: Prof. Dr. Luís Cláudio do Nascimento Silva

SÃO LUÍS, MA

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

FERREIRA DOS SANTOS, VALDENICE.

ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DA LECTINA DAS
SEMENTES DE *Dioclea violacea* E O ANTIBIÓTICO GENTAMICINA
EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES / VALDENICE FERREIRA DOS
SANTOS. - 2021.

68 f.

Coorientador(a): LUÍS CLÁUDIO DO NASCIMENTO SILVA.

Orientador(a): CLAUDENER SOUZA TEIXEIRA.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
SÃO LUÍS, 2021.

1. Antimicrobiano. 2. Interação. 3. Proteína. I. DO
NASCIMENTO SILVA, LUÍS CLÁUDIO. II. SOUZA TEIXEIRA,
CLAUDENER. III. Título.

**ESTUDO DA INTERAÇÃO E EFEITO MODULADOR DA LECTINA
DAS SEMENTES DE *Dioclea violacea* E O ANTIBIÓTICO
GENTAMICINA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito necessário para a obtenção do título de mestra em ciências da saúde.

Aprovada em: 11 / 02 / 2021

BANCA EXAMINADORA:

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

Profa. Dra. Alexandra Martins dos Santos Soares
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Jefferson Almeida Rocha
Universidade Federal do Maranhão (UFMA)

Prof. Dr. Romulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Que do pó levanta o pequeno e, do
monturo ergue o necessitado, para o fazer
assentar com os príncipes, sim, com os
príncipes do seu povo.

Salmos 113: 7,8.

Dedico

À Deus.
À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por Seu imenso amor, por ter me dado a oportunidade de viver tudo que estou vivendo, por ser o autor da minha história. Toda honra e toda glória seja dada a Ele.

À toda a minha família, em especial meu pai Walter e minha mãe Maria Rosete, por serem a minha base, por estarem sempre ao meu lado me inspirando e me incentivando a ir além das dificuldades. Por cada sacrifício, por me mostrar que a educação transforma vidas. Como meu pai sempre diz, há um ditado que filho de pobre não tem sorte, mas filho de pobre não precisa de sorte, o que ele precisa é de oportunidade. Obrigada por agarrarem comigo esta oportunidade. Essa conquista é nossa! Agradeço também aos meus irmãos Waldey e Walter Júnior por todo o apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira, pela oportunidade, confiança, paciência, por todos os ensinamentos, por me inspirar através da garra de um cearense que nasceu no interior, passou por muitas dificuldades, mas agarrou as oportunidades e hoje é um professor/cientista de excelência. Sou grata a Deus por ter me concedido a oportunidade de lhe conhecer e poder seguir os seus passos na ciência.

Ao meu coorientador prof. Dr. Luís Cláudio do Nascimento Silva, por me “adotar” cientificamente e me acolher em seu laboratório desde o primeiro mês do mestrado, em uma parceria inesperada, a qual espero que se prolongue por muito tempo.

À todas as pessoas do meu quilombo Piqui da Rampa, por me inspirarem a sair em busca de um sonho. Talvez não saibam, mas em alguns momentos da minha trajetória eu pensei que não iria conseguir devido às muitas dificuldades, porém nunca pensei em desistir e, essa força que tenho, tem uma grande contribuição desta comunidade.

Aos meus tios e primos, em especial minhas tias Francisca e Dorinha, por me acolherem em suas casas, por todo o amor e cuidado durante esses anos. Agradeço ainda à Fran, Mara, Adrielle, Alan e Gilcélia por estarem sempre ao meu lado nessa trajetória.

Aos irmãos na fé da área de missões João Jonas pelo cuidado em oração e ainda aos irmãos que conheci em São Luís, agradeço a acolhida, a amizade e cada oração feita em favor da minha vida.

Aos amigos da turma 2019 do mestrado em ciências da saúde, sou grata pela empatia, pelo apoio e companheirismo.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular - LABEM, pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM da Universidade Regional do Cariri – URCA, na pessoa do prof. Dr. Henrique Douglas por possibilitar a execução dos ensaios biológicos, além disso, agradeço cada aluna, pela acolhida e por toda a ajuda na realização dos experimentos.

À Universidade Federal do ABC Paulista, na pessoa do prof. Wanius Garcia pela colaboração nos ensaios de interação.

À Universidade CEUMA pela parceria para a realização de ensaios biológicos.

Às instituições de fomento, FAPEMA, CAPES e CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de pós-graduação em ciências da saúde, pela oportunidade de poder fazer parte desta instituição e desse programa.

Aos docentes que compõem a banca de avaliação desse trabalho, pela disponibilidade e por todas as contribuições.

Aos meus professores desde a educação básica até a pós-graduação por todos os ensinamentos.

A todos os amigos que estiveram comigo em algum momento da minha trajetória e a cada pessoa que direta ou indiretamente contribuiu com o meu crescimento acadêmico e humano.

A todos, a minha eterna gratidão!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS.....	17
2.2 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA	18
2.3 ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS	19
2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LECTINAS.....	21
2.5 LECTINAS DE PLANTAS.....	22
2.6 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE <i>Dioclea violacea</i>	24
2.7 ASPECTOS GERAIS DA LECTINA DE <i>Dioclea violacea</i>	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 GERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 COLETA DAS SEMENTES, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA.....	28
4.2 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE	28
4.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	29
4.4 REAGENTES, DROGAS E CEPAS BACTERIANAS.	29
4.5 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	30
4.6 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	30
4.7 EFEITO MODULADOR DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA	31
4.8 PERFIL DA TOLERÂNCIA BACTERIANA À GENTAMICINA	31
4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 PURIFICAÇÃO DA LECTINA E ENSAIOS DE INTERAÇÃO DVL-GENTAMICINA	33
5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULAÇÃO ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR DVL	37
5.3 PERFIL DA TOLERÂNCIA BACTERIANA À GENTAMICINA	38
6 CONCLUSÕES.....	40
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO	41

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO A
ANEXO B
ANEXO C
ANEXO D
ANEXO E
ANEXO F
ANEXO G
ANEXO H

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMEs	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
ARGs	Genes de resistência antimicrobiana
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CIM	Concentração inibitória mínima
CLF1	Lupano triterpeno 3β , 6β , 16β -trihidroxylup-20 (29) -eno
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
cm	Centímetros
Con A	<i>Concanavalina A</i>
DEAE	Dietilaminoetil celulose
DVL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
DRC	Domínio de reconhecimento a carboidratos
g	Gravitacional
h	Horas
HGT	Transferência horizontal de genes
kDa	Kilodalton
M	Molaridade
m	Massa
mg	Miligramas
mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitros
Min	Minutos
mL	Mililitros
mL min ⁻¹	Mililitros por minutos
MurNAc	Ácido <i>N</i> -acetilmurâmico
nm	Nanômetros
NI	Não inibiu
PI	Pico I
PII	Pico II
PAGE	Eletroforese em gel e poliacrilamida
PELa	Lectina de <i>Platypodium elegans</i>
pH	Potencial hidrogeniôco
PPL	Lectina de <i>Parkia platycephala</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
U.H.	Unidade de hemaglutinação
v	Volume
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
μL	Microlitros
μG	Microgramas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A: interação entre a lectina e carboidratos da membrana dos eritrócitos. B: Ilustração da reversibilidade da ligação lectina-carboidratos.....	21
Figura 2 - Ilustração da espécie <i>D. violacea</i>	24
Figura 3- Estrutura tetramérica da DVL com a presença de Ca^{2+} e Mn^{2+}	25
Figura 4- Purificação da DVL.....	34
Figura 5- Espectroscopia de fluorescência intrínseca de DVL.....	36
Figura 6- Modulação da atividade antibiótica da gentamicina complexada com DVL.....	38
Figura 7- Efeito de DVL na aquisição da tolerância à gentamicina por <i>Staphylococcus aureus</i>	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividades biológicas da lectina DVL	25
Tabela 2 - Fonte bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.....	30
Tabela 3- Purificação de DVL.....	33
Tabela 4- Efeito inibitório de monossacarídeos e gentamicina na atividade hemaglutinante de DVL.....	35
Tabela 5- Valores de concentração inibitória mínima.....	37

RESUMO

A Organização Mundial da Saúde classificou a resistência bacteriana aos antibióticos como um importante problema de saúde pública no século XXI, em virtude dos danos causados tanto a saúde humana e animal quanto no âmbito econômico, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias, a fim de solucionar esta problemática. Visando isso, estudos *in vitro* revelam que uma classe de proteínas com habilidade de reconhecerem e interagirem com carboidratos específicos, chamadas lectinas, quando associadas à antibióticos têm se mostrado uma alternativa eficaz para o tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes, visto que essa combinação é capaz de aumentar o efeito antibacteriano de aminoglicosídeos. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a interação e o efeito modulador da lectina de *Dioclea violacea* (DVL) e o antibiótico gentamicina contra linhagens bacterianas multirresistentes. Inicialmente foi realizada a coleta das sementes, preparação da farinha e extração da lectina utilizando solução salina de NaCl 0,15 M, seguida da purificação da lectina por meio de cromatografia de afinidade em gel sephadex G-75. A lectina pura foi utilizada nos ensaios de interação, os quais foram: inibição da atividade hemaglutinante e espectroscopia de fluorescência, a fim de medir a constante de interação entre lectina e antibiótico. Nos ensaios biológicos foram utilizadas cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* 06 e *Pseudomonas aeruginosa* 15, onde foi observada a concentração inibitória mínima (CIM) da lectina, além disso, foi utilizada uma concentração sub-inibitória da lectina no ensaio de modulação da atividade antibiótica, buscando observar a capacidade da lectina de potencializar o efeito da gentamicina contra as cepas bacterianas e, realizou-se ainda o ensaio de influência da DVL no desenvolvimento do fenótipo adaptativo para a gentamicina. O perfil do cromatograma mostrou dois picos, o primeiro (PI) correspondendo à fração de proteína não retida e o segundo (PII) correspondendo à fração de proteína retida. Na eletroforese, PII mostrou três bandas correspondendo à cadeia α (25,5 kDa), cadeia β (14 kDa) e cadeia γ (12 kDa) de DVL. A inibição da atividade hemaglutinante mostrou que DVL tem afinidade à gentamicina, glicose e manose com concentrações inibitórias mínimas de 12,5, 25 e 12,5 mM, respectivamente. Os resultados revelaram uma diminuição gradual na intensidade de fluorescência de DVL levando à extinção na presença de concentrações crescentes de gentamicina. A CIM obtida para DVL contra todas as cepas estudadas não foi clinicamente relevante (CIM \geq 1024 ug/mL). No entanto, quando a DVL foi combinada com gentamicina, foi observado um aumento significativo da atividade antibiótica, representando uma redução de 80,1% e 60,3% na quantidade de gentamicina necessária para ter o mesmo efeito em *S. aureus* e *E. coli* respectivamente, constatou-se após 10 dias de tratamento contínuo que a DVL reduziu a tolerância de *S. aureus* à gentamicina. Desta forma observou-se que a gentamicina pode interagir com DVL através do domínio de reconhecimento à carboidratos (DRC), sugerindo que os resultados obtidos neste estudo podem estar diretamente relacionados à interação DVL-gentamicina.

Palavras chaves: Antimicrobiano; Proteína; Interação.

ABSTRACT

The World Health Organization ranked the bacterial resistance to antibiotics as an important public health problem in the 21st century, due to the damage caused both to human and animal health and economically, making it necessary to develop new strategies in order to solve this problem. To this end, *in vitro* studies reveal that a class of proteins with the ability to recognize and interact with specific carbohydrates, called lectins, when associated with antibiotics have been shown an effective alternative for the treatment of infections caused by multidrug-resistant pathogens, since this combination is able to increase the antibacterial effect of aminoglycosides. This work aimed to evaluate the interaction and the modulating effect of the lectin of *Dioclea violacea* (DVL) and the antibiotic gentamicin against multiresistant bacterial strains. Initially, seeds were collected, flour was prepared and lectin was extracted using 0.15 M NaCl saline solution, followed by lectin purification by means of sephadex G-75 affinity chromatography. Pure lectin was used in the interaction tests, which were inhibition of hemagglutinating activity and fluorescence spectroscopy in order to measure the interaction constant between lectin and antibiotic. In biological assays, multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* 06 and *Pseudomonas aeruginosa* 15 were used, where the minimum inhibitory concentration of lectin capable of inhibiting bacterial growth was observed, a subinhibitory concentration of lectin was used in the modulation test of the lectin antibiotic activity, aiming to observe the ability of lectin to potentiate the effect of gentamicin against bacterial strains, in addition, the DVL Influence assay on the development of the adaptive phenotype for gentamicin was carried out. The chromatogram profile showed two peaks, the first (PI) corresponding to the fraction of unretained protein and the second (PII) corresponding to the fraction of retained protein. In electrophoresis, PII showed three bands corresponding to the α (25.5 kDa), β (14 kDa) and γ (12 kDa) DVL chains. The inhibition of hemagglutinating activity showed that DVL has an affinity for gentamicin, glucose and mannose with minimum inhibitory concentrations of 12.5, 25 and 12.5 mM, respectively. The results revealed a gradual decrease in the fluorescence intensity of DVL leading to extinction in the presence of increasing concentrations of gentamicin. The MIC obtained for DVL against all strains studied was not clinically relevant (MIC \geq 1024 μ g / mL). However, when DVL was combined with gentamicin, a significant increase in antibiotic activity was observed, representing a reduction of 80.1% and 60.3% in the amount of gentamicin needed to have the same effect in *S. aureus* and *E. coli* respectively, it was found after 10 days of continuous treatment that DVL reduced the tolerance of *S. aureus* to gentamicin. In this way it was observed that gentamicin can interact with DVL through the carbohydrate recognition domain (CRD), suggesting that the results obtained in this study may be directly related to the DVL-gentamicin interaction.

Keywords: Antimicrobial; Protein; Interaction

1 INTRODUÇÃO

A Organização mundial da Saúde (OMS) estima que as infecções causadas por bactérias resistentes a medicamentos, são responsáveis por 700 mil mortes anualmente, principalmente relacionadas à infecções comuns como tuberculose e malária. Baseado neste índice e considerando o atual arcabouço terapêutico estima-se que no ano de 2050 ocorrerão 10 milhões de mortes associadas as infecções bacterianas multirresistentes (WHO, 2014).

Diante do surgimento de cepas de micro-organismos, tais como *S. aureus* e *E. coli*, resistentes a diversos antibióticos, surgiram grandes desafios na escolha da terapêutica, devido a maior parte das cepas isoladas de infecções hospitalares ser resistente as principais classes de antibióticos utilizados nos tratamentos convencionais tais como, aminoglicosídeos, betalactâmicos, fluoroquinolonas e glicopeptídeos (MONTUFAR ANDRADE et al., 2016). No Brasil, foi criado, o plano nacional para a prevenção e controle da resistência microbiana nos serviços de saúde, visando notificar os casos e buscar soluções para a problemática da resistência bacteriana aos antibióticos (ANVISA, 2017).

A resistência dos microrganismos à ação dos antimicrobianos pode ocorrer de forma parcial ou total, por meio de diferentes mecanismos, sendo que o uso incorreto de antibióticos aliado a pressão seletiva, são fatores determinantes no surgimento e disseminação da resistência bacteriana (CARD et al., 2013).

Atualmente tem ocorrido uma constante busca por novas moléculas que possam ser utilizadas como alternativas para aumentar a eficiência dos antibióticos quando administradas em menores concentrações. Essa prática, visa controlar o surgimento de novas cepas resistentes à determinados antibióticos e reduzir os efeitos nefrotóxicos ocasionados pelo uso prolongado dessas drogas (SIEBRA et al., 2018). Entre as diversas moléculas de origem natural com potencial em modular a ação de antibióticos, podemos citar, os óleos essenciais (COUTINHO et al., 2017), secreções glandulares de anfíbios (SALES, et al., 2017) vitaminas (TINTINO, et al., 2018), extratos de macroalgas (CORDEIRO et al., 2018) e proteínas de plantas (SANTOS et al., 2019).

Dentre as proteínas com ação contra bactérias destacam-se as lectinas, que são proteínas de origem não-imunológica com capacidade de reconhecer glicanos na superfície das membranas biológicas e assim modular diferentes respostas celulares (PEUMANS;VAN DAMME, 1995). Essas proteínas são classicamente consideradas um grupo heterogêneo com

propriedades bioquímicas e atividades biológicas acentuadamente diferentes, e apresentam funções em processo importantes tais como infecções, câncer, transporte proteico e embriogênese (GABIUS;GABIUS, 1997). Todas as atividades estão diretamente relacionadas com a capacidade dessas proteínas em reconhecer carboidratos de membranas celulares.

As lectinas podem mediar a identificação de microrganismos por meio da interação com carboidratos complexos em superfícies de bactérias (PROCÓPIO et al., 2017). Muitos trabalhos têm relatado o papel das lectinas com atividade antibacteriana tanto contra bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, através da interação com peptidoglicanos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana (IORDACHE et al., 2015).

Estudos com lectinas na modulação da atividade antibiótica têm ganhado destaque nos últimos anos, a exemplo podemos destacar o potencial modulador de uma lectina isolada das sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML), uma espécie encontrada no cerrado maranhense conhecida popularmente como amargoso ou angelim-do-cerrado. Nesse estudo Santos e colaboradores (2020a), relataram a interação da lectina com o antibiótico gentamicina por meio da inibição da atividade hemaglutinante. Além disso, foi demonstrado o efeito modulador da gentamicina contra cepas multirresistentes de *S. aureus*.

A lectina presente nas sementes de *Parkia platycephala*, que apresenta afinidade principalmente com os carboidratos glicose e manose, também se mostrou um agente modulador da ação antibiótica de gentamicina contra cepas bacterianas multirresistentes (SILVA et al., 2019).

Diante do exposto, é importante destacar que a lectina de *Dioclea violacea* (DVL), a qual é alvo de estudo desse trabalho, é uma proteína que assim como outras lectinas com potencial modulador da ação antibiótica, reconhece e interage primariamente com resíduos de glicose e manose. (BEZERRA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2019).

Nesse cenário o presente estudo buscou examinar a interação e o efeito modulador da atividade antibiótica da lectina das sementes de *D. violacea* e sua capacidade de inibir o desenvolvimento do fenótipo adaptativo em cepas bacterianas. Visando contribuir com as medidas de combate à resistência bacteriana aos antibióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana aos antibióticos tem sido uma problemática preocupante no âmbito clínico e da saúde pública, haja vista que o desenvolvimento da resistência de determinadas bactérias patogênicas está ocorrendo num fluxo muito rápido, comparando-se com a capacidade da indústria de produzir novas drogas, o que torna, escassa a terapêutica antimicrobiana convencionalmente aplicada (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

A evolução da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos ocorre como uma resposta natural das bactérias à frequente exposição aos diferentes fármacos, podendo ser definida por sua capacidade de resistir às concentrações terapêuticas do antimicrobiano. Está separada em duas formas, a resistência intrínseca e a adquirida. Entende-se por resistência intrínseca quando esta ocorre de forma natural, já a resistência adquirida se dá através do surgimento de mutações durante a fase de crescimento bacteriano e/ou aquisição de DNA exógeno, por transferência de genes de organismos resistentes para os sensíveis, sendo por isso considerada a forma mais preocupante de resistência, em vista da possibilidade do surgimento da rápida disseminação dos genes entre populações bacterianas (TROTT; MOSS et al., 2007; TAFUR; VILLEGAS, 2008; BLAIR et al., 2015; LUPO et al., 2018; SCHWARZ et al., 2017).

Muitos são os fatores que contribuem para o surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos, como a utilização irracional de diversos agentes antimicrobianos na agricultura, na medicina humana e na veterinária (LIMA et al., 2016). A maioria das bactérias têm múltiplos mecanismos de resistência a qualquer droga e, uma vez resistente, pode rapidamente dar origem a um grande número de descendentes resistentes (GOLD; MOELLERING, 1996).

Existem diversas formas pelas quais os microrganismos adquirem resistência aos efeitos dos antimicrobianos, dentre elas podemos citar; as modificações no arranjo molecular dos agentes antimicrobianos, a inativação da droga através da produção de enzimas para catalisar tal reação, alteração das proteínas ligantes a penicilina ou outros pontos-alvo nas paredes das células, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações ribossômicas (FILE-JÚNIOR, 2000).

Desta forma, a resistência antimicrobiana pode causar sérias consequências e portanto, representa um risco para a saúde humana e animal, não devendo ser então subestimada, em vista que diminui a eficácia dos agentes microbicidas, podendo tornar procedimentos clínicos importantes como transplantes de órgãos, quimioterapia para o cancro, ou até mesmo procedimentos cirúrgicos comuns, inviáveis de serem realizados com segurança (Centro Europeu de Prevenção e Controle das Doenças - ECDC, 2017).

2.2 MODULAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

Diante da crescente importância dada a infecções bacterianas em comunidades hospitalares e para o desenvolvimento progressivo da resistência antimicrobiana, diversas pesquisas têm demonstrado que a associação múltipla de drogas sintéticas está sendo utilizada na tentativa de combater à disseminação de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos, como acontece na combinação de penicilina com a gentamicina. Tal combinação vem sendo utilizada também entre antibiótico e produtos naturais de origem vegetal, demonstrando a modificação do efeito dos antibióticos, gerando respostas sinérgicas capazes de aumentar a atividade antibiótica ou até mesmo reverter o quadro da resistência bacteriana (COUTINHO et al., 2008; GIBBONS, 2004)

A busca por novas moléculas que possam ser utilizadas como alternativas para aumentar a eficiência dos antibióticos quando administradas em menores concentrações, tem ocorrido de forma constante, haja vista que, essa prática, visa controlar o surgimento de novas cepas resistentes a determinados antibióticos e reduzir os efeitos nefrotóxicos ocasionado pelo uso prolongado dessas drogas (SIEBRA et al., 2018).

