UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGÊNICOS

Bruno Rafael Barboza

**Efeito da lectina ArtinM em células B de origem murina e células de
linhagem humana de linfoma não-Hodgkin**

Ribeirão Preto
2020

Bruno Rafael Barboza

Efeito da lectina ArtinM em células B de origem murina e células de linhagem humana de linfoma não-Hodgkin

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Thiago Aparecido da Silva

Ribeirão Preto

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Barboza, Bruno Rafael

Efeito da lectina ArtinM em células B de origem murina e células de linhagem humana de linfoma não-Hodgkin.

Ribeirão Preto, 2020.

98 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Da Silva, Thiago Aparecido.

1. ArtinM. 2. Células B. 3. Imunomodulação. 4. Lectina. 5. Linfoma de Burkitt. 6. Reconhecimento de carboidrato.

Bruno Rafael Barboza

Efeito da lectina ArtinM em células B de origem murina e células de linhagem humana de linfoma não-Hodgkin

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Thiago Aparecido da Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedicado ao amor da minha vida, Meu Benjamin. Eu sei que em algum momento da vida você irá duvidar dos seus sonhos. Saiba que eu também duvidei e isso não é um sinal de fraqueza. Assim, quando você pensar em desistir, sonhe outra vez. E, se eu for motivo de alguma coisa na sua vida, que seja motivo para não desistir do que ama.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz,
e os seus planos serão bem-sucedidos”.

(Provérbios 16:3)

Trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Apoio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESPS (Processo 2019/05867-9)

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pelo maior presente de todos: o dom de viver e, digo como disse o Apóstolo Paulo na carta aos Romanos 11:36 “**Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém**”. Agradeço por seu imensurável e indefinível amor, por seu cuidado em todos os detalhes de minha vida (especialmente acadêmica) me cercando de pessoas maravilhosas, que me acompanham nessa fascinante jornada que é a ciência!*

Agradeço a mulher mais guerreira que já vi em todos os tempos, minha mãe. Uma mulher que não mediu esforços diante de uma vida de muitas dificuldades para me garantir por todos os dias um amor incondicional e a oportunidade de estudar. Afinal de contas “Quando você nasce pobre, ser estudioso é o maior ato de rebeldia contra o sistema”. Obrigado Dona Maria Lúcia, por tudo. Por não me permitir desistir até quando eu pensei ser o fim.

À minha 2ª mãe, Mainha Denise por me permitir a honra de ser seu filho e ser sempre uma importante referência na minha vida. Obrigado por me apoiar, torcer e rezar por mim.

A minha irmã, Bruna Barboza, por todo o apoio, amor e torcida. Eu amo você mais do que tudo.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Thiago Aparecido da Silva por sua dedicação e compromisso com a Ciência, além de sua acessibilidade e ensinamentos para realização deste trabalho. O “Senhor” é um exemplo a ser seguido não apenas como cientista, mas como ser humano. Agradeço por sua disponibilidade em me orientar e, por contribuir imensamente durante esses 2 anos de mestrado com minha formação acadêmica, obrigado.

À Profa. Dra. Maria Cristina Roque-Barreira, por seu amor, dedicação e admirável comprometimento com a ciência. Serei eternamente grato por sua contribuição na minha jornada acadêmica! Agradeço por me permitir integrar a equipe do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia.

À minha amiga Gabriela Yamazaki, por toda sua generosa e enriquecedora contribuição na minha trajetória dentro e fora da USP. Obrigado por me incentivar a sempre ir em frente e ter tornado os dias mais agradáveis. Obrigado pelas conversas, alegrias, lágrimas, discussões científicas e por me permitir fazer parte de sua vida. Obrigado.

À Sandra Thomaz (Sandrinha, Darling) por toda ajuda com as sugestões e discussões científicas e, acima de tudo, por sua amizade. Obrigado por todo suporte científico, e por todos os cafés entre os intervalos de purificação de ArtinM. Obrigado por cada puxão de orelha, por

cada palavra de encorajamento, por cada experiência compartilhada e por todas as risadas também.

À Patrícia (Pati), eu sou eternamente grato à Deus por sua vida! Muito obrigado por seus conselhos, por seus ensinamentos e principalmente por sua amizade. Você é uma referência para minha vida. Obrigado por me conceder sua amizade.

A todos os GlycoFriends, em especial aos Doutores Rafael, Relber, Nayla e Flávia, e as irmãs Érica e Patrícia Vendrusculo, por todo carinho, disposição, e auxílio para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por me receberem com tanto carinho e tornarem meus dias em Ribeirão Preto mais felizes. Vocês são muito especiais para mim, já sinto muitas saudades!

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, em especial à Gabriela Zamoner e aos amigos pós-graduandos da Biocel.

Aos meus melhores amigos, Guilherme (Guiga Barbieri) e Abdênego (Ab) por toda cumplicidade, pelas ajudas, pelas discussões científicas (que foram muitas), por todas as lágrimas compartilhadas, mas também por todos os sorrisos. Obrigado por estarem comigo até quando os dias se apresentaram mais difíceis, me mostrando que sou capaz de ir além do que imagino. Sou grato por ter vocês como irmãos.

À Lays Trajano (melhor presente deste mestrado), por ser minha amiga e me e me ensinar a ser resiliente durante as dificuldades da vida acadêmica e pessoal. Por me apoiar e me permitir desfrutar da sua companhia e de motivos únicos de sua vida. Obrigado minha linda.

Ao amigo que a vida me apresentou em Ribeirão Preto durante a realização deste mestrado, Lucas David. Obrigado por tudo amigo! Serei eternamente grato por sua amizade, pelos rolês em Ribeirão e por me permitir fazer parte do seu ciclo de amigos.

Aos amigos João Uliana, Airton Di Carvalho, Cristina Costa, Gabriel Viliod, Marina Peruzzolo, Gabi e Lays que fizeram parte da comissão organizadora do CV Biocel/2020, incluindo Paulo Henrique e Cleber Jr. Obrigado por tornarem meus dias mais fáceis e felizes durante o mestrado. Por me suportarem todos os dias! Não é uma tarefa fácil, mas o apoio de vocês significa muito pra mim. Amo vocês! Aos alunos que vieram de diversos lugares do Brasil para o CV, obrigado pelos momentos divididos.

Aos amigos de Ribeirão Preto, Matheus Henrique, Kevin Castrillon, Leonardo Nascimento, Lucas Victor, minha família fora de casa. Obrigado pela amizade, conversas e muitos rolês. Obrigado!

Agradeço com muito carinho a Profa. Dra. Cristiane Moutinho, por me apresentar o Universo brilhante da Ciência. Obrigado pelos ensinamentos e por ser uma inspiração pra minha vida. Serei eternamente grato por tudo! #TeamLaia.

À Universidade de São Paulo, juntamente com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e ao Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, pela infraestrutura e oportunidade de me tornar mestre.

Aos meus queridos amigos que embora não tenham contribuído diretamente com este trabalho, são essenciais durante minha jornada acadêmica: Anita Lima, Raldney (Ral), Áquila Alcantara, Leyde Patriotta, Jéssica Brito, Alef Diogo, Rennato Silva (Natinho), Dra. Ana Rosa, Vinicius Pereira e Karen Ferreira. Obrigado por tudo! Pelas muitas orações, ajudas e amizade.

Aos examinadores do trabalho, por favorecerem o aperfeiçoamento dessa dissertação.

Aos órgãos de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, que possibilitaram o suporte financeiro para realização deste trabalho.

Por fim, à todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Nós dois sabemos dos momentos que passei. De cada bênção e das lutas que enfrentei. Estás comigo, e eu confio que vais estar. Eu confio, vejo meu passado e confio. Olho pro futuro e posso caminhar. Estás guiando meus passos”.

(Nova Voz)

RESUMO

BARBOZA, B. R. **Efeito da lectina ArtinM em células B de origem murina e células de linhagem humana de linfoma não-Hodgkin.** 2020. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A lectina ArtinM, obtida a partir do extrato salino de sementes de *Artocarpus heterophyllus* (jaca), é caracterizada estruturalmente como um homotetrâmero de subunidades de 16 kDa, cada uma delas constituída por um CRD com sítio de ligação primária para Man α 1–3[Man α 1–6]Man β 1–4, estrutura presente no core de *N*-glicanas. ArtinM induz a ativação de mastócitos (via interação com Fc ϵ RI), neutrófilos (via interação com CXCR2/TLR2), macrófagos (via interação com TLR2/CD14), e a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (via interação com a cadeia *gamma* de CD3). A atividade imunomoduladora de ArtinM sobre essas células resulta em um perfil pró-inflamatório com a capacidade de combater infecções por patógenos intracelulares. Recentemente, células B murinas foram incluídas como alvos de ArtinM que induziu a produção de IL-17 e IL-12p40 nesse tipo celular, de maneira independente do reconhecimento de TLR2/CD14. Com isso, o presente estudo buscou caracterizar os efeitos da lectina ArtinM sobre células B de origem murina e linhagens celulares humanas de linfoma não-Hodgkin, ressaltando os mecanismos moleculares induzidos após o reconhecimento de carboidratos. Inicialmente, células B murinas purificadas de camundongos C57Bl/6 foram incubadas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 5,0 μ g/mL), e a lectina não induziu a proliferação celular e baixos níveis de IL-2, IFN- γ e IL-12 foram produzidos pelas células B. No entanto, as concentrações da lectina testadas, com destaque para as altas concentrações, induziram a apoptose de células B murinas. Portanto, ArtinM não apresenta um efeito imunomodulador em células B que direciona uma resposta imune associada ao perfil Th1. Por conseguinte, o efeito citotóxico da lectina sobre células B originadas de linfoma não-Hodgkin foi avaliado, a partir das linhagens celulares Raji e Daudi. Ao explorar o efeito de ArtinM nessas linhagens celulares, observamos a capacidade de ArtinM em reduzir o crescimento e a viabilidade celular com intensidade diferente para cada tipo celular, com efeito citotóxico mais pronunciado nas células Raji. Assim, ao aprofundar a avaliação do efeito citotóxico de ArtinM em células Raji, verificamos a ausência da fragmentação de DNA e um contundente indicativo da exclusão da cascata de apoptose via mitocondrial e moléculas sinalizadoras da via de autofagia. Com isso, possíveis moléculas de sinalizadoras envolvidas no efeito citotóxico de ArtinM sobre células de linfoma não-Hodgkin foi investigado com o uso de inibidores farmacológicos específicos para PKC, PTK, atividade fosfatase de CD45 sobre Lck, e quinases

da família Src. Essa abordagem implicou que a indução da apoptose por ArtinM em células Raji está relacionada com os seguintes mecanismos moleculares, como: (i) PTK e PKC regulam negativamente a indução da apoptose em células Raji por ArtinM; (ii) a atividade de fosfatase de CD45 sobre Lck regula negativamente o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji; (iii) quinases da família Src regulam de forma positiva a indução da apoptose de células Raji por ArtinM. Portanto, ArtinM apresenta um efeito citotóxico em linhagens de células B de linfoma não-Hodgkin. O presente trabalho demonstra as limitações do efeito imunomodulador de ArtinM em células B murinas, e cria uma importante área investigativa no campo terapêutico frente a células de linfoma não-Hodgkin através do reconhecimento de carboidratos.

Palavras-chave: ArtinM; células B; imunomodulação; lectina; linfoma de Burkitt; reconhecimento de carboidrato;

ABSTRACT

BARBOZA, B. R. **Effect of ArtinM in murine B cells and human cell lines derived from non-Hodgkin lymphoma**. 2020. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The ArtinM lectin, obtained from the saline extract of seeds of *Artocarpus heterophyllus* (jackfruit), is structurally characterized as a homotetramer of 16 kDa subunits, each consisting of a CRD with primary binding site for Man α 1–3[Man α 1–6]Man β 1–4, structure present in the *N*-glycans core. ArtinM induces mast cell activation (via interaction with Fc ϵ RI), neutrophils (via interaction with CXCR2/TLR2), macrophages (via interaction with TLR2/CD14), and activation of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells (via interaction with the *gamma* chain of CD3). The immunomodulatory activity of ArtinM on these cells results in a pro-inflammatory profile with the ability to combat infections by intracellular pathogens. Recently, murine B cells were included as targets of ArtinM that induced the production of IL-17 and IL-12p40 in that cell type, independently manner of TLR2/CD14 recognition. Thus, the present study sought to characterize the effects of ArtinM in murine B cells and human non-Hodgkin lymphoma cell lines, highlighting the molecular mechanisms induced after carbohydrate recognition. Initially, murine B cells purified from C57BL/6 mice were incubated with different concentrations of ArtinM (0.312 – 5.0 μ g/mL), and lectin did not induce cell proliferation and low levels of IL-2, IFN- γ and IL-12 were produced by B cells. However, the lectin concentrations tested, with emphasis on high concentrations, induced apoptosis of murine B cells. Therefore, ArtinM does not have an immunomodulatory effect on B cells that directs an immune response associated with the Th1 profile. Therefore, the cytotoxic effect of lectin on B cells originating from non-Hodgkin's lymphoma was evaluated, from the cell lines Raji and Daudi. When exploring the effect of ArtinM on these cell lines, we observed the ability of ArtinM to reduce cell growth and viability with different intensity for each cell type, with a more pronounced cytotoxic effect on Raji cells. Thus, when deepening the evaluation of the cytotoxic effect of ArtinM in Raji cells, we verified the absence of DNA fragmentation and a strong indication of the exclusion of the apoptosis cascade via mitochondrial and signaling molecules of the autophagy pathway. Thus, possible signaling molecules involved in the cytotoxic effect of ArtinM in non-Hodgkin's lymphoma cells were investigated with the use of specific pharmacological inhibitors for PKC, PTK, CD45 phosphatase activity in Lck, and kinases of Src family. This approach implied that the induction of apoptosis by ArtinM in Raji cells is related to the following molecular mechanisms, such as: (i) PTK and PKC down-regulate the induction of apoptosis in Raji cells by ArtinM; (ii) the phosphatase activity of CD45

in Lck down-regulate the cytotoxic effect of ArtinM in Raji cells; (iii) Src kinases regulate positively the induction of Raji cell apoptosis by ArtinM. Therefore, ArtinM has a cytotoxic effect in non-Hodgkin's lymphoma B cell lines. The present work demonstrates the limitations of the immunomodulatory effect of ArtinM in murine B cells, and creates an important investigative area in the therapeutic field against non-Hodgkin's lymphoma cells through the recognition of carbohydrates.

Keywords: ArtinM; B cells; immunomodulation; Burkitt's lymphoma; cell death; carbohydrate recognition;

SUMÁRIO

Resumo.....	x
Abstract.....	xiii
Introdução.....	18
1. Lectinas: Da descoberta às Aplicações Biotecnológicas	19
2. Fronteira do conhecimento sobre a atividade imunomodulatória da lectina ArtinM 22	
3. Aspectos gerais da Biossíntese de N- e O-glicosilação	24
4. A importância da glicosilação na Linfopoiese de células B	25
5. Relevância funcional de glicanas em subpopulações de células B.....	27
6. O Papel do reconhecimento de glicanas associadas a receptores expressos em células B 29	
7. Células B dos Centros Germinativos relacionadas com a Linfomagenese.....	33
Objetivos	36
1. Objetivo geral.....	37
2. Objetivos específicos	37
Materiais e Métodos.....	38
1. Animais	39
2. Purificação da lectina ArtinM.....	39
3. Purificação de células B esplênicas de camundongos C57BL/6	39
4. Linhagens celulares de Linfoma de Burkitt.....	40
5. Ligação de ArtinM na superfície de células Raji e Daudi	40
6. Determinação da atividade mitocondrial	41
7. Ensaio de proliferação celular.....	41
8. Mensuração dos níveis da citocina IL-2	41
9. Marcação intracelular das citocinas IL-12 e IFN- γ	42
10. Detecção da frequência de células positivas para Anexina-V e/ou Iodeto de propídio (PI)	42
11. Ensaio de fragmentação do DNA	43

12. Quantificação dos marcadores de apoptose associados a via mitocondrial e relacionados a autofagia por qRT-PCR.....	43
13. Análise estatística.....	44
Resultados	45
1. Capítulo 1	46
1.1 ArtinM induz um aumento da atividade mitocondrial de células B com ausência da indução da proliferação celular	47
1.2 Células B estimuladas com ArtinM são induzidas a apoptose	49
1.3 ArtinM não induz a produção de IL-12 e IFN- γ por células B murinas.....	50
2. Capítulo II	52
2.1 ArtinM interage com a superfície celular de Raji e Daudi via domínio de reconhecimento de carboidrato.....	53
2.2 ArtinM induz um aumento na frequência de células Raji duplo-positivas para anexina-V e PI	56
2.3 ArtinM não induz a fragmentação do DNA de células Raji e Daudi	57
2.4 ArtinM não induz em células Raji o aumento da expressão relativa de marcadores moleculares associados a autofagia.....	58
2.5 Efeito da inibição de moléculas da sinalização celular no efeito citotóxico de ArtinM sobre as células Raji e Daudi.....	60
2.6 Inibição da atividade de fosfatase de CD45 sobre Lck intensifica o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji.....	64
2.7 Quinases da família Src estão envolvidas no efeito citotóxico de ArtinM em células Raji	66
2.8 Quinases da família Src e a regulação de Lck ativa atuam de forma antagonica no efeito citotóxico de ArtinM em células Raji	68
Discussão	70
Conclusão	81
Referências Bibliográficas	83

INTRODUÇÃO

1. Lectinas: Da descoberta às Aplicações Biotecnológicas

Os primeiros estudos envolvendo as proteínas atualmente descritas como lectinas, foram conduzidos por Peter Hermann Stillmark, no final do século XIX. Na sua tese de Doutorado, apresentada em 1888, Stillmark descreveu a capacidade do extrato vegetal das sementes da mamona (*Ricinus communis*) em promover aglutinação de eritrócitos e, por conseguinte, atribuiu esse efeito a uma proteína altamente tóxica denominada Ricina (MICHAEL LORD; SPOONER, 2011; SOWA-ROGOZIŃSKA *et al.*, 2019). Com a descoberta da Ricina, outras proteínas com a habilidade de aglutinar eritrócitos foram descritas, levando à introdução do termo “aglutinina” por Elfstrand, em 1898, para descrever esse grupo de proteínas (VAN DAMME, 2014). Em 1907, Landsteiner e Raubitscheck descreveram que a atividade hemaglutinante de extratos obtidos de diferentes sementes de leguminosas diferiam quando testados com eritrócitos de diferentes animais, fornecendo assim, as primeiras evidências na especificidade da atividade de aglutininas vegetais (SINGH; SARATHI, 2012).

Mais tarde, em 1919, James Sumner obteve a primeira aglutinina isolada na sua forma cristalina, a Concanavalina A (ConA), purificada do extrato salino das sementes de *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco). No ano de 1936, Sumner e Stacey Howell demonstraram que a atividade aglutinante da ConA era inibida pelo açúcar da cana (sacarose), sendo esse, o estudo pioneiro descrevendo a predileção de lectinas por um determinado carboidrato (SHARON; LIS, 2004; SUMNER; HOWELL, 1936). No entanto, a relação entre o efeito hemaglutinante e o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de eritrócitos por aglutininas foi demonstrado, pela primeira vez, apenas em 1952 por Morgan e Watkins (VAN DAMME, 2014).