A pesquisa por produtos de origem natural com potencial modulador da atividade antibiótica tem ganhado importância nos últimos anos, entre esses agentes moduladores podemos citar, os óleos essenciais, vitaminas e as lectinas de plantas, uma classe de proteínas com diversas atividades biológicas (COUTINHO et al., 2017; TINTINO, et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

Dentro as proteínas de plantas, a classe das lectinas têm se tornado alvo de estudo das pesquisas por potenciais agentes moduladores da atividade antibiótica, à exemplo podemos citar a lectina das sementes de *Vatairea macrocarpa* (VML), uma espécie encontrada no cerrado maranhense conhecida popularmente como amargoso ou angelim-do-cerrado. Nesse estudo Santos et., al. (2019) demonstraram que esta lectina foi capaz de

interagir com o antibiótico gentamicina e, além disso potencializou o efeito do antibiótico contra *S. aureus* multirresistente. A lectina presente nas sementes de *Parkia platycephala*, também se mostrou um agente modulador da ação antibiótica de gentamicina contra cepas bacterianas multirresistentes (SILVA et al., 2019).

Desta forma faz-se necessário mais estudos utilizando outras lectinas e/ou técnicas mais avançadas que visem aprimorar o entendimento a cerca do processo de modulação da atividade antibiótica de aminoglicosídeos.

2.3 ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS

Sobre os aminoglicosídeos, a classe em que está inserido o antibiótico gentamicina, um dos alvos de estudo desse projeto, podemos destacar que essa classe foi primeiramente estudada em 1994, quando Waksman e seus colaboradores isolaram a partir de culturas de *Streptomyces griseus* o primeiro antibiótico aminoglicosídeo, a estreptomicina, sendo o segundo antibiótico a ser utilizado no tratamento de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, após o aparecimento da penicilina. Diante do surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes à estreptomicina foram descritos novos antibióticos com melhores características terapêuticas (SOUSA, 2006).

Os aminoglicosídeos são em sua maioria de origem natural, pois são em geral produzidos por microrganismos, alguns são derivados de *Streptomyces* spp., a exemplo a neomicina, tobramicina e estreptomicina, já a gentamicina é encontrada em *Micromonospora* spp. Contudo esses antibióticos também podem ser sintetizados *in vitro* à custa de produtos naturais como por exemplo a netilmicina, ampicacina, arbecacina e isepamicina (DURANTE-MANGONI et al., 2009).

Os aminoglicosídeos são antibióticos de largo espectro, moderadamente ativos contra bactérias aeróbias Gram-positivo, apresentam extensa atividade sobre bactérias aeróbias Gram negativo, não apresentando, todavia, atividade sobre bactérias anaeróbias estritas (SOUSA, 2006). Diante do fato de que os aminoglicosídeos dependem da cadeia de transporte de elétrons para adentrar no interior das bactérias, as bactérias anaeróbicas são intrinsicamente resistentes, o que torna este o principal mecanismo de resistência natural a estes antibióticos (LEGGETT, 2017).

Em geral os aminoglicosídeos apresentam um peso molecular variando entre os 445 e os 600 daltons, possuem alta solubilidade em água, são estáveis na faixa de pH 6 a 8,

destacando-se ainda a sua estrutura polar catiônica (OLIVEIRA et al., 2006). Essas moléculas apresentam em sua composição um anel aminociclitol que deriva do inositol, onde este anel está associado através de ligações glicosídicas a um ou mais carboidratos aminados (MAGNET; BLANCHARD, 2005).

Quando associados com outros antimicrobianos, os aminoglicosídeos apresentam uma característica extremamente relevante, que é a sua capacidade de desencadear um efeito sinérgico na atividade bactericida (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

Dentre os antibióticos aminoglicosídeos encontra-se a gentamicina, um antibiótico bactericida pertencente ao grupo aminoglicosídeo usado para o tratamento de diferentes infecções bacterianas, principalmente para infecções do trato urinário, pneumonia, infecção óssea, meningite e doenças inflamatórias pélvicas. Gentamicina consiste em um número diferente de compostos relacionados, incluindo gentamicina C1, C1a e C2 (que possuem 80% de atividade antibacteriana) enquanto; gentamicina A, B, X (possui 20% de atividade antibacteriana) (VYSAKH et al., 2018).

A gentamicina atua ligando-se à subunidade ribossômica 30S, que causa erros na ordem e no tipo de aminoácidos inseridos na cadeia polipeptídica, causando interrupção do alongamento da cadeia peptídica e morte bacteriana (PERIANU; RAU; VIJAN, 2019; PRATT et al., 2018).

Os quatro principais mecanismos de resistência a gentamicina são: a modificação ou destruição enzimática do antibiótico que modificam covalentemente os grupos hidroxila ou amino da molécula de aminoglicosídeo (RAMIREZ; TOLMASKI, 2010); A prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico ou da existência de bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas; As alterações nas moléculas alvo dos antibióticos e a produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico, enquanto se continua a produzir as moléculas alvo originais, contornando desse modo a inibição induzida pelo antibiótico (HAWKEY, 1998; FORBES, SAHM, WEISSFELD, 2007; LOUREIRO et al., 2016).

Com a intenção de impedir a ação destes mecanismos, o efeito sinérgico de moléculas e o antibiótico gentamicina já vêm sendo descrito, como no trabalho de Alves et al. (2019) em que o óleo essencial de *Piper rivinoides* Kunth (BETIS-WHITE) quando acoplado à gentamicina, agiu sinérgicamente a partir de ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Desta forma se faz necessário mais estudo a cerca dos mecanismo de

resistência dos antibióticos aos aminoglicosídeos em especial a gentamicina e a utilização das lectinas como agente modulador.

2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LECTINAS

Lectinas são consideradas uma classe de proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que apresentam a capacidade de interagir de forma reversível a carboidratos, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (figura 1) (FAHEINA-MARTINS et al., 2012; GOLDSTEIN et al., 1980). Devido à sua capacidade de fazer ligações com oligossacarídeos de membranas celulares, as lectinas participam de uma diversidade de processos celulares (ASSREUY et al., 2009).

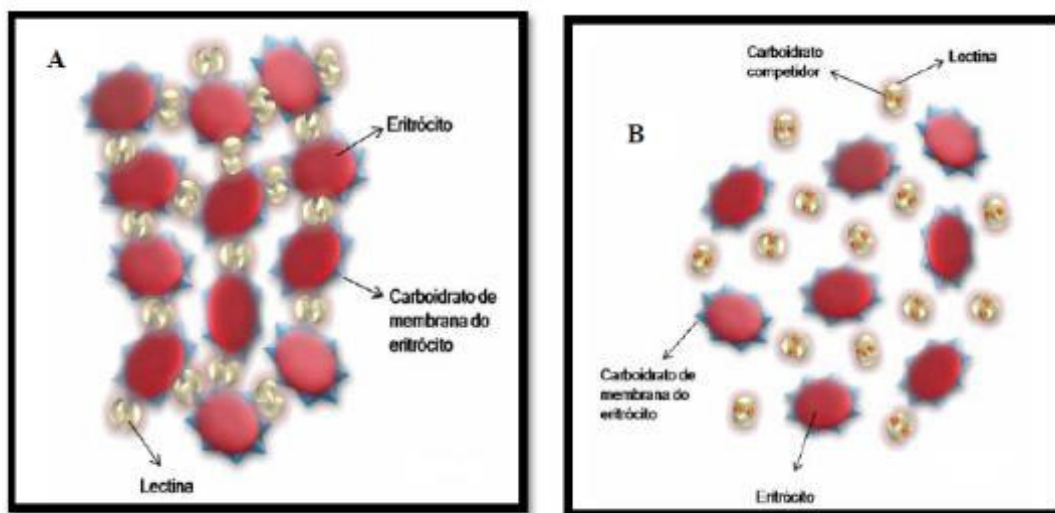


Figura 1- A: interação entre a lectina e carboidratos da membrana dos eritrócitos. B: Ilustração da reversibilidade da ligação lectina-carboidratos.

Fonte (BEZERRA, 2009)

A história das lectinas teve início no final do século XIX, quando algumas evidências demonstravam que havia no meio ambiente um grupo de proteínas que possuía a habilidade de aglutinar eritrócitos. A princípio estas proteínas ficaram conhecidas através dos termos hemaglutininas ou fito-hemaglutininas, dado que a maioria foram encontradas em plantas (SHARON; LIS, 2004).

Estudos pioneiros acerca das lectinas relataram o fato de Silas Weir Mitchell em 1860, ter observado uma atividade hemaglutinante em extrato de veneno de cobra *Crotalus Durissus* (MITCHELL, 1860), além disso, Peter Hermann Stillmark demonstrou que a ricina, uma lectina extraída das sementes de mamona (*Ricinus communis*) caracterizada por seu alto grau

de toxicidade (STILLMARK, 1888). A partir dessas descobertas surgiram novos trabalhos com uma diversidade de lectinas vegetais.

Em seguida constatou-se através do isolamento e caracterização biológica das sementes da *Phaseolus limensis* e *Vicia craca* que havia lectinas que não apresentavam toxicidade e que tinham a habilidade e preferência por aglutinar eritrócitos do sistema ABO (SHARON; LIS, 2004). Outro ponto crucial na história das lectinas foi a descoberta de Peter Nowell (1960), onde o mesmo revelou que a lectina de *Phaseolus vulgaris* possui atividade mitogênica atribuindo informações importante na área imunológica, gerando avanços nas pesquisas e estudos das interações intraespecíficas das células do sistema imunológico (BRANDO-LIMA et al., 2006).

Depois disso, surgiu uma gama de estudos com lectinas, onde estas se mostraram capazes de ativar células do sistema imune de animais (GUPTA, 2012), interferindo em várias vias apoptóticas, como agentes antitumorais (HAMID et al., 2013; FU et al., 2011), sendo consideradas bons agentes biotecnológicos para as diversas áreas.

2.5 LECTINAS DE PLANTAS

Há estudos que relatam a presença de lectinas desde organismos mais simples como as algas (LIMA et al., 2005) e musgos (MOLINA; VINCENTE, 1995) até aos mais complexos, a exemplo as gimnospermas (HAN et al., 2005) e angiospermas, destacando-se como as mais estudadas em relação aos demais grupos (KAUR et al., 2005).

As lectinas vegetais constituem um grupo heterogêneo de proteínas por serem diferentes entre si no que diz respeito às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, estrutura molecular, especificidade e atividades biológicas (VAN DAMME et al., 1998). Apresentam diversidade estrutural e o aspecto comum entre estas moléculas é a presença de pelo menos um sítio de ligação a carboidrato em cada cadeia polipeptídica (XIMENES, 2009).

Comumente, as lectinas de leguminosas consistem de duas ou quatro subunidades idênticas ou quase idênticas (protômeros) de 25 a 30 kDa cada, que geralmente são um único polipeptídeo formado por cadeias com cerca de 250 aminoácidos, apresentando um ou dois *N*-oligossacarídeos ligados. Cada protômero contém um local de combinação de carboidratos, um Ca^{2+} firmemente ligado e um íon metálico, geralmente Mn^{2+} (AMBROSI;

CAMERON; DAVIS, 2005).

De acordo com Van Damme et al. (1998), as lectinas extraídas a partir de vegetais são classificadas considerando suas habilidades de reconhecimento e especificidade de ligação aos carboidratos e seus aspectos estruturais, estando organizadas em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

As merolectinas são proteínas que apresentam em sua estrutura apenas um domínio ligante de carboidrato, sendo incapazes de aglutinar eritrócitos ou precipitar glicoconjugados, visto que, são monovalentes; por exemplo, tem-se a *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991). Já as hololectinas são um grupo de lectinas que possuem dois ou mais domínios que interagem com carboidratos iguais ou similares. As quais podem ser divalentes ou multivalentes, apresentam ainda a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Maioria das lectinas compreende esta classe, entre elas, as espécies da subtribo Diocleinae (CAVADA et al., 2001).

As quimerolectinas são proteínas com um domínio ligante a carboidrato que está associado a outro domínio catalítico ou atividade biológica distinta atuando independente do domínio de ligação de carboidratos. De acordo com o número de domínios ligantes a carboidratos, esta classe de lectinas pode ser considerada como merolecinas ou hololectinas, à exemplo têm-se a ricina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

Por fim, as superlectinas são reconhecidas como uma classe de hololectinas que possuem, no mínimo, dois domínios ligantes a carboidratos. Entretanto, estes domínios diferentes das hololectinas, não são iguais e nem similares os fazendo capazes de reconhecer carboidratos diferentes em sua estrutura. Lectina do bulbo de tulipa é uma superlectina que apresentam dois domínios de ligação a carboidrato, a manose e *N*-acetil-galactosamina (VAN DAMME et al., 1996).

Análises de genoma/transcriptoma de plantas forneceram evidências para a ocorrência de muitas proteínas contendo um ou mais domínios de lectina incorporados em uma arquitetura de múltiplos domínios mais ou menos complexa (VAN DAMME et al., 2008). Devido a esta complexidade e heterogeneidade entre todas as proteínas de ligação a carboidratos, é preferível considerar a classe de lectinas vegetais em termos dos domínios de ligação a carboidratos presentes nessas proteínas (VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

2.6 ASPECTOS GERAIS DA ESPÉCIE *Dioclea violacea*

A espécie *D. violacea* da qual foi extraída a lectina em estudo, pertence a subtribo diocleinae, esta subtribo ocorre em grande escala na América Latina, sendo diferenciada das demais subtribos pela presença de características primitivas, tais como hábito lenhoso ou grosso, flores grandes e a presença do aminoácido não-proteinogênico canavanina (ácido L-2-amino-4-guanidinoxibutanóico) que é encontrado em muitas leguminosas. A referida subtribo é composta por 13 gêneros (*Dioclea*, *Canavalia*, *Cymbosema*, *Cleobulia*, *Macropychanthus*, *Luzonia*, *Cratylia*, *Collaea*, *Galactia*, *Calopogonium*, *Herpyzia*, *Pachyrhizus* e *Camptosema*), dentre estes, cinco possuem lectinas purificadas de suas sementes, os quais são: *Canavalia*, *Cymbosema*, *Galactia*, *Cratylia*, *Camptosema* e *Dioclea* (CAVADA et al., 2001; VARELA et al., 2004).

A espécie *D. violacea* (figura 2) é conhecida popularmente como cipó-de imbirí, mucunã, mucuná-assú, pó-de mico e olho-de-boi. A planta é uma trepadeira lenhosa, possui folhas compostas, inflorescência no formato de espiga, os frutos são vagens grandes e lenhosas cobertas de pelos dourado-castanho, contendo sementes grandes, duras e de cor castanho-marrom de formato achatado globosa (LORENZI, 1999).



Figura 2: Ilustração da espécie *D. violacea*. Fonte: The Shirley Sherwood Collection.

2.7 ASPECTOS GERAIS DA LECTINA DE *Dioclea violacea*

A grande maioria das lectinas de Diocleinae possuem afinidade primária a glicose e manose, mas apesar dessa característica compartilhada e da proximidade filogenética, essas proteínas podem apresentar atividades biológicas distintas (CAVADA et al., 2001).

Entre estas lectinas da família Leguminosae, podemos destacar a lectina em estudo, obtida das sementes de *D. violacea* (DVL). Esta lectina apresenta estrutura tetramérica (figura 3), independente do pH, que inclui um sítio de ligação com metais, interagindo com o cálcio e o manganês (BEZERRA et al., 2013). Do mesmo modo que outras lectinas da subtribo Diocleinae, a DVL apresenta especificidade por resíduos *D*-glicose ou *D*-manose (MONTEIRO-TÍNEL et al., 2014).

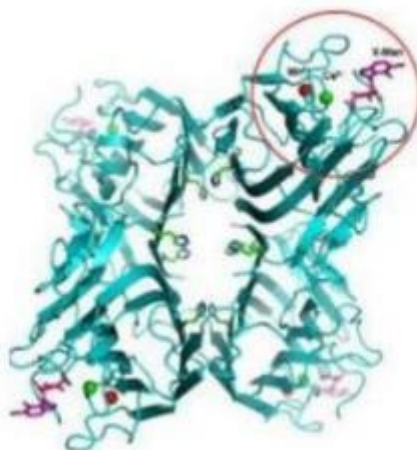


Figura 3: Estrutura tetramérica da Dvl com a presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} . O ligante X-man foi utilizado como estabilizador de dobras flexíveis no domínio de reconhecimento de carboidratos (BEZERRA et al., 2013).

A lectina DVL apresenta diversos trabalhos mostrando suas aplicações biológicas, onde algumas estão descritas na tabela a seguir (tabela 1):

Tabela 1 – Atividades biológicas da lectina DVL

Atividades biológicas	Autores
Cicatrizante	(SHIRATO 2006)
Anti-inflamatória	(ASSEURY 1997) (PAIM 2006)
Vasorelaxante	(BEZERRA et al., 2013)

Antinocicepitiva	(LEITE 2009)
Anti-glioma	(NASCIMENTO et al., 2018)

Tendo em vista que todas as atividades supracitadas ocorrem devido à capacidade das lectinas de reconhecer e interagir com carboidratos específicos, se faz necessário estudar a lectina DVL, como um agente modulador da atividade antibiótica de aminoglicosídeos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar a interação e a capacidade da lectina das sementes de *Dioclea violacea* (DVL) em modular a atividade antibiótica da gentamicina em linhagens de bactérias multirresistentes.

3.2 ESPECÍFICOS

- Investigar a interação da DVL com antibiótico gentamicina
- Avaliar a atividade antimicrobiana da DVL
- Avaliar o efeito modulador da DVL no antibiótico gentamicina
- Analisar o efeito da DVL na inibição da tolerância à gentamicina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS SEMENTES, EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LECTINA

As sementes de *D. violacea* foram coletadas na comunidade quilombola Piqui da Rampa, no município de Vargem Grande/MA. Após a coleta, as sementes foram descascadas e submetidas à trituração até se obter um pó fino na forma de farinha, apropriada para o processo de extração proteica. Previamente, a farinha foi submetida à extração proteica na proporção de 1:10 (m/v) em solução salina de NaCl 0,15 M em agitação constante por 4 horas. Em seguida, o extrato foi centrifugado uma única vez a uma velocidade de 1.500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi separado da fração precipitada, para a obtenção de uma fração denominada de extrato bruto. O extrato bruto foi aplicado à coluna sephadex G-75 equilibrada com a solução de extração. A fração não retida foi retirada com a mesma solução de equilíbrio e a fração retida foi eluída com gliocose 0,2 M. A fração retida, referente à lectina, foi dialisada contra água destilada e liofilizada, sendo o material liofilizado utilizado para os ensaios de interação e ensaios de atividade microbiológica.

4.2 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

A interação entre a lectina de *D. violacea* (DVL) e o antibiótico gentamicina foi determinada pelo ensaio de inibição da atividade hemaglutinante, onde o teste de inibição foi realizado utilizando uma solução de gentamicina na concentração de 0,1 M seguindo a adaptação do protocolo descrito por Ramos e colaboradores (1996).

Em placas de micro titulação, foram adicionados em todos os poços 50 µL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,6, posteriormente 50 µL da solução de gentamicina no primeiro poço, diluindo 3 vezes em cada poço e passando para o seguinte até o último poço, que ficou com volume final de 100 µL, em seguida, foi adicionado 50 µL da DVL com título de 4 unidades hemaglutinante em cada poço. Após 1 hora, foram adicionados 50 µL de eritrócitos de coelho a 3% em cada poço. O resultado da inibição da atividade hemaglutinante foi definido como a menor concentração (µg/mL) do antibiótico necessária para inibir a atividade hemaglutinante (CIM), o qual foi observado 2 (duas) horas após a adição dos eritrócitos. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As medições de espectroscopia de fluorescência intrínseca para DVL foram realizadas em um Espectrofotômetro de Fluorescência Varian-Cary Eclipse de estado estacionário equipado com um sistema de controle de temperatura. Os resíduos aromáticos de DVL foram excitados a 289 nm. Os espectros de emissão de fluorescência (em média seis vezes) de DVL na ausência e presença de gentamicina foram registrados em uma cubeta de quartzo de comprimento de caminho de 1 cm de 300 a 450 nm a 293 K. A concentração de DVL foi de 1 μ M em 50 mM Tris-HCl ajustado a pH 7,4 contendo NaCl 150 mM. As concentrações finais de gentamicina na solução DVL foram 0,0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0, 4,8, 5,6, 6,4, 7,2, 7,9, 8,7 e 9,5 μ M. Para corrigir No efeito de filtro interno , a seguinte equação foi usada $F_{cor} = F_{obs} 10^{\frac{A_{289}+A_e}{2}}$ (LAKOWICZ., 2006), onde F_{cor} and F_{obs} são a intensidade de fluorescência corrigida e a intensidade de fluorescência observada no comprimento de onda de emissão, respectivamente. A_{289} e A_e são a soma da absorbância de todos os componentes a 289 nm e o comprimento de onda de emissão, respectivamente. Todas as experiências foram feitas em triplicata. Os dados de fluorescência foram analisados pela conhecida relação Stern-Volmer $\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[gentamicin]$ (LAKOWICZ., 2006), onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença de gentamicina, respectivamente, $[gentamicina]$ é a concentração de gentamicina, e K_{sv} , é a constante de extinção de Stern- Volmer . A constante de ligação (K_b) e o número de locais de ligação (n) foram determinados utilizando a seguinte relação $\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log(K_b) + n\log[gentamicin]$ (LAKOWICZ., 2006). A Gibbs variação de energia livre (ΔG^0) foi calculada usando a equação de Van't Hoff $\Delta G^0 = -RT\ln(K_b)$: , onde T é a temperatura absoluta , e $R = 8,314 \text{ J / mol.K}$.

4.4 REAGENTES, DROGAS E CEPAS BACTERIANAS.

O antibiótico gentamicina e a DVL foram dissolvidos em água estéril a uma concentração final de 1024 μ g/mL.

Foram utilizadas nos ensaios as cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* 06 e *Pseudomonas aeruginosa* 15 (Tabela 2).

As cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular - LMBM da Universidade Regional do Cariri – URCA. Estas foram mantidas em agar base de

sangue (Laboratory Difco Ltda) e cultivados a 37 ° C em ágar Heart Infusion (HIA, Difco.Laboratorises Ltda.).

Tabela 2 - Fonte bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.

Cepas	Fonte	Perfil de Resistencia*
<i>E. coli</i> 06	Cultura de urina	Cf, Cef, Ca, Cro. Ca, Cef, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amox, Mox,
<i>S. aureus</i> 10	Cotonete retal	Cip, Lev, Asb, Amc, Cla, Azi, Clin.
<i>P. aeruginosa</i> 15	Ponta de cateter	Cpm, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer

*Amp-Ampicilina; Asb-Ampicilina + Sulbactam; Amox-Amoxicilina; Amc-Amoxicilina + Ac. clavulânico; Azi-Azitromicina; Ca-cefadroxil; Cf-cefalotina; Cef-Cefalexina; Cla-Claritromicina; Cro-Ceftriaxona; Cip-Ciprofloxacina; Clin-Clindamicina; Imi - imipenem; Lev-levofloxacina; Mer Meropenem; Mox-Moxifloxacina; Oxa-oxacilina, Pen-Penicilina; Ptz - Piperacilina + Tazobacta.

4.5 PREPARAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Após o cultivo e crescimento dos microrganismos no período requerido, os inóculos foram preparados de acordo com o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). As bactérias foram colocadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de soro fisiológico estéril (NaCl a 0,9%), então esta suspensão foi agitada com auxílio de um aparelho de vortex e sua turbidez foi comparada e ajustada com base na escala de McFarland, que corresponde a 10⁶ CFU/mL.

4.6 TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Para os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram utilizados eppendorfs para a preparação contendo 100 µL do inóculo e 900 µL do meio de cultura líquido BHI em concentração de 10%, posteriormente foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços que foram preenchidas no sentido numérico pela adição de 100 µL desta solução em cada poço, seguido da realização de diluição em série com 100 µL da

solução de lectina variando as concentrações de 1024 µg/mL a 1,0 µg/mL. As placas foram transferidas para a incubadora durante 24 horas a 37 °C. Para a leitura da CIM bacteriana foi adicionado a cada poço 20 µL de um indicador de crescimento bacteriano (resazurina), após uma hora a mudança de cor dos poços foi observada, onde a modificação da coloração azul para vermelha corresponde ao crescimento microbiano e a permanência em azul corresponde a ausência de crescimento, conforme estabelecido pelo CLSI (2008).

4.7 EFEITO MODULADOR DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

A avaliação das lectinas como agentes moduladores da atividade da gentamicina foi realizada segundo Coutinho e colaboradores (2017). Os testes foram realizados em triplicata. Para cada eppendorf, foram utilizados 1162 µL de BHI a 10%, com 150 µL do inóculo de cada cepa multirresistente e a solução contendo a lectina testada com volume correspondente a uma concentração subinibitória (CIM/8). Os controles foram preparados utilizando 1350 µL de BHI (10%) e 150 µL de suspensão bacteriana. As placas foram preenchidas em ordem numérica e cada poço recebeu 100 µL de solução. Em seguida foi realizada a diluição em série com 100 µL da solução da gentamicina variando as concentrações de 1024 µg/mL a 1,0 µg/mL. As placas foram transferidas para a incubadora durante 24 horas a 37 °C. Para a leitura da CIM bacteriana, foi adicionado a cada poço 20 µL de resazurina.

4.8 PERFIL DA TOLERÂNCIA BACTERIANA À GENTAMICINA

Para a avaliação da influência da DVL no perfil da tolerância à gentamicina foram utilizadas cepas de *S. aureus* ATCC 6538 fornecidas pela coleção microbiológica da Universidade Ceuma (São Luís, Brasil).

Foram realizadas sucessivas culturas de *S. aureus* na presença de concentração subinibitória (CIM/2) de gentamicina e DVL (CIM/8). Primeiramente, uma suspensão de *S. aureus* foi diluída (1:50) em caldo BHI contendo os compostos testados. Após 48 h, a CIM para gentamicina foi determinada. Depois disso, as bactérias foram cultivadas em caldo BHI contendo os compostos testados por 24 h, após cada ciclo de 24 horas a CIM de gentamicina foi determinada. Este procedimento foi repetido por 10 dias. A concentração da droga (CIM) para cada nova passagem foi baseada na CIM calculada para a passagem anterior.

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5.0. Os dados foram analisados através de um teste ANOVA de duas vias, utilizando como dados centrais a média geométrica das triplicatas \pm erro padrão da média. Posteriormente, foi realizado um teste post hoc de Tukey, sendo os valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho estão publicados no artigo intitulado “*Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure”. Este artigo foi publicado na revista International Journal of Biological Macromolecules, Qualis A2 em medicina I, fator de impacto 5.162.

5.1 PURIFICAÇÃO DA LECTINA E ENSAIOS DE INTERAÇÃO DVL-GENTAMICINA

A purificação de DVL foi feita por cromatografia de afinidade em coluna sephadex-G75 (Tabela 3) como previamente descrito por Moreira et al. (1996). O perfil do cromatograma mostrou dois picos, o primeiro (PI) correspondendo à fração de proteína não retida e o segundo (PII) correspondendo à fração de proteína retida (Fig. 4A). Na eletroforese em gel sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), PII mostrou três bandas (Fig. 4B) correspondendo à cadeia α (25,5 kDa), cadeia β (14 kDa) e cadeia γ (12 kDa) de DVL.

Tabela 3. Purificação de DVL (a partir de 10 g de farinha de semente).

Frações	Proteína (mg mL ⁻¹) ^a	Atividade hemaglutinante (U.H mL ⁻¹) ^b	Atividade específica (U.H mg ⁻¹ P)	Purificação fold (x)
Extrato bruto	2.45	2,048	835.9	1
Sephadex-G75	0.08	512	6,400	7.65

^a Concentração de proteína

^b Atividade hemaglutinante expressa em unidades hemaglutinantes

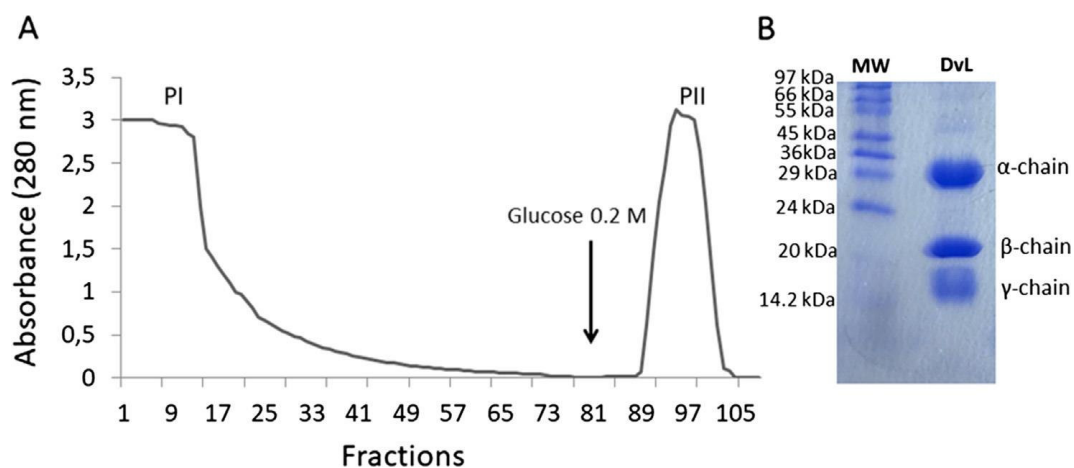


Figura 4. Purificação da DVL. (A) Perfil de eluição da DVL em cromatografia Sephadex G-75. (B) Perfil SDS-PAGE, (MW) Marcadores de massa molecular: fosforilase B, 97 kDa; albumina de soro bovino, 66 kDa; desidrogenase glutâmica, 55 kDa; ovalbumina, 45 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 kDa; anidrase carbônica, 29 kDa; tripsinogênio, 24 kDa; inibidor de tripsina, 20 kDa e α -lactalbumina 14,2 kDa. (DVL) cadeia α , cadeia β e cadeia γ de DVL

A inibição da atividade hemaglutinante mostrou que DVL tem afinidade à gentamicina, glicose e manose com concentrações inibitórias mínimas de 12,5, 25 e 12,5 mM, respectivamente, enquanto nenhuma afinidade significativa foi observada para os outros carboidratos testados (Tabela 4). O ensaio de hemaglutinação é um método simples para obter dados semiquantitativos sobre a ligação ao carboidrato e a especificidade de uma lectina (ADAMOVIĆ et al., 2014). A interação lectina-gentamicina foi descrita pela primeira vez por Santos et al. (2020), que demonstraram a inibição da atividade hemaglutinante da lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) na presença de gentamicina com CIM de 50 mM. Embora ambas as lectinas tenham afinidade pela gentamicina, foi observado que DVL tem uma afinidade maior para o antibiótico em relação à VML.

Tabela 4. Efeito inibitório de monossacarídeos e gentamicina na atividade hemaglutinante de DVL.

Substancias	CIM (mM) ^a
Gentamicina	12.5
<i>D</i> -Manose	12.5
α -metil- <i>D</i> -mannopiranosídeo	6.25
<i>D</i> -Glicose	25
<i>D</i> -Galactose	NI ^b
β -Lactose	NI

^a MIC, concentração inibitória mínima;

^bNI, substância não inibidora até uma concentração de 100 mM.

Para confirmar os resultados de interação observados no ensaio de inibição (Tabela 4), a interação entre gentamicina e DVL também foi analisada usando espectroscopia de fluorescência intrínseca com excitação a 289 nm. A absorbância da gentamicina foi praticamente zero, mesmo na concentração mais alta medida (inserção da Fig. 5A), e a intensidade de emissão de fluorescência foi desprezível (Fig. 5A). O espectro de emissão de DVL em 293 K e pH 7,4 foi caracterizado por uma intensidade máxima em 336 nm, que é típico de resíduos aromáticos parcialmente expostos ao ambiente tampão (Fig. 5A). Os espectros de emissão de fluorescência de DVL com a adição de gentamicina foram medidos. Os resultados revelaram uma diminuição gradual na intensidade de fluorescência de DVL levando à extinção na presença de concentrações crescentes de gentamicina (Figura 5A).

Os dados de fluorescência foram então analisados pela conhecida relação Stern-Volmer (LAKOWICZ., 2006). O gráfico de Stern-Volmer (Fig. 5B) mostrou uma boa relação linear (r^2 de 0,986), indicando a predominância de um único mecanismo de extinção induzido por gentamicina com $K_{sv} = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. A fim de obter informações sobre a ligação da gentamicina com DVL, a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) foram determinados assumindo que DVL tem sítios de ligação independentes (LAKOWICZ., 2006).

De acordo com o gráfico (Fig. 5C), n e K_b são estimados em $0.55 \pm 0.04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Os resultados revelaram que n foi aproximadamente igual a 1, sugerindo um sítio de ligação a gentamicina para cada monômero da DVL, que corresponde ao número de DRCs por monômero em DVL (BEZERRA et al., 2013), corroborando com os resultados obtidos na inibição da atividade hemaglutinante descrita acima. Além disso, o valor determinado para K_b foi semelhante ao valor relatado para a interação entre DVL e metil α -D-mannopiranosideo (Me α Man) com K_b of $1.27 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (CAVADA et al., 1998). Além disso, a variação calculada da energia livre de Gibbs (ΔG^0) foi -21.0 kJ/mol . O valor negativo ($\Delta G^0 < 0$) indica que a interação da gentamicina com DVL é espontânea, e é muito provável que as interações de van der Waals e as ligações de hidrogênio desempenhem papéis importantes nessa interação.

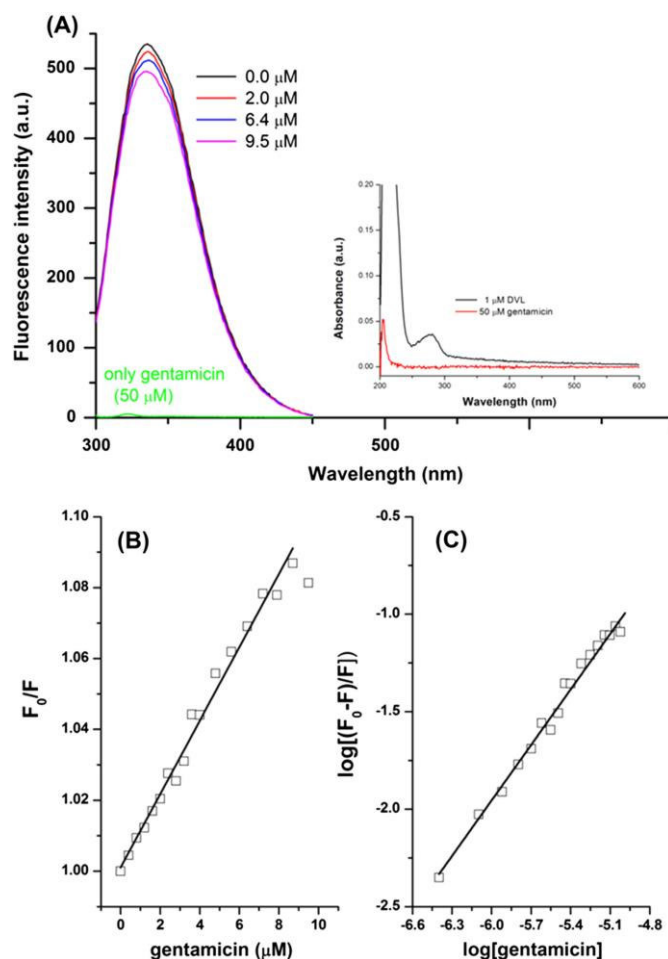


Figura 5. Espectroscopia de fluorescência intrínseca de DVL na ausência e presença de gentamicina . A) As concentrações de gentamicina foram 0,0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0, 4,8, 5,6, 6,4, 7,2, 7,9, 8,7 e 9,5 μM. Inserção : espectro de absorvância para DVL e gentamicina . B) Stern-Volmer plot. C) Double logarithmic plot of $\log[(F_0-F)/F]$ versus $\log [(M_0 - F)]$ em função de $\log [\text{ gentamicina }]$ derivada a partir da fluorescência de têmpera de DVL (1 μM) induzida por gentamicina .

5.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULAÇÃO ATIVIDADE ANTIBIÓTICA POR DVL

A atividade antibacteriana de DVL foi realizada contra cepas multirresistentes de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e avaliada por CIM. DVL não mostrou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas ($CIM \geq 1.024 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 5). Esses valores não são considerados clinicamente relevantes para seu efeito antibacteriano direto. Valores de CIM maiores que $1.000 \mu\text{g/mL}$ são considerados sem atividade antibacteriana direta para a prática clínica (HOLETZ et al., 2002).

Tabela 5. Valores de concentração inibitória mínima - CIM para $\mu\text{g/mL}$

Substância	Cepas bacterianas		
	<i>E. coli</i> 06	<i>P. aeruginosa</i> 15	<i>S. aureus</i> 10
DVL	$\geq 1,024$	$\geq 1,024$	$\geq 1,024$

Embora DVL não iniba o crescimento bacteriano, avaliamos se a interação entre DVL e gentamicina poderia modificar o efeito do antibiótico contra cepas multirresistentes (Fig. 6). Nossos resultados mostraram que DVL pode aumentar a atividade da gentamicina contra *S. aureus*, diminuindo a CIM de 50,8 para $10,1 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 6A). Proporcionalmente, esse valor corresponde a uma redução de 80,1% na quantidade de gentamicina necessária para ter o mesmo efeito na cepa em estudo. Na presença de DVL, a atividade da gentamicina diminuiu a CIM de 32 para $12,7 \mu\text{g/mL}$ para *E. coli* (Fig. 6B). Esse valor corresponde a uma redução de 60,3% na quantidade de gentamicina necessária para ter o mesmo efeito em *E. coli*. Por outro lado, DVL não apresentou efeito significativo na modulação da atividade da gentamicina contra a cepa *P. aeruginosa* (Fig. 6C).

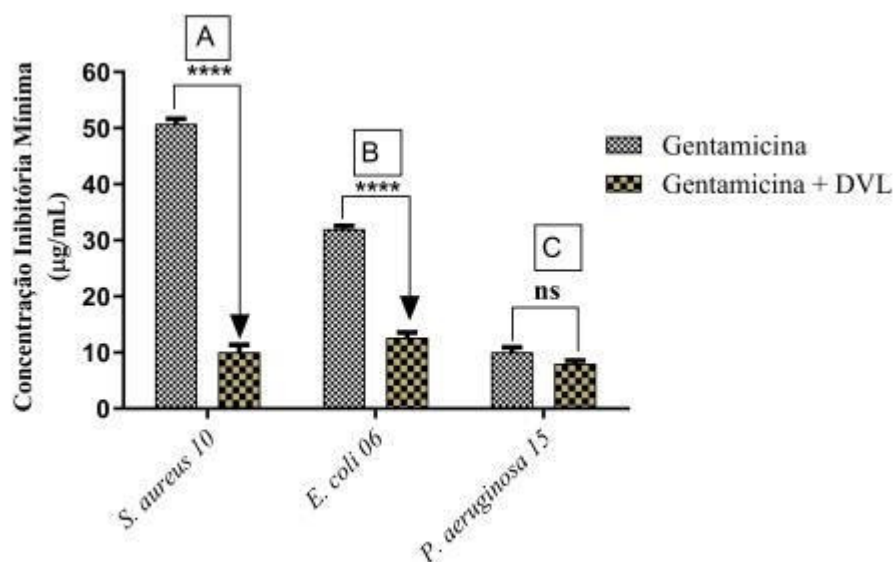


Figura 6. Modulação da atividade antibiótica da gentamicina complexada com DVL. A) Modulação da atividade antibiótica contra *S. aureus* 10. B) Modulação da atividade antibiótica contra *E. coli* 06. C) Modulação da atividade antibiótica contra *P. aeruginosa* 15. Asteriscos quádruplos indicam diferença estatisticamente significativa com $p < 0,0001$; ns, valor não estatisticamente significativo com $p > 0,05$.

Alguns estudos têm mostrado que as lectinas podem interagir com glicanos presentes em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HENDRICKSON et al., 2019) e, por mecanismos ainda não elucidados, podem alterar a estrutura das membranas bacterianas (BARBOSA et al., 2010). Embora DVL não tenha inibido o crescimento microbiano, sua associação com gentamicina aumentou a atividade antibiótica contra cepas multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. Assim, é provável que DVL possa aumentar a atividade antibiótica de gentamicina pelo mecanismo de interação com gentamicina no DRC, permitindo a distribuição da droga para as células alvo através de reconhecimento de hidretos de carbono da membrana, o que leva a liberação de gentamicina, e facilitando, assim, a entrada do antibiótico no citoplasma bacteriano. No entanto, são necessários estudos mais detalhados para comprovar esse mecanismo de ação.

5.3 PERFIL DA TOLERÂNCIA BACTERIANA À GENTAMICINA

A exposição a longo prazo de uma população bacteriana ao tratamento com antibióticos está associada ao desenvolvimento de fenótipos que permitem sua sobrevivência sob estresse induzido por drogas (ZINNER et al., 2014). Este fenômeno resulta no surgimento de resistência aos medicamentos devido a mutações em diferentes genes (LEVIN-REISMAN

et al., 2017). Nesse sentido, examinamos se DVL poderia inibir a aquisição do fenótipo adaptativo por *S. aureus* durante a exposição contínua à gentamicina. Neste ensaio, as bactérias foram tratadas com concentração Sub-CIM de gentamicina na presença ou ausência de DVL. A CIM inicial para gentamicina foi de 4 µg/mL.

Observou-se que *S. aureus* aumentou rápida e gradualmente a CIM para este medicamento e, após quatro dias de exposição, a CIM aumentou 16 vezes. No final do ensaio, as bactérias tratadas com gentamicina apresentaram um valor de CIM de 512 µg/mL para esta droga (CIM aumentou 128 vezes) (Fig. 7). Este efeito foi radicalmente alterado pela coincubação de *S. aureus* com DVL e gentamicina. Nesse grupo, o valor da CIM aumentou apenas após dois dias de exposição e, ao final do período experimental (dez dias), a bactéria apresentou CIM de 16 µg/mL (aumento de 4 vezes). Esses resultados sugerem que a co-administração de DVL com gentamicina pode ser uma estratégia valiosa no combate ao desenvolvimento de novas cepas resistentes. Isso também leva à mesma hipótese de que o mecanismo de ação está relacionado à interação com DVL, que melhora o efeito da droga e reduz a capacidade do *S. aureus* de adquirir tolerância à droga.