Os estudos sobre aglutininas de plantas forneceram evidências de que o efeito hemaglutinante em eritrócitos humanos era dependente do tipo de grupo sanguíneo, fato que levou a utilização do termo lectina (proveniente do latim “*legere*”, que significa: escolher, selecionar) por Body e Shapleigh, em 1954, para descrever que lectinas exibem predileção distinta por carboidratos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). No início da década de 1960, a demonstração do efeito mitogênico da lectina Fitohemaglutinina (PHA) em estimular a proliferação de linfócitos humanos colocou a pesquisa com lectinas em destaque, dando início a uma nova era na investigação do efeito biológico de lectinas. Desde então, o potencial mitogênico têm sido reportado para lectinas com distintas especificidades, como a ConA (SHARON; LIS, 2004), Jacalina (*Artocarpus heterophyllus*) (PINEAU *et al.*, 1990), Cramoll-1,4 (*Cratylia mollis*) (DE MELO *et al.*, 2011), ApuL (*Alpinia purpurata*) (DE SANTANA

BRITO *et al.*, 2017), entre outras (CARVALHO *et al.*, 2018a), destacando a relevância funcional do reconhecimento de carboidrato e outras atividades biológicas das lectinas além da hemaglutinação celular.

Historicamente, as lectinas foram primeiramente identificadas e isoladas a partir de plantas, especificamente, sementes de leguminosas (GORAKSHAKAR; GHOSH, 2016). No entanto, os estudos sobre lectinas constataram sua ampla distribuição na natureza (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2012), sendo encontradas em plantas (CAVADA *et al.*, 2019a; DE SANTANA BRITO *et al.*, 2017; DE SIQUEIRA PATRIOTA *et al.*, 2017), mamíferos (BORNHÖFFT *et al.*, 2018; CATT; PEACOCK; HARRISON, 1985; GIOVANNONE *et al.*, 2018b) e microrganismos (MENDONÇA-NATIVIDADE *et al.*, 2019; RICCI-AZEVEDO *et al.*, 2018; WILHELM *et al.*, 2019). Na década de 1970, o aprimoramento nos protocolos de purificação e a introdução de tecnologias de DNA recombinante intensificaram a pesquisa com lectinas e mudou o foco dos estudos para a caracterização molecular, determinação das sequências de aminoácidos, elucidação da estrutura tridimensional e efeito biológico de lectinas (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Sendo a ConA, a primeira lectina a ter sua sequência primária e estrutura tridimensional completamente determinadas (EDELMAN *et al.*, 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1972).

Desde a descoberta da primeira lectina de planta, inúmeras definições foram propostas para descrever essas proteínas e seus efeitos biológicos, com destaque na década de 1980 que testemunhou consideráveis debates relacionados à definição de lectinas (BARONDES, 1988; DIXON, 1981; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; KOCOUREK; HOREJSI, 1983). Atualmente, a definição adotada foi proposta por Peumans e Van Damme, em 1995, que definiram lectinas como um grupo heterogêneo de proteínas com a capacidade de reconhecer de maneira específica, reversível e não-covalente mono ou oligossacarídeos, através de um domínio não catalítico, denominado domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Na lectinologia moderna, o número de CRDs e sua homologia de especificidade constituem a base para classificação das lectinas de plantas (THAKUR *et al.*, 2019; VAN DAMME, 2014). Cada CRD é caracterizado por sua própria sequência de aminoácidos, segmentos protéicos com dobramento independente e a estrutura do sítio de ligação à carboidrato. A clusterização induzida pelo reconhecimento de carboidrato via CRDs é usualmente requerido nos efeitos biológicos desencadeados pelas lectinas (TAYLOR *et al.*, 2015).

Os estudos sobre lectinas constataram que a capacidade de ligação a carboidratos específicos dessas proteínas viabilizam diversas atividades biológicas, fato que as tornaram importantes ferramentas biotecnológicas em diferentes campos investigativos (HOLANDA *et al.*, 2012), como: aplicações como agentes antimicrobianos (COELHO *et al.*, 2018), inseticidas (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017), antitumorais (PROCÓPIO *et al.*, 2017) e antivirais (MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017). Mais recentemente, os atuais avanços da Nanobiotecnologia possibilitaram a conjugação de lectinas com nanocristais semicondutores fluorescentes, conhecidos como pontos quânticos (PQs), permitindo o emprego de lectinas como nanosondas fluorescentes (YILMAZ; BECER, 2015) para caracterizar o perfil de glicanas em tecidos tumorais (CARVALHO *et al.*, 2019) e microorganismos patogênicos (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Dentre as aplicações biotecnológicas descritas para lectinas, a atividade biológica de destaque destas moléculas refere-se à capacidade de desencadear em células da imunidade a transdução de sinal que pode resultar na ativação celular, migração celular e/ou uma produção de citocinas envolvidas na resposta imunitária efetora (CARVALHO *et al.*, 2018b; VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008; VAN DAMME *et al.*, 1998).

A atividade lectínica sobre células da imunidade apresenta extrema relevância devido, basicamente, a dois fatores: (i) receptores de reconhecimento padrão (PRR), majoritariamente encontrados em células da imunidade inata, possuem diferentes glicanas ligadas a cadeia polipeptídica; (ii) receptores de superfície exclusivos de células da imunidade adaptativa, em sua maioria, também são glicosilados (MARIANO *et al.*, 2014a; WOLFERT; BOONS, 2013). Nesse sentido, importantes mediadores de ativação das células da imunidade são potenciais alvos de reconhecimento pelas lectinas, fato que desencadeia efeitos biológicos relacionada a imunomodulação do hospedeiro (CARVALHO *et al.*, 2018b; JANDÚ *et al.*, 2017; RABINOVICH; CROCI, 2012; SOUZA *et al.*, 2013). Em geral, nosso grupo tem concentrado seus estudos na extensiva investigação do potencial imunomodulador de diferentes lectinas. Assim, para exemplificar o efeito imunomodulatório promovido por lectinas, tomando como base sua capacidade de ativar células da imunidade inata e/ou adaptativa, os efeitos das lectinas galectina-3 e paracoccina, estão delineados a seguir:

(a) A galectina-3 (Gal-3) é uma lectina amplamente expressa em células animais, ligante de β -galactosídeo. Em geral, tem sido sugerido que a Gal-3 atua como um mediador crítico na regulação de vários processos biológicos, incluindo a modulação das respostas imunitárias inatas e adaptativas (SCIACCHITANO *et al.*, 2018). Durante um processo infeccioso, a Gal-3

pode promover uma atividade pró-inflamatória, induzir o recrutamento e aumento da sobrevivência de macrófagos, produzir citocinas e regular a maturação, diferenciação e ativação de células B e T (ALMEIDA *et al.*, 2017; VASTA, 2009). Em macrófagos, a Gal-3 pode reconhecer glicanas presentes na superfície de espécies fúngicas patogênicas, como *C. albicans*, por meio de um mecanismo cooperativo envolvendo receptor Toll-like 2 (TLR2) (JOUAULT *et al.*, 2006). Além disso, a Gal-3 pode atuar como um ligante autócrino para TLR4 e induzir a ativação celular mediada pelo TLR4 (DÍAZ-ALVAREZ; ORTEGA, 2017).

(b) A paracoccina (PCN), uma proteína que apresenta múltiplos domínios, sendo um domínio lectínico de ligação para N-acetil-D-glucosamina e um domínio enzimático, com atividade N-acetilglucosamidase, é obtida do extrato de leveduras de *Paracoccidioides brasiliensis*. A PCN é capaz de induzir um perfil pró-inflamatório em células da imunidade inata (ALMEIDA *et al.*, 2010; COLTRI *et al.*, 2006; GANIKO *et al.*, 2007). A forma recombinante de paracoccina foi expressa em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*, e os resultados demonstraram que a administração profilática ou terapêutica da paracoccina, confere um efeito imunomodulador protetor contra a paracoccidioidomicose experimental (ALEGRE-MALLER *et al.*, 2014; ALEGRE *et al.*, 2014). A resposta imunitária efetora de perfil Th1 induzida pela PCN é decorrente de sua interação com glicanas ancoradas a receptores TLR2 e/ou TLR4 (ALEGRE-MALLER *et al.*, 2014; ALEGRE *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2016).

2. Fronteira do conhecimento sobre a atividade imunomodulatória da lectina ArtinM

Dentre as lectinas alvo de estudos do nosso grupo, está a ArtinM, obtida a partir do extrato salino de sementes de *Artocarpus heterophyllus*. A lectina ArtinM se organiza estruturalmente como um homotetrâmero formado de subunidades não glicosiladas com massa molecular de 16 kDa, cada uma delas constituídas por um CRD com sítio primário de ligação para Man α 1–3[Man α 1–6]Man β 1–4, enquanto um sítio secundário se liga a Fuc α 1–6 ou GlcNAc α 1–2 associado a Man α 1–3[Man α 1–6]Man β 1–4, estruturas presentes no core de N-glicanas (DA SILVA *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2015; SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994). Ao longo dos anos, o potencial imunomodulador de ArtinM sobre células da imunidade inata e adaptativa têm sido extensivamente explorado pelo nosso grupo (DA SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA BRITO *et al.*, 2017a; SOUZA *et al.*, 2013).

Os estudos têm demonstrado que ArtinM é capaz de ativar mastócitos, induzindo a desgranulação e secreção dos mediadores β -hexosaminidase e Leucotrieno B₄ (LTB₄), efeitos decorrentes da interação com *N*-glicanas associadas ao receptor de alta afinidade para IgE (Fc ϵ RI) (BARBOSA-LORENZI *et al.*, 2011) ou *N*-glicanas de Fc ϵ R ligado a IgE (MORENO *et al.*, 2003). Em similaridade a forma nativa, a lectina recombinante (rArtinM) induz a ativação e desgranulação de mastócitos e induzir a secreção das citocinas IL-4 e TNF- α (BARBOSA-LORENZI *et al.*, 2016). Recentemente, Buranello *et al.* demonstraram a capacidade de ArtinM em induzir a proliferação de mastócitos e a produção de IL-6, levando a ativação do fator de transcrição NF-kappa B (NF κ B) (BURANELLO *et al.*, 2020). Em neutrófilos, ArtinM é capaz de induzir a migração e ativação celular por meio da interação com *N*-glicanas associadas ao receptor do tipo Toll-like 2 (TLR2) e o receptor de quimiocina CXC tipo 2 (CXCR2), promovendo desgranulação, liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-8, e espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando a habilidade fagocitária e de morte de neutrófilos contra patógenos intracelulares como *Leishmania major* (PEREIRA-DASILVA *et al.*, 2006; RICCI-AZEVEDO *et al.*, 2016; TOLEDO *et al.*, 2009) e *Paracoccidioides brasiliensis* (RUAS *et al.*, 2018).

Em células apresentadoras de antígenos (APCs), a lectina ArtinM possui *N*-glicanas de TLR2 e CD14 como alvos de reconhecimento e mediadores da ativação celular (DASILVA *et al.*, 2017a). Como resultado, constatou-se que ArtinM induz a polarização de macrófagos para o perfil M1, caracterizado pela produção de diversos mediadores pró-inflamatórios. Dessa forma, os produtos oriundos do efeito de ArtinM sobre APCs favorecem a ativação e diferenciação de linfócitos para um perfil Th1, fato que favorece o direcionamento de uma resposta imunitária protetora contra infecções causadas por patógenos intracelulares (LIU *et al.*, 2015; PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001). Em estudos prévios, constatou-se que a administração profilática e/ou terapêutica de ArtinM em modelo experimental foi capaz de modular a resposta imunitária do hospedeiro de forma a conferir proteção contra *Paracoccidioides brasiliensis* (COLTRI *et al.*, 2010), *Leishmania amazonenses* (TEIXEIRA *et al.*, 2006), *Leishmania major* (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001), *Neospora caninum* (CARDOSO *et al.*, 2011) e *Candida albicans* (CUSTODIO *et al.*, 2011).

Vale ressaltar que o potencial imunomodulador desencadeado por ArtinM também está associado ao seu efeito sobre células da imunidade adaptativa. Inicialmente, verificou-se que ArtinM induz a ativação de células esplênicas murinas devido aos altos níveis da atividade mitocondrial, proliferação celular e produção de IL-2 (DASILVA *et al.*, 2014).

Por conseguinte, estudos com células T CD4⁺ e T CD8⁺ murinas purificadas evidenciou a habilidade de ArtinM em induzir a ativação dessas populações celulares, via reconhecimento de *N*-glicanas na cadeia *gamma* do receptor CD3 (DA SILVA *et al.*, 2017b). Além disso, constatou-se que o efeito de ArtinM sobre as células T CD4⁺ induz a produção de IL-17, fato que favorece a montagem da resposta imunitária de perfil Th17 (DA SILVA *et al.*, 2016). Dando continuidade aos estudos envolvendo o efeito de ArtinM sobre células da imunidade adaptativa, nosso grupo relatou recentemente que ArtinM é capaz de ativar células B murinas, promovendo a produção das citocinas IL-17 e IL-12p40, de maneira independente do reconhecimento de TLR2/CD14. Devemos relatar que esse estudo é pioneiro na descrição da produção de IL-17 por células B através da estimulação via reconhecimento de carboidratos (OLIVEIRA-BRITO; ROQUE-BARREIRA; DA SILVA, 2018a). Portanto, essa linha investigativa envolvendo a interação direta de lectinas com células B é extremamente promissora, como demonstrado previamente pelo nosso grupo com a lectina ArtinM.

3. Aspectos gerais da Biossíntese de N- e O-glicosilação

A glicosilação é uma das modificações co- e/ou pós-traducionais mais relevantes e complexas na biologia da célula (MAZOLA; CHINEA; MUSACCHIO, 2011). Esse processo é caracterizado pela adição de glicanas (monossacarídeos e oligossacarídeos também referidos como açúcares) em estruturas glicosiladas como lipídeos e proteínas, originando glicoconjugados (PINHO; REIS, 2015). O processo de glicosilação ocorre no retículo endoplasmático (RE) e no aparelho de Golgi por meio da ação catalítica de glicosiltransferases e glicosidases (REILY *et al.*, 2019). As glicanas ligadas a moléculas distintas garantem as características estruturais de forma adequada, e os açúcares localizados nos glicoconjugados (glicoproteínas e glicolipídeos) estão envolvidos em uma ampla gama de atividades biológicas, com destaque para adesão celular (GU; TANIGUCHI, 2008), sinalização celular (ZHAO *et al.*, 2008), ativação celular (GIOVANNONE *et al.*, 2018a), modulação de respostas imunitárias (BAUM; COBB, 2017), morte celular (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013), e iniciação da progressão tumoral e metástases (TANIGUCHI; KIZUKA, 2015).

N- e *O*-glicanas são as principais classes de glicosilação estudadas e comumente encontradas nos glicoconjugados expressos em células de mamíferos (STOLFA *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2017). *N*-glicanas constituem a combinação covalente de oligossacarídeos à resíduos de Asparagina (Asn), que está localizada na cadeia polipeptídica consensual Asn-X-Serina (Ser)/Treonina (Thr) and "X" representa qualquer aminoácido exceto Prolina (Pro)

(CHUGH *et al.*, 2015). Por outro lado, a *O*-glicosilação tem início com a adição de um resíduo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) em resíduos de Ser/Thr presentes na estrutura da proteína (GUPTA *et al.*, 2020a). Uma vez que as glicanas estão ligadas a um resíduo de aminoácido específico, a *N*- e *O*-glicosilação têm uma intensa contribuição de glicosiltransferases e glicosidase (BIEBERICH, 2014; NAGAE *et al.*, 2020).

Nos eucarióticos, *N*-glicanas exibem uma sequência central comum (core) composta por três resíduos de manose (Man) e dois resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) contendo a seguinte abreviação padrão: Man α 1-3[Man α 1-6]Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr. Além disso, *N*-glicanas são classificadas em três tipos, oligomanose ou tipo *high-mannose* (apenas resíduos de Man estendem o core), tipo complexo (ramificações iniciadas por GlcNAc estendem o core) e tipo híbrido (Man e um ou dois resíduos de GlcNAc estendem o braço Man α 1-6 e Man α 1-3 montando o core, respectivamente) (VARKI *et al.*, 2017; ZABCZYŃSKA; KOZŁOWSKA; POCHÉĆ, 2018). Por outro lado, a *O*-glicosilação não tem um padrão na estrutura central comum (core) e quatro estruturas centrais principais estão bem estabelecidas em *O*-glicanas, sendo estes: core 1 (adição de β 1-3Gal), core 2 (adição de β 1-6GlcNAc para o resíduo de GalNAc presente no core 1), core 3 (adição de β 1-3GlcNAc) e core 4 (ramificações pela adição de β 1-6GlcNAc) (REILY *et al.*, 2019; VARKI *et al.*, 2017). Além disso, vários monossacarídeos como GlcNAc, galactose (Gal), fucose (Fuc) e ácido siálico (Sia) são encontrados no alongamento do core de *O*-glicana (GUPTA *et al.*, 2020b; TRAN; TEN HAGEN, 2013).

4. A importância da glicosilação na Linfopoiese de células B

Células B, também conhecidas como linfócitos B, são originadas a partir de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) no fígado durante a vida fetal e na medula óssea na fase adulta. A diferenciação de CTHs em células B maduras pode ser dividida em diferentes estágios, com base nas características fenotípicas e propriedades funcionais que as células da linhagem B adquirem, de forma progressiva, durante esse processo de desenvolvimento, conhecido como linfopoiese de células B (AZIZ *et al.*, 2015; CARSETTI, 2000; TOBÓN; IZQUIERDO; CAÑAS, 2013). O processo de diferenciação de células imunológicas é acompanhado de significativas mudanças na glicosilação. Na ontogenia de células T, *N*-glicanas ramificadas associadas a glicoproteínas da superfície celular, tais como β -1,6-N-acetilglucosamina, tri- e tetra-antenadas, e β -galactosídeos são necessários para seleção positiva e geração de células T CD4⁺ e CD8⁺ (LIU *et al.*, 2008, 2009; ZHOU *et al.*, 2014). Em células B, resíduos de β -

galactosídeo ancorados no pré-receptor de célula B (pré-BCR) são essenciais para a clusterização e ativação do pré-BCR, promovendo a proliferação e diferenciação celular (ELANTAK *et al.*, 2012). A fucosilação do core de *N*-glicanas no pré-BCR é necessária na montagem e na sinalização intracelular (LI *et al.*, 2012). Além disso, resíduos de ácidos siálicos são necessários durante o desenvolvimento e ativação das células B, regulando negativamente a ativação da via de sinalização do receptor de antígeno de célula B (BCR) (CARIAPPA *et al.*, 2009; CLARK; GILTIAY, 2018; GHOSH; BANDULET; NITSCHKE, 2006; MEYER *et al.*, 2018).