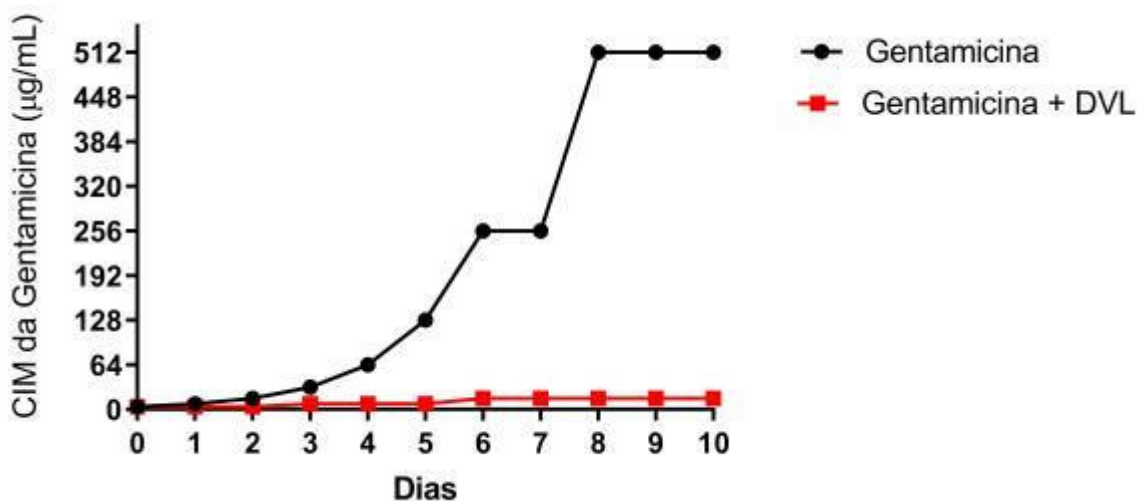


Figura 7. Efeito de DVL na aquisição da tolerância à gentamicina por *Staphylococcus aureus*.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante e espectroscopia de fluorescência que a gentamicina pode interagir com DVL através do domínio de reconhecimento à carboidratos (DRC). Foi comprovado que no modelo experimental proposto a DVL por si só, não apresenta atividade antibacteriana clinicamente relevante, entretanto quando associada com a gentamicina foi capaz de aumentar o efeito do antibiótico contra linhagens multirresistentes de *S. aureus* e *E. coli*. Mostrou-se ainda eficaz no combate ao desenvolvimento de novas cepas multirresistentes, tendo em vista que a mesma reduziu o perfil de tolerância de *S. aureus* frente à gentamicina, sugerindo que os resultados obtidos neste estudo podem estar diretamente relacionados à interação DVL-gentamicina.

Este trabalho abre perspectivas para utilização desta e de outras lectinas vegetais como ferramentas biotecnológicas necessárias ao estudo da resistência bacteriana aos antibióticos.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

SANTOS, V. F.; ARAÚJO, A. C. J.; SILVA, A. L. F.; ALMEIDA, D. V.; FREITAS, P. R.; SANTOS, A. L. E.; ROCHA, B. A. M.; GARCIA, W.; LEME, A. M.; BONDAN, M.; BORGES, F. T.; CUTRIM, B. S.; SILVA, L. C. N.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. *Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.207. Fator de impacto 5.162.

SANTOS, V. F.; COSTA, M. S.; CAMPINA, F. F.; RODRIGUES, R. R.; SANTOS, A. L. E.; PEREIRA, F. M.; BATISTA, K. L. R.; SILVA, R. C.; PEREIRA, R. O.; ROCHA, B. A. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. The galactose-binding lectin isolated from *Vatairea macrocarpa* seeds enhances the effect of antibiotics against *Staphylococcus aureus*-resistant strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2019. doi: 10.1007/s12602-019-9526-z. Fator de impacto 2.962.

SANTOS, V. F.; ARAÚJO A.C. J.; SILVA, A. L. P.; FREITAS, P. R.; SANTOS, A. L. E.; ROCHA, B. A. M.; SILVA, R.R.S.; ALMEIDA, D. V.; GARCIA, W.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA. Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multidrug-resistant strains when complexed with *Canavalia ensiformis* lectin *Microb Pathog*. 2020 Nov 22;104639. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104639. Fator de impacto 2.581.

CARNEIRO, R. F. ; AGUIAR, E. S. ; SANTOS, V. F. ; SANTOS, A. L. E. ; SANTOS, MARIA H. C. ; ROMA, R. R. ; SILVA, R. R. S. ; LEAL, M. L. M. B. ; SILVA, L. T. ; ROCHA, B. A. M. ; SILVA, C.G.L. ; NAGANO, C. S. ; SAMPAIO, A. H. ; SOUZA, R. O. S. ; TEIXEIRA, C. S. Elucidation of the primary structure and molecular modeling of *Parkia pendula* lectin and in vitro evaluation of the leishmanicidal activity. *Process Biochemistry*, v. 101, p. 1-10, 2021. Fator de impacto 2.952.

SANTOS, A. L. E. ; JÚNIOR, C. P. S.; NETO, R.N.M. ; SANTOS, M. H. C. ; SANTOS, V. F. ; ROCHA, B.A.M. ; SOUSA, E. M. ; CARVALHO, R. C. ; MENEZES, I. R. A. ; OLIVEIRA, M. R.C. ;DANTAS, L.B.R. ; SILVA, T. M. ; TEIXEIRA, C. S. . *Machaerium acutifolium* lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation. *Process Biochemistry*, v. 97, p. 149-157, 2020. Fator de impacto 2.952.

SANTOS, A. L. E.; LEITE, G. O.; CARNEIRO, R. F.; ROMA, R. R.; SANTOS, V. F.; SANTOS, M. H. C.; PEREIRA, R. O.; SILVA, R.C.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; ROCHA, B. A. M.; DELATORRE, P.; CAMPOS, A. R.; TEIXEIRA, C. S. Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-dglucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 664, p.149-156, 2019. doi: 10.1016/j.abb.2019.02.009. Fator de impacto 3.559.

SILVA, R. R. S.; SILVA, C. R.; SANTOS, V. F.; BARBOSA, C. R. S.; MUNIZ, D. F.; SANTOS, A. L. E.; SANTOS, M. H. C.; ROCHA, B. A. M.; BATISTA, K. L. R.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. *Microbial Pathogenesis*. 2019. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103629. Fator de impacto 2.581.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOVIĆ L.; MALINOVIĆ L.; WIMMERVIĆ M. New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy, *Microsc Res Tech.* 77: 2014; 841-849.

AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. "Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode," *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3: 1593-1608; 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos. Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde, Brasília, . 84p. 2017.

BAGGIO, C. L. Análise microscópica das células ciliadas externas no uso da gentamicina: Universidade Federal de Santa Maria. Tese, 63; 2007.

BARBOSA P.S.F.; MARTINS A.M.C.; TOYAMA M.H.; JOAZEIRO P.P.; BERIAM L.O.S.; FONTELES M.C.; MONTEIRO H.S.A. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*, *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 16: 493-504; 2010.

BEZERRA, M. J. B. et al. Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45: 807–15; 2013.

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13: 42-5; 2015.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; PEREIRA, C.R.; VILLELA, C. G.; SAMPAIO, A.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; HENRIQUES, M.D.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. *International Immunopharmacology*, 6: 465- 472; 2006.

CARD, R.; ZHANG, J.; DAS, P.; COOK, C.; WOODFORD.; ANJUM, M.F. Evaluation an expanded microarray for detecting antibiotic resistance genes in broad Range of gram-negative bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 458-465; 2013.

CARNEIRO R.F.; TORRES R.C.F.; CHAVES R.P; VASCONCELOS M.A.; SOUSA B.L.; CASTELO A.C.R.; ARRUDA F.V.;MATOS M.N.C.; MATTEWS-CASCON H.; FREIRE V.N.; TEIXEIRA E.H.; NAGANO C.S.;SAMPALIO A.H.Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysiadactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential, *Mar. Biotechnol*, 19: 49–64; 2017.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL NETTO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potencial biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe lectins. *Current Proteinand Peptide Sciences*, 2: 123-135; 2001.

CORDEIRO, I. F.; COUTINHO, H. D. M.; FERREIRA, J. V.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; MENEZES I.R.A.; LIMA, M. A.; FREITAS, T. S.; GONCALO, M. I. P ; ROCHA, F. L. G. ; FURTADO, R. F. F. ; ANDRADE, J. C. . In Vitro Evaluation of the Antibacterial Activity and Antibiotic- Modulatory Effect of *Gracilariacervicornis* (Turner) J. Agardh. Letters in Drug Design & Discovery, 15: 227-230; 2018.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA, J. J. P.; LIMA, E. O. Atividade anti-estafilocócica in vitro de *Hyptis martiusii* Benth contra cepas de *Staphylococcus aureus*-MRSA resistentes à meticilina. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18: 670-675; 2008.

COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R. ; MENEZES I.R.A. ; COSTA, J. G. M. ; FELIPE, C. F. B. ; SANTOS V. S.; NASCIMENTO, E. P. ; DELMONDES, G. A. ; MONTEIRO, A. B. . Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. Revista cubana de plantas medicinales, 22: 1-11; 2017.

COUTINHO H.D.M., COSTA J.G.M., LIMA E.O., FALCÃO-SILVA V.S., JÚNIOR J.P.S., Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L., BMC complementary and alternative medicine 8: 9-13; 2009.

CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Second Informational Supplement. 9th ed. Document M100–S22. 2012

DAM T.K., CAVADA B.S., GRANGEIRO T.B., SANTOS C.F., SOUSA F.A., OSCARSON S., BREWER C.F., 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. 273: 12082-12088; 1998.

DURANTE-MANGONI, E. et al. Do we still need the aminoglycosides?. International Journal of Antimicrobial Agents, 33: 201-205; 2009.

ECDC. (2017). Healthcare-associated infections acquired in intensive care units – Annual Epidemiological Report for 2015.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development the failure of success? Nature Biotechnology, 24; 1497-1503, 2006.

FILE JR TM. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. Ple Chest, 2:3-8. 2000

FORBES, B. A.; SAHM, D. F.; WEISSFELD, A. S. Diagnostic microbiology. 12 Ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier, 2007.

FU, L. L; ZHOU, C.C.; YAO, S.; YU, J.I.; LIU. B.; BAO, J.K. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. The international journal of biochemistry and cell biology, 43: 1442-1449; 2011.

GABIUS, H. J.; GABIUS, S. Glycoscience. Status and Perspectives. Chapman & Hall, Weinheim, Germany. 1997.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Infectious disease 2001: Drugresistance, new drugs. Drug Resistance Updates, 5: 181–191; 2005.

GIBBONS S. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat Prod Rep. 21: 263-277;2004.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GOLD HS, MOELLERING ERC. Antimicrobial-drug resistance. N Engl J Med., 335: 1445-1453; 1996.

GREENFIELD N.J. Determination of the folding of proteins as a function of denaturants, osmolytes or ligands using circular dichroism, Nature Protocols, 1: 2733-274; 2007.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions, Nature Protocols, 1: 2527-2535; 2006.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos : importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, 33: 667-679, 2010.

GUPTA. G. Animal Lectins: From, Function and Clinical Applications. Springer Science & Business Media 2012.

HAMID, R, MASOOD A., WANI, I. H., RAFIQ S. Lectins: Proteins with Diverse Applications. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3: 93-103; 2013

HAN, C. H.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; WANG, H. X. A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split Gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 14: 336; 2005.

HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. The British Medical Journal, 317: 657-660; 1998.

HENDRICKSON O.D.; NIKITUSHKIN V.D.; ZHERDEV A.V.; DZANTIEV B.B. Lectin-based detection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry, Arch Microbiol. 201: 313-324; 2019.

HOLETZ F.B., PESSINI G.L., SANCHES N.R., APARÍCIO C.D. G, NAKAMURA C.V., DIAS-FILHO B.P., Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, Memórias do Inst. Oswaldo Cruz. 97: 1027–1031; 2002.

IORDACHE, F.; IONITA, M.; MITREA, L. I.; FAFANEATA, C.; POP, A. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. *Curr Pharm Biotechnol*, 16: 152-161; 2015.

KAUR, A.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S.; SEXANA, A. K.; PANDITA, R. M.; SHAMNUGAVEL, M. Isolation of an N-acetyl-D-glucosamine specific lectin from the rhizomes of *Arundo donax* with antiproliferative activity. *Phytochemistry*, 66: 16; 2005.

LAEMLI U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227: 680-685; 1970.

LAKOWICZ J.R., Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. Springer: New York, 2006.

MOREIRA R.A.; CORDEIRO E.F.; GRANGEIRO T.B.; RAMOS M.V.; MARTINS J.L.; CAVADA B.S.; OLIVEIRA J.T.A., Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasil 8: 23-29; 1996.

MOREIRA R.A.; PERRONE J.C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiology* 59: 783-787; 1977.

LEGGETT, J. E. Aminoglycosides. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*, 2: 1233-1238; 2017.

LEVIN-REISMAN I.; RONIN I.; GEFEN O.; BRANISS I.; SHORESH N.; BALABAN N.Q.; Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance, *Science* 355: 826-830; 2017.

LIMA, M. E. P.; CARNEIRO, M. E.; NASCIMENTO, A. E.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. L.; AMORIM, R. C. N. AND BENEVIDES, N. M. B. Purification of a Lectin from the Marine Red Alga *Gracilaria cornea* and Its Effects on the Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6414-6419; 2017.

LIMA, A.L., RODRIGUES, D.P., ARAÚJO, M.S., REIS, E.M.F., FESTIVO, M.L., 44 RODRIGUES, E.C.P., LÁZARO, N. S. Sorovares e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 68:39-47; 2016.

LORENZI H., HARRIS M. S.; Plantas ornamentais do Brasil: arbustos, herbáceas e trepadeiras; 2ª Ed. rev. e ampl. Nova odessa, SP; Instituto Plantarum, 1999.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista portuguesa de saúde pública*, 34: 77-84; 2016.

LUPO, A., HAENNI, M., MADEC, J.-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. 1-16; 2018.

MAGNET, S. E BLANCHARD, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chem. Rev.*, 105: 477-497; 2005.

MANOJ, N., SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. *Prot. Eng.*; 14: 735-745; 2001.

MITCHELL, S.W., Researches upon the venoms of the rattlesnake, Smithson, Contrib. Knowl. XII. 89-90; 1860.

MOLINA, M. C.; VINCENTE, C. Correlationships between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina phycobionts*. Cell Communication and Adhesion, 3: 1-12; 1995.

MONTUFAR ANDRADE, F. E.; MUÑOZ, C. A.M.; FRANCO, J. P. V.; CORREA, L. M. D.; RIVERA, J. D. V.; MIRANDA, J. V.; LONDOÑO, A. M. B.; TÓBON., J. J. Z.; PANTOJA, M.C.M. Bacteremia por *Staphylococcus* coagulase negativo com concentração inibitoria mínima para vancomicina ≥ 2 . Infectio, 20: 3-8; 2016.

MONTEIRO TÍNEL, J. M. B. et al. A Lectin from *Dioclea violacea* Interacts with Midgut Surface of *Lutzomyia migonei*, Unlike Its Homologues, *Cratylia floribunda* Lectin and *Canavalia gladiata* Lectin. The Scientific World Journal, 239208; 2014.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford University Press: New York. cap. 10, 1995.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. Oxford University Press: New York. cap. 16, 2005.

PERIANU, E.; RAU, I.; VIJAN, L. E.; DNA influence on norfloxacin fluorescence. Spectrochim. Acta Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 206: 8–15; 2019.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol; 109: 347-352, 1995.

PROCÓPIO T.F.; MOURA M.C, ALBUQUERQUE L.P.; GOMES F.S.; SANTOS N.D.L.; COELHO L.C.B.B.; PONTUALE.V.; NAPOLEÃO T.H.; Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential, in: E. Collins (Ed.), Antibacterials: Synthesis, Properties and Biological Activities, Nova Science Publishers Inc., 69–89; 2017.

PROJAN, S. J.; SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: is it all downhill from here? **Clinical Microbiology Infection**, 10:18-22; 2004.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat, 13: 151-71; 2010.

RAMOS, M. V.; MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROUGE, P. Interaction of lectins from the sub tribe Diocleinae with specific ligands. R. Bras. Fisiol. Veg. 8: 193-199; 1996.

Review on AMR, Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014

SALES, D. L.; MORAIS-BRAGA M.F.B.; SANTOS A.T.L.D.; MACHADO A.J.T.; ARAUJO FILHO, J.A.; DIAS D.Q.; CUNHA, F.A.B.D.; SARAIVA, R.A.; MENEZES I.R.A.; COUTINHO H.D.M.; COSTA, J.G.M.; FERREIRA F.S.; ALVES R.R.D.N.; ALMEIDA W.O.; Antibacterial, modulatory activity of antibiotics and toxicity from *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae) glandular secretions. *Biomed Pharmacother* 92: 554-561; 2017.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enferm.* 13: 64-70; 2004.

SANTOS, V.F., COSTA, M.S., CAMPINA, F.F., RODRIGUES, R.R., SANTOS, A.L.E., PEREIRA, F.M., BATISTA, K.L.R., SILVA, R.C., PEREIRA, R.O., ROCHA, B.A.M., COUTINHO, H.D.M., TEIXEIRA, C.S. The galactose-binding lectin isolated from *Vatairea macrocarpa* seeds enhances the effect of antibiotics against *Staphylococcus aureus*-resistant strain. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2019 doi: 10.1007/s12602-019-9526-z.

SCHWARZ, S., LOEFFLER, A., KADLEC, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*; 28:82-19; 2017.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from haemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14: 53-62; 2004.

SIEBRA, A.L.A., OLIVEIRA, L.R., PEREIRA, A.O., SIEBRA, D.C., ALBUQUERQUE, R. S., LEMOS, I.C.S., DELMONDES, G.A., TINTINO, S.R., FIGUEREDO, F.G., COSTA, J.G.M., COUTINHO, H.D.M., MENEZES I.R.A., FELIPE, C.F.B., KERNTOPF, M.R. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 25, 37-43, 2018.

SILVA, R. R. S.; SILVA, C. R.; SANTOS, V. F.; BARBOSA, C. R. S.; MUNIZ, D. F.; SANTOS, A. L. E.; SANTOS, M. H. C.; ROCHA, B. A. M.; BATISTA, K. L. R.; COSTA-JÚNIOR, L. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, C. S. *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. **Microbial Pathogenesis**. 2019. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103629

SMITH R; COAST J. The true cost of antimicrobial resistance, *BMJ*, 346: 1493; 2013.

SOUSA, J. C. Manual de Antibióticos Antibacterianos. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa 2006.

STILLMARK, H. Über Ricin, eines giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und anderson Euphorbiacen, Inaugural Dissertation, University of Dorpat, Estonia. 1888.(German) IV. A fate of orally administered ricin in rats. *Journal of Pharmacobiodyn*, 15: 147-56; 1992.

TAFUR, D., VILLEGAS, V. Mecanismos de resistência a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*; 12: 217-226, 2008.

The Shirley Sherwood Collection. disponível em <<http://shirleysherwood.com/-NADv3895>> acesso em 10 março 2020.

TINTINO, S. R. ; OLIVEIRA-TINTINO , CÍCERA D. M. ; CAMPINA, F. F.; VERDE, P. W.L.; PEREIRA, P. S.;SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SILVA, T. G.; LEAL-BALBINO, T.C.; BALBINO, V. Q.; Vitamin K enhances the effect of antibiotics inhibiting the efflux pumps of *Staphylococcus aureus* strains. *Medicinal Chemistry Research* 27: 261-267; 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 10 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TROTT, D. J., MOSS, S. M., SEE, A. M., REES, R. Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. *Australian Veterinary Journal*, 85: 464–466; 2007.

VAKULENKO, S. E MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews*, 430-450; 2003.