Durante a linfopoiese, um importante evento é a expressão do receptor da interleucina 7 (IL-7) em progenitores linfóides comuns (PLCs) (BOLLER; GROSSCHEDL, 2014). A sinalização via IL-7R não garante apenas o comprometimento de PLCs com o próximo estágio de desenvolvimento, mas contribui para a sobrevivência e proliferação celular (MCELROY *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2017). O IL-7R consiste em uma subunidade alfa (IL-7R α) que é altamente glicosilada e exibe seis potenciais sítios de *N*-glicanas (Asn²¹, Asn²⁹, Asn⁴⁵, Asn¹³¹, Asn¹⁶² and Asn²¹²). Funcionalmente, as *N*-glicanas associadas a IL-7R α atuam na ligação de IL-7 e modulam suas propriedades funcionais (MCELROY; DOHM; WALSH, 2009; WALSH, 2010). O complexo IL-7/IL-7R evita que o desenvolvimento de células B seja interrompido. Na ausência de IL-7, o comprometimento de PLCs com o desenvolvimento de células B é gravemente interrompido, sugerindo que a IL-7 é crítica para o desenvolvimento da linhagem linfóide B (TSAPOGAS *et al.*, 2011) e bloqueia o surgimento de leucemias e linfomas (WALSH, 2012). A expressão da proteína Ly6d marca a subdivisão dos PLCs em duas populações diferentes: (i) **Ly6d⁻**, conhecido como progenitores linfóides totais, que mantem o potencial linfóide completo pelo desenvolvimento de células B, células T, células natural killer e células dendríticas; (ii) **Ly6d⁺**, denominados progenitores linfóides polarizados de células B que se comprometem, essencialmente, por meio do progenitor pre-pro-B com o desenvolvimento da linhagem de células B (INLAY *et al.*, 2009; REVILLA-I-DOMINGO *et al.*, 2012).

O comprometimento das células pre-pro-B é controlado por diferentes fatores de transcrição, com destaque para E2A (helix-loop-helix protein E2A), Ebf1 (early B-cell factor Ebf1) e Pax-5 (paired-box protein-5). E2A e Ebf1 atuam especificando a linhagem de células B regulando a expressão e ativação de genes essenciais para linhagem B (GIAMPAOLO *et al.*, 2019; MCMANUS *et al.*, 2011). Pax5, um fator de transcrição expresso exclusivamente na linha de células B, controla o comprometimento dessas células na transição para o estágio de

células pró-B, reprimindo genes inadequados para linhagem B e ativando simultaneamente genes específicos de células B (MCMANUS *et al.*, 2011; MEDVEDOVIC *et al.*, 2011). Nesse estágio de diferenciação, células pre-pro-B não expressam marcadores canônicos de células B, como CD19, e são fenotipicamente caracterizadas pela alta expressão de B220⁺, uma isoforma do receptor CD45, que atua regulando a sinalização do receptor de células B (HARDY; KINCADE; DORSHKIND, 2007).

O CD45 é uma das glicoproteínas de superfície celular mais abundantes e existe como múltiplas isoformas que carregam sítios de *N*- e *O*-glicosilação, gerados por splicing alternativo de exons que codificam uma região do domínio extracelular (CLARK; BAUM, 2012). Os sítios de *N*-glicosilação são cadeias de açúcar do tipo complexo contendo ramificações de poli(*N*-acetilactosamina) e resíduos de ácidos siálicos α -2,6-ligados, estendidos através do domínio extracelular. Os sítios de *O*-glicosilação são decorados com o core1 e core2 de *O*-glicanas, que são expressos em exons variáveis (HERMISTON; XU; WEISS, 2003). No entanto, embora o entendimento sobre a relevância do CD45 como importante regulador na linfopoiese de células B seja limitado, alguns estudos têm mostrado que a ausência de CD45 compromete todo o desenvolvimento das células B, promovendo o acúmulo de células Pro-B. Além disso, esse defeito também reflete em uma drástica diminuição no número de células B maduras (FLEMING; MILNE; PAIGE, 2004; ZIKHERMAN *et al.*, 2012). Nas etapas seguintes, o desenvolvimento das células B requer a expressão do receptor do antígeno da célula B precursor (pre-BCR) formado por duas cadeias pesadas (H) de imunoglobulina (Ig), duas cadeias leves substitutas (CLS) e o heterodímero Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) (WINKLER; MÅRTENSSON, 2018).

5. Relevância funcional de glicanas em subpopulações de células B

A sinalização do pre-BCR representa um ponto de verificação crucial para a expansão e desenvolvimento de células B. Um pre-BCR funcional promove a proliferação celular, rearranjos na cadeia leve (L) de Ig e leva à diferenciação de células B imaturas que expressam receptor de antígeno de célula B (BCR) em sua superfície celular (HOBEIKA *et al.*, 2018; STEIN *et al.*, 2017). Nessa etapa, a lectina Galectina-1 (Gal-1) secretada pelas células estromais da medula óssea pode interagir com as CLs de pré-BCR (via interações proteína-proteína) e integrinas (via reconhecimento de carboidratos) expressas em células pré-B, levando à realocização desses receptores e promovendo aumento no agrupamento e sinalização do pre-BCR, indicando o envolvimento de glicanas na regulação do desenvolvimento de células B

(BONZI *et al.*, 2015; GIOVANNONE *et al.*, 2018b). É importante mencionar que os rearranjos na cadeia de Ig também garantem que células B imaturas migrem da médula óssea para os órgãos linfoides secundários onde completam seu desenvolvimento, adquirem especificidade antigênica (PATTON; PLUMB; ABRAHAM, 2014; TOBÓN; IZQUIERDO; CAÑAS, 2013) e com base em sua ontogenia, localização anatômica e mecanismos efetores de resposta imune, serão divididas em subpopulações distintas, células B-1 e B-2 (PIEPER; GRIMBACHER; EIBEL, 2013; POPI; LONGO-MAUGÉRI; MARIANO, 2016; SCHWEIGHOFFER; TYBULEWICZ, 2018).

As células B-1 são definidas pela expressão diferencial de CD5 e marcador mieloide CD11b em duas subpopulações: células B-1a (CD19^{hi} CD5^{hi}) e células B-1b (CD19^{hi} CD5^{low} CD11b^{hi}). Essas subpopulações celulares são encontradas com alta frequência na cavidade peritoneal, mas com baixa frequência no baço (DAVIS, 2015). Embora as células B-1 atuem na resposta imune humoral precoce contra patógenos (HAAS *et al.*, 2005; OSUGUI *et al.*, 2018), os subtipos de células B-1a e B-1b têm funções imunológicas distintas (NEW; KING; KEARNEY, 2016). Células B-1a atuam como células produtoras e secretoras espontâneas de anticorpos (Ab) naturais poli-reativos, especificamente IgM e IgA naturais, que são capazes de reconhecer e eliminar patógenos oportunistas causadores de infecções bacterianas e virais (AZIZ *et al.*, 2015). Embora estejam predominantemente localizadas na cavidade peritoneal, as células B-1a podem ser encontradas em outros tecidos, incluindo baço, médula óssea, linfonodos, trato respiratório e tecidos intestinais (AZIZ *et al.*, 2018). Além da capacidade em secretar Ab naturais, foi demonstrado em modelo murino que durante a sepse as células B-1a são importantes produtoras de IL-10, o que contribui na atenuação do processo inflamatório exacerbado (AZIZ *et al.*, 2017).

Em comparação com as células B-1a, os mecanismos efetores das células B-1b são mais caracterizados. Esse subtipo de células B pode ser ativada em resposta à antígenos de forma independentes (TI) e dependente (TD) de células T, induzindo uma alta produção de IgM específico para o antígeno, e com níveis reduzidos de IgG3 (ROSENFELD *et al.*, 2015). Em resposta ao antígeno de forma TI, as células B-1b também são diferenciadas em células B de memória fornecendo uma resposta imune humoral protetora de longa duração contra patógenos oportunistas (ALUGUPALLI, 2008; HAAS, 2015). Em ambos os subtipos de células B-1, a importância de glicanas é exemplificada pela relevância funcional de dois receptores que regulam a ativação celular, Siglec-2 e Siglec-G. Funcionalmente, esses receptores reconhecem resíduos de ácido siálico α 2,6-ligados (Siglec-2) e ácido siálico α 2,3- ou α 2,6-ligados (Siglec-

G). Esse reconhecimento afeta a inibição da ativação celular via BCR e desempenha um papel crucial na prevenção da autoimunidade (DUONG *et al.*, 2010; JELLUSOVA; NITSCHKE, 2012; MEYER *et al.*, 2018).

As células B-2 pode ser dividido em duas subpopulações, células B da zona marginal (B-Mz) e foliculares (B-Fo). Células B-Mz (IgM^{high} IgD^{low} $\text{CD21}^{\text{high}}$ CD23^{low}) estão anatomicamente localizadas na interface entre a circulação sanguínea e o sistema imunológico, fornecendo eficiente vigilância imunológica (CERUTTI; COLS; PUGA, 2013). Assim como células B-1, as células B-Mz são essencialmente produtoras de Ab naturais, respondendo rapidamente aos antígenos de forma TI e TD. Frequentemente, células B-Mz produzem altos níveis de IgM natural em respostas TI (HENDRICKS; BOS; KROESE, 2018). Por outro lado, em resposta aos antígenos TD, essas células podem produzir IgG, IgA ou IgE (APPELGREN *et al.*, 2018). Após exposição antigênica, células B-MZ podem se diferenciar rapidamente em células plasmáticas, garantindo respostas protetoras rápidas e eficazes contra patógenos oportunistas (DAVIS, 2015; YAM-PUC *et al.*, 2018).

Células B- Fo (B220^+ CD21^{low} $\text{CD23}^{\text{high}}$) são linfócitos B recirculantes localizados nas regiões foliculares de órgãos linfoides secundários, incluindo baço e linfonodos, respondendo a antígenos de uma maneira TD (GENESTIER *et al.*, 2007; HOEK *et al.*, 2010). Nesse nicho folicular, células B-Fo naive formam estruturas microanatômicas conhecidas como centros germinativos (CGs), onde ocorre a produção, maturação e diversificação por afinidade de Ab (MESIN; ERSCHING; VICTORA, 2016). Essas regiões foliculares também permitem que, após a aquisição do antígeno, as células B-Fo migrem para a fronteira entre a zona de células T e os folículos de células B primárias, onde recebem sinais co-estimuladores de células T CD4^+ ativadas (ALLMAN; PILLAI, 2008; SCHROEDER; RADBRUCH; BEREK, 2019). Além de participar da resposta imune humoral produzindo anticorpos IgG de alta afinidade e longa duração (após um processo infeccioso e/ou vacinação), as células B-Fo também podem responder a antígenos de forma TI, produzindo IgM (HOFFMAN; LAKKIS; CHALASANI, 2016).

6. O Papel do reconhecimento de glicanas associadas a receptores expressos em células B

As células imunológicas exibem vários receptores altamente glicosilados, especialmente na superfície (DA SILVA *et al.*, 2017b; RHEINLÄNDER; SCHRAVEN;

BOMMHARDT, 2018; RICCI-AZEVEDO; ROQUE-BARREIRA; GAY, 2017; SHATNYEVA *et al.*, 2011; WILHELM *et al.*, 2019). Essas glicanas estão envolvidos na modulação das atividades efectoras, por meio da transdução de sinais responsáveis pela ativação celular pela produção de secreção de citocinas envolvidas nas respostas imunes (CARVALHO *et al.*, 2018b; SCHNAAR, 2015; VAN DAMME; LANNON; PEUMANS, 2008; VAN DAMME *et al.*, 1998) e indução da morte celular (LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013). Portanto, para exemplificar o papel do reconhecimento de glicanas promovido por lectinas, os aspectos gerais da glicosilação do BCR, CD22 e CD45, bem como o efeito decorrente do reconhecimento de carboidrato nestes receptores por lectinas estão delineados a seguir:

▪ BCR

O receptor do antígeno da célula B, conhecido como BCR, consiste em IgD e IgM ancorados na membrana plasmática e não covalentemente ligados como os heterodímeros das cadeias Igα / Igβ (CD79a / CD79b), formando dois isotipos BCRs: IgD-BCR e IgM- BCR (TREANOR, 2012; YUE *et al.*, 2019). Células B naïve maduras co-expressam IgD e IgM na superfície celular, por meio de um mecanismo que envolve o splicing alternativo de um mRNA precursor (pre-RNA) (GUTZEIT; CHEN; CERUTTI, 2018). O BCR desempenha papéis essenciais na biologia das células B (SHAIN; TAO, 2014). Durante o processo de maturação, a sinalização BCR garante a sobrevivência celular (YAM-PUC *et al.*, 2018). Em células B maduras, a ligação do BCR com seu antígeno específico, ativa uma cascata de sinalização intracelular que promove a internalização do antígeno para seu processamento e subsequente apresentação às células T (TREANOR, 2012; YAM-PUC *et al.*, 2018).

Em resumo, o BCR também está envolvido na sobrevivência e proliferação de células B malignas, por meio da estimulação contínua do BCR por antígenos e autoantígenos ou por mecanismos que promovem a sinalização do BCR independente de ligantes (BURGER; WIESTNER, 2018). O BCR é um receptor altamente glicosilado que se expressa exclusivamente em células B, com papel fundamental na resposta imune humoral (WILHELM *et al.*, 2019). IgD exibe três sítios de *N*-glicanas em sua cadeia pesada, nas posições Asn³⁵⁴, Asn⁴⁴⁵ e Asn⁴⁹⁶, além de vários locais de *O*-glicano na região de dobradiça (ARNOLD *et al.*, 2004; GALA; MORRISON, 2002). Na IgM humana, existem cinco sítios putativos de *N*-glicosilação nas posições Asn¹⁷¹, Asn³³², Asn³⁹⁵, Asn⁴⁰² and Asn⁵⁶³ da cadeia pesada (SU *et al.*, 2018). Devido à alta glicosilação de BCR, diferentes estudos descreveram os glicanos expressos em BCR como alvos de lectinas (SCHNEIDER *et al.*, 2015).

Cao *et al.* descreveram que Gal-9, uma lectina endógena de ligação a β -galactosídeo, atua intrinsecamente como um regulador negativo da ativação de células B. Gal-9 se liga à glicanas de IgM-BCR, promovendo um aumento na agregação e mobilização de nanoclusters IgM-BCR, isso afeta a sinalização BCR (CAO *et al.*, 2018). Além disso, Gal-9 promove um aumento na interação entre IgM-BCR com os co-receptores inibitórios CD22 e CD45, garantindo o efeito inibitório de Gal-9 na ativação de células B (CAO *et al.*, 2018). Em outro estudo, Wilhelm *et al.* demonstraram que BambL (*Burkholderia ambifaria*), uma lectina bacteriana com CRD específico para fucose, induz a liberação de Ca^{2+} intracelular, aumento na expressão de CD86, secreção de TNF- α e morte celular de células B, por meio da ativação canônica de IgD-BCR. Curiosamente, esses efeitos foram observados apenas na presença do isotipo IgD-BCR, sugerindo que BambL se liga especificamente a glicanas de IgD-BCR (WILHELM *et al.*, 2019).

▪ CD22

CD22, também conhecido como Siglec-2, é uma proteína transmembrana pertencente à família das lectinas do tipo imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (Siglecs), expressa exclusivamente em células B (DI CARLUCCIO *et al.*, 2020). Essa família de receptores compreende um conjunto de proteínas transmembranares que compartilham características estruturais. Estruturalmente, as Siglecs são constituídas por um domínio extracelular formado de vários domínios de imunoglobulina (Ig) que exibem um domínio *N*-terminal altamente conservado, responsável pelo reconhecimento de glicoconjugados sialilados (BORNHÖFFT *et al.*, 2018). Em geral, Siglecs têm uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática com motivos de sinalização, principalmente, Motivos de Inibição do Imunorreceptor Baseado em Tirosina (ITIMs). Os resíduos de ácido siálico presentes nas estruturas terminais de glicana são ligantes das proteínas Siglec. Embora, diferentes Siglecs exibam ligação preferencial a diferentes resíduos de ácido siálico (MEYER *et al.*, 2018).

O CD22 atua principalmente como um co-receptor inibitório da ativação da sinalização de BCR (ENTERINA; JUNG; MACAULEY, 2019). Em generalidade, a ativação de células B, via BCR, inicia a fosforilação de resíduos-chave de tirosina na cauda citoplasmática de CD22, por proteínas tirosina quinases da família Src. Esses eventos de fosforilação fazem com que esses resíduos se tornem sítios de ligação da fosfatase SHP-1, que catalisa a defosforilação dos componentes da sinalização de BCR, antagonizando a ativação de BCR (DÖRNER *et al.*, 2015). Embora o CD22 seja classificado como receptor inibitório, dois ITIMs distais na cauda citoplasmática podem recrutar as proteínas que formam um complexo proteico capaz de ativar

a via de MAPK, promovendo uma regulação da sobrevivência e proliferação celular (CLARK; GILTIAY, 2018). O domínio extracelular de CD22 contém doze locais de *N*-glicosilação (EREÑO-ORBEA *et al.*, 2017), sendo que seis sítios estão localizados nos ectodomínios mais externos do CD22, sendo necessários para a organização e função do CD22 na regulação da sinalização do BCR (ENTERINA; JUNG; MACAULEY, 2019; WASIM *et al.*, 2019).

Funcionalmente, CD22 interage com ácidos siálicos α 2,6-ligados expressos na mesma célula, sugerindo que essa interação *cis* (com ligantes endógenos) são essenciais para a função do CD22. No entanto, o CD22 pode interagir de maneira *trans* (com glicanos exógenos) com outra célula e/ou partícula contendo esses resíduos de ácidos siálicos (MATSUBARA *et al.*, 2018). Embora o papel funcional da interação *trans* de CD22 seja pouco caracterizada, foi proposto que essas interações podem fornecer informações sobre como os recursos exógenos podem influenciar a função de CD22 e, consequentemente, inibir a sinalização de BCR (COURTNEY *et al.*, 2009). Os glico-alvos para o reconhecimento de CD22 são sintetizados, *in vivo*, pela enzima ST6Gal I (MEYER *et al.*, 2018). Collins *et al.* observaram que camundongos deficientes de ST6Gal I exibem níveis séricos reduzidos de IgM, diminuição na taxa proliferativa de células B e desenvolvem imunossupressão em resposta a imunização com antígenos TI e TD. Sugerindo assim, que a ausência do ligante específico de CD22, permite a regulação negativa de CD22 mais forte na sinalização de células B (COLLINS *et al.*, 2002).