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

VYSAKH, A.; ABHILASH, S.; KURIAKOSE, J.; MIDHUN, S. J.; JYOTHIS, M.; LATHA, M. S. Protective effect of Lour aquatic labeling against gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in Wistar rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106: 1188-94, 2018.
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. WHO, Geneva Switzerland. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Tuberculosis Factsheet*, Online, Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/> acesso em 20 de abril de 2019

XIMENES, N. C. A. Caracterização e avaliação de atividades biológicas da lectina da vagem *Caesalpinia ferrea* (CfePL). 2009. 136 f. Tese (Doutoramento em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

ZINNER S.H.; GOLIKOVA M.V; STRUKOVA E.N.; PORTNOY Y.A.; FIRSOV A.A.; Predicting antibiotic combination effects on the selection of resistant *Staphylococcus aureus*: *In vitro* model studies with linezolid and gentamicin, *Int. J. Antimicrob. Agents*. 52; 854-860; 2018.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure



Valdenice F. Santos^a, Ana C.J. Araújo^b, Ana L.F. Silva^a, Dnane V. Almeida^c, Priscilla R. Freitas^b, Ana L.E. Santos^a, Bruno A.M. Rocha^d, Wanius Garcia^c, Ala M. Leme^e, Eduardo Bondan^f, Fernanda T. Borges^{e,g}, Brenda S. Cutrim^h, Luis C.N. Silva^h, Henrique D.M. Coutinho^b, Claudener S. Teixeira^{a,*}

^aAgrarian and Environmental Sciences Center, Federal University of Maranhão, Chapadinha, Maranhão, Brazil

^bDepartment of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^cCentro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil

^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^eNephrology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^fInterdisciplinary Postgraduate Program in Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, SP, Brazil

^gGraduate Program in Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, São Paulo, SP, Brazil

^hPostgraduate Program in Microbial Biology, CEJMA University, São Luís, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2019

Received in revised form 19 September 2019

2019

Accepted 20 September 2019

Available online 11 November 2019

Keywords:

Aminoglycosides

Lectin

Nephroprotection

ABSTRACT

Gentamicin is an aminoglycoside antibiotic used to treat infections of various origins. In the last few decades, the constant use of gentamicin has resulted in increased bacterial resistance and nephrotoxicity in some cases. In this study, we examined the ability of *Dioclea violacea* lectin (DVL) to modulate the antimicrobial activity of gentamicin and reduce the nephrotoxicity induced by this drug. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for DVL against all strains studied was not clinically relevant (MIC \geq 1024 μ g/ml). However, when DVL was combined with gentamicin, a significant increase in antibiotic action was observed against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. DVL also reduced antibiotic tolerance in *S. aureus* during 10 days of continuous treatment. In addition, DVL presented a nephroprotective effect, reducing sodium excretion, N-Gal expression and urinary protein, that are important markers of glomerular and tubular injuries. Taken together, studies of inhibition of hemagglutinating activity, fluorescence spectroscopy and molecular docking revealed that gentamicin can interact with DVL via the carbohydrate recognition domain (CRD), suggesting that the results obtained in this study may be directly related to the interaction of DVL-gentamicin and with the ability of the lectin to interact with glycans present in the cells of the peritoneum.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



The Galactose-Binding Lectin Isolated from *Vatairea macrocarpa* Seeds Enhances the Effect of Antibiotics Against *Staphylococcus aureus*-Resistant Strain

Valdenice F. Santos¹ · Maria S. Costa² · Fábila F. Campina² · Renato R. Rodrigues¹ · Ana L. E. Santos¹ · Felipe M. Pereira¹ · Karla L. R. Batista¹ · Rafael C. Silva¹ · Raquel O. Pereira¹ · Bruno A. M. Rocha³ · Henrique D. M. Coutinho² · Claudener S. Teixeira¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The use of natural products together with standard antimicrobial drugs has recently received more attention as a strategy to combat infectious diseases caused by multidrug-resistant (MDR) microorganisms. This study aimed to evaluate the capacity of a galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds (VML) to modulate antibiotic activity against standard and MDR *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacterial strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for VML against all strains was not clinically relevant (MIC \geq 1024 μ g/mL). However, when VML was combined with the antibacterial drugs gentamicin, norfloxacin and penicillin, a significant increase in antibiotic activity was observed against *S. aureus*, whereas the combination of VML and norfloxacin presented decreased and, hence, antagonistic antibiotic activity against *E. coli*. By its inhibition of hemagglutinating activity, gentamicin (MIC = 50 mM) revealed its interaction with the carbohydrate-binding site (CBS) of VML. Using molecular docking, it was found that gentamicin interacts with residues that constitute the CBS of VML with a score of -120.79 MDS. It is this interaction between the antibiotic and the lectin's CBS that may be responsible for the enhanced activity of gentamicin in *S. aureus*. Thus, our results suggest that the VML can be an effective modulating agent against *S. aureus*. This is the first study to report the effect of lectins as modulators of bacterial sensitivity, and as such, the outcome of this study could lay the groundwork for future research involving the use of lectins and conventional antibiotics against such infectious diseases such as community-acquired methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

Keywords Antimicrobial · Gentamicin · Protein · Agglutinin

ARTICLE IN PRESS

Microbial Pathogenesis xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multidrug-resistant strains when complexed with *Canavalia ensiformis* lectin

Valdenice F. Santos^a, Ana C.J. Araújo^b, Priscilla R. Freitas^b, Ana L.P. Silva^a, Ana L.E. Santos^a, Bruno Anderson Matias da Rocha^c, Romério R.S. Silva^a, Dnane V. Almeida^d, Wanius Garcia^d, Henrique D.M. Coutinho^{b,*,**}, Claudener S. Teixeira^{*,*}

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

^b Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^c Departamento de Biopálmitica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil

^{*} Instituto de Formação de Educadores, Universidade Federal do Cariri, Brejo Santo, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Intrinsic fluorescence spectroscopy

Hemagglutinating activity

Carbohydrate-binding proteins

ABSTRACT

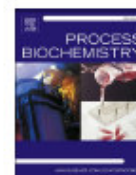
The lectins are carbohydrate-binding proteins that are highly specific to sugar groups associated to other molecules. In addition to interacting with carbohydrates, a number of studies have reported the ability of these proteins to modulate the activity of several antibiotics against multidrug-resistant (MDR) strains. In this study, we report the enhanced antibacterial activity of the gentamicin against MDR strains when complexed with a lectin from *Canavalia ensiformis* seeds (ConA). Hemagglutination activity test and intrinsic fluorescence spectroscopy revealed that the gentamicin can interact with ConA most likely via the carbohydrate recognition domain (CRD) with binding constant (K_b) value estimated of $(0.44 \pm 0.04) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Furthermore, the minimum inhibitory concentrations (MIC) obtained for ConA against all strains studied were not clinically relevant ($\text{MIC} \geq 1024 \mu\text{g/mL}$). However, when ConA was combined with gentamicin, a significant increase in antibiotic activity was observed against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The present study showed that ConA has an affinity for gentamicin and modulates its activity against MDR strains. These results indicate that ConA improves gentamicin performance and is a promising candidate for structure/function analyses.



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/proctbio



Elucidation of the primary structure and molecular modeling of *Parkia pendula* lectin and *in vitro* evaluation of the leishmanicidal activity

Romulo F. Carneiro^a, Evelyn S. Aguiar^b, Valdenice F. Santos^b, Ana L.E. Santos^b, Maria H. C. Santos^b, Renato R. Roma^b, Romerio R.S. Silva^b, Maria L.M.B. Leal^a, Lívia T. Silva^a, Bruno A. M. Rocha^c, Cláudio G.L. Silva^d, Celso S. Nagano^a, Alexandre H. Sampaio^a, Racquel O.S. Souza^d, Claudener S. Teixeira^{e,*}

^a Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

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

^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Barbalha, CE, Brazil

^e Instituto de Formação de Educadores, Universidade Federal do Ceará, Brejo Santo, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Lectin

Leishmaniasis

Mass spectrometry

Molecular docking

ABSTRACT

Structure-function study of plant lectins has received attention for elucidating possible mechanisms of lectins in cell models. Lectins have the ability to interact with target glycans and trigger responses able to inhibit the development of various pathogens. In this work, we report amino acid sequencing, prediction of the three-dimensional structure of *P. pendula* lectin (PpeL) and the effect of this lectin on inhibiting the development of *Leishmania infantum* promastigote. PpeL was purified on affinity chromatography and has haemagglutinating activity after exposure to temperatures up to 50 °C and at a pH corresponding to the range of 5.0 and 7.0. PpeL consists of 447 amino acids; the theoretical average molecular mass was 47,410 Da. The three-dimensional model of PpeL revealed that it consists of three β -prism domains tandemly arranged with each one presenting a different carbohydrate recognition domain (CRD). PpeL inhibited growth of *L. infantum* promastigotes (45.6 \pm 1.92 %) within 48 h, an effect that occurred via the CRD, suggesting an interaction between PpeL and glycans from *L. infantum*. Our results confirm the leishmanicidal potential of PpeL, suggesting that this lectin may be a new strategy for the development of antileishmanial drugs.



Machaerium acutifolium lectin inhibits inflammatory responses through cytokine modulation



Ana L.E. Santos^a, Cícero P.S. Júnior^b, Roberval N.M. Neto^c, Maria. H.C. Santos^a, Valdenice F. Santos^a, Bruno A.M. Rocha^d, Eduardo M. Sousa^c, Rafael C. Carvalho^a, Irwin R.A. Menezes^{b,*,**}, Maria R.C. Oliveira^b, Lindaiane B.R. Dantas^b, Tarcísio M. Silva^b, Claudener S. Teixeira^{e,*}

^a Agrarian and Environmental Sciences Center, Federal University of Maranhão, Chapadinha, Maranhão, Brazil

^b Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^c Postgraduate Program in Microbial Biology, CEUMA, University of São Luis, Maranhão, Brazil

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

^e Educator Training Institute, Federal University of Cariri, Brejo Santo, Ceará, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Agglutinin

Inflammation

LPS-stimulated macrophages

ABSTRACT

Inflammatory response occurs when tissues are injured by pathogens, trauma, toxins, or heat. Lectins are proteins that recognize and bind reversibly to glycans and glycoconjugates and can modulate inflammatory responses in *in vitro* and *in vivo* models. As such, this study aimed to evaluate the potential of an anti-inflammatory lectin isolated from *Machaerium acutifolium* seeds (MaL) in mice and LPS-stimulated macrophage models. The protein was solubilized in sterile saline (0.9 % NaCl) immediately before treatment of mice by intraperitoneal routes at doses of 0.02 mg/kg, 1 mg/kg and 5 mg/kg. MaL significantly decreased inflammation in the formalin test, inhibited cell migration in experimental models of carrageenan-induced peritonitis, and blocked the formation of paw edema induced by carrageenan and dextran. *In vitro* studies showed that MaL downregulated the proinflammatory cytokine genes inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), but upregulated the anti-inflammatory IL-10 gene in LPS-stimulated macrophages. Therefore, this study suggests that MaL has an anti-inflammatory effect relative to modulated levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, indicating that MaL can be used as a potential therapeutic agent in cellular inflammatory events.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Purification and biophysical characterization of a mannose/*N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor



Ana L.E. Santos^a, Gerlânia O. Leite^b, Romulo F. Carneiro^c, Renato R. Roma^a, Valdenice F. Santos^a, Maria H.C. Santos^a, Raquel O. Pereira^a, Rafael C. Silva^a, Celso S. Nagano^c, Alexandre H. Sampaio^c, Bruno A.M. Rocha^d, Plinio Delatorre^e, Adriana R. Campos^b, Claudener S. Teixeira^{a,*}

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

^b Núcleo de Biologia Experimental, Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

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

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Lectin
Purification
Zebrafish
Acute pain
Capsaicin

ABSTRACT

A new mannose/*N*-acetyl-D-glucosamine-specific lectin, named Mal, was purified from seeds of *Machaerium acutifolium* by precipitation with ammonium sulfate, followed by affinity and ion-exchange chromatography. Mal haemagglutinates either native rabbit erythrocytes or those treated with proteolytic enzymes. Mal is highly stable by the ability to maintain its haemagglutinating activity after exposure to temperatures up to 50 °C. The lectin haemagglutinating activity was optimum between pH 6.0 and 7.0 and inhibited after incubation with D-mannose and *N*-acetyl-D-glucosamine and α -methyl-D-mannopyranoside. Mal is a glycoprotein with relative molecular mass of 29 kDa (α -chain), 13 kDa (β -chain) and 8 kDa (γ -chain) with secondary structure composed of 3% α -helix, 44% β -sheet, 21% β -turn, and 32% coil. The orofacial antinociceptive activity of the lectin was also evaluated. Mal (0.03 mg mL⁻¹) reduced orofacial nociception induced by capsaicin, an effect that occurred via carbohydrate recognition domain interaction, suggesting an interaction of Mal with the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) receptor. Our results confirm the potential pharmacological relevance of Mal as an inhibitor of acute orofacial mediated by TRPV1.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Parkia platycephala lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*



Romerio R.S. Silva^a, Carolina R. Silva^b, Valdenice F. Santos^a, Cristina R.S. Barbosa^c, Debora F. Muniz^c, Ana L.E. Santos^a, Maria H.C. Santos^a, Bruno A.M. Rocha^d, Karla L.R. Batista^a, Livio M. Costa-Júnior^b, Henrique D.M. Coutinho^c, 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 Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:
Antimicrobial
Anthelmintic
Gentamicin
Lectin
Agglutinin

ABSTRACT

Lectins have been studied in the past few years as an alternative to inhibit the development of pathogenic bacteria and gastrointestinal nematodes of small ruminants. The development of new antibacterial and anthelmintic compounds is necessary owing to the increase in drug resistance among important pathogens. Therefore, this study aimed to evaluate the capacity of a glucose/mannose-binding lectin from *Parkia platycephala* seeds (PPL) to inhibit the development of *Haemonchus contortus* and to modulate antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains, thereby confirming its efficacy when used in combination with gentamicin. PPL at the concentration of 1.2 mg/mL did not show inhibitory activity on *H. contortus* in the egg hatch test or the exsheathment assay. However, it did show significant inhibition of *H. contortus* larval development with an IC₅₀ of 0.31 mg/mL. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for PPL against all tested bacterial strains was not clinically relevant (MIC ≥ 1024 µg/mL). However, when PPL was combined with gentamicin, a significant increase in antibiotic activity was observed against *S. aureus* and *E. coli* multi-resistant strains. The inhibition of hemagglutinating activity by gentamicin (MIC = 50 mM) revealed that it may be interacting with the carbohydrate-binding site of PPL. It is this interaction between the antibiotic and lectin carbohydrate-binding site that may be responsible for the enhanced activity of gentamicin against multi-resistant strains. It can be concluded that PPL showed selective anthelmintic effect, inhibiting the development of *H. contortus* larvae and that it increased the effect of the antibiotic gentamicin against multi-resistant bacterial strains, thus constituting a potential therapeutic resource against resistant bacterial strains and *H. contortus*.

ANEXO H

Artigo referente à dissertação, intitulado: “*Dioclea violacea* lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure.”



Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure

Valdenice F. Santos^a, Ana C.J. Araújo^b, Ana L.F. Silva^a, Dnane V. Almeida^c, Priscilla R. Freitas^b, Ana L.E. Santos^a, Bruno A.M. Rocha^d, Wanius Garcia^c, Ala M. Leme^e, Eduardo Bondan^f, Fernanda T. Borges^{e,g}, Brenda S. Cutrim^h, Luis C.N. Silva^h, Henrique D.M. Coutinho^b, Claudener S. Teixeira^{a,*}

^aAgrarian and Environmental Sciences Center, Federal University of Maranhão, Chapadinha, Maranhão, Brazil

^bDepartment of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará, Brazil

^cCentro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil

^dDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^eNephrology Division, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^fInterdisciplinary Postgraduate Program in Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, SP, Brazil

^gGraduate Program in Environmental and Experimental Pathology, Paulista University, São Paulo, SP, Brazil

^hPostgraduate Program in Microbial Biology, CEUMA University, São Luis, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2019

Received in revised form 19 September 2019

Accepted 20 September 2019

Available online 11 November 2019

Keywords:

Aminoglycosides
Lectin
Nephroprotection

ABSTRACT

Gentamicin is an aminoglycoside antibiotic used to treat infections of various origins. In the last few decades, the constant use of gentamicin has resulted in increased bacterial resistance and nephrotoxicity in some cases. In this study, we examined the ability of *Dioclea violacea* lectin (DVL) to modulate the antimicrobial activity of gentamicin and reduce the nephrotoxicity induced by this drug. The minimum inhibitory concentration (MIC) obtained for DVL against all strains studied was not clinically relevant (MIC \geq 1024 μ g/mL). However, when DVL was combined with gentamicin, a significant increase in antibiotic action was observed against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. DVL also reduced antibiotic tolerance in *S. aureus* during 10 days of continuous treatment. In addition, DVL presented a nephroprotective effect, reducing sodium excretion, N-Gal expression and urinary protein, that are important markers of glomerular and tubular injuries. Taken together, studies of inhibition of hemagglutinating activity, fluorescence spectroscopy and molecular docking revealed that gentamicin can interact with DVL via the carbohydrate recognition domain (CRD), suggesting that the results obtained in this study may be directly related to the interaction of DVL-gentamicin and with the ability of the lectin to interact with glycans present in the cells of the peritoneum.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Antibiotics inhibit the synthesis of the bacterial cell wall, proteins, deoxyribonucleic acid (DNA), and ribonucleic acid (RNA) [1]. Antibiotics may also penetrate the bacterial cell wall through binding, using the energy-dependent transport mechanisms in ribosomal sites, which subsequently lead to the inhibition of protein synthesis [2].

Among the antibiotics that inhibit bacterial protein synthesis, aminoglycosides, such as streptomycin, amikacin, kanamycin, gentamicin and tobramycin, can be highlighted [3]. Gentamicin is an aminoglycoside produced by various *Micromonospora* species, widely used in treatments of enterococcal, mycobacterial, and severe Gram-negative bacterial infections [4].

Structurally, gentamicin is a 4,6-disubstituted aminocyclitol composed of the core aminocyclitol moiety, 2-deoxystreptamine, which is decorated by purpurosamine and garosamine amino sugars at positions C-4 and C-6, respectively [3]. In its therapeutic form, gentamicin comprises a complex of gentamicin C1, C1a, and C2, which differ only in the degree of methylation of the C-6' position of the sugar attached at C-4 of 2-deoxystreptamine [5].

* Corresponding author at: Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal do Maranhão, Campus Chapadinha S/N, 65500-000 Chapadinha, Maranhão, Brazil.

E-mail address: claudener@gmail.com (C.S. Teixeira).

The principal collateral effect of gentamicin is its nephrotoxicity, which may occur in up to 20% of exposed patients, among whom those with renal dysfunction or those receiving high doses or prolonged therapy are at highest risk [6]. Nephrotoxicity from gentamicin causes nonoliguric renal failure and a drop in glomerular filtration, generally occurring seven days after treatment. Treatment of nephrotoxicity caused by gentamicin basically consists of the cessation of drug use, if possible, or replacing it with another non-nephrotoxic antibiotic, but in some cases, this may increase the resistance of the bacteria to the antibiotic, causing the patient clinical prognosis to worsen [7].

Bacteria are acquiring resistance to gentamicin and other aminoglycosides by various mechanisms. The most common is the inactivation of aminoglycosides by enzymes called aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) [8]. In addition, resistance to aminoglycosides may result from mutations in ribosomes or, more commonly, by modifications performed by a family of ribosomal methyltransferase enzymes [9]. This scenario suggests the need to find new molecules able to increase the efficacy of these drugs.

Lectins are a group of widely distributed and structurally heterogeneous proteins that contain at least one noncatalytic domain that selectively recognizes and reversibly binds to specific free sugars or glycans present on glyconjugates without altering the structure of the carbohydrate [10]. These proteins are known to possess some pharmacological properties such as antiproliferative, anti-inflammatory, antimicrobial, immunomodulatory, nociceptive, vasoactive and antidepressant activities [11–14]. New evidences have also suggested that lectins may potentiate the activity of some antibiotics [15,16].

Dioclea violacea lectin (DVL) is a protein that recognizes and binds primarily to Man/Glc saccharides present in cell surface glycans [17]. This lectin exhibits various pharmacological properties, for example anti-glioma, anti-inflammatory and vasorelaxant activities [18–20]. All these effects are directly related to the ability of these proteins to interact with carbohydrates via the carbohydrate recognition domain (CRD).

The present study examines the effects of DVL as a modulator of antibiotic activity and its ability to interfere with the development of adaptive phenotype by the continuous exposure to gentamicin. The effect of DVL on the decrease of gentamicin-induced nephrotoxicity was also examined.

2. Material and methods

2.1. Purification of native DVL from *Dioclea violacea* seeds

D. violacea seeds were collected from plants located at Vargem Grande, Maranhão, Brazil. The seeds from *D. violacea* were ground to a fine powder in a coffee mill, and the soluble proteins were extracted at 25 °C by continuous stirring with 50 mL of 0.15 M NaCl and 5 g of *D. violacea* powder for 4 h, followed by centrifugation at 10,000g at 4 °C for 20 min. Protein purification was carried out by the affinity chromatography protocol, as previously described by Moreira et al. [17], using a Sephadex-G75 column (Sigma, Saint Louis, USA) (2 × 10 cm). The fraction containing *Dioclea violacea* lectin (DVL) was then freeze-dried and purity-tested by SDS-PAGE [21].

2.2. Hemagglutination and inhibition assays

Hemagglutination assays were carried out as described by Moreira and Perrone [22] using serial dilutions with rabbit erythrocytes, either native or treated, with proteolytic enzymes (trypsin or papain). Results were expressed in hemagglutinating units

(HU), 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 of 100 mM) of D-glucose, D-galactose, α -methyl-D-mannopyranoside, D-mannose, β -lactose and gentamicin were prepared in ultrapure water. DVL (4 HU) was added to each dilution.

2.3. Intrinsic fluorescence spectroscopy

Intrinsic fluorescence spectroscopy measurements for DVL were performed on a steady-state Varian-Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer equipped with a temperature control system. The aromatic residues of DVL were excited at 289 nm. The fluorescence emission spectra (averaged six times) of DVL in the absence and presence of gentamicin were recorded in a 1 cm path length quartz cuvette from 300 to 450 nm at 293 K. DVL concentration was 1 μ M in 50 mM Tris-HCl adjusted at pH 7.4 containing 150 mM NaCl. The final concentrations of gentamicin in DVL solution were 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.8, 5.6, 6.4, 7.2, 7.9, 8.7, and 9.5 μ M. To correct the inner filter effect, the following equation was used [23]: $F_{cor} = F_{obs} 10^{\frac{A_{289} + A_e}{2}}$, where F_{cor} and F_{obs} are the corrected fluorescence intensity and the observed fluorescence intensity at the emission wavelength, respectively. A_{289} and A_e are the sum of the absorbance of all components at 289 nm and the emission wavelength, respectively. All the experiments were done in triplicate. The fluorescence data were analyzed by the well-known Stern-Volmer relationship [23]: $\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[gentamicin]$, where F_0 and F are the fluorescence intensities in the absence and presence of gentamicin, respectively, $[gentamicin]$ is the gentamicin concentration, and K_{sv} is the Stern-Volmer quenching constant. The binding constant (K_b) and the number of binding sites (n) were determined using the following relationship [23]: $\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_b) + n \log[gentamicin]$. The Gibbs free energy change (ΔG^0) was calculated using the Van't Hoff equation: $\Delta G^0 = -RT \ln(K_b)$, where T is the absolute temperature, and R = 8.314 J/mol.K.

2.4. Microbial assays

2.4.1. Drugs and reagents

All reagents used in this study were of the highest purity analytical grade. Both DVL and gentamicin (Sigma, Saint Louis, USA) were dissolved at a final concentration of 1024 μ g/mL in ultrapure water.

2.4.2. Bacterial strains

Multi-resistant *Staphylococcus aureus* 10, *Escherichia coli* 06 and *Pseudomonas aeruginosa* 15 strains were used in the assays.

Table 1
Bacterial source and antibiotic resistance profile.

Strains	Source	Resistance profile*
<i>E. coli</i> 06	Urine culture	Cf, Cef, Ca, Cro.
<i>S. aureus</i> 10	Rectal Swab	Ca, Cef, Cf, Oxa, Pen, Amp, Amox, Mox, Cip, Lev, Asb, Amc, Cla, Azi, Clin.
<i>P. aeruginosa</i> 15	Catheter tip	Cpm, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer

Amp – Ampicillin; Asb – Ampicillin + Sulbactam; Amox – Amoxicillin; Amc – Amoxicillin + Ac. clavulanic; Azi – Azithromycin; Ca – Cefadroxil; Cf – Cephalotin; Cef – Cephalexin; Cla – Clarithromycin; Cro – Ceftriaxone; Cip – Ciprofloxacin; Clin – Clindamycin; Imi – imipenem; Lev – levofloxacin; Mer – Meropenem; Mox – Moxifloxacin; Oxa – oxacillin, Pen – Penicillin; Ptz – Piperacilina + Tazobactam.

The Microbiology and Molecular Biology Laboratory of the Regional University of Cariri (URCA) provided the strains with resistance profiles identified in Table 1. These were maintained in blood agar base (Difco Laboratories, Detroit, MI) and cultured at 37 °C for 24 h in Heart Infusion Agar (HIA, Difco Laboratories).

2.4.3. Preparation and standardization of the inoculum

After cultivation and growth of the microorganisms for the required period, the inoculum was prepared according to CLSI [24]. The bacteria were placed in test tubes containing 5 mL of sterile saline (0.9% NaCl). The suspension was then shaken by vortex, and its turbidity was compared and adjusted based on the McFarland scale, which corresponds to 10^6 CFU/mL.

2.4.4. Minimum inhibitory concentration test

For Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assays, 100 μ L of the inoculum were diluted in 10% BHI (Brain Heart Infusion) to give a concentration of 10^5 CFU/mL. A volume of 100 μ L of BHI and inoculum was added to each well of a 96-well plate, followed by 100 μ L of serial dilutions of DVL, varying in concentrations from 1024 μ g/mL to 1.0 μ L/mL. The plates were submitted to incubation for 24 h at 37 °C. To determine the bacterial MIC, 20 μ L of resazurin were added to each well, and after 1 h, the color change of the wells from blue to red signaled microbial growth, whereas permanent blue indicated the absence of growth in accordance with CLSI [24].

2.4.5. Antibiotic and modulatory activities

The antibiotic and modulatory activities of DVL were evaluated according to Coutinho et al. [25]. The tests were performed in triplicate. A volume of 100 μ L of inoculum was diluted in 10% BHI (brain heart infusion) to give a concentration of 10^5 CFU/mL of each multi-resistant strain and DVL with volume corresponding to a sub-inhibitory concentration ($MIC/8 = 128 \mu$ g/mL). Controls were prepared with only 1350 μ L of BHI (10%) and 150 μ L of bacterial suspension. The microdilution was performed with 100 μ L of each antibiotic up to the penultimate well, and the final volumes were discarded. The plates were then incubated at 37 °C for 24 h and read through the addition of resazurin.

2.4.6. Influence of DVL on the development of adaptive phenotype towards gentamicin

The evaluation of phenotype adaptation towards gentamicin was performed through successive cultures of *S. aureus* in the presence of subinhibitory concentration (sub-MIC; $MIC/2$) of gentamicin and DVL (1024 μ g/mL). First, one overnight suspension of *S. aureus* was diluted (1:50) in MH broth containing the tested compounds. After 48 h, the MIC for gentamicin was determined. Following that, the bacteria were grown in MH broth containing the tested compounds for 24 h, and the MIC was determined. This procedure was repeated for 10 days. The drug concentration ($MIC/2$) for each new passage was based on the MIC calculated for the previous passage.

2.5. Nephrotoxicity evaluation assays

2.5.1. Animals

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de São Paulo and was performed in accordance with the Brazilian guidelines for scientific animal care and use (CEUA-UNIFESP – 52373004-19).

Twenty Wistar male rats aged 6 weeks and weighing 190–210 g were maintained in metabolic cages. The cages were kept at a temperature- (21 ± 2 °C) and humidity-controlled ($60 \pm 10\%$) room with a 12 h-dark/light (artificial lights, 7 a.m.–7 p.m.) cycle and air

exhaust (15 min/h). Water and chow diet were supplied *ad libitum* during 15 days.

Rats were divided into 4 groups: control group (CTL); *Dioclea violacea*-treated group (DVL, 100 μ g/kg, intraperitoneal injections, during 15 days), Gentamicin-treated group (40 mg/kg weight, intraperitoneal injections during 15 days, Schering-Plough Corporation, New Jersey, USA) and DVL + Gentamicin group, i.e., animals that received gentamicin and were concomitantly treated with DVL during 15 days.

Fifteen days after the beginning of the experimental protocol, all animals were weighed, blood samples were collected from the lateral tail vein, and rats were maintained in metabolic cages for 24 h for urine collection and quantification of urine volume. The animals were euthanized 15 days after the beginning of the experimental protocol with a toxic IP dose of ketamine (90 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg), (AgribRANDS Do Brasil Ltda em Paulínia/SP). The right and left kidneys were then removed for immunohistochemical analysis. Biochemical parameters were measured in plasma and urine samples.

2.5.2. Biochemical analysis

Blood and urine creatinine levels were assayed spectrophotometrically according to standard procedures using commercially available diagnostic kits (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brazil) based on Jaffé reaction [26]. Creatinine clearance (mL/min) was calculated according to the following formula: (urine creatinine concentration \times urine volume)/(serum creatinine concentration \times 1440). Urea was assayed using a colorimetric assay based on urease activity (Labtest Diagnostica, Minas Gerais, Brazil) [27]. Urine sodium concentration was determined with a Micronal B462 flame photometer (Micronal, São Paulo, Brazil). Sodium excretion is reported as percentage of mEq/24 h. Urinary protein was analyzed using a colorimetric method based on pyrogallol red-molybdate [28]. Results are expressed as the mg/24 h.

2.5.3. Oxidative stress studies

Lipid peroxidation was measured by quantifying TBARS (thiobarbituric acid reactive substances assay). Reactive substances combine with thiobarbituric acid forming a red compound. Malondialdehyde was used as a standard curve, and the results are expressed as mM of MDA/mg protein. Urine samples were added to a solution of 0.375% thiobarbituric acid, 15% trichloroacetic acid and 0.25 NHCl (Sigma, Saint Louis, USA); after that, samples were continually agitated while being heated to 95 °C for 20 min and then allowed to cool to room temperature. Absorbance was spectrophotometrically determined at 535 nm. Protein level in urine samples was assessed as previously described. The results were expressed as 10^{-6} M/mg creatinine.

Urinary peroxides were determined by the ferrous oxidation of xylenol orange version 2 (FOX-2) method [29]. Ferrous iron is oxidized to ferric iron by peroxides contained in the samples. Xylenol orange reagent shows high selectivity for the Fe^{3+} ion, producing a purplish-blue complex, the absorbance of which can be measured at 560 nm ($A = 4.3 \times 10^4$ M/cm). The following reagent was prepared: 90 mL methanol; 10 mL double distilled water; 100 μ M xylenol orange; 4 mM butylated hydroxytoluene (BHT); 25 mM sulfuric acid, and 250 μ M ferrous ammonium sulfate. The urine sample was mixed with FOX-2 reagent (1:9), vortexed and incubated for 30 min at room temperature. Solutions were then centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4 °C for the removal of protein residues. The absorbance at 560 nm was read against a blank. Results are expressed as nmol/mg urinary creatinine.

2.5.4. Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissues were cut into 4- μ m thick sections on a rotary microtome (Leica Microsystems, Herlev, Denmark). Kidney

slices were then deparaffinized and rehydrated. Kidney sections were stained for hematoxylin eosin and images were obtained in an Olympus BX60 microscope, 20X objective. A pathologist who had no prior knowledge of the experimental groups analyzed the images and evaluated the presence of inflammatory infiltrate, tubular dilation.

For immunostaining, kidney slices were boiled in a target retrieval solution (1 mmol/l Tris, pH 9.0, with 0.5 mM EGTA) during 10 min for antigen exposure. Nonspecific binding was prevented by incubating the sections in PBS containing 1% BSA, 0.05% saponin, and 0.2% gelatin. Endogenous peroxidase activity was blocked with 5% H₂O₂ in absolute methanol for 10 min at room temperature. The sections were incubated with primary antibodies to neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), diluted to 1:100, and left to stand overnight at 4 °C. After washing, the sections were incubated with horseradish peroxidase-labeled polymer conjugated to secondary antibody (Dako, Denmark) for 1 h at room temperature. The sites of antibody-antigen reactions were visualized with 0.5% 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAKO, Denmark) dissolved in distilled water with 0.1% H₂O₂. Thirty photomicrographs per group along the kidney cortex were taken, and the light brown staining was quantified (LAS software, version 3.8) and averaged for each rat. The data are reported as percentage of stained area.

2.6. Statistical analysis

Data analysis was performed using the statistical program GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). The data were analyzed with two-way ANOVA, using the geometric mean of the triplicates and the standard deviation of the mean as the central data. Subsequently, a Bonferroni post hoc test was performed where $p < 0.05$ and $p < 0.0001$ were considered significant. For kidney analyses, Shapiro-Wilk normality test was applied. Normally distributed data were evaluated the two-way ANOVA and Tukey post-hoc test, while data with another distribution were analyzed by the Kruskal-Wallis and Dunn test.

Table 2
Purification of DVL (from 10 g of seed flour).

Steps	Protein (mg mL ⁻¹) ^a	Haemagglutinating activity (U.H mL ⁻¹) ^b	Specific activity (U.H mg ⁻¹ P)	Purification fold (x)
Crude extract	2.45	2,048	835.9	1
Sephadex-G75	0.08	512	6400	7.65

^a Protein concentration.

^b Haemagglutinating activity expressed in haemagglutinating units.

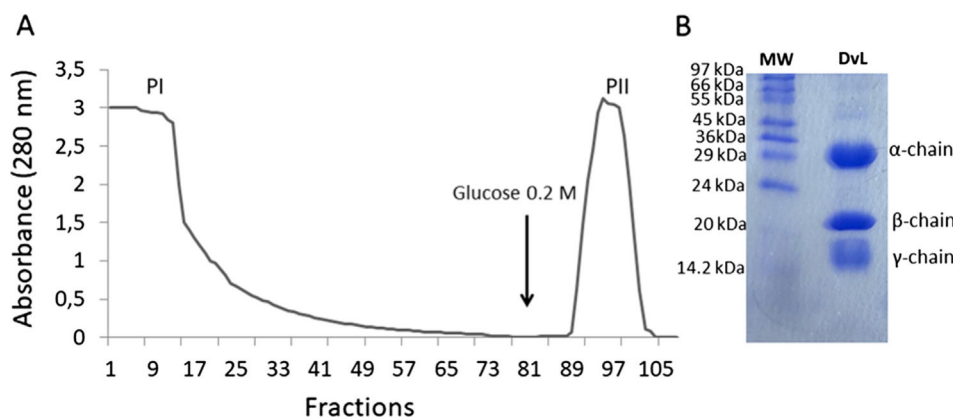


Fig. 1. DVL purification. (A) Elution profile of DVL in Sephadex G-75 chromatography. (B) SDS-PAGE profile, (MW) Molecular mass markers: phosphorylase B, 97 kDa; bovine serum albumin, 66 kDa; glutamic dehydrogenase, 55 kDa; ovalbumin, 45 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 36 kDa; carbonic anhydrase, 29 kDa; trypsinogen, 24 kDa; trypsin inhibitor, 20 kDa and α -lactalbumin 14.2 kDa. (DVL) α -chain, β -chain, and γ -chain of DVL.

2.7. Molecular docking

The crystal structure of lectin from *Dioclea violacea* (DVL) monomer (PDB code 3AX4) [20] was used for all molecular docking simulations. The gentamicin coordinates were obtained from Crystal Structure of ANT(2'')-Ia (PDB code 5CFT) [30]. Molecular docking analysis was performed with Molegro, using the MolDock method [31]. MolDock is based on a search algorithm that combines differential evolution with a cavity prediction algorithm. The program takes hydrogen bond directionality into account as an additional term in the scoring function. The MolDock Score (MDS) was calculated using the scoring function. Grid resolution was 0.30 Å with a radius of 15 Å. MolDock Optimizer with default settings was used as the search algorithm. The number of runs was 10, and the maximum number of interactions was 2,000. Population size and maximum number of poses were 200 and 10, respectively. MDS was calculated as $MDS = E_{inter} + E_{intra}$, where E_{inter} is the ligand-protein interaction energy [31].

Polar interactions were analyzed with the CCP4 software CONTACT [32], adopting cutoff distances of 3.2 Å. All figures and superposition were performed with the PyMOL program [33].

3. Results and discussion

3.1. Lectin purification and DVL-gentamicin interaction assays

The purification of DVL was achieved by affinity chromatography on sephadex-G75 column (Table 2) as previously described by Moreira et al. [17]. The chromatogram profile showed two peaks, the first (PI) corresponding to unbound protein fraction and the second (PII) corresponding to the retained protein fraction (Fig. 1A). In gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE), PII showed three bands (Fig. 1B) corresponding to α -chain (25.5 kDa), β -chain (14 kDa), and γ -chain (12 kDa) of DVL.

The inhibition of hemagglutinating activity showed that DVL has an affinity for gentamicin, glucose and mannose with minimum inhibitory concentrations of 12.5, 25 and 12.5 mM, respec-

Table 3
Inhibitory effect of monosaccharides and gentamicin on DVL's hemagglutinating activity.

Substances	MIC (mM) ^a
Gentamicin	12.5
D-Mannose	12.5
α -Methyl-D-mannopyranoside	6.25
D-Glucose	25
D-Galactose	NI ^b
β -Lactose	NI

^a MIC, minimum inhibitory concentration.

^b NI, substance not inhibitory until a concentration of 100 mM.

tively, while no significant affinity was observed for the other carbohydrates tested (Table 3). Hemagglutination assay is a simple method to obtain semi-quantitative data on the sugar binding and specificity of a lectin [34]. Lectin-gentamicin interaction was first described by Santos et al. [35], who demonstrated the inhibition of hemagglutinating activity of *Vatairea macrocarpa* (VML) lectin in the presence of gentamicin with MIC of 50 mM. Although both lectins had affinity for gentamicin, DVL was observed to have a higher affinity for the antibiotic relative to VML.

To confirm the interaction results observed in the inhibition assay (Table 3), the interaction between gentamicin and DVL was also analyzed using intrinsic fluorescence spectroscopy with exci-

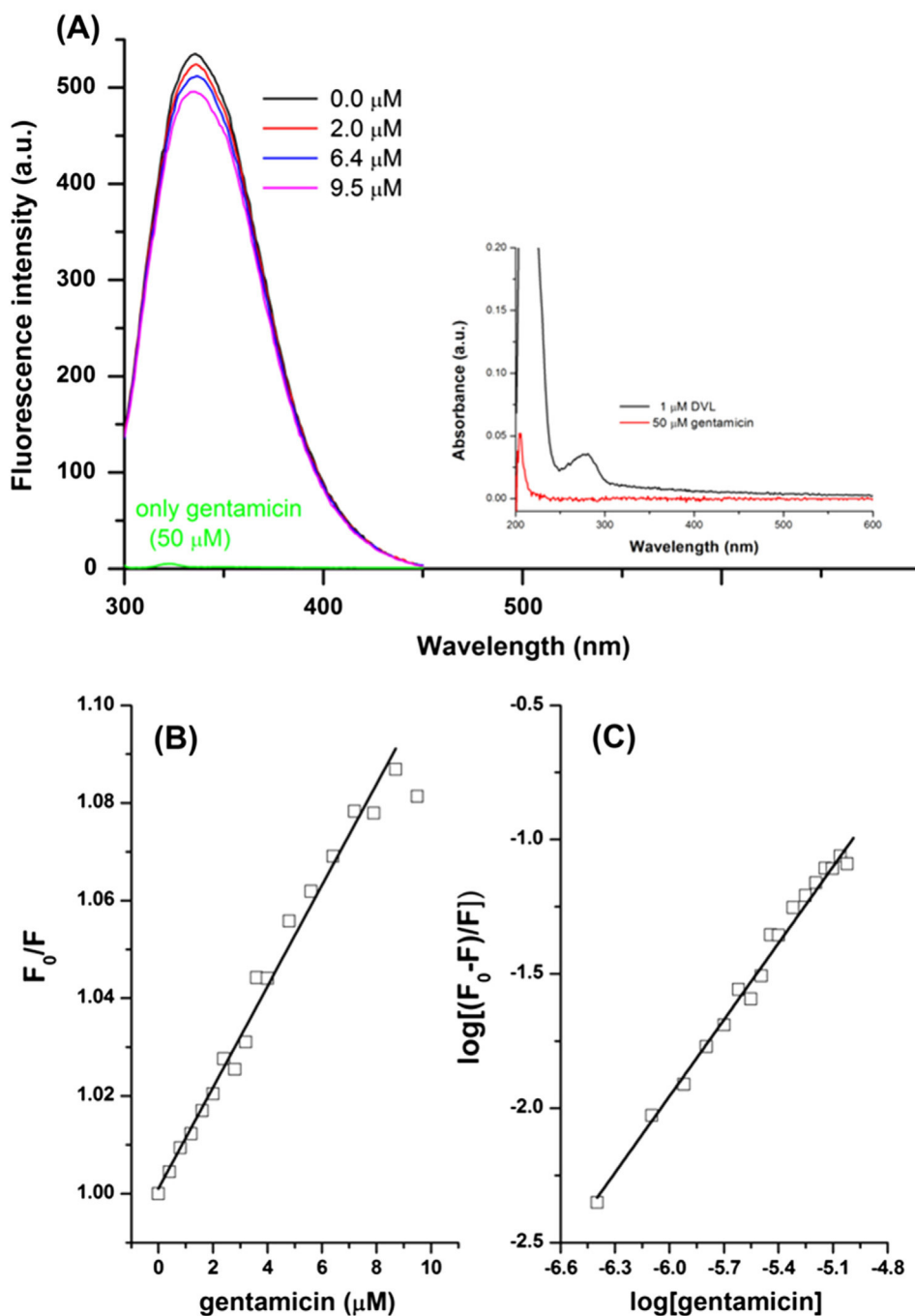


Fig. 2. Intrinsic fluorescence spectroscopy of DVL in the absence and presence of gentamicin. (A) The concentrations of gentamicin were 0.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4.0, 4.8, 5.6, 6.4, 7.2, 7.9, 8.7, and 9.5 μM . Inset: absorbance spectra for DVL and gentamicin. (B) Stern-Volmer plot. (C) Double logarithmic plot of $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log[\text{gentamicin}]$ derived from the fluorescence quenching of DVL (1 μM) induced by gentamicin.

Table 4
Minimum inhibitory concentration values – MIC for $\mu\text{g/mL}$.

Substance	Bacterial strains		
	<i>E. coli</i> 06	<i>P. aeruginosa</i> 15	<i>S. aureus</i> 10
DVL	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

tation at 289 nm. The absorbance of gentamicin was virtually zero, even at the highest concentration measured (inset of Fig. 2A), and the fluorescence emission intensity was negligible (Fig. 2A). The emission spectrum of DVL at 293 K and pH 7.4 was characterized by a maximum intensity at 336 nm, which is typical of aromatic residues partially exposed to buffer environment (Fig. 2A). The fluorescence emission spectra of DVL with the addition of gentamicin were measured. The results revealed a gradual decrease in fluorescence intensity of DVL caused by quenching in the presence of increasing concentrations of gentamicin (Fig. 2A). The fluorescence data were then analyzed by the well-known Stern-Volmer relationship [23]. The Stern-Volmer plot (Fig. 2B) showed a good linear relationship (r^2 of 0.986), indicating the predominance of a single quenching mechanism induced by gentamicin with $K_{sv} = 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. In order to obtain information about the binding of gentamicin with DVL, the binding constant (K_b) and the number of binding sites (n) were determined under the assumption that DVL has independent binding sites [23].

According to the plot (Fig. 2C), n and K_b are estimated to be 0.95 ± 0.03 and $0.55 \pm 0.04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively. The results revealed that n was approximately equal to 1, suggesting one binding site for gentamicin for each DVL monomer, which corresponds to the number of CRDs per monomer in DVL [20], corroborating the results obtained in the inhibition of hemagglutinating activity above and as also further suggested by molecular docking results described below. Furthermore, the value determined for K_b was similar to the value reported for the interaction between DVL and methyl α -D-mannopyranoside (Me α Man) with K_b of $1.27 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [36]. Furthermore, the calculated Gibbs free energy change (ΔG^0) was -21.0 kJ/mol . The negative value ($\Delta G^0 < 0$) indicates that the binding interaction of gentamicin with DVL is spontaneous, and it is very likely that van der Waals interaction and hydrogen bonds play major roles in this interaction.

3.2. Modulation of antibacterial activity and antibiotic activity by DVL

Antibacterial activity of DVL was performed against multi-resistant *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* strains and evaluated by MIC. DVL did not show antimicrobial activity against the tested bacteria (MIC $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$) (Table 4). These values are not considered clinically relevant for their direct antibacterial effect. MIC values greater than 1000 $\mu\text{g/mL}$ are considered to lack direct antibacterial activity for clinical practice [37].

Although DVL does not inhibit bacterial growth, we evaluated whether the interaction between DVL and gentamicin could modify the effect of the antibiotic against multi-resistant strains (Fig. 3). Our results showed that DVL could enhance the activity of gentamicin against *S. aureus*, decreasing the MIC from 50.8 to 10.1 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3A). Proportionally, this value corresponds to an 80.1% reduction in the amount of gentamicin needed to have the same effect on the strain under study. In the presence of DVL, the activity of gentamicin decreased the MIC from 32 to 12.7 $\mu\text{g/mL}$ for *E. coli* (Fig. 3B). This value corresponds to a 60.3% reduction in the amount of gentamicin needed to have the same effect in *E. coli*. On the other hand, DVL showed no significant effect on the modulation of gentamicin activity against the *P. aeruginosa* strain (Fig. 3C).

Some studies have shown that lectins can interact with glycans present in Gram-positive and Gram-negative bacteria [38], and by mechanisms not yet elucidated, they can alter the structure of bacterial membranes [39]. Although DVL did not inhibit microbial growth, its association with gentamicin enhanced antibiotic activity against multi-resistant strains of *S. aureus* and *E. coli*. Thus, we may suppose that DVL can enhance the antibiotic activity of gentamicin by the mechanism of interacting with gentamicin in the CRD, delivering the drug to target cells through membrane carbohydrate recognition, which leads the gentamicin release, and thereby facilitating the entry of the antibiotic into the bacterial cytoplasm. However, further detailed studies are needed to prove this mechanism of action.