▪ CD45

CD45 é um receptor semelhante a tirosina fosfatase que atua regulando a sinalização do complexo do receptor de antígenos de células T e B, TCR e BCR, respectivamente (COUGHLIN *et al.*, 2015). Com exceção dos eritrócitos e plaquetas, o CD45 é expresso na superfície de todas as células hematopoiéticas, podendo ser expresso em múltiplas isoformas, dependendo do tipo de célula, estágio de desenvolvimento e ativação celular (CHANG *et al.*, 2016). CD45 é constituído por um enorme domínio extracelular altamente glicosilado, um único domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática, que contém dois domínios de proteína tirosina fosfatase (THIEL *et al.*, 2015). O domínio extracelular de CD45 exhibe, em maiores proporções, vários sítios de *O*-glicosilação. No entanto, este domínio contém uma região rica em cisteína e três repetições de fibronectina tipo III, que são fortemente *N*-glicosiladas (RHEINLÄNDER; SCHRAVEN; BOMMARDT, 2018). Em geral, as glicanos de CD45 participam de diferentes processos biológicos, incluindo diferenciação, ativação, migração e sobrevivência celular (REILY *et al.*, 2019).

Recentemente, Giovannone *et al.* descreveram Gal-9 como um importante regulador intrínseco da sinalização e ativação de BCR. Neste estudo, os autores identificaram os principais receptores-alvo para Gal-9 nas células B. Como resultado, mostraram que o efeito regulatório de Gal-9 em células B naïve é devido ao reconhecimento de glicanos expressos em CD45 (GIOVANNONE *et al.*, 2018b). Diferentes estudos têm descrito o efeito imunomodulador de Jacalina, uma lectina isolada de sementes de *Artocarpus heterophyllus* (jaca), com especificidade para ligação a Gal β 1-3GalNAc (GABRIELA *et al.*, 2013; JANDÚ *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2020). Resumidamente, CD45 é relatado como o principal alvo da jacalina nas células B, promoveu a mobilização do Ca $^{2+}$ intracelular e induziu a ativação da calpaína, efeito que levou à morte por apoptose (MA *et al.*, 2009). Além disso, Jacalina é capaz de interagir com o CD45 expresso em células T CD4 $^{+}$, induzindo alta produção de citocinas IL-2, IFN- γ e IL-4 (GERALDINO *et al.*, 2017).

7. Células B dos Centros Germinativos relacionadas com a Linfomagenese

Os centros germinativos (CGs) são estruturas microanatômicas que se formam nos folículos de órgãos linfoides secundários em resposta ao comprometimento de células B naïve com o desenvolvimento e seleção de células B produtoras de anticorpos de alta afinidade (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015; STEBEGG *et al.*, 2018). No CG, as células B maturam a afinidade do anticorpo através do processo de hipermutação somática (HS), e sofrem recombinação para troca de classe isotípica, fato que garante a diferenciação em células B de memória e plasmócitos visando a produção de anticorpos antígeno-específica (HOLMES *et al.*, 2020; ROCO *et al.*, 2019). Estruturalmente, o CG é constituído pela *zona escura* e *zona clara*, microambientes caracterizados funcionalmente pela elevada taxa proliferativa de células B em HS e pela seleção de células B antígeno-específica, respectivamente (CYSTER; ALLEN, 2019).

A formação do CG tem início com a interação direta de células B naïve e células T CD4 $^{+}$ naïve antígeno-específicas na fronteira T-B do folículo ou região parafolicular. As células B ativadas destinadas à formação do GC, se agregam nos folículos primários e, assim, originam os CGs (HUANG, 2020). Apesar do CG ser constituído por compartimentos distintos, a maturação de células B não percorre um caminho unidirecional entre os dois compartimentos, mas envolve uma série de reentradas cíclicas entre as zonas clara e escura, garantindo novas rodadas de proliferação celular e HS. Esse trânsito entre as duas zonas e a diferenciação pós-GC de células B são coordenados por uma complexa rede de sinalização celular e sinais solúveis

que favorecem a ativação e supressão de programas transcricionais específicos, incluindo IRF4, NF- κ B, BCL-6, MEF2B e MYC (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015; VICTORA; NUSSENZWEIG, 2012). Embora as reações do CG sejam estritamente reguladas, os mecanismos genéticos que controlam esses eventos podem sofrer mutações que repercutem na transformação maligna de células B, favorecendo o surgimento de linfomas (SHAFFER; YOUNG; STAUDT, 2012).

A maioria dos linfomas oriundos de reações do CG são linfomas não-Hodgkin de células B (B-LNHs), como Linfoma de Burkitt (LB), Linfoma Folicular (LF) e Linfoma Difuso de Grandes Células B (LDGCB). Considerando os perfis de expressão gênica de B-LNHs, acredita-se que o LB se origina de células B da zona escura. Por outro lado, o LF e o LDGCB podem surgir de transformações que ocorrem em diferentes estágios do CG. No entanto, no LF as células se assemelham, predominantemente, com células B da zona clara. Por outro lado, no LDGCB as células tem aparência de células B da zona clara ou em estágios iniciais de diferenciação pós-CG como plasmoblastos (BASSO; DALLA-FAVERA, 2015). Em geral, B-NHLs apresentam uma enorme variedade de características genéticas, fenotípicas e clínicas distintas (FUERTES; RAMIRO; DE YEBENES, 2020; MLYNARCZYK; FONTÁN; MELNICK, 2019).

O Linfoma de Burkitt é um LNH derivado de células B maduras do CG ou pós-CG altamente agressivo e com alta taxa proliferativa (SALEH *et al.*, 2020). Clinicamente o LB pode ser subdividido em três diferentes subtipos, como endêmico, esporádico e relacionado à imunodeficiência, todas as formas apresentando fatores epidemiológicos, manifestações clínicas e fatores de risco distintos (KALISZ *et al.*, 2019). Por outro lado, rearranjos cromossômicos envolvendo a translocação (8; 14) do gene *MYC* para o locus do gene da cadeia pesada da imunoglobulina é a assinatura molecular de todos os subtipos de LB. No entanto, existem outras translocações variantes, como t (2; 8) e t (8; 22) que podem ser encontradas, mais raramente, no loci da cadeia leve de imunoglobulina (ASADBEIGI; DEEL, 2020; ROBAINA; MAZZOCCOLI; KLUMB, 2019).

Embora, o LB represente menos de 5% de todos casos de linfomas diagnosticados em adultos, essa neoplasia é responsável por cerca de 40% de todos os casos de LNH em crianças em todo o mundo (ZHANG *et al.*, 2020). Em particular, o tipo endêmico ocorre principalmente na África Tropical, sendo altamente prevalente e incidente em crianças. Estima-se que nessa região, o LB endêmico seja responsável por 50% de todos os casos de tumores infantis e cerca de 90% de todos os linfomas diagnosticados (QUINTANA *et al.*, 2020; SALEH *et al.*, 2020).

Por outro lado, a forma relacionada à imunodeficiência é comumente observada em pacientes HIV-positivos, mas também pode ser observado em receptores de aloenxerto e pacientes com imunodeficiência congênita (KALISZ *et al.*, 2019). A infecção pelo HIV está correlacionada com um risco aumentado de neoplasias linfóides em comparação com a população HIV-negativa. Dentre as quais, o LB é responsável por até 40% de todos os linfomas associados ao HIV diagnosticados (ATALLAH-YUNES; MURPHY; NOY, 2020).

Embora a translocação do oncogene MYC seja a marca registrada do linfoma de Burkitt, ao contrário da maioria dos linfomas de células B, este subtipo pode ser formado por vias que independem da ativação da cascata de sinalização de NF- κ B (SCHMITZ *et al.*, 2012). Diferentes genes envolvidos com vias distintas, como as vias de sinalização do BCR, PI3K/AKT, apoptose, regulação epigenética e a sinalização do receptor acoplado à proteína G têm sido reportados como potenciais candidatos envolvidos na tumorigênese do LB (ZHANG *et al.*, 2020), sugerindo que em comparação aos outros B-LNH do CG, o LB pode ter uma patogênese exclusiva.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar o efeito biológico da lectina ArtinM sobre linfócitos B de origem murina e células humanas de linhagens de linfoma não-Hodgkin.

2. Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a capacidade do domínio de reconhecimento de carboidrato de ArtinM em ativar e induzir a proliferação de células B murina, através:
 - Atividade mitocondrial;
 - Proliferação celular;
 - Produção de citocinas;
- ❖ Investigar o efeito de diferentes concentrações de ArtinM na viabilidade celular de células B murina, através:
 - Avaliação da apoptose por Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI);
- ❖ Avaliar a interação do domínio de reconhecimento de carboidrato de ArtinM com linhagens celulares de linfoma não-Hodgkin, através:
 - Ensaio de binding;
 - Avaliação da apoptose por Anexina-V e PI;
 - Ensaio de fragmentação do DNA;
 - Quantificação dos marcadores de apoptose associados a via mitocondrial e relacionados a autofagia por qRT-PCR;
 - Avaliação do efeito da inibição de moléculas sinalizadoras;
 - Avaliação do efeito da inibição da atividade fosfatase de CD45 sobre Lck e quinases da família Scr.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, machos, entre 6–8 semanas de idade. Os camundongos foram provenientes do biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos conforme as diretrizes éticas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e Comitê de Ética em Estudos Animais da Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto (USP-RP) que aprovou os estudos com animais, conforme protocolo nº 61/2019.

2. Purificação da lectina ArtinM

A lectina ArtinM foi purificada a partir do extrato salino das sementes de *Artocarpus heterophyllus* (jaca) utilizando cromatografia de afinidade com colunas de D-manose acoplada a Sepharose® (Pierce Chemical Company, USA), de acordo com os procedimentos experimentais descritos previamente por Santos-de-Oliveira *et al.* (SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.*, 1994). Os procedimentos de cromatografia foram realizados por meio do sistema *AKTA Purifier* (General Electric). Para avaliar a pureza da lectina ArtinM purificada, o gel de eletroforese apresentou marcador de peso molecular e amostra de jacalina que é o principal contaminante no processo de purificação de ArtinM. Após verificar a presença de uma única banda na altura de 16 kDa e a ausência de bandas na mesma posição da amostra de jacalina, foi confirmada a pureza da lectina ArtinM. Por fim, a quantificação da concentração de ArtinM foi determinada através do método de BCA, de acordo com metodologia previamente descrita por Smith *et al.* (SMITH *et al.*, 1985). Todos esses procedimentos foram relatados por Da Silva *et al.* (DA SILVA *et al.*, 2020).

3. Purificação de células B esplênicas de camundongos C57BL/6

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical com a finalidade de obter o baço para a purificação de células B. As células B murinas foram purificadas a partir de suspensão de células esplênicas de camundongos *naive* da linhagem C57BL/6, conforme descrito por Oliveira-Brito *et al.* (OLIVEIRA-BRITO; ROQUE-BARREIRA; DA SILVA, 2018b), utilizando o kit de enriquecimento de células B (Pan B Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, EUA), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, os baços dos animais foram removidos assepticamente e macerados em peneira de nylon com 40 µm para obtenção de células esplênicas totais. As células obtidas foram destituídas de hemácias pela adição de 1 mL de tampão de lise (constituído de nove partes de cloreto de amônio a 0,16 M e uma parte de

Tris-HCl a 0,17 M), durante 5 minutos em gelo. Posteriormente, as suspensões celulares foram lavadas em PBS e adicionadas a Histopaque-1077[®] (Sigma-Aldrich) na proporção de 1:2, para separação celular por grau de densidade. As células foram centrifugadas na ausência de aceleração e freio a 400g por 45 minutos e a temperatura de 23 °C. Após esta etapa, foi descartada a fração celular de baixa densidade e a fração de alta densidade foi lavada duas vezes com tampão PBS contendo BSA (0.5%) e EDTA (2 mM). A concentração celular foi determinada por meio da contagem em câmara de Neubauer e ajustado o número de células de acordo com a quantidade de anticorpos e de MicroBeads, seguindo instruções do fabricante. As células B foram eluídas em colunas MiniMacs[®] (Miltenyi Biotec, USA) de acordo com as instruções do fabricante e lavadas duas vezes com meio avançado Roswell Park Memorial Institute 1640 (Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, piruvato de sódio (1 mM), L-glutamina (2 mM) e antibiótico (1%). As células obtidas por depleção negativa foram marcadas com anticorpo PE Rat Anti-Mouse CD19 (BD Pharmingen[™]) e analisadas por citometria de fluxo (Guava[®] easyCyte, Millipore, EUA), sendo normalmente alcançados graus de pureza com valores em torno de 96% de células positivas para essa marcação.

4. Linhagens celulares de Linfoma de Burkitt

Células Raji e Daudi, ambas linhagens de linfoma de Burkitt, foram rotineiramente cultivadas em meio avançado Roswell Park Memorial Institute 1640 (Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomicina/penicilina, piruvato de sódio (1 mM) e L-glutamina (2 mM), em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37 °C. As células Raji e Daudi foram generosamente fornecidas pela Dra. Fabíola Traina (Departamento de Imagens Médicas, Hematologia e Oncologia Clínica, HC-FMRP, USP).

5. Ligação de ArtinM na superfície de células Raji e Daudi

Células Raji e Daudi (1×10^6 células/mL) foram fixadas com uma solução de PBS-formaldeído 3%, por 20 minutos. As células foram lavadas com uma solução de PBS/glicina 1%, seguida por duas lavagens com PBS. Após duas lavagens, células Raji e Daudi foram incubadas com ArtinM biotinilada (20 µg/ml) previamente incubada ou não com manotriose (1 mM), manose (20 mM) ou lactose (20 mM), por 40 minutos a 4 °C. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com estreptavidina-FITC (5 µg/mL) para detecção da ligação de ArtinM através de citometria de fluxo (Guava[®] easyCyte, Millipore,

EUA). Como controle negativo, células Raji e Daudi foram incubadas somente com estreptavidina-FITC (5 µg/mL) na ausência da lectina.

6. Determinação da atividade mitocondrial

Células B murinas purificadas foram estimuladas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 5,0 µg/mL) por 24 ou 48 horas a 37 °C. Como controle positivo de ativação celular, utilizou-se PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µM). Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com Meio de cultura. Após o tempo de cultivo celular, Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; 50 µg/mL) foi adicionado à cultura celular e a atividade mitocondrial foi determinada através da redução de MTT para produzir cristais de formazan, com leitura de absorbância em 570 nm, conforme metodologia descrita previamente por Da Silva *et al.* (DA SILVA *et al.*, 2014). A atividade mitocondrial foi expressa em porcentagem que indicam o aumento/redução percentual após comparação com os valores de absorbância determinados nas células B não estimuladas (Meio).

7. Ensaio de proliferação celular

Células B murinas purificadas foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 5,0 µg/mL) por 48 horas a 37 °C. Como controle positivo de ativação celular, utilizou-se PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µM). Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com Meio de cultura. Após o tempo de cultivo, as células foram tratadas com [³H]-timidina (0.5 µCi/poço) e a taxa proliferativa de células B murinas foi mensurada em função da incorporação de [3H]-TdR. A detecção da incorporação de [3H]-TdR foi mensurada por meio de cintilador com os valores sendo expressos em contagem por minuto (CPM) e em índice de estimulação da proliferação celular.

8. Mensuração dos níveis da citocina IL-2

Células B murinas purificadas foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 5,0 µg/mL) por 48 horas a 37 °C. Como controle positivo de ativação celular, utilizou-se PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µM). Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com Meio de cultura. Após a incubação, as células foram centrifugadas a 300 × g por 10 minutos em temperatura ambiente e os sobrenadantes foram coletados para determinar as concentrações de IL-2. Os níveis de IL-2 foram mensurados através do ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o Kit OptEIA™ (BD Biosciences, USA), conforme as instruções do fabricante. O cálculo dos valores em pg/mL

foi realizado no programa Prisma 7.0 (GraphPad Software) tendo como parâmetro a leitura obtida com a curva padrão.

9. Marcação intracelular das citocinas IL-12 e IFN- γ

Células B murinas foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 1,25 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas a 37 °C. Como controle positivo de ativação celular, utilizou-se PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 μM). Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com Meio de cultura. Durante as últimas 12 horas de incubação, foi adicionado 1 μl do inibidor do transporte de proteína (BD GolgiStopTM) a cada 1,5 mL do volume de cultura. Após o período de incubação, as células foram lavadas, fixadas/permeabilizadas com a solução de fixação/permeabilização (BD Cytofix/CytopermTM Plus), por 20 minutos a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão de lavagem (BD Perm/WashTM buffer) e ressuspensas em tampão de Perm/WashTM com anticorpos: anti-IFN- γ PE (BD PharmingenTM) e anti-IL-12 FITC (BD PharmingenTM), por 40 minutos a 4 °C. Por fim, as células foram lavadas e ressuspensas com tampão Perm/Wash. Posteriormente, a frequência de células B positivas para a marcação intracelular de IL-12, IFN- γ ou duplo-positivas para IL-12⁺ IFN- γ ⁺ foi determinada através de citometria de fluxo (Guava EasyCyteTM Mini System).

10. Detecção da frequência de células positivas para Anexina-V e/ou Iodeto de propídio (PI)

Células B murinas, células Raji e Daudi foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com diferentes concentrações de ArtinM (0,019 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$) por 24 ou 48 horas a 37 °C. Como controle positivo de ativação celular, utilizou-se PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 μM). DMSO (5 %) ou AS₂O₃ (12 μM ou 24 μM) foram utilizados como controles positivos para indução de morte celular. Como controle negativo, as células foram incubadas apenas com Meio de cultura. Após a incubação, as células foram marcadas com anexina V-FITC (5 $\mu\text{g/mL}$; 40 minutos) e o Iodeto de Propídio (10 $\mu\text{g/mL}$) adicionado no momento da análise por citometria de fluxo (Guava EasyCyteTM Mini System). A frequência de células B murinas, Raji e Daudi marcadas com anexinaV-FITC, duplamente marcadas com anexinaV-FITC/PI e/ou marcada pela incorporação de PI foi determinada por citometria de fluxo e os valores foram expressos em porcentagem.

11. Ensaio de fragmentação do DNA

As células Raji e Daudi foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM nas concentrações de 1,25 µg/mL (células Raji) e 20,0 µg/mL (células Daudi), durante 24 ou 48 horas a 37 °C. Trióxido de Arsênio (AS₂O₃) nas concentrações de 12 µM (Raji) e 24 µM (Daudi) foi utilizado como controle positivo na indução de morte celular, e apenas meio de cultura como controle negativo. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e submetidas a lise celular com tampão constituído de Tris-HCl (50 mM), EDTA (10 mM), Triton-X (0,2%), RNase (100 µg/mL) e Proteinase K (500 µg/mL). Em seguida, esse material foi mantido sob agitação constante por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, a fragmentação do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8%). A visualização do DNA foi realizada pela coloração com SYBR safe visualizado pelo sistema de imagem de gel ChemiDoc (Bio-Rad).