The long-term exposure of a bacterial population to antibiotic treatment is associated with development of phenotypes that enable their survival under drug-induced stress [40]. This phenomenon results in the emergence of drug resistance owing to

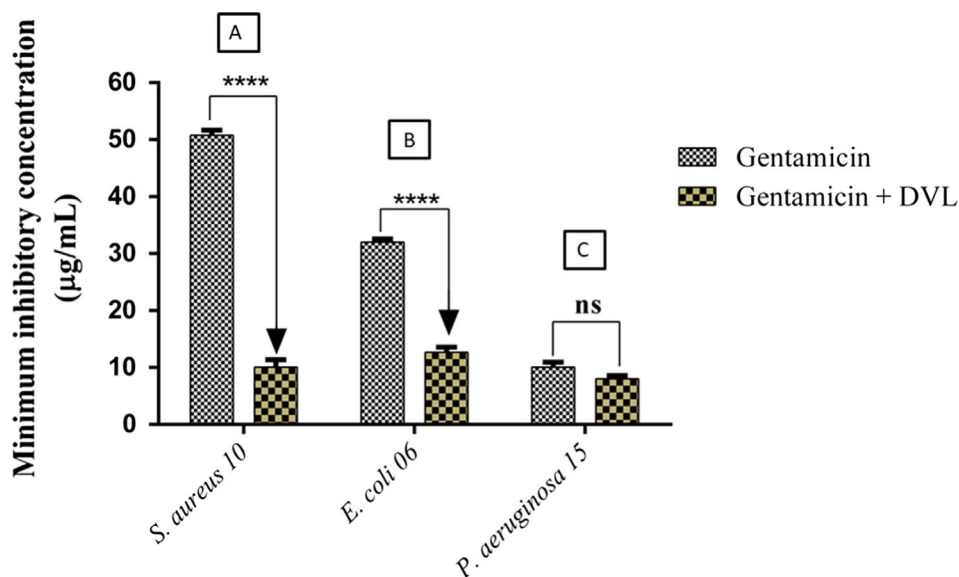


Fig. 3. Modulation of the antibiotic activity of gentamicin complexed with DVL. (A) Modulation of the antibiotic activity against *S. aureus* 10. (B) Modulation of the antibiotic activity against *E. coli* 06. (C) Modulation of the antibiotic activity against *P. aeruginosa* 15. Quadruple asterisks indicate statistically significant difference with $p < 0.0001$; ns, not statistically significant value with $p > 0.05$.

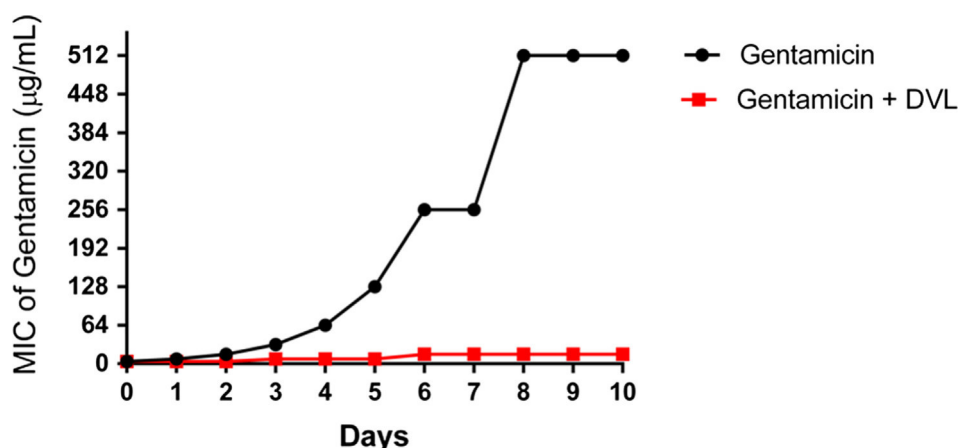


Fig. 4. Effect of DVL on acquisition of gentamicin tolerance by *Staphylococcus aureus*.

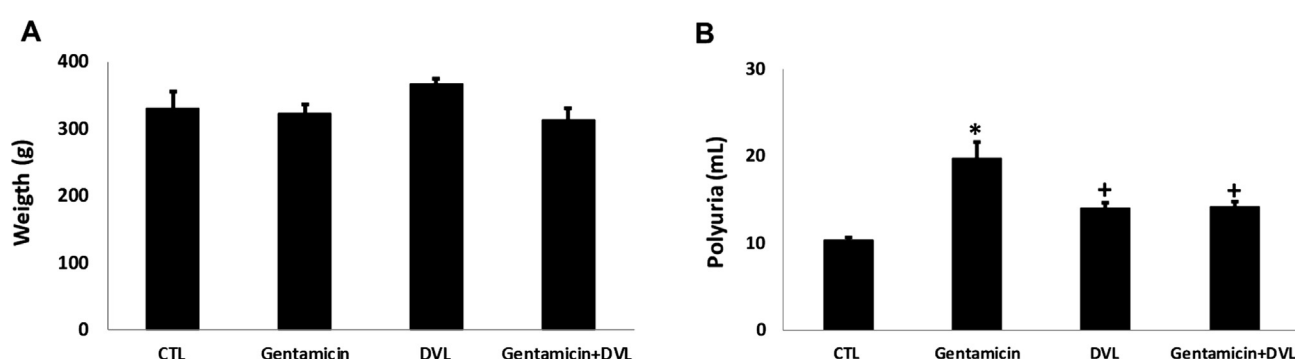


Fig. 5. Analysis of physiological parameters. Graphical representation of weight (A) and polyuria (B) in the CTL – control group, DVL – *Dioclea violacea* lectin group (100 µg/kg), gentamicin group (40 mg/kg) and gentamicin + DVL group for 15 days. The significance level for the null hypothesis was set at 5% ($P < 0.05$). (*) all groups compared to the CTL group; (**) DVL and gentamicin + DVL groups compared to the gentamicin group. $N = 5$ per group.

mutations in different genes [41]. In this sense, we examined whether DVL could inhibit the acquisition of adaptive phenotype by *S. aureus* during continuous exposure to gentamicin. In this assay, bacteria were treated with Sub-MIC concentration of gentamicin in the presence or absence of DVL. The initial MIC for gentamicin was 4 µg/mL.

Unsurprisingly, *S. aureus* rapidly and gradually increased the MIC to this drug, and after four days of exposure, the MIC increased 16-fold. At the end of the assay, gentamicin-treated bacteria showed a MIC value of 512 µg/mL for this drug (MIC increased 128-fold) (Fig. 4). This effect was radically changed by coinubation of *S. aureus* with DVL and gentamicin. In this group, the MIC value increased only after two days of exposure, and at the end of the experimental period (ten days), bacteria showed a MIC of 16 µg/mL (4-fold increase). These results suggest that co-administration of DVL with gentamicin may be a valuable strategy in combating the development of new resistant strains. This also leads to the same hypothesis that the mechanism of action is related to the interaction with DVL, which improve the drug effect and reduce the ability of *S. aureus* to acquire drug tolerance.

3.3. Nephrotoxicity evaluation

Nephrotoxicity is one important side effect of gentamicin, what limits its use in clinical practice. It is well known that gentamicin can induce acute renal failure, which calls for alternative therapies to prevent gentamicin nephrotoxicity, as indicated in the present work.

Exposure to gentamicin, DVL and gentamicin + DVL did not change the mean body weight of the animals when compared to the control group (Fig. 5A). Nevertheless, we observed an increase in polyuria only in the gentamicin group, when compared to the other groups (Fig. 5B). It is interesting to note that DVL treatment blunted polyuria induced by gentamicin.

In evaluating renal function, we observed creatinine clearance and plasmatic creatinine. As expected, creatinine clearance decreased and plasmatic creatinine increased in the gentamicin group when compared to the CTL and DVL groups (Fig. 6A). DVL treatment did not change the decrease in creatinine clearance (Fig. 6A) nor the increase in plasma creatinine (Fig. 6B), suggesting that in our experimental conditions DVL was not effective in prevent gentamicin effect on kidney function. Plasma urea was not statistically different among the groups analyzed in the present study (Fig. 6C). Urea is a poor marker of glomerular filtration, because plasmatic urea depends on diet and urea cycle enzymes, so it may variate despite glomerular filtration rate, lacking specificity [42]. Nevertheless, gentamicin group presented a significant increase in urinary protein when compared to the CTL and DVL groups (Fig. 7A), while in the gentamicin + DVL, this increase was blunted.

Renal tubular function was evaluated by means of sodium excretion (Fig. 7B) and NGal production (Fig. 9B). Sodium excretion and NGal expression increased only in the gentamicin group, when compared to the CTL groups. Gentamicin + DVL group showed a significant decrease of sodium excretion when compared to the gentamicin group, suggesting improvement in kidney tubule function.

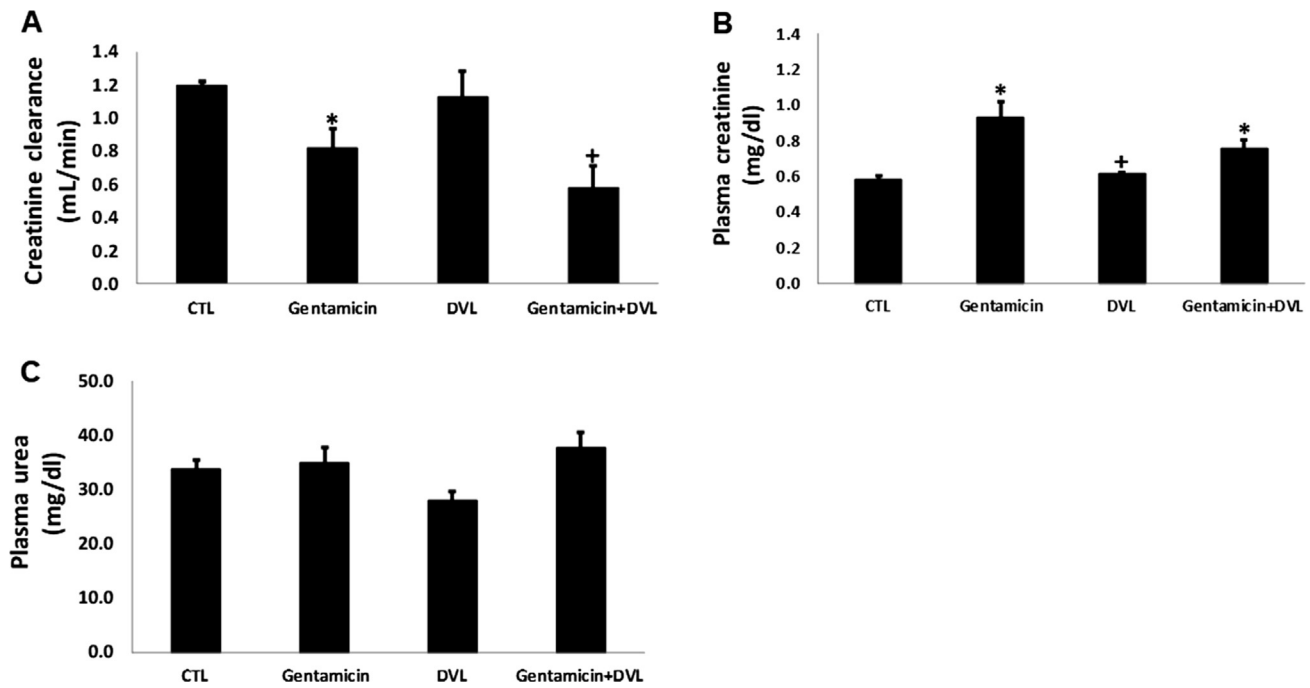


Fig. 6. Evaluation of renal function. Graphical representation of creatinine clearance (A), plasma creatinine (B) and plasma urea (C) in the CTL – control group, DVL – *Dioclea violacea* lectin group (100 µg/kg), gentamicin group (40 mg/kg) and gentamicin + DVL group for 15 days. The significance level for the null hypothesis was set at 5% ($P < 0.05$). N = 5 per group. (*) all groups compared to the CTL group; (+) DVL and gentamicin + DVL groups compared to the gentamicin group. N = 5 per group.

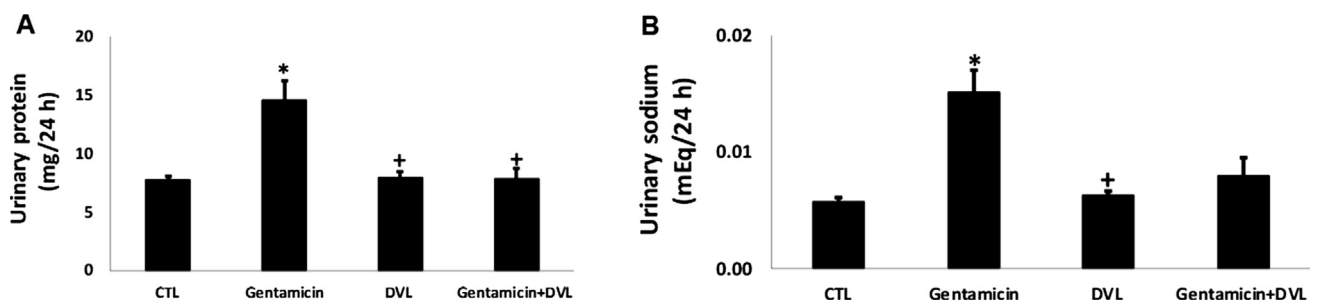


Fig. 7. Evaluation of renal function. Graphical representation of urinary protein (A), and urinary sodium (B) in the CTL – control group, DVL – *Dioclea violacea* lectin group (100 µg/kg), gentamicin group (40 mg/kg) and gentamicin + DVL group for 15 days. The significance level for the null hypothesis was set at 5% ($P < 0.05$). (*) all groups compared to the CTL group; (+) DVL and gentamicin + DVL groups compared to the gentamicin group. N = 5 per group.

Since the oxidant effect of gentamicin is well documented in kidney [43], we analyzed lipid peroxidation (TBARS) and hydroperoxide (FOX-2) levels in urine. The gentamicin group presented an increase in both lipid peroxidation and hydroperoxides compared to these processes in the control group. In the gentamicin + DVL group, TBARS and FOX-2 levels were reduced when compared to the gentamicin group alone (Fig. 8). Without gentamicin-induced renal injury, DVL alone had no effect on kidney TBARS and FOX-2 levels.

Fig. 9A demonstrates the hematoxylin eosin staining and immunohistochemistry for N-Gal in the kidney cortex. Images show in CTL and DVL groups a preserved morphology and intact tubules (* asterisk), while the GM group has dilated tubules (star), many areas of inflammation (arrows) and epithelial cell loss. However, in the GM + DVL group there was a reduction in tubular dilation (star) and inflamed surface (arrows).

Tubular N-Gal marking increased in the gentamicin group compared to the CTL group. Corroborating previous results in this study, DVL treatment blunted gentamicin effect in NGal. Interestingly, DVL induced a small, but significant, increase in NGal marking (Fig. 9B).

Gentamicin-induced nephrotoxicity is a well-documented event in which reabsorption occurs mainly in the proximal tubule. Studies showed that gentamicin acts on mitochondria and induces oxidative stress and apoptosis. Other studies also showed that gentamicin causes glomerular congestion, renal free radical generation, reduced antioxidant defense mechanisms, and acute tubular necrosis [44–47].

Our experimental model of gentamicin-induced nephrotoxicity was characterized by a decrease of creatinine clearance and an increase in plasma creatinine, urinary protein, sodium excretion and N-Gal, which are important markers of glomerular and tubular injury, respectively [48]. Treatment with DVL in gentamicin-exposed rats reduced tubular injury by normalizing the sodium excretion and NGal, but not kidney function parameters.

We may speculate that DVL can partially protect the kidney from gentamicin nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory and maybe others effects, as previously reported in ischemia/reperfusion model of acute kidney injury [49]. However, it is reasonable to suggest that higher concentration of DVL could be more effective to prevent gentamicin toxicity and improve kidney function.

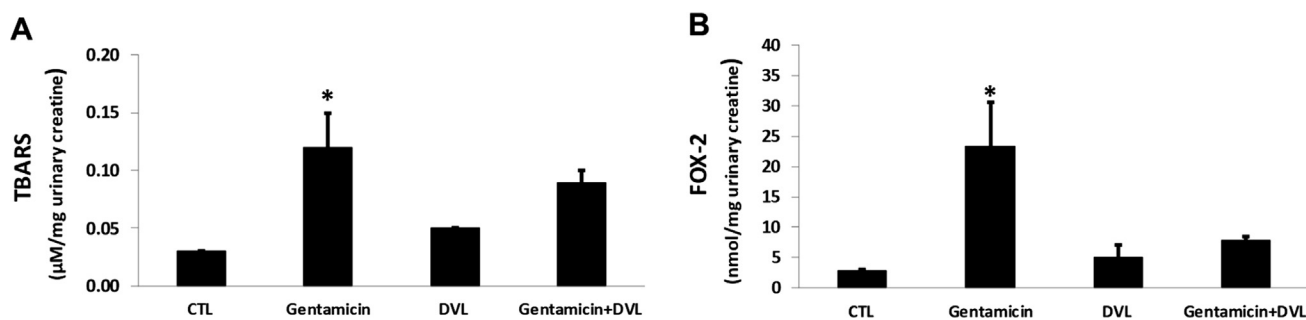


Fig. 8. Analysis of reactive oxygen species formation. Graphical representation of the thiobarbituric reactive substances (A) and urinary hydrogen peroxide (B) in the CTL – control group, DVL – *Dioclea violacea* lectin group (100 µg/kg), gentamicin group (40 mg/kg) and gentamicin + DVL group for 15 days. The significance level for the null hypothesis was set at 5% ($P < 0.05$). (*) all groups compared to the CTL group; (+) DVL and gentamicin + DVL groups compared to the gentamicin group. N = 5 per group.

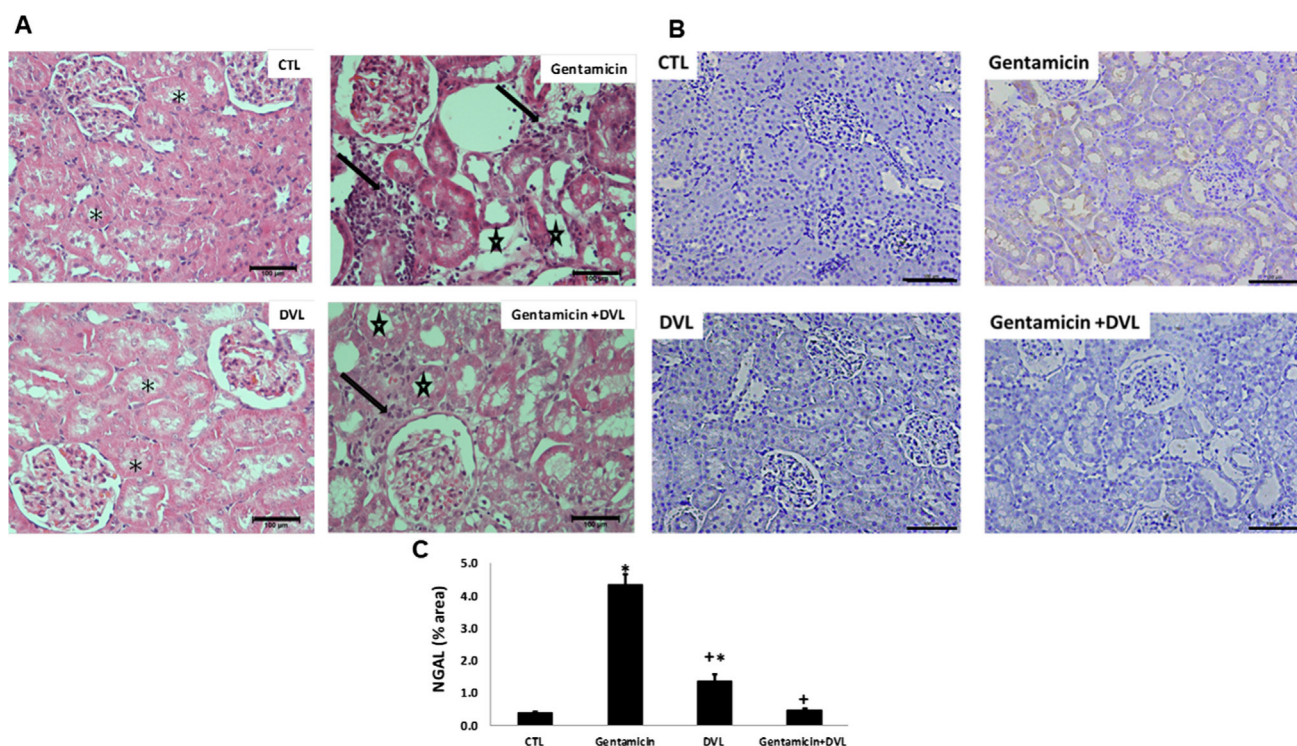


Fig. 9. Analysis of kidney injury. Light microscopy of hematoxylin-eosin stained (A), immunostained kidney sections (B) and quantitative analyses of stained kidney sections (C) for Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in animals in the CTL – control group, DVL – *Dioclea violacea* lectin group (100 µg/kg), gentamicin group (40 mg/kg) and gentamicin + DVL group for 15 days. The significance level for the null hypothesis was set at 5% ($P < 0.05$). (*) all groups compared to the CTL group; (+) DVL and gentamicin + DVL groups compared to the gentamicin group. N = 5 per group. Asterisks represent preserved morphology and intact tubules, stars represent dilated tubules and arrows indicate areas of inflammation and epithelial cell loss. Scale bar, 100 µm.

Treatment with gentamicin produces oxidative stress in cells of the tubules, both *in vivo* and in culture [50]. In the cytoplasm, gentamicin acts on mitochondria, both directly and indirectly, and activates the intrinsic apoptosis pathway, breaking the respiratory chain, decreasing ATP synthesis and leading to oxidative stress which results in cell death [51]. In the present work, gentamicin group showed an increase in renal lipidic peroxidation and urinary peroxides. Oxidative stress caused by ROS can damage both macromolecules, including DNA, proteins, and lipids, and mitochondrial structure [52]. DVL played an important role in reducing oxidative stress, thus minimizing nephrotoxicity by gentamicin. It is likely that oxidative stress and related oxidative cellular damage induced by aminoglycosides underlie many of the adverse side effects associated with these antibiotics [53,54].