12. Quantificação dos marcadores de apoptose associados a via mitocondrial e relacionados a autofagia por qRT-PCR

As células Raji e Daudi foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM nas concentrações de 1,25 µg/mL (células Raji) e 20,0 µg/mL (células Daudi), durante 24 horas a 37 °C. Trióxido de Arsênio (AS₂O₃) nas concentrações de 12 µM (Raji) e 24 µM (Daudi) foi utilizado como controle positivo na indução de morte celular, e apenas meio de cultura como controle negativo. Após o tempo de incubação, O RNA total foi extraído de células Raji e Daudi utilizando Trizol, conforme as instruções do fabricante. A conversão do RNA em cDNA foi realizada pelo kit iScript™ cDNA synthesis (Bio-Rad). A reação de qRT-PCR foi realizada em um volume final de 10 µL utilizando EvaGreen (Bio-Rad). Para a leitura do qRT-PCR foi utilizado o equipamento CFX96 (Bio-Rad) considerando as seguintes condições de reação: 95°C por 30 sec, e 40 ciclos de 95°C por 5 sec/60°C por 5 sec. A expressão relativa do transcrito foi quantificada usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizado para a expressão de β -actina. Os primers utilizados para a reação de PCR foram: β -actina, caspase-3, Apaf-1, Smac/Diablo, LC3-I, ATG14 e ATG-12.

1. Ensaio de inibição de moléculas sinalizadoras em células Raji e Daudi estimuladas com ArtinM

As células Raji e Daudi foram distribuídas em microplacas de 96 poços e previamente incubadas, separadamente, com os seguintes inibidores farmacológicos: PD98059 (inibidor de p42/44MAPK), Genisteína (inibidor de PTK), SB202190 (inibidor de p38MAPK), SP600125

(inibidor de JNK), H-7 (inibidor de PKC), NQ-301 (inibidor da atividade fosfatase de CD45 sobre Lck) e Dasatinib (inibidor de Lyn, Fyn e Blk) durante 210 minutos a 37 °C. Posteriormente, essas células foram estimuladas com ArtinM nas concentrações de 1,25 µg/mL (células Raji) e 20,0 µg/mL (células Daudi). Como controle positivo para indução de morte celular utilizou-se AS₂O₃ (12 µM ou 24 µM). Após 24 ou 48 horas de incubação o efeito da lectina ArtinM foi avaliado pela frequência de células positivas para Anexina-V e/ou Iodeto de propídio (PI), conforme procedimentos descritos no item 10.

13. Análise estatística

Inicialmente, foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Confirmada a distribuição normal e variância homogênea, foi aplicado o teste One-way ANOVA. Na ausência de normalidade na distribuição e variância heterogênea, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. A avaliação estatística das diferenças entre as médias dos grupos foi determinada por meio da análise de variância unidirecional, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni e, no teste não paramétrico, as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de comparação múltipla de Dunn's. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa Prisma 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os resultados estão expressos em média ± EPM (erro padrão da média), com as diferenças observadas sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****).

RESULTADOS

1. Capítulo 1

Título: Investigação do efeito imunomodulador da lectina ArtinM em células B murina

1.1 ArtinM induz um aumento da atividade mitocondrial de células B com ausência da indução da proliferação celular

A caracterização do efeito dose-dependente de moléculas bioativas, aplicada em modelos experimentais *ex vivo*, contribui na compreensão dos efeitos biológicos desencadeados pela molécula em estudo, fato explorado na caracterização da atividade imunomoduladora de lectinas em diferentes concentrações (dose) sobre células da imunidade inata e adaptativa. Nesse cenário, nos propusemos a caracterizar o efeito dose-dependente de ArtinM em linfócitos B purificados de células esplênicas de camundongos da linhagem C57BL/6. Inicialmente, as células B tiveram sua atividade mitocondrial mensurada através do ensaio de MTT nos períodos de 24 e 48 h após o estímulo com ArtinM em diferentes concentrações (0,312 – 5,0 µg/mL). Após 48 h de cultivo celular a atividade mitocondrial de células B incubadas com ArtinM nas concentrações de 0,312 e 0,625 µg/mL apresentou uma elevação de 28,5% e 18,7%, respectivamente, comparado às células não estimuladas (Figura 1A). No entanto, as concentrações de ArtinM no intervalo de 1,25 a 5,0 µg/mL resultou na redução da atividade mitocondrial de células B nos tempos de incubação analisados (Figura 1A). Destaca-se a redução média de 43,05% da atividade mitocondrial de células B incubadas com ArtinM na concentração de 5,0 µg/mL, após o período de 24 h (Figura 1A). Esses achados evidenciam a capacidade de altas concentrações de ArtinM em promover um efeito citotóxico em células B murina, enquanto baixas concentrações da lectina não exerceram a mesma atividade biológica.

Considerando o aumento na atividade mitocondrial de células B murina na presença de baixas concentrações de ArtinM, investigamos a capacidade da lectina em desencadear a proliferação celular e a produção da citocina linfoproliferativa IL-2 em células B murina. Para isso, os linfócitos B foram estimulados com ArtinM (0,312 – 5,0 µg/mL) por 48 h, e PMA (50 ng/mL) + Ionomicina (1 µM) foram considerados como controle positivo. A taxa de proliferação celular foi determinada através da incorporação de timidina tritiada ([³H]-TdR) que foi mensurada por cintilador, enquanto os níveis de IL-2 foram quantificados no sobrenadante do cultivo celular através de ELISA. As células B estimuladas com as diferentes concentrações de ArtinM apresentaram níveis de incorporação de [³H]-TdR com ausência de significância comparado às células não estimuladas (Meio), enquanto o controle positivo (PMA+IONO) induziu uma elevada taxa proliferativa de células B (Figura 1B, C). Nessa mesma linha, os níveis de IL-2 no sobrenadante de células B incubadas com ArtinM não diferiu significativamente dos níveis produzidos pelas células não estimuladas (Meio) (Figura 1D), e o estímulo com PMA+IONO induziu a produção de elevados níveis de IL-2 em células B

(Figura 1D). Esses dados evidenciam que as concentrações de ArtinM com leve efeito citotóxico sobre células B murina foram incapazes de induzirem uma atividade proliferativa nesse tipo celular.

Figura 1. ArtinM promove um aumento na atividade mitocondrial de células B murinas com ausência na indução da proliferação celular e produção de IL-2. Células B foram purificadas a partir da suspensão de células esplênicas de camundongos da linhagem C57BL/6. As células B purificadas (5×10^5 células/poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM em diferentes concentrações (0,312 – 5,0 μg/mL) por 24 ou 48 horas a 37 °C. Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA; 50 ng/mL) mais Ionomicina (IONO; 1 μM) foram utilizados como controle positivo de ativação celular e apenas meio de cultura foi utilizado como controle negativo (Meio). **(A)** Após 24 ou 48 h de cultivo celular, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT; 50 μg/mL) foi adicionado à cultura celular e a atividade mitocondrial foi determinada por meio da redução de MTT, com leitura de absorbância em 570 nm. Os valores estão expressos em porcentagem que indicam o aumento/redução percentual após comparação com os valores de absorbância determinados nas células B não estimuladas (Meio); **(B, C)** A taxa proliferativa de células B murinas foi mensurada em função da incorporação de [³H]-TdR (0,5μCi/poço) após 48 h de cultivo. A detecção da incorporação de [³H]-TdR foi mensurada por meio de cintilador com os valores sendo expressos em contagem por minuto (CPM) e índice de estimulação da proliferação celular; **(D)** Os níveis de IL-2 foram quantificados nos sobrenadantes da cultura celular, após 48 h de incubação, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), com os valores expressos em pg/mL. Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo apresentaram $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****).

1.2 Células B estimuladas com ArtinM são induzidas a apoptose

Levando em consideração que as concentrações de ArtinM testadas não induziram um efeito linfoproliferativo em células B murinas e, além disso, uma determinada faixa de concentração de ArtinM repercutiu em uma drástica redução da atividade mitocondrial, averiguamos o efeito da lectina na indução da apoptose de células B. Sendo assim, investigamos a indução de apoptose em células B murinas incubadas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 5,0 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h. A detecção de células B em apoptose foi constatada através de marcadores específicos, como a anexina-V e iodeto de propídio (PI), que foram avaliados por citometria de fluxo. A frequência de células B duplo-positivas para anexina-V e PI atingiram níveis elevados em resposta a incubação com altas concentrações de ArtinM, e a redução da frequência de células B positivas para anexina-V e PI na presença de ArtinM ocorreu de maneira dose-dependente, comparado às células B não estimuladas (Meio) (Figura 2A-B). Deve-se ressaltar que a frequência de células B positivas para anexina-V apresenta níveis elevados em resposta a incubação com ArtinM em concentrações inferiores a 1,25 $\mu\text{g/mL}$, ao final de 24 h de cultivo (Figura 2A-C). Portanto, a indução de apoptose de células B murinas é intensificada por ArtinM de forma dose-dependente.

Figura 2. ArtinM promove um aumento na frequência de células B positivas para anexina-V e PI. As células B foram purificadas a partir da suspensão de células esplênicas de camundongos da linhagem C57BL/6. Células B (5×10^5 células/poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM em diferentes concentrações (0,312 – 5,0 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas a 37 °C. Apenas meio de cultura (Meio) foi utilizado como controle negativo. As células B foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) para determinar a porcentagem de células em apoptose tardia (anexina V + PI) e apoptose recente (anexina-V). A frequência de células positivas conforme a categorização de apoptose foi mensurada por citometria de fluxo. Os resultados são expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM) de ensaios realizados em triplicatas. Diferenças significativas em comparação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,001$ (***).

1.3 ArtinM não induz a produção de IL-12 e IFN- γ por células B murinas

Estudos prévios do grupo demonstraram a atividade imunomoduladora de ArtinM sobre diferentes células da imunidade, via reconhecimento de carboidrato. Nesse sentido, a produção de IL-12 e IFN- γ induzida pela lectina favorece o desenvolvimento e a manutenção de uma resposta imunitária de perfil Th1. Nesse cenário, o papel funcional das células B na modulação desencadeada por ArtinM foi investigado através da mensuração dos níveis de citocinas de perfil Th1 produzidos em resposta ao estímulo com ArtinM. Para isso, células B murinas foram incubadas com diferentes concentrações de ArtinM (0,312 – 1,25 $\mu\text{g/mL}$), e após 24 h a frequência de células produtoras de IL-12 e/ou IFN- γ foi mensurada por meio da citometria de fluxo. Inesperadamente, a frequência de célula B murinas produtoras de IL-12 (Figura 2A), IFN- γ (Figura 2B) ou duplo-positivas para IL-12⁺IFN- γ ⁺ (Figura 2C) após incubação com ArtinM não diferiu significativamente comparado às células não estimuladas

(Meio). Portanto, a atividade imunomoduladora de ArtinM foi incapaz de induzir células B murinas a secretarem mediadores pró-inflamatórios associados ao perfil Th1. Esse conjunto de dados sugere fortemente que ArtinM tem predileção por glicoproteínas com maior envolvimento na regulação do processo de apoptose em células B murinas.

Figura 3. Frequência de células B positivas para IL-12 e/ou IFN- γ não aumenta com o estímulo de ArtinM. As células B foram purificadas a partir da suspensão de células esplênicas de camundongos da linhagem C57BL/6. Células B (5×10^5 células/poço) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM na faixa de concentrações entre 0,6312 – 1,25 $\mu\text{g/mL}$, por 24 horas a 37 °C. Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA; 50 ng/mL) mais Ionomicina (IONO; 1 μM) foram utilizados como controle positivo de ativação celular e apenas meio de cultura foi utilizado como controle negativo (Meio). Após tempo de incubação, a frequência de células B positivas para a marcação intracelular de IL-12 (A), IFN- γ (B) ou duplo-positivas para IL-12⁺ IFN- γ (C) foi determinada através de citometria de fluxo. As barras verticais representam valores expressos em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM) de ensaios realizados em triplicatas. Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,05$ (*).

2. Capítulo II

Título: Caracterização do efeito de ArtinM em linhagens de células B humana originadas de linfoma não-Hodgkin

2.1 ArtinM interage com a superfície celular de Raji e Daudi via domínio de reconhecimento de carboidrato.

Os relatos da capacidade de ArtinM em induzir de forma predominante a apoptose de células B murinas impulsionaram a investigação dos possíveis efeitos biológicos de ArtinM em linhagens celulares humanas de linfoma não-Hodgkin, como a Raji e Daudi. Inicialmente, investigamos a capacidade de ligação de ArtinM na superfície celular das linhagens Raji e Daudi através do domínio lectínico, nessa abordagem a forma biotinilada de ArtinM permitiu a detecção da lectina na superfície celular através da revelação de estreptavidina-FITC por citometria de fluxo. No primeiro momento, células Raji e Daudi (1×10^6 células/mL) foram incubadas com ArtinM biotinilada (20,0 $\mu\text{g/mL}$) e observamos níveis superiores a 99% de células Raji e Daudi positivas para o reconhecimento de ArtinM (Figura 4A-B). Em um segundo momento, ArtinM-biotinilada foi incubada com manotriose (1 mM), manose (20 mM) ou lactose (20 mM) previamente a adição em células Raji e Daudi, e os dados demonstraram que a ligação de ArtinM na superfície dessas linhagens celulares foi reduzida significativamente na presença do carboidrato específico (manose/manotriose) para a lectina (Figura 4A-B). Por outro lado, o dissacarídeo lactose incubado com ArtinM não resultou na redução significativa da interação da lectina com glicoproteínas da superfície de células Raji e Daudi (Figura 4A-B). Esses dados demonstram a capacidade de ligação de ArtinM em células Raji e Daudi de maneira dependente do CRD da lectina.

Figura 4. ArtinM interage com células Raji e Daudi via domínio de reconhecimento de carboidrato. Células Raji (**A**) e Daudi (**B**) (1×10^6 células/mL) fixadas foram incubadas com ArtinM-biotinilada ($20 \mu\text{g/mL}$) ou ArtinM-biotinilada previamente incubada por 40 min com manotriose (1 mM), Manose (20 mM) ou lactose (20 mM). Após 40 min de incubação, as células foram lavadas e incubadas com estreptavidina-FITC ($5,0 \mu\text{g/mL}$) por 40 min adicionais. A detecção da interação de ArtinM com as células ocorreu por citometria de fluxo, como controle negativo as células foram incubadas somente com estreptavidina-FITC ($5,0 \mu\text{g/mL}$). As células foram analisadas por citometria de fluxo para determinar a porcentagem de células positivas para o reconhecimento de ArtinM, com a linha vermelha (M1) delimitando o campo de células positivas.

2.2. ArtinM reduz a taxa de crescimento de células Raji e Daudi devido a diminuição da viabilidade celular

Com o propósito de investigar um possível efeito citotóxico de ArtinM nas linhagens celulares Raji e Daudi, no primeiro momento avaliamos o crescimento celular e a porcentagem de células viáveis em resposta a incubação com distintas concentrações de ArtinM. Com isso, células Raji e Daudi foram incubadas com ArtinM ($0,019 - 20,0 \mu\text{g/mL}$) por 48 h a 37°C , e a concentração celular e a viabilidade das células Raji e Daudi foram determinadas através de citometria de fluxo com uso do iodeto de propídio (PI) para marcar células não viáveis. Os dados demonstraram que células Raji incubadas com uma ampla faixa de concentração de ArtinM ($0,625 - 20,0 \mu\text{g/mL}$) tiveram uma redução significativa na concentração celular e, consequentemente, a porcentagem de células Raji positivas para PI elevou na presença de ArtinM ($0,625 - 20,0 \mu\text{g/mL}$), em comparação ao controle negativo (Meio) (Figura 5A-B). Por outro lado, a concentração celular da linhagem Daudi reduziu de forma significativa somente na concentração de $20,0 \mu\text{g/mL}$ de ArtinM comparado as células não estimuladas (Figura 5C), com isso uma maior frequência de células não viáveis foi observado na presença de ArtinM

(Figura 5D). Portanto, ArtinM induz um efeito citotóxico sobre as células Raji e Daudi de maneira dependente da concentração da lectina.

Figura 5. ArtinM reduz a viabilidade celular e altera a taxa de crescimento de células Raji e Daudi. As células Raji e Daudi (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM em diferentes concentrações (0,019 – 20,0 µg/mL) por 48 horas a 37 °C. DMSO (5%) foi utilizado como controle positivo para a indução de morte celular, e apenas meio de cultura foi adotado como controle negativo (Meio). **(A, B)** A concentração celular foi determinada após a incorporação de iodeto de propídio (10,0 µg/mL), detectada por citometria de fluxo, que determina a porcentagem de células não viáveis (C, D). Com base na concentração celular total e na frequência de células não viáveis, a concentração de células viáveis (A, B) e a frequência de células positivas para PI (C, D) foram determinadas. Os resultados são expressos em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM), sendo representativo de três replicatas experimentais. Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) ou $p < 0,0001$ (****).

2.2 ArtinM induz um aumento na frequência de células Raji duplo-positivas para anexina-V e PI

Para corroborar com os dados que sugerem um possível efeito citotóxico da lectina sobre as linhagens celulares de linfoma não-Hodgkin como demonstrado na Figura 5A-B, frequência de células Raji e Daudi positivas para anexina-V e PI sob o estímulo com diferentes concentrações de ArtinM foi quantificada por citometria de fluxo. Após 48 h de cultivo, nossos resultados evidenciaram o efeito de ArtinM em induzir, de maneira dose-dependente, um aumento significativo na frequência de células Raji marcadas para anexina-V e PI, comparado ao controle negativo (Meio) (Figura 6A-B). Por outro lado, o percentual de células Daudi duplo-positivas para anexina-V e PI não elevou significativamente na presença de distintas concentrações da lectina em comparação ao controle negativo, enquanto uma alta porcentagem de células Daudi duplo-positivas para anexina-V e PI foi detectada na presença do controle positivo (AS_2O_3) (Figura 6C-D). Esses achados demonstram o efeito citotóxico de ArtinM sobre determinada linhagem celular de linfoma não-Hodgkin.

Figura 6. ArtinM induz a apoptose de células Raji. As células Raji e Daudi (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM em diferentes concentrações (0,312 – 20,0 $\mu\text{g/mL}$) por 48 horas a 37 °C. Trióxido de Arsênio (As_2O_3) nas concentrações de 12 μM (Raji) e 24 μM (Daudi) foi utilizado como controle positivo da indução de morte celular, e apenas meio de cultura como controle negativo (Meio). **(A-D)** Após o tempo de incubação, as células foram incubadas com anexina V-FITC (5,0 $\mu\text{g/mL}$) e PI (10,0 $\mu\text{g/mL}$), e a frequência (%) de células Raji e Daudi duplamente marcadas com anexina V-FITC/PI foi determinada por citometria de fluxo. Os valores foram expressos em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Valores com diferenças significativas em comparação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,0001$ (****).

2.3 ArtinM não induz a fragmentação do DNA de células Raji e Daudi

O efeito citotóxico de ArtinM sobre células Raji foi confirmado por duas abordagens distintas que estão destacadas nas Figuras 5 e 6, com isso, direcionamos a linha investigativa para caracterizar os mecanismos envolvidos na atividade biológica desencadeada por ArtinM sobre as linhagens celulares em estudo. A primeira forma avaliativa abordou a capacidade de ArtinM em induzir dano ao DNA de células Raji e Daudi. Para isso, as células foram incubadas com ArtinM, As_2O_3 ou somente meio, e após 24 e 48 h de cultivo a fragmentação do DNA das células Raji e Daudi foi avaliado por eletroforese em gel de agarose. Como esperado, a incubação das células com meio ou As_2O_3 resultaram, respectivamente, na ausência e

predomínio da fragmentação de DNA (Figura 7). O DNA extraído de células Raji e Daudi cultivadas na presença de ArtinM não apresentaram um padrão de arraste e bandas de diferentes peso molecular que indicam a fragmentação do DNA, após 24 e 48 h de incubação (Figura 7).

Figura 7. ArtinM não induz a fragmentação do DNA de células Raji e Daudi. As células Raji e Daudi (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM nas concentrações de 1,25 $\mu\text{g/mL}$ (células Raji) e 20,0 $\mu\text{g/mL}$ (células Daudi), durante 24 ou 48 horas a 37 °C. Trióxido de Arsênio (AS_2O_3) nas concentrações de 12 μM (Raji) e 24 μM (Daudi) foi utilizado como controle positivo na indução de morte celular, e apenas meio de cultura como controle negativo (Meio). As células foram submetidas ao protocolo de extração de DNA que foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (0,8%). A visualização do DNA foi realizada pela coloração com SYBR safe.

2.4 ArtinM não induz em células Raji o aumento da expressão relativa de marcadores moleculares associados a autofagia

A constatação de que a estimulação de células Raji e Daudi com ArtinM não repercutiu na fragmentação de DNA, nos instigou a investigar a expressão relativa de transcritos específicos dos marcadores de apoptose associados a via mitocondrial (Caspase-3, Apaf-1 e Smac/DIABLO) e relacionados a autofagia (LC3-I, ATG14 e ATG12), para delinear possíveis mecanismos moleculares utilizados pela lectina na indução da apoptose. Considerando que o efeito citotóxico de ArtinM é mais evidente em células Raji, priorizamos nessa linhagem celular a investigação dos marcadores moleculares citados acima. Para isso, células Raji foram incubadas com ArtinM, AS_2O_3 ou somente meio, e após 24 h de cultivo, a expressão relativa dos transcritos de caspase-3, Apaf-1, Smac/DIABLO, LC3-I, Atg14 e Atg12 foi determinada

por qRT-PCR. Os resultados demonstraram que a incubação de células Raji com ArtinM não induziu uma alteração significativa da expressão relativa dos marcadores associados a cascata de apoptose via mitocondrial (Figura 8A-C) e vinculados a via de autofagia (Figura 8D-F), em comparação às células não estimuladas (Meio, controle negativo). Por outro lado, a utilização do controle positivo, AS₂O₃, induziu um aumento drástico da expressão relativa dos marcadores moleculares analisados (Figura 8A-F), comparado às células não estimuladas. Esse conjunto de dados permite inferir que o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji possivelmente não depende da cascata de apoptose via mitocondrial e não envolve moléculas da via autofágica.

Figura 8 – Expressão relativa aumentada de marcadores moleculares associados a via de apoptose mitocondrial e via autofágica não foram relacionados com o efeito citotóxico de ArtinM sobre células Raji. As células Raji (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e estimuladas com ArtinM (1,25 µg/mL) durante 24 horas a 37 °C, seguido pela extração de RNA e conversão para cDNA. Trióxido de Arsênio (AS₂O₃; 12 µM) foi utilizado como controle positivo na indução de morte celular, e apenas meio de cultura como controle negativo (Meio). A expressão relativa de Caspase-3 (A), SMAC (B), APAF1 (C), LC3-I (D), ATG14 (E) e ATG12 (F) foi determinada por qRT-PCR. Os valores de Ct dos transcritos alvos foram normalizados para a expressão relativa de β-actina como controle endógeno. Os resultados são expressos como média ± SEM, e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*); $p < 0,001$ (**);

2.5 Efeito da inibição de moléculas da sinalização celular no efeito citotóxico de ArtinM sobre as células Raji e Daudi

Ao investigar o efeito de ArtinM em induzir apoptose nas linhagens celulares Raji e Daudi observamos que a atividade citotóxica mediada pela lectina ocorre com intensidade distinta para cada tipo celular, conforme demonstrado na figura 6A-D. Isso indica que as moléculas de sinalização celular envolvidas no efeito citotóxico de ArtinM sejam recrutadas com intensidade distinta entre as células Raji e Daudi, e esse fato pode relacionar com a maior resiliência das células Daudi ao efeito citotóxico de ArtinM. Dessa forma, investigamos o envolvimento de importantes moléculas de sinalização celular, relacionadas a regulação da sobrevivência/apoptose, em resposta ao efeito citotóxico de ArtinM. As moléculas sinalizadoras p38MAPK (SB202190), JNK (SP600125), ERK (PD98059), PKC (H-7) e PTKs (Genisteína) tiveram sua atividade reduzida na presença de inibidores farmacológicos, destacados anteriormente. Com isso, células Raji e Daudi foram previamente incubadas com os inibidores farmacológicos (20 μ M) durante 210 minutos e, em seguida, incubadas com ArtinM nas concentrações de 1,25 μ g/mL (células Raji) e 20,0 μ g/mL (células Daudi). Após 24 h de incubação, o crescimento celular foi determinado pela mensuração da concentração de células viáveis por citometria de fluxo na presença de PI marcador para células não viáveis. Os resultados demonstraram que as células Raji após a incubação com ArtinM (1,25 μ g/mL) tiveram uma redução da concentração celular comparado ao controle negativo (Figura 9A), enquanto as células Raji pré-incubadas com inibidores farmacológicos ainda mantiveram uma redução significativa da concentração celular na presença de ArtinM (Figura 9A). Destaca-se o a capacidade do inibidor de PTK em conjunto com ArtinM em induzir uma redução significativa da concentração celular em comparação às células incubadas somente com ArtinM (Figura 9A). Em relação a concentração celular da linhagem Daudi, as células incubadas com ArtinM (20,0 μ g/mL) apresentaram uma concentração celular ao final de 24 h de incubação que não diferiu significativamente da concentração celular encontrada nas células Daudi incubadas com meio (Figura 9B). Contudo, a prévia incubação das células Daudi com os inibidores das moléculas p38, JNK, PKC e PTK seguido pela incubação com ArtinM repercutiu em uma redução significativa da concentração celular comparado com as células incubadas somente com ArtinM (Figura 9B). Devemos ressaltar o efeito do inibidor da molécula p38MAPK, de forma isolada, em reduzir a concentração celular de Daudi, comparado ao controle negativo (Figura 9B). Esses dados reforçam a hipótese de que as moléculas de sinalização celular estudadas estão envolvidas de forma distinta no efeito citotóxico de ArtinM em células Raji e Daudi.

Figura 9. Efeito citotóxico de ArtinM em células Raji e Daudi pode ser intensificado na presença dos inibidores farmacológicos das moléculas sinalizadoras p38, JNK, ERK, PKC ou PTK. As células Raji e Daudi (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e previamente incubadas ou não com os inibidores farmacológicos (20 μ M), como: SB202190 (inibidor de p38MAPK), SP600125 (inibidor de JNK), PD98059 (inibidor de ERK), H-7 (inibidor de PKC) e Genisteína (inibidor de PTK). Após 210 minutos, as células foram estimuladas com ArtinM nas concentrações de 1,25 μ g/mL (células Raji) ou 20,0 μ g/mL (células Daudi), por 24 horas a 37 °C. Trióxido de Arsênio (AS₂O₃) nas concentrações de 12 μ M (Raji) ou 24 μ M (Daudi) foi utilizado como controle positivo da indução de morte celular, e apenas meio de cultura foi utilizado como controle negativo (Meio). Após o tempo de cultivo celular, a concentração de células viáveis (células/mL) foi determinada através de citometria de fluxo com marcação para PI das células não viáveis. Os resultados são expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM) de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,05$ (*); $p < 0,001$ (**); $p < 0,0001$ (****).

Considerando que o efeito de ArtinM em reduzir o crescimento das células Raji no período de 24 h não foi revertido através da inibição das moléculas sinalizadoras p38MAPK, JNK, ERK, PKC e PTK, a capacidade desses inibidores farmacológicos em alterar a frequência de células Raji positivas para Anexina-V e PI na presença de ArtinM foi considerada. Assim, células Raji foram previamente incubadas com os inibidores farmacológicos (20 μ M) durante 210 minutos e, em seguida, incubadas com ArtinM (1,25 μ g/mL) por 24 h a 37 °C. A frequência de células marcadas com anexina-V (apoptose inicial) ou duplamente marcadas com anexina-V/PI (apoptose tardia) foi determinada por citometria de fluxo. Conforme apresentado na Figura 10A, o inibidor de JNK (SP600125) de forma isolada, após incubação prévia com células Raji, foi o único a promover um aumento da frequência de células anexina-V⁺/PI⁻ (apoptose inicial), comparado ao controle negativo (Meio) (Figura 10A). Dentre as moléculas inibidoras testadas, ficou evidente que a inibição da molécula PKC elevou a frequência de células Raji positivas para anexina-V⁺ devido a presença de ArtinM, comparado com as células incubadas somente com ArtinM (Figura 10C). Por outro lado, a molécula p38MAPK quando inibida resultou na

redução da frequência de células Raji positivas para anexina- V^+ na presença de ArtinM (Figura 10C). Ao avaliarmos os níveis de células Raji anexina- V^+ /PI $^+$ positivas, os dados demonstram que as células previamente incubadas com os inibidores e incubadas com ArtinM não tiveram uma alteração significativa na frequência de células Raji anexina- V^+ /PI $^+$ comparado ao grupo cultivo na presença somente de ArtinM (Figura 10B, D). Ao considerarmos a análise conjunta do crescimento das células Raji sob o efeito das moléculas inibidoras e na presença de ArtinM (Figura 9A) e a detecção de células positivas para anexinaV, podemos concluir que as moléculas PTK e PKC quando inibidas contribuem com o efeito citotóxico de ArtinM.

Figura 10. A inibição de proteína tirosina quinase C (PKC) intensifica o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji. As células Raji (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e previamente incubadas ou não com os inibidores farmacológicos (20 μ M), como: SB202190 (inibidor de p38MAPK), SP600125 (inibidor de JNK), PD98059 (inibidor de ERK), H-7 (inibidor de PKC) e Genisteína (inibidor de PTK). Após 210 minutos, as células foram estimuladas com ArtinM (1,25 μ g/mL) por 24 horas a 37 °C. Trióxido de Arsênio (AS₂O₃; 12 μ M) foi utilizado como controle positivo da indução de morte celular e apenas meio de cultura foi utilizado como controle negativo (Meio). **(A-C)** Após o tempo de incubação, as células foram incubadas com anexina V-FITC (5,0 μ g/mL) e PI (10,0 μ g/mL), e a frequência (%) de células Raji marcadas com anexinaV-FITC e/ou duplamente marcadas com anexinaV-FITC/PI foi determinada por citometria de fluxo. **(A)** As barras verticais representam a frequência de células Raji marcadas com anexinaV-FITC e/ou duplamente marcadas com anexinaV-FITC/PI que foram estimuladas apenas com os inibidores farmacológicos; **(B,C)** Frequência de células Raji marcadas com marcadas com anexinaV-FITC e/ou duplamente marcadas com anexinaV-FITC/PI que foram estimuladas com ArtinM na presença ou ausência dos inibidores farmacológicos. As barras verticais representam valores expressos em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) ou as células estimuladas apenas com ArtinM apresentaram $p < 0,05$ (*), $p < 0,0001$ (****).

2.6 Inibição da atividade de fosfatase de CD45 sobre Lck intensifica o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji

Ao final da caracterização do efeito citotóxico de ArtinM em células Raji e Daudi através de marcadores de apoptose, indicamos moléculas de sinalização com estreita associação aos mecanismos envolvidos na morte celular induzida por ArtinM em células Raji. Assim, propusemos a identificar um possível glico-alvo presente na superfície de células B com atividade direta na regulação da sobrevivência celular, tendo a atividade de fosfatase do receptor CD45 como alvo principal. Nesse sentido, consideramos o inibidor farmacológico NQ-301 que impede a defosforilação do resíduo Y505 da molécula Lck pelo receptor CD45, fato que bloqueia a regulação positiva de CD45 sobre Lck. Inicialmente, células Raji e Daudi foram previamente incubadas com NQ-301 em diferentes concentrações durante 210 minutos e, em seguida, incubadas com ArtinM nas concentrações de 1,25 µg/mL (células Raji) e 20,0 µg/mL (células Daudi) por 24 h a 37 °C. Posteriormente, a concentração e a viabilidade celular foram determinadas através da marcação com iodeto de propídio seguido pela análise por citometria de fluxo. Observamos que as células Raji previamente incubadas com NQ-301 e na presença de ArtinM tiveram uma queda significativa da concentração celular comparado ao efeito somente de ArtinM (Figura 11A) e a viabilidade dessas células estavam significativamente reduzidas em comparação às células incubadas com ArtinM (Figura 11A). O efeito sinérgico de NQ-301 e ArtinM na redução da concentração celular de Raji devido à diminuição da viabilidade não foi reproduzido na linhagem celular Daudi (Figura 11B). Esses dados indicam que a regulação positiva de CD45 sobre Lck é capaz de conter um efeito citotóxico aumentado de ArtinM em células Raji.

Figura 11. Inibir a defosforilação de Lck realizada por CD45 intensifica o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji. As células Raji (A) e Daudi (B) (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e previamente estimuladas ou não com diferentes concentrações de NQ-301 (0,5 – 0,1 μ M) por 210 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com ArtinM (1,25 μ g/mL, células Raji; e 20 μ g/mL, células Raji), trióxido de arsênio (AS₂O₃) nas concentrações de 12 μ M (Raji) e 24 μ M (Daudi) como controle positivo ou somente meio de cultura como controle negativo (Meio). Após 24 h, iodeto de propídio (10 μ g/mL) foi adicionado à cultura celular e a incorporação desse marcador foi detectada por citometria de fluxo, permitindo a quantificação da concentração de células viáveis e da frequência de células não viáveis. Os resultados são expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM) de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (**), $p < 0,0001$ (****).

2.7 Quinases da família Src estão envolvidas no efeito citotóxico de ArtinM em células Raji

A participação de Lck na regulação da apoptose induzida por ArtinM em células Raji levou a investigação de outras proteínas tirosina quinases associadas com a regulação da proliferação/sobrevida de células B. Consideramos o inibidor farmacológico Dasatinib que é caracterizado pela capacidade de bloquear a atividade de três principais quinases da família Src presentes em células B, sendo a Lyn, Fyn e Blk. Desta forma, células Raji e Daudi foram previamente incubadas com Dasatinib em diferentes concentrações por 210 minutos e, em seguida, estimuladas ou não com ArtinM nas concentrações de 1,25 µg/mL (células Raji) e 20,0 µg/mL (células Daudi) por 24 h a 37 °C. A utilização de iodeto de propídio com análise por citometria de fluxo permitiu determinar a concentração e a viabilidade celular frente as diferentes condições de cultivo. As células Raji com prévia incubação com Dasatinib e na presença de ArtinM apresentou uma elevação significativa na concentração celular comparado aos níveis desencadeados pela incubação somente com ArtinM (Figura 12A), e o efeito inibitório promovido por Dasatinib resultou em maior viabilidade celular de células Raji incubadas com ArtinM (Figura 12A). No caso das células Daudi, constatamos que a incubação prévia com as diferentes concentrações de Dasatinib, na ausência de ArtinM, já reduz de forma significativa o crescimento celular, comparado ao controle negativo (Figura 12B). Em relação as células Daudi pré-incubadas com Dasatinib e na presença de ArtinM não verificamos um efeito sinérgico da lectina na redução da concentração e viabilidade celular em comparação as células tratadas somente com Dasatinib (Figura 12B). Em especial nos dados gerados com as células Raji, podemos inferir que quinases da família Src medeiam a morte celular desencadeada por ArtinM.

Figura 12. Proteínas tirosina quinases da família Scr medeiam o efeito citotóxico de ArtinM em células Raji. As células Raji e Daudi (1×10^5 células/mL) foram distribuídas em microplacas de 96 poços e previamente estimuladas ou não com Dasatinib em diferentes concentrações (0,5 – 0,1 μ M) por 210 minutos. Por conseguinte, as células foram estimuladas com ArtinM nas concentrações de 1,25 μ g/mL (células Raji) e 20,0 μ g/mL (células Daudi), por 24 h a 37 °C. Trióxido de Arsênio (As_2O_3) nas concentrações de 12 μ M (Raji) e 24 μ M (Daudi) foi utilizado como controle positivo da indução de morte celular e apenas meio de cultura adotado como controle negativo (Meio). Após 24 h, iodeto de propídio (10 μ g/mL) foi adicionado à cultura celular e a incorporação desse marcador foi detectada por citometria de fluxo, permitindo a quantificação da concentração de células viáveis e da frequência de células não viáveis. Os resultados são expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM) de três experimentos independentes realizados em triplicatas. Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) apresentaram $p < 0,0001$ (****).

2.8 Quinases da família Src e a regulação de Lck ativa atuam de forma antagônica no efeito citotóxico de ArtinM em células Raji

Buscamos correlacionar o efeito de ArtinM na curva de crescimento e viabilidade de células Raji, na presença dos inibidores NQ-301 e Dasatinib, com a capacidade desses inibidores em alterar a frequência de células Raji anexina-V⁺/PI⁺ em resposta a lectina. Para isso, células Raji foram previamente incubadas com NQ-301 e Dasatinib (0,2μM) durante 210 minutos e, em seguida, estimuladas com ArtinM (1,25μg/mL) por 24 horas. A ocorrência de células Raji positivas para anexina-V (apoptose inicial) e duplo-positivas para anexina-V/PI (apoptose tardia) foi determinada por citometria de fluxo. A incubação de células Raji com os inibidores não desencadeou um aumento significativo na frequência de células positivas para anexina-V⁺ ou anexina-V⁺/PI⁺, em comparação ao controle negativo (Figura 13A-C). No caso de células Raji incubadas com ArtinM, na presença do NQ-301, constatamos um aumento significativo na frequência de células positivas para anexina-V⁺ comparado com as células incubadas somente com ArtinM (Figura 13B), mas esse dado foi observado na análise de células Raji anexina-V⁺/PI⁺ (Figura 13B). Por outro lado, a frequência de células Raji anexina-V⁺/PI⁺ foi significativamente reduzida após incubação com o inibidor Dasatinib e na presença de ArtinM em relação as células incubadas somente com ArtinM (Figura 13C). Já a frequência de células Raji anexina-V⁺ se manteve inalterado entre as condições sob a incubação com ArtinM e na presença ou não de Dasatinib (Figura 13C) Esse conjunto de dados reforça que a regulação positiva de CD45 sobre Lck e as quinases da família Src atuam diretamente na intensificação e bloqueio, respectivamente, do efeito citotóxico de ArtinM em células Raji.

Figura 13. Quinases da família Src e a regulação de Lck ativa atuam distintamente na frequência de células Raji anexina-V+/PI+. As células Raji [1×10^5 células/mL] foram distribuídas em microplacas de 96 poços e previamente estimuladas ou não com os inibidores farmacológicos NQ-301 e Dasatinib na concentração de 0,2 μ M, por 210 minutos. Em seguida, as células foram estimuladas com ArtinM (1,25 μ g/mL), trióxido de arsênio (AS_2O_3) na concentração de 12 μ M como controle positivo ou somente meio de cultura como controle negativo (Meio). Após o tempo de incubação, as células foram incubadas com anexina-V-FITC [5,0 μ g/mL] e PI [10,0 μ g/mL]. A frequência de células Raji marcadas com anexina-V e/ou duplamente marcadas com anexina-V/PI foi determinada por citometria de fluxo, com valores expressos em porcentagem. As barras verticais representam valores expressos em média $\pm$ Erro Padrão da Média (SEM). Valores com diferenças significativas em relação ao controle negativo (Meio) ou ao estímulo apenas com ArtinM apresentaram $p < 0,05$ (*), $< 0,0001$ (****).

DISCUSSÃO

A capacidade da lectina ArtinM em modular células da imunidade inata (BARBOSA-LORENZI *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2017b; MARIANO *et al.*, 2014a; RICCI-AZEVEDO *et al.*, 2016; TOLEDO *et al.*, 2009) e adaptativa (DA SILVA *et al.*, 2014, 2017a) tem sido amplamente estudado pelo nosso grupo para elucidar os mecanismos envolvidos no direcionamento da resposta imunitária de perfis Th1 e Th17 induzido por ArtinM, como caracterizado em modelos *in vitro* e *in vivo*. Essa propriedade de ArtinM tem extrema relevância no controle de infecções causadas por patógenos intracelulares, pois os mediadores pró-inflamatórios desencadeados por ArtinM via reconhecimento de carboidrato tem favorecido uma resposta imunitária efetora do hospedeiro contra diferentes patógenos intracelulares (CARDOSO *et al.*, 2011; COLTRI *et al.*, 2008; CUSTODIO *et al.*, 2011; PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001; RICCI-AZEVEDO *et al.*, 2016; RUAS *et al.*, 2018). A interação de ArtinM com N-glicanas localizadas em receptores como TLR2/CD14 e a cadeia γ de CD3 se tornou o principal mecanismo de ativação desencadeado por ArtinM sobre células da imunidade inata e adaptativa, respectivamente (DA SILVA *et al.*, 2017b; MARIANO *et al.*, 2014a; SOUZA *et al.*, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Contudo, estudo recente do grupo realizado por Oliveira-Brito *et al.* demonstrou que N-glicanas associadas aos receptores TLR2/CD14 não mediarão a ativação de células B murinas induzida por ArtinM, fato relacionado com a produção das citocinas IL-17 e IL-12p40 (OLIVEIRA-BRITO; ROQUE-BARREIRA; DA SILVA, 2018b). Outra evidência que sugeriu um envolvimento de células B murinas no efeito imunomodulador promovido pela administração de ArtinM foi relatado por Oliveira-Brito *et al.* que observou uma elevação significativa da frequência de células B esplênicas em BALB/c naïve que recebeu ArtinM via subcutânea (OLIVEIRA BRITO *et al.*, 2017a). Esses fatores indicaram a necessidade de investigar os efeitos biológicos de ArtinM em células B decorrente da interação com glicoproteínas de superfície e elucidar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos.

Nos estudos que caracterizam os efeitos biológicos de lectinas, a avaliação da atividade mitocondrial por MTT é comumente aplicada para prever possíveis efeitos citotóxicos da lectina em diferentes tipos celulares (CASELLA-MARTINS *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2019, 2018; NOLTE *et al.*, 2012; PALHARINI *et al.*, 2017; PROCÓPIO *et al.*, 2017). A estratégia de investigar o efeito citotóxico de ArtinM em diferentes tipos celulares através do ensaio de MTT foi útil para relacionar a capacidade de diferentes concentrações de ArtinM com a alteração da atividade mitocondrial nas células estudadas (CARVALHO *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2014). Nesse sentido, a avaliação da atividade mitocondrial de células B murinas

na presença de ArtinM foi capaz de detectar um possível efeito citotóxico, principalmente, de altas concentrações de ArtinM. Por outro lado, as menores concentrações de ArtinM testadas sugeriram um possível efeito na ativação de células B. Essas observações alinham com estudos prévios do grupo que constatarem a capacidade de ArtinM, em baixas concentrações (0,625 – 1,25 µg/mL), em induzir um aumento da atividade mitocondrial de células T CD4⁺ e T CD8⁺ murinas. Por outro lado, concentrações elevadas de ArtinM, a partir de 2,5 µg/mL, foram vinculadas com um perfil de redução da atividade mitocondrial de células T murinas (DA SILVA *et al.*, 2014, 2017a). Essa relação da concentração de ArtinM e um possível efeito citotóxico sobre células da imunidade é constatado seguidamente pelos estudos do grupo. De forma semelhante, a relação da concentração de ArtinM com a alteração da atividade mitocondrial de células B foi replicada para a lectina BambL que reduz a viabilidade de células B murinas de maneira dose-dependente (WILHELM *et al.*, 2019). A lectina BambL tem domínio de reconhecimento para o ácido siálico e foi hábil na indução da apoptose de células B murinas mediado pela via canônica de BCR. Destaca-se a capacidade de BambL em concentrações específicas de induzir a ativação de células B murinas (WILHELM *et al.*, 2019).

Estudos prévios evidenciaram uma correlação direta entre o aumento da atividade mitocondrial de células T murinas e a maior produção de IL-2 em decorrência do estímulo com ArtinM (DA SILVA *et al.*, 2014, 2017a). Sabemos que a avaliação dos níveis de IL-2 se aplicam ao presente estudo pois essa citocina atua como um regulador crítico da diferenciação e proliferação de linfócitos (DE MELO *et al.*, 2011; KENNEL; GOULD; SALAMAN, 2014; VALLE-MENDIOLA *et al.*, 2016). Desta forma, investigamos a possibilidade do efeito de ArtinM em desencadear a proliferação de células B murinas como relatado para as células T, no entanto, constatou-se que a proliferação de células B murinas e sua produção de IL-2 estavam ausentes nas diferentes concentrações de ArtinM avaliadas. Essas observações sugerem que o(s) glico-alvo(s) de ArtinM em células B murinas estejam fracamente envolvidos com a indução da proliferação celular. Diferentes lectinas com os mais diversos domínio de reconhecimento de carboidrato interagem com estruturas glicosiladas na superfície de linfócitos T induzindo a proliferação celular (DE SIQUEIRA PATRIOTA *et al.*, 2019a), como exemplificado pelas lectinas: ConBr (*Canavalia brasiliensis*) – ligante de glicose/manose (DE OLIVEIRA SILVA *et al.*, 2011), Jacalina (*Artocarpus heterophyllus*) – ligante de galactose (PINEAU *et al.*, 1990), ConA (*Canavalia ensiformis*) – ligante de glicose/manose (CAVADA *et al.*, 2019b); RcaL (*Rachycentron canadum*) – ligante de metil- α -D-manopiranosídeo (CORIOLANO *et al.*, 2012); ApuL (*Alpinia purpurata*) – ligante de fetuína e ovalbumina (DE

SANTANA BRITO *et al.*, 2017) e Cramoll (*Cratylia mollis*) – ligante de glicose/manose (DE MELO *et al.*, 2011). Por outro lado, poucos estudos abordam o efeito de lectina de planta na proliferação de células B murinas (BHUTIA; MALLICK; MAITI, 2009; WILHELM *et al.*, 2019) e há relatos de lectinas que induzem a proliferação somente de células T (BAINS *et al.*, 2005). Ainda nessa linha, também é visto o efeito de lectina de planta na ativação de células B murinas com a ausência de efeito biológico em células T murinas (HUANG *et al.*, 2008). Outras lectinas como Mistletoe-1 (*Viscum album*) (HOSTANSKA *et al.*, 1995) e WGA (aglutinina do germe de trigo) (KILPATRICK; MCCURRACH, 1987; REED *et al.*, 1985) não repercutem na proliferação linfocítica, embora essas lectinas induzam a ativação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Portanto, a capacidade de ArtinM em induzir a proliferação celular somente em linfócitos T é um achado pertinente com estudos prévios de lectinas de plantas.

Os resultados de atividade mitocondrial reduzida em células B incubadas com altas concentrações de ArtinM tem forte relação com um efeito citotóxico da lectina, fato reportado em outros estudos que observaram um efeito citotóxico de lectinas em diferentes tipos celulares após detectarem uma redução da atividade mitocondrial (ARAÚJO *et al.*, 2013; FAHEINAMARTINS *et al.*, 2012; POIROUX *et al.*, 2019). Desta forma, partimos para uma investigação mais específica da ocorrência de apoptose em células B estimuladas com ArtinM. Corroborando com nossos dados de atividade mitocondrial de células B incubadas com ArtinM, a verificação da marcação de anexina-V e iodeto de propídeo em células B murinas na presença de ArtinM demonstrou níveis elevados de células apoptóticas causados pela lectina. Esse efeito de ArtinM foi reportado em diferentes lectinas com CRDs muito distintos, também frente as células B. Segundo Ma *et al.*, a lectina Jacalina (*A. heterophyllus*), uma lectina de ligação à galactose, induziu apoptose de células B (MA *et al.*, 2009), fato não evidenciado em células T purificadas e na presença de Jacalina mesmo em elevadas concentrações (BABA *et al.*, 2007). Estudo recente demonstra que células B murinas estimuladas com BambL (*Burkholderia ambifaria*), lectina ligante de fucose, expressam níveis elevados de marcadores de apoptose após a ativação celular caracterizada pela liberação de Ca^{2+} intracelular, aumento na expressão de CD86 e secreção de TNF- α (WILHELM *et al.*, 2019). Podemos perceber que as células B murinas possuem receptores glicosilados de forma N- e O-ligados que medeiam a apoptose desse tipo celular através da interação com carboidratos presentes no core ou na terminação da cadeia de glicana.

A atividade imunomoduladora de ArtinM tem sido extensivamente explorada pelo nosso grupo, e a diferenciação dos perfis Th1 e Th17 induzidos por ArtinM foram descritos a

partir de modelos *in vitro* e *in vivo* através da caracterização de mediadores pró-inflamatórios específicos e marcadores de diferenciação de células T CD4⁺ (DA SILVA *et al.*, 2017b; MARIANO *et al.*, 2014b; OLIVEIRA BRITO *et al.*, 2017b; SOUZA *et al.*, 2013). Nessa abordagem, as células B murinas foram capazes de produzirem níveis elevados de IL-17 em resposta a ArtinM (OLIVEIRA-BRITO; ROQUE-BARREIRA; DA SILVA, 2018b), porém devemos ressaltar que as concentrações da lectina indutoras desse perfil em células B murinas acarretam um efeito citotóxico como visto no presente estudo. Com o intuito de investigar a ocorrência de células B murinas produtoras de IL-12 e IFN- γ , adotamos concentrações de ArtinM com reduzido efeito citotóxico, para abordar a contribuição desse tipo celular na montagem da resposta de perfil Th1. Constatamos que ArtinM nas concentrações testadas não induziu um aumento na frequência de células B produtoras de IL-12 e IFN- γ , isso demonstra que as células B murinas tenham um papel muito restrito na diferenciação do perfil Th1 induzido por ArtinM. Porém, a atividade imunomoduladora da lectina MPL (*Musca domestica*), ligante de galactose, utiliza da interação com células B para induzir a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-12 (CAO *et al.*, 2011). Em contrapartida, lectinas podem atuar como reguladoras da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL-12, IFN- γ e TNF- α) por células T, como demonstrado pela atividade de galectina-1 (ligante de β -galactosídeos; Gal-1) localizada na superfície de células T (CAMBY *et al.*, 2006; MOTRAN *et al.*, 2008; SANTUCCI *et al.*, 2000). A atividade reguladora de Ga-1 em células T está associada principalmente com os perfis Th1 e Th17 (GORDON-ALONSO; BRUGER; VAN DER BRUGGEN, 2018; HAHN *et al.*, 2004). Portanto, o sítio de reconhecimento por ArtinM em células B murinas apresenta pouca influência na produção de citocinas que direcionam a diferenciação para o perfil Th1. De forma interessante, lectinas com CRD relacionados a glicoconjugados O-ligados demonstram uma atividade biológica em células B murinas mais evidente.

Com o intuito de ampliar a abordagem do efeito citotóxico de ArtinM em células B, se tornou interessante investigar a atividade biológica de ArtinM em linhagens de células B humanas derivadas de linfoma de Burkitt (LB) que é um subtipo de linfoma não-Hodgkin (LNH) (VALLA; FLOWERS; KOFF, 2018). No primeiro momento avaliamos a capacidade de ArtinM em reconhecer carboidrato na superfície das linhagens celulares Raji e Daudi, pois os efeitos biológicos das lectinas devem resultar do reconhecimento de carboidratos específicos (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Como esperado, a ligação de ArtinM na superfície das células Raji e Daudi ocorreu de forma dependente do reconhecimento de manose presente no

core de *N*-glicana. Sabe-se que células tumorais podem expressar glicoconjugados com alterações no padrão de glicosilação o que favorece a progressão tumoral (DALL'OLIO; TRINCHERA, 2017; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016), mas as possíveis glicosilação aberrantes na superfície de células Raji e Daudi ainda são sítios importantes de reconhecimento por ArtinM. Esse fator inclui a lectina ArtinM como uma ferramenta viável na contribuição de estudos relacionados com a descrição da composição de carboidratos localizados na superfície de células Raji e Daudi, pois essa é uma valiosa abordagem comumente adotada devido à alta especificidade do CRD das lectinas (BHUTIA *et al.*, 2019). Lectinas obtidas de diferentes fontes e com CRDs distintos, como a SAL (*Silurus asotus*) – ligante de α -galactosídeo (KAWANO *et al.*, 2009; SUGAWARA *et al.*, 2009), CGL (*Crenomytilus grayanus*) – ligante de Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc (CHERNIKOV *et al.*, 2017), MytiLec (*Mytilus galloprovincialis*) – ligante de α -GalNAc (HASAN *et al.*, 2015) e OLL (*Osmerus lanceolatus*) – ligante de globotriaosilceramida (HOSONO *et al.*, 2014) foram hábeis no reconhecimento de estruturas glicosiladas também na superfície das linhagens celulares Raji e Daudi.

Na abordagem do efeito citotóxico de ArtinM nas linhagens celulares Raji e Daudi consideramos a redução da concentração celular e a marcação de anexina-V e iodeto de propídeo como determinantes para inferir sobre a indução de apoptose por ArtinM. Nossos resultados demonstraram que ArtinM reduziu a concentração celular em ambas as linhagens celulares Raji e Daudi o que repercutiu em uma curva de crescimento celular também reduzido, fato decorrido pelo comprometimento da viabilidade celular. Observamos que somente a concentração de 20 μ M de ArtinM teve efeito na redução da concentração de células Daudi, enquanto as células Raji foram afetadas por um intervalo maior de concentração de ArtinM. Novamente, as células Daudi foram levemente afetadas pelo efeito citotóxico de ArtinM após a análise da marcação de anexina-V e PI por citometria de fluxo, e as células Raji são induzidas a apoptose por diferentes concentrações de ArtinM. Suspeitamos que uma menor concentração celular da linhagem de Daudi, na presença de ArtinM, não repercutiu no aumento de células Daudi positivas para anexina-V/PI devido a um possível efeito de ArtinM em retardar o crescimento dessa linhagem celular. Além disso, ficou evidente que as células Daudi são mais resistentes a indutores de morte celular comparado com as células Raji, pois observamos que 24 μ M de As_2O_3 promove uma menor redução da viabilidade de células Daudi comparado a 12 μ M de As_2O_3 adicionado em células Raji (Figuras 5 e 6).

Outros indutores de apoptose em células Raji através do reconhecimento de carboidratos foram encontrados, como as lectinas Jacalina (*Artocarpus heterophyllus*) (BABA *et al.*, 2007), SAL (*Silurus asotus*) (HOSONO *et al.*, 2014) e ALL (*Artocarpus lingnanensis*) (LUO *et al.*, 2018), com especificidade por diferentes carboidratos. Essa capacidade de ArtinM em induzir a apoptose de células de linhagem de origem leucêmica foi primeiramente relatada por Carvalho *et al.* a partir de células de leucemia mielocítica humana (CARVALHO *et al.*, 2011). A apoptose atua na regulação fina na homeostase entre a geração de novas células e a eliminação de células alteradas e/ou envelhecidas (D'ARCY, 2019; SARVOTHAMAN *et al.*, 2015). Há uma mudança morfológica observada na apoptose que se relaciona com a fragmentação do DNA que é frequentemente utilizado para sugerir a ocorrência do evento de apoptose (MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). Isso possibilitou a investigação de dano ao DNA de células Raji e Daudi na presença de ArtinM, e o efeito indutor de apoptose visto para a lectina não desencadeou a fragmentação do DNA nesses tipos celulares. Essa situação também foi observada em células de leucemia mieloide humana que foram induzidas a apoptose por ArtinM com ausência na detecção de dano ao DNA (CARVALHO *et al.*, 2011). Em outro estudo, Ohba *et al.* demonstraram que a Abrina (*Abrus precatorius*), lectina de ligação a D-galactose, induziu a apoptose de linhagens celulares humana de leucemia linfoblástica aguda (HPB-ALL) e leucemia mielóide (MOLT-4), e esse efeito não foi acompanhado da fragmentação de DNA (OHBA *et al.*, 2004). Os mecanismos efetores envolvidos na apoptose dependem predominantemente da ativação de caspases que clivam múltiplos substratos celulares e, assim, ocorre a fragmentação do DNA (D'ARCY, 2019; LI; YUAN, 2008; PISTRITTO *et al.*, 2016). No entanto, estudos suportam a indução de apoptose com ausência de fragmentação do DNA, sugerindo que o dano ao DNA não é constitutivo do evento de apoptose (SCHULZE-OSTHOFF *et al.*, 1994; ZHANG; XU, 2000; ZHANG *et al.*, 1998).

Por conseguinte, com o intuito de elucidar o mecanismo envolvido na apoptose induzida por ArtinM em células Raji houve a quantificação da expressão relativa de marcadores de apoptose relacionada a via mitocondrial (Caspase-3, Apaf-1 e Smac/Diablo) e marcadores restritos a autofagia (LC3-I, ATG14 e ATG12). Constatamos que ArtinM não elevou os níveis de expressão relativa dos marcadores citados anteriormente. Esses dados devem ser validados através da técnica de western blotting para a pesquisa das formas de caspase-3, assim será coerente a exclusão da via mitocondrial. Estudos tem relatado que a atividade antitumoral desempenhada por diversas lectinas se correlaciona com a ativação de caspases vinculadas com a via mitocondrial (BHUTIA *et al.*, 2019; DE SIQUEIRA PATRIOTA *et al.*, 2019b), como

exemplo, a lectina ALL (*A. Lingnanensis*) induz a apoptose de células Raji através da ativação de caspase-3 (LUO *et al.*, 2018). Em outra linhagem de células leucêmicas também foi constatado o papel da lectina Morniga-G (*Morus nigra*) como indutor de apoptose através da ativação de caspases-8, 9 e 3 (POIROUX *et al.*, 2019). Por outro lado, estudos prévios demonstraram a capacidade das lectinas Abrina (*Abrus precatorius*) e CvL (*Cliona varians*) de induzir a apoptose de linhagens celulares de leucemia linfoblástica aguda humana (CCRF-CEM) e eritroleucemia humana (K562), respectivamente, de maneira independente da atividade de caspases (OHBA *et al.*, 2004; QUEIROZ *et al.*, 2009). Com isso, a indução de apoptose desencadeada por ArtinM em células Raji possivelmente não depende da cascata de apoptose via mitocondrial. Em resposta a sinais externos, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas em uma célula e, assim, direcionar para a proliferação, sobrevivência, morte ou parada do ciclo celular (WADA; PENNINGER, 2004).

Em geral, as moléculas de sinalização regulam os eventos celulares por mecanismos envolvidos na fosforilação/defosforilação de proteínas chaves na via de sinalização celular (NOVAK *et al.*, 2010). Luo *et al.* demonstraram que a indução de apoptose em células Raji mediada pela lectina ALL, ligante de N-acetil-D-galactosamina, é dependente da ativação da via de sinalização de p38 MAPK (LUO *et al.*, 2018). Em outro estudo, demonstraram que o reconhecimento de Gal α 1-4Gal β 1-4Gl pela lectina MytiLec na superfície de células Ramos (linhagem de LB) repercute na indução de apoptose, efeito dependente da ativação das vias MEK/ERK e JNK/p38 MAPK (HASAN *et al.*, 2015). Desta forma, elencamos as principais proteínas quinase como p38 MAPK, JNK, ERK, PKC e PTK para serem inibidas com o objetivo de avaliar o papel dessas moléculas no efeito de ArtinM sobre a taxa de crescimento de células Raji e Daudi. Essa análise constatou que a inibição farmacológica de PTK intensifica a atividade de ArtinM sobre a redução da concentração de células Raji, ou seja, PTK possivelmente regula de forma negativa a capacidade de ArtinM em reduzir o crescimento de células Raji. Por outro lado, em células Jurkat (linhagem de linfócito T oriunda de células leucêmicas) a inibição de PTK reduz a apoptose induzida por ArtinM nessa população celular (DA SILVA *et al.*, 2017a). Já a frequência de células Raji positivas para anexina-V/PI ou somente anexina-V não se altera na presença de ArtinM e do inibidor de PTK, isso sugere que a regulação negativa de PTK sobre o efeito de ArtinM ocorre majoritariamente no evento de proliferação celular. Em relação as células Daudi, destacamos as moléculas JNK, PKC e PTK como reguladoras negativas do efeito de ArtinM em induzir uma menor concentração celular após 24 h de cultivo, pois evidenciamos que os inibidores farmacológicos para JNK, PKC e

PTK intensificam a capacidade de ArtinM em reduzir a taxa de crescimento de células Daudi. Portanto, as moléculas sinalizadoras estudadas atuam de forma diferente na regulação da proliferação de células Raji e Daudi em resposta a capacidade de ArtinM em atuar nesse evento celular.

Em diferentes subtipos de NHLs, a desregulação na cascata de sinalização do BCR contribui com a linfomagenese e sobrevivência de células tumorais. Dentre os componentes envolvidos na sinalização de BCR, as proteínas quinase da família Src participam estritamente com a propagação de sinais pró-sobrevivência (VALLA; FLOWERS; KOFF, 2018). Nessa abordagem, o receptor CD45 é um importante regulador positivo e negativo da cascata de sinalização oriunda do BCR, e essa atividade de CD45 utiliza a molécula Lck como mediador do processo de regulação. Além disso, o receptor CD45 apresenta vários sítios de N-glicosilação que são potenciais glico-alvos de ArtinM na superfície de células Raji e Daudi. Nessa linha, diversos estudos relataram que o receptor CD45 expresso em células B é reconhecido por lectinas como PNA (*Arachis hypogaea*) (GIOVANNONE *et al.*, 2018c), Jacalina (MA *et al.*, 2009) e Galectina-9 (GIOVANNONE *et al.*, 2018a). Baseados nessas evidências, investigamos o envolvimento da atividade regulatória de CD45 na sinalização desencadeada, principalmente, pelo BCR no mecanismo de ArtinM em induzir uma redução da taxa de crescimento e viabilidade de células Raji e Daudi. Como estratégia experimental adotamos o inibidor farmacológico NQ301 que bloqueia a defosforilação do resíduo Y505 da molécula Lck através da atividade fosfatase de CD45, isso mantém Lck inativada impedindo sua atividade de fosforilação da cauda citoplasmática do BCR que resulta na sinalização. De forma interessante, constatamos que o inibidor NQ301 intensifica a capacidade de ArtinM em reduzir o crescimento e viabilidade de células Raji, principalmente. Além disso, o inibidor NQ301 na presença de ArtinM induz uma maior frequência de células Raji positivas para anexina-V. Com base nesses dados e na revisão de Rheinlander *et al.* duas hipóteses podem ser postuladas considerando a intensidade de clusterização do receptor CD45, como: (i) na situação de média para baixa intensidade de clusters da molécula de CD45, o inibidor NQ301 impede que CD45 regule positivamente o sinal de sobrevivência via BCR o que favorece o efeito citotóxico de ArtinM sobre as células Raji; (ii) maior intensidade na clusterização de CD45 acarreta uma regulação negativa desse receptor sobre o sinal de sobrevivência via BCR, pois CD45 defosforila a forma ativada de Lck, e isso atua sinergicamente com o inibidor NQ301 que intensifica a regulação negativa de CD45, como resultado o efeito citotóxico de ArtinM se sobressai (RHEINLÄNDER; SCHRAVEN; BOMMARDT, 2018).

Em estudos prévios, foi demonstrado que na transdução de sinais a partir do BCR presente em células de leucemia linfóide crônica (LLC), a ativação de Lck catalisa a fosforilação de CD79a que medeia a ativação de PI3K/Akt, NF- κ B e MAPK, fato que prolonga a sobrevivência celular (TALAB *et al.*, 2013). Também foi visto o envolvimento de Lck na transdução de sinais do BCR em células B-1, pois na ausência de Lck essa sinalização do BCR foi deficitária (DAL PORTO; BURKE; CAMBIER, 2004). Esse papel de Lck foi preponderante na indução da apoptose de células T incubadas com a lectina Galectina-1 (Gal-1) que depende da fosforilação de Lck para que a apoptose desse tipo celular seja constatada, como comprovado em células T deficientes de Lck (ION *et al.*, 2005).

As quinases da família Src (SFKs), como Lyn, Fyn e Blk, são requeridas em várias funções de células B, incluindo diferenciação, proliferação e sobrevivência (ROSKOSKI, 2005). Essas quinases são fortemente reguladas pela atividade fosfatase de CD45 e, consequentemente, interferindo na sinalização do BCR (ZIKHERMAN *et al.*, 2012). Em particular, Lyn tem papel crucial na cascata de sinal do BCR que é conhecida como sinalização tônica, evento que ocorre independente da interação BCR-antígeno. Além disso, Lyn contribui com a ativação da via PI3K/AKT que coordena *downstream* os mecanismos efetores e regulatórios de sobrevivência e do ciclo celular, respectivamente (VALLA; FLOWERS; KOFF, 2018). A partir do envolvimento de Lyn, Fyn e Blk com a sinalização do eixo BCR/CD45, foi necessário investigarmos a influência da atividade de quinases da família Src no efeito citotóxico de ArtinM sobre células Raji e Daudi. Novamente, adotamos um inibidor farmacológico específico para quinases da família Src, denominado Dasatinib, analisar se essas moléculas atuam regulando de forma positiva ou negativa a redução da viabilidade celular induzida por ArtinM. Constatamos que a inibição quinases da família Src em células Raji, na presença de ArtinM, resultou em uma taxa de crescimento e viabilidade celular aumentada em relação as células Raji incubadas somente com ArtinM. Na avaliação da marcação de células Raji positivas para anexina-V/PI foi evidente a inibição da apoptose induzida por ArtinM em resposta a inibição por Dasatinib. Esses dados demonstraram que as quinases da família Src são reguladores positivos do efeito citotóxico de ArtinM em células Raji, fato que reforça o papel de BCR e CD45 como possíveis alvos de reconhecimento por ArtinM. Esse conjunto de moléculas também se destacaram durante a interação de Gal-9 com CD45 na superfície de células B, que suprime a ativação e proliferação celular por meio de um mecanismo dependente da ativação de Lyn, que favorece a ativação de vias de sinalização inibitórias envolvendo CD22 (co-receptor inibitório) e a tirosina fosfatase SHP-1 (GIOVANNONE *et al.*, 2018a). Em

linfomas de Burkitt (LB), a sinalização tônica de BCR é frequentemente cooptada por meio de perturbações do eixo PI3K, para garantir a sobrevivência celular e, portanto, desencadear a linfomagenese (SANDER *et al.*, 2012).

CONCLUSÃO

O presente trabalho evidencia que o efeito imunomodulador da lectina ArtinM sobre células B murinas não favorece o eixo de diferenciação Th1, e a lectina induz a apoptose de células B murinas de maneira dose-dependente. Esse efeito citotóxico de ArtinM ocorre em linhagens de linfoma não-Hodgkin, como as células Raji e Daudi, com PTK e PKC regulando negativamente a apoptose induzida por ArtinM. O efeito citotóxico de ArtinM em células Raji é regulado diretamente pela atividade de fosfatase de CD45 sobre Lck e pelas quinases da família Src.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE-MALLER, Ana Claudia Paiva *et al.* Therapeutic Administration of Recombinant Paracoccin Confers Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection: Involvement of TLRs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003317>
- ALEGRE, Ana Claudia Paiva *et al.* Recombinant Paracoccin Reproduces the Biological Properties of the Native Protein and Induces Protective Th1 Immunity against *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 1–11, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002788>
- ALLMAN, David; PILLAI, Shiv. **Peripheral B cell subsets**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.014>
- ALMEIDA, Fausto *et al.* Galectin-3 impacts *Cryptococcus neoformans* infection through direct antifungal effects. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1968, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02126-7>
- ALMEIDA, Fausto Bruno Dos Reis *et al.* Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis*; purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. **Yeast**, [S. l.], v. 27, n. 2, p. 67–76, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/yea.1731>
- ALUGUPALLI, K. R. **A distinct role for B1b lymphocytes in T cell-independent immunity**. [S. l.: s. n.] Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-540-73900-5_5
- APPELGREN, Daniel *et al.* Marginal-Zone B-Cells are main producers of IgM in humans, and are reduced in patients with autoimmune vasculitis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02242>
- ARAÚJO, Larissa Cardoso Corrêa *et al.* Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS ONE**, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081973>
- ARNOLD, James N. *et al.* The Glycosylation of Human Serum IgD and IgE and the Accessibility of Identified Oligomannose Structures for Interaction with Mannan-Binding Lectin. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6831>
- ASADBEIGI, Sepideh N.; DEEL, Chelsey D. Burkitt-Like Lymphoma with 11q Aberration: A Case Report and Review of a Rare Entity. **Case Reports in Hematology**, [S. l.], v. 2020, p. 1–6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/8896322>
- ATALLAH-YUNES, Suheil Albert; MURPHY, Dermot J.; NOY, Ariela. HIV-associated Burkitt lymphoma. **The Lancet Haematology**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. e594–e600, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(20\)30126-5](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(20)30126-5)
- AZIZ, Monowar *et al.* **The role of B-1 cells in inflammation**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8708-3>
- AZIZ, Monowar *et al.* B-1a Cells Protect Mice from Sepsis: Critical Role of CREB. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602056>
- AZIZ, Monowar *et al.* B-1a cells protect mice from sepsis-induced acute lung injury. **Molecular Medicine**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0029-2>
- BABA, Makoto *et al.* Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.1106660>
- BAINS, Jagmohan Singh *et al.* Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.02.006>
- BARBOSA-LORENZI, Valéria Cintra *et al.* The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 416, n. 3–4, p. 318–324, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.033>
- BARBOSA-LORENZI, Valéria Cintra *et al.* Recombinant ArtinM activates mast cells. **BMC Immunology**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0161-0>

- BARONDES, Samuel H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90235-6)
- BASSO, Katia; DALLA-FAVERA, Riccardo. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3814>
- BAUM, Linda G.; COBB, Brian A. **The direct and indirect effects of glycans on immune function**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx036>
- BHUTIA, Sujit K. *et al.* **Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>
- BHUTIA, Sujit K.; MALLICK, Sanjaya K.; MAITI, Tapas K. In vitro immunostimulatory properties of Abrus lectins derived peptides in tumor bearing mice. **Phytomedicine**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.01.006>
- BIEBERICH, Erhard. Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins. In: [S. l.: s. n.]. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1154-7_3
- BOLLER, Sören; GROSSCHEDL, Rudolf. The regulatory network of B-cell differentiation: A focused view of early B-cell factor 1 function. **Immunological Reviews**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12206>
- BONZI, Jeremy *et al.* Pre-B cell receptor binding to galectin-1 modifies galectin-1/carbohydrate affinity to modulate specific galectin-1/glycan lattice interactions. **Nature Communications**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7194>
- BORNHÖFFT, Kim F. *et al.* **Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.05.008>
- BOYD, William C.; SHAPLEIGH, Elizabeth. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, [S. l.], 1954. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.119.3091.419>
- BURANELLO, Patricia A. A. *et al.* The lectin ArtinM activates RBL-2H3 mast cells without inducing degranulation. **PLoS ONE**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230633>
- BURGER, Jan A.; WIESTNER, Adrian. **Targeting B cell receptor signalling in cancer: Preclinical and clinical advances**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.121>
- CAMBY, Isabelle *et al.* **Galectin-1: A small protein with major functions**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl025>
- CAO, Anh *et al.* Galectin-9 binds IgM-BCR to regulate B cell signaling. **Nature Communications**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05771-8>
- CAO, Xiaohong *et al.* A lectin from Musca domestica pupae stimulates B cell proliferation and enhances IL-12 production via ERK1/2-NF- κ B signaling pathways. **Biotechnology Letters**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0601-0>
- CARDOSO, Mariana R. D. *et al.* ArtinM, a d-mannose-binding lectin from Artocarpus integrifolia, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against Neospora caninum. **Vaccine**, [S. l.], v. 29, p. 9183–9193, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.136>
- CARIAPPA, Annaiah *et al.* B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 206, n. 1, p. 125–138, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20081399>
- CARSETTI, Rita. **The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.191.1.5>
- CARVALHO, Elba V. M. M. *et al.* **Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.003>
- CARVALHO, Elba V. M. M. *et al.* Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. **Life Sciences**, [S. l.], v. 207, p. 152–157, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.003>
- CARVALHO, Fernanda Caroline *et al.* The recognition of N-glycans by the lectin ArtinM mediates cell death of a human myeloid leukemia cell line. **PLoS ONE**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027892>

- CARVALHO, Maria Eduarda T. *et al.* Evaluating the glycophenotype on breast cancer tissues with quantum dots-Cramoll lectin conjugates. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.088>
- CASELLA-MARTINS, Andrea *et al.* Immunomodulatory activity of Tityus serrulatus scorpion venom on human T lymphocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0046-3>
- CATT, J. W.; PEACOCK, M. A.; HARRISON, F. L. Surface localization of an endogenous lectin in rabbit bone marrow. **The Histochemical Journal**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 189–199, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01003218>
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* ConBr, the Lectin from Canavalia brasiliensis Mart. Seeds: Forty Years of Research. **Current Protein & Peptide Science**, [S. l.], 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389203720666190104123210>
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* **One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100>
- CERUTTI, Andrea; COLS, Montserrat; PUGA, Irene. **Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- CHANG, Veronica T. *et al.* Initiation of T cell signaling by CD45 segregation at “close contacts”. **Nature Immunology**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.3392>
- CHERNIKOV, Oleg *et al.* Lectin CGL from the sea mussel Crenomytilus grayanus induces Burkitt’s lymphoma cells death via interaction with surface glycan. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.074>
- CHUGH, Seema *et al.* **Pathobiological implications of mucin glycans in cancer: Sweet poison and novel targets.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.003>
- CLARK, Edward A.; GILTIAI, Natalia V. **CD22: A Regulator of Innate and Adaptive B Cell Responses and Autoimmunity.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02235>
- CLARK, Mary C.; BAUM, Linda G. **T cells modulate glycans on CD43 and CD45 during development and activation, signal regulation, and survival.** [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06304.x>
- COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins as Antimicrobial Agents. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 125, n. 5, p. 1238–1252, 2018.
- COLLINS, Brian E. *et al.* Constitutively unmasked CD22 on B cells of ST6Gal I knockout mice: Novel sialoside probe for murine CD22. **Glycobiology**, [S. l.], 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwf067>
- COLTRI, Kely C. *et al.* Paracoccin, a GlcNAc-binding lectin from Paracoccidioides brasiliensis, binds to laminin and induces TNF- α production by macrophages. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 704–713, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.008>
- COLTRI, Kely C. *et al.* Therapeutic administration of KM+lectin protects mice against Paracoccidioides brasiliensis infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 173, p. 423–432, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.080126>
- COLTRI, Kely C. *et al.* Protection against Paracoccidioides brasiliensis infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 792–796, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/13693780903501671>
- CORIOLO, M. C. *et al.* Rachycentron canadum (cobia) Lectin Promoted Mitogenic Response in Mice BALB/c Splenocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02774.x>
- COUGHLIN, Sarah *et al.* An extracatalytic function of CD45 in B cells is mediated by CD22. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1519925112>
- COURTNEY, Adam H. *et al.* Sialylated multivalent antigens engage CD22 in trans and inhibit B cell activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0807207106>

- CUSTODIO, Luiz Antonio *et al.* Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, [S. l.], v. 11, p. 1510–1515, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.05.005>
- CYSTER, Jason G.; ALLEN, Christopher D. C. **B Cell Responses: Cell Interaction Dynamics and Decisions**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>
- D'ARCY, Mark S. **Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- DA SILVA, José Dayvid Ferreira *et al.* *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.188>
- DA SILVA, Pollyanna Michelle *et al.* PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.039>
- DA SILVA, T. A. *et al.* IL-17 Induction by ArtinM is Due to Stimulation of IL-23 and IL-1 Release and/or Interaction with CD3 in CD4⁺ T Cells. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 11, n. e0149721, p. 1–16, 2016.
- DA SILVA, Thiago Aparecido *et al.* Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. **Cell and tissue research**, [S. l.], v. 357, p. 719–730, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1879-8>
- DA SILVA, Thiago Aparecido *et al.* Artinm mediates murine T cell activation and induces cell death in jurkat human leukemic T cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 1–21, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18071400>
- DA