Table 5

Energy values calculated during molecular docking between the DVL and gentamicin.

Type of energies	Energy values (kcal·mol ⁻¹)
MolDock Score	-118.23
Intermolecular	-117.03
Hydrogen bonding	-12.10
Intramolecular	-28.62
Interaction energies of residues*	Energy values (kcal·mol ⁻¹)
Tyr12	-23.60
Asn14	-14.71
Leu99	-6.81
Tyr100	-4.73
Asp208	-6.55
Arg228	-15.43

* All residues make up the carbohydrate recognition domain of DVL.

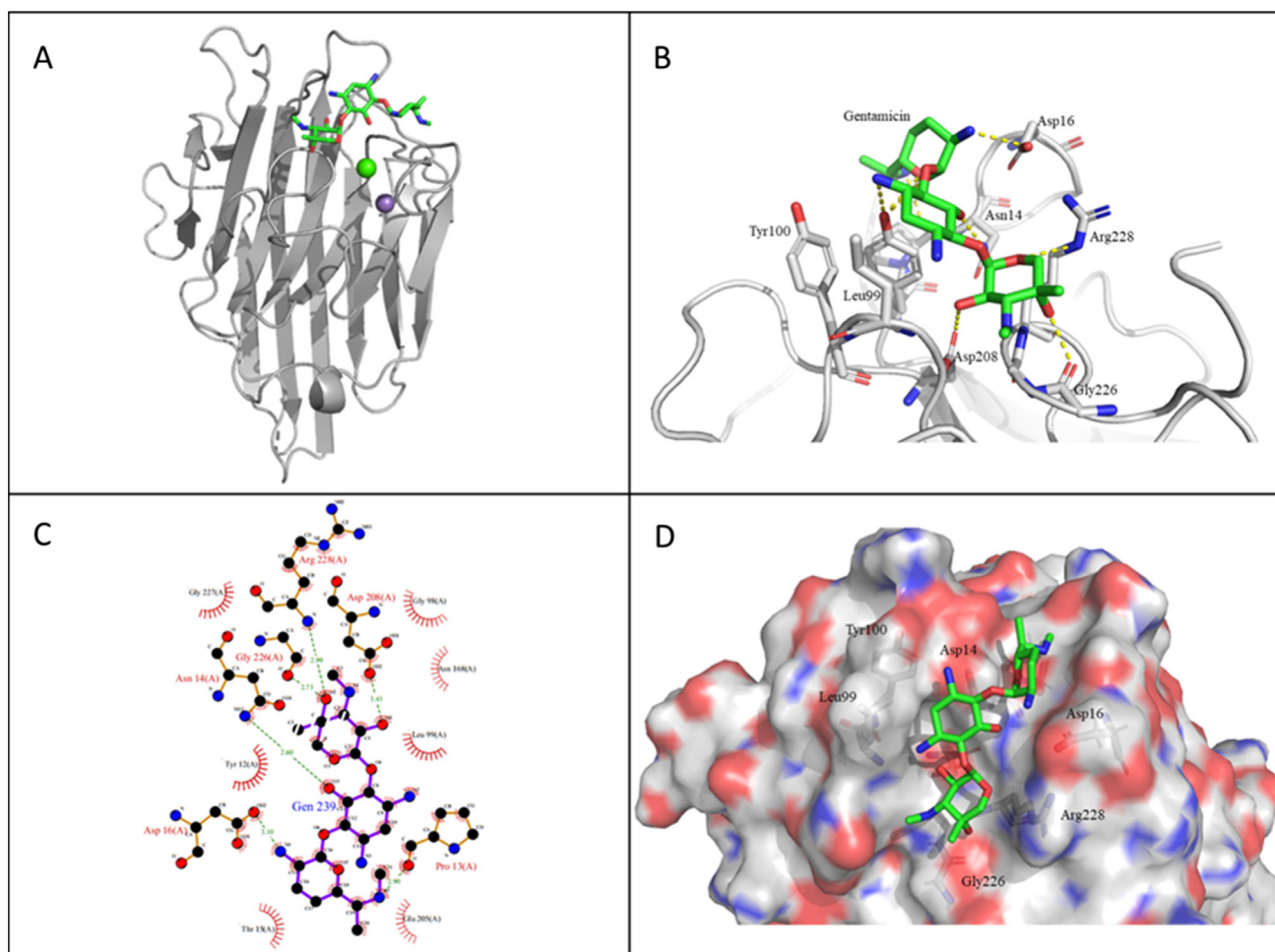


Fig. 10. Molecular docking of DVL with gentamicin. (A) Representation of the monomeric structure of DVL complexed with gentamicin at the CRD. (B) Gentamicin interacting with DVL through H-bond interactions in CRD. (C) Ligplot representation of H-bonds and hydrophobic interactions between gentamicin and residues of the DVL. (D) Electrostatic surface view of the docking of gentamicin in DVL structure.

3.4. Structural analysis

To investigate the molecular details of the intermolecular interactions between DVL and gentamicin, molecular docking studies were performed. The results of the energy calculations are shown in Table 5. Gentamicin anchored at the CRD of DVL (Fig. 10) with energy values of $-118.23 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, revealing the interaction between gentamicin and amino acids Tyr12, Pro13, Asn14, Asp16, Gly98, Leu99, Asp208, Gly226, Gly227 and Arg228 through hydrogen bonds and van der Waals interactions (Table 6). Our results also show that gentamicin exhibits favorable interaction energy with all amino acid residues that make up the lectin's CRD. These interactions are mostly maintained by hydrogen bonds and van der Waals interactions, corroborating the fluorescence spectroscopy results.

Molecular docking is an excellent tool and has been used for various purposes, in particular understanding the mechanism underlying the development of resistance against microorganisms and obtaining detailed information about the active site of the enzyme [55]. Studies of molecular docking with different lectins have shown that these lectins can interact with heparan sulfates, complex carbohydrates and secondary metabolites [56–58]. The molecular docking findings, combined with the results of fluorescence spectroscopy and inhibition of hemagglutinating activity, suggest that DVL can serve as a carrier molecule of gentamicin for microorganisms, or even be used in studies with probes for the detection of gentamicin in different biological samples.

Table 6

The van der Waals interaction and polar contacts between DVL and gentamicin.

Amino acids	Gentamicin	Distances (Å)
<i>Polar contacts</i>		
Tyr12 OH	N3	3.1
Tyr12 OH	O6	3.2
Tyr12 OH	O7	3.2
Pro13 O	N5	2.9
Asn14 ND2	O5	2.6
Asp16 OD2	N4	3.1
Asp208 OD2	O1	3.2
Gly226 O	O2	2.7
Arg228 N	O2	2.9
<i>van der Waals interactions</i>		
Tyr12 C2	O5	3.1
Tyr12 OH	C11	3.2
Tyr12 OH	C12	2.5
Tyr12 OH	C18	3.5
Pro13 O	C19	3.3
Pro13 O	C21	3.4
Gly98 CA	O1	3.4
Gly98 CA	N1	3.3
Leu99 CB	N2	3.1
Leu99 CD2	N2	3.5
Gly226 C	O2	3.5
Gly227 CA	N1	3.1
Gly227 CA	O2	3.3
Arg228 CB	O3	3.5
Arg228 CG	O2	3.4
Arg228 CG	O3	3.0
Arg228 NE	C6	3.3

4. Conclusion

DVL modulates antibiotic activity by a mechanism related to the high affinity interaction with the drug, and could impair the evolution of adaptive phenotype, as mediated by uninterrupted exposure to gentamicin. The improvement of the drug effect reduces the resistance capacity of tested bacterial strains. DVL also protects the kidneys from toxicity induced by gentamicin. Our studies further suggest that the interaction of DVL with carbohydrates present in kidney cells as well as its interaction with gentamicin may be directly related to these effects.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was partly funded by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Finance Code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), referring to the Research Productivity Grants of Wanius Garcia, Bruno A.M. Rocha and Henrique D.M. Coutinho.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.207>.

References

- [1] S.B. Levy, B. Marshall, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nat. Med.* 10 (2004) 122–129.
- [2] M.C. Maranan, B. Moreira, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum, Antimicrobial resistance in staphylococci. Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical relevance, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 11 (1997) 813–849.
- [3] K.M. Krause, A.W. Serio, T.R. Kane, L.E. Connolly, Aminoglycosides: an overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6 (2016) a027029.
- [4] C.G. Kumar, M. Himabindu, A. Jetty, Microbial biosynthesis and applications of gentamicin: a critical appraisal, *Crit. Rev. Biotechnol.* 28 (2008) 173–212.
- [5] J.W. Park, J.S. Hong, N. Parajuli, W.S. Jung, S.R. Park, S.K. Lim, J.K. Sohng, Y.J. Yoon, Genetic dissection of the biosynthetic route to gentamicin A2 by heterologous expression of its minimal gene set, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 8399–8404.
- [6] P. Saleh, S. Abbasalizadeh, S. Rezaeian, M. Naghavi-Behzad, R. Piri, H.H. Pourfeizi, Gentamicin-mediated ototoxicity and nephrotoxicity: A clinical trial study, *Niger. Med. J.* 57 (2016) 347–352.
- [7] J.F.P. Oliveira, J.P. Cipullo, E.A. Burdmann, Aminoglycoside nephrotoxicity, *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.* 21 (2006) 444–452.
- [8] K.J. Labby, S. Garneau-Tsodikova, Strategies to overcome the action of aminoglycoside-modifying enzymes for treating resistant bacterial infections, *Future Med. Chem.* 5 (2013) 1285–1309.
- [9] S. Garneau-Tsodikova, K.J. Labby, Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives, *Med. Chem. Comm.* (2016) 11–27.
- [10] E.J.M. Van Damme, W.J. Peumans, A. Barre, P. Rougé, Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles, *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 17 (1998) 575–692.
- [11] F.O. Silva, P. Santos, E.O. Figueirôa, C.M. Melo, J.K.A.L. Neves, F.V. Arruda, J.B. Cajazeiras, K.S. Nascimento, E.H. Teixeira, B.S. Cavada, A.L. Porto, V.R. Pereira, Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells, *Res. Veterin. Sci.* 96 (2014) 276–282.
- [12] C.S. Teixeira, A.M.S. Assrey, J.V.O. Silva, 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 Biochem.* 49 (2014) 529–534.
- [13] V.R. Pinto-Junior, V.J. Osterne, M.Q. Santiago, J.L. Correia, F.N. Pereira-Junior, R. B. Leal, M.G. Pereira, L.S. Chicas, C.S. Nagano, B.A. Rocha, J.C. Silva-Filho, W.P. Ferreira, C.R. Rocha, K.S. Nascimento, A.M. Assrey, B.S. Cavada, Structural studies of a vasorelaxant lectin from *Dioclea reflexa* Hook seeds: crystal structure, molecular docking and dynamics, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 12–23.
- [14] D.K. Rieger, A.P. Costa, J. Budni, M. Moretti, S.G. Barbosa, K.S. Nascimento, E.H. Teixeira, B.S. Cavada, A.L. Rodrigues, R.B. Leal, Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122 (2014) 53–60.
- [15] G.R.S. Ferreira, J.S. Brito, T.F. Procópio, N.D.L. Santos, B.J.R.C. Lima, L.C.B.B. Coelho, D.M.D.A.F. Navarro, P.M.G. Paiva, T. Soares, M.C. Moura, T.H. Napoleão, Antimicrobial potential of *Alpinia purpurata* lectin (ApuL): Growth inhibitory action, synergistic effects in combination with antibiotics, and antibiofilm activity, *Microbial Pathogen.* 124 (2018) 152–162.
- [16] T.F. Procópio, M.C. Moura, E.F.L. Bento, T. Soares, L.C.B.B. Coelho, R.P. Bezerra, R. A. Mota, A.L.F. Porto, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, Looking for alternative treatments for bovine and caprine mastitis: evaluation of the potential of *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae lectin (CasuL), both alone and in combination with antibiotics, *Microbiologyopen* (2019) e869, <https://doi.org/10.1002/mbo3.869>.
- [17] R.A. Moreira, E.F. Cordeiro, T.B. Grangeiro, M.V. Ramos, J.L. Martins, B.S. Cavada, J.T.A. Oliveira, Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Brasil* 8 (1996) 23–29.
- [18] A.P.M. Nascimento, J.L. Knaut, D.K. Rieger, I.A.V. Wolin, I.A. Heinrich, J. Mann, A. V. Juarez, L.D.V. Sosa, A.L. De Paul, C.G. Moreira, I.B. Silva, C.S. Nobre, V.J.S. Osterne, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, R.B. Leal, Anti-glioma properties of DVL, a lectin purified from *Dioclea violacea*, *Int. J. Biol. Macromol.* 120 (2018) 566–577.
- [19] J.T. Clemente-Napimoga, M.A.S.M. Silva, S.N.C. Peres, A.H.P. Lopes, C.F. Lossio, M.V. Oliveira, V.J.S. Osterne, K.S. Nascimento, H.B. Abdalla, J.M. Teixeira, B.S. Cavada, M.H. Napimoga, *Dioclea violacea* lectin ameliorates inflammation in the temporomandibular joint of rats by suppressing intercellular adhesion molecule-1 expression, *Biochimie* 158 (2019) 34–42.
- [20] M.J. Bezerra, N.V. Rodrigues, A.F. Pires, G.A. Bezerra, C.B. Nobre, K.L. Alencar, P. M. Soares, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, J.L. Martins, K. Gruber, A.H. Sampaio, P. Delatorre, B.A. Rocha, A.M. Assrey, B.S. Cavada, Crystal structure of *Dioclea violacea* lectin and a comparative study of vasorelaxant properties with *Dioclea rostrata* lectin, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 807–815.
- [21] U.K. Laemli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [22] R.A. Moreira, J.C. Perrone, Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*, *Plant Physiol.* 59 (1977) 783–787.
- [23] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed., Springer, New York, 2006.
- [24] CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty Second Informational Supplement (2012), 9th ed., 2012, Document M100-S22.
- [25] H.D.M. Coutinho, J.G.M. Costa, E.O. Lima, V.S. Falcão-Silva, J.P.S. Júnior, Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L, *BMC Complement. Altern. Med.* 8 (2009) 9–13.
- [26] H.H. Taussky, A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction, *J. Biol. Chem.* 208 (1954) 853–861.
- [27] H.U. Bergmeyer (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Ninth ed., Publishers, Florida, 1985, pp. 435–449.
- [28] J.L. Orsonneau, P. Douet, C. Massoubre, P. Lustenberger, S. Bernard, An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein, *Clin. Chem.* 35 (1989) 2233–2236.
- [29] S.P. Wolff, Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides, *Methods Enzymol.* 233 (1994) 182–189.
- [30] A.V. Bassenden, D. Rodionov, K. Shi, A.M. Berghuis, Structural analysis of the tobramycin and gentamicin clinical resistance reveals limitations for next-generation aminoglycoside design, *ACS Chem. Biol.* 20 (2016) 1339–1346.
- [31] R. Thomsen, M.H. Christensen, MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking, *J. Med. Chem.* 49 (2006) 3315–3321.
- [32] Collaborative Computational, Project Number 4, The CCP4 suite: programs for crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 50 (1994) 760–763.
- [33] W. Delano, The PyMol Molecular Graphics System, 2002.
- [34] L. Adamová, L. Malinová, M. Wimmerová, New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy, *Microsc. Res. Tech.* 77 (2014) 841–849.
- [35] V.F. Santos, M.S. Costa, F.F. Campina, R.R. Rodrigues, A.L.E. Santos, F.M. Pereira, K.L.R. Batista, R.C. Silva, R.O. Pereira, B.A.M. Rocha, H.D.M. Coutinho, C.S. Teixeira, The galactose-binding lectin isolated from *Vatairea macrocarpa* seeds enhances the effect of antibiotics against *Staphylococcus aureus*-resistant strain, *Probiot. Antimicrob. Proteins* (2019), <https://doi.org/10.1007/s12602-019-9526-z>.
- [36] 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.* 273 (1998) 12082–12088.
- [37] F.B. Holecz, G.L. Pessini, N.R. Sanches, C.D.G. Aparício, C.V. Nakamura, B.P. Dias-Filho, Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases, *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz.* 97 (2002) 1027–1031.
- [38] O.D. Hendrickson, V.D. Nikitushkin, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev, Lectin-based detection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by flow cytometry, *Arch. Microbiol.* 201 (2019) 313–324.

- [39] P.S.F. Barbosa, A.M.C. Martins, M.H. Toyama, P.P. Joazeiro, L.O.S. Beriam, M.C. Fonteles, H.S.A. Monteiro, Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 16 (2010) 493–504.
- [40] S.H. Zinner, M.V. Golikova, E.N. Strukova, Y.A. Portnoy, A.A. Firsov, Predicting antibiotic combination effects on the selection of resistant *Staphylococcus aureus*: *In vitro* model studies with linezolid and gentamicin, *Int. J. Antimicrob. Agents* 52 (2018) 854–860.
- [41] I. Levin-Reisman, I. Ronin, O. Gefen, I. Braniss, N. Shores, N.Q. Balaban, Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance, *Science* 355 (2017) 826–830.
- [42] S. Gowda, P.B. Desai, S.S. Kulkarni, V.V. Hull, A.A. Math, S.N. Vernekar, Markers of renal function tests, *N. Am. J. Med.* 2 (2010) 170–173.
- [43] L. Cao, D. Zhi, J. Han, S. Kumar Sah, Y. Xie, Combinational effect of curcumin and metformin against gentamicin-induced nephrotoxicity: Involvement of antioxidative, anti-inflammatory and antiapoptotic pathway, *J. Food Biochem.* 43 (2019) e12836.
- [44] I. Karahan, A. Ateşşahin, S. Yılmaz, A.O. Ceribaşı, F. Sakin, Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats, *Toxicology* 215 (2005) 198–204.
- [45] P.D. Walker, Y. Barri, S.V. Shah, Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity, *Ren. Fail.* 21 (1999) 433–442.
- [46] B.H. Ali, M.A. Za'abi, G. Blunden, A. Nemmar, Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini-review of recent research, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109 (2011) 225–232.
- [47] Y. Quiros, L. Vicente-Vicente, A.I. Morales, J.M. López-Novoa, F.J. López-Hernández, An integrative overview on the mechanisms underlying the renal tubular cytotoxicity of gentamicin, *Toxicol. Sci.* 119 (2011) 245–256.
- [48] L.A. Peres, A.D. Cunha Jr., R.A. Assumpção, A. Schäfer Jr, A.L. Silva, A.D. Gaspar, D.F. Scarpari, J.B. Alves, R. Girelli Neto, T.F. Oliveira, Evaluation of the cisplatin nephrotoxicity using the urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in patients with head and neck cancer, *J. Bras. Nefrol.* 36 (2014) 280–288.
- [49] F.P. Freitas, M.L. Porto, C.P. Tranhago, R. Piontkowski, E.C. Miguel, T.B. Miguel, J. L. Martins, K.S. Nascimento, C.M. Balarini, B.S. Cavada, S.S. Meyrelles, E.C. Vasquez, A.L. Gava, *Dioclea violacea* lectin ameliorates oxidative stress and renal dysfunction in an experimental model of acute kidney injury, *Am. J. Transl. Res.* 7 (2015) 2573–2588.
- [50] F. Duarte, E.A. Pessoa, L.A. Reis, N. Schor, F.T. Borges, Priming prevent nephrotoxic acute renal failure through stimulation of antioxidant defense mechanism, *Brazil. J. Nephrol.* 38 (2016) 161–172.
- [51] E.A. Pessoa, M.B. Convento, O.S. Ribas, V.R. Tristão, L.A. Reis, F.T. Borges, N. Schor, Preconditioning induced by gentamicin protects against acute kidney injury: the role of prostaglandins but not nitric oxide, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 253 (2011) 1–6.
- [52] C. Guo, L. Sun, X. Chen, D. Zhang, Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases, *Neural Regen Res.* 8 (2013) 2003–2014.
- [53] R.E. Brummett, K.E. Fox, Aminoglycoside-induced hearing loss in humans, *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (1989) 797.
- [54] M.P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens, Aminoglycosides: nephrotoxicity, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 1003.
- [55] P.R. Daga, J. Duan, R.J. Doerksen, Computational model of hepatitis B virus DNA polymerase: molecular dynamics and docking to understand resistant mutations, *Protein Sci.* 19 (2010) 796–807.
- [56] B.A. Rocha, I.L. Barroso-Neto, C.S. Teixeira, M.Q. Santiago, A.F. Pires, L.A. Souza, K.S. Nascimento, A.H. Sampaio, P. Delatorre, A.M. Assreuy, B.S. Cavada, CRLI induces vascular smooth muscle relaxation and suggests a dual mechanism of eNOS activation by legume lectins via muscarinic receptors and shear stress, *Arch Biochem. Biophys.* 565 (2015) 32–39.
- [57] B.S. Cavada, M.T.L. Silva, V.J.S. Osterne, V.R. Pinto-Junior, A.P.M. Nascimento, I. A.V. Wolin, I.A. Heinrich, C.A.S. Nobre, C.G. Moreira, C.F. Lossio, C.R.C. Rocha, J.L. Martins, K.S. Nascimento, R.B. Leal, *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and antiglioma potential, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 369–378.
- [58] B.A. Rocha, C.S. Teixeira, J.C. Silva-Filho, R.B. Nóbrega, D.B. Alencar, K.S. Nascimento, V.N. Freire, C.J. Gottfried, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, S. Saker-Sampaio, B.S. Cavada, P. Delatorre, Structural basis of ConM binding with resveratrol, an anti-inflammatory and antioxidant polyphenol, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 1136–1142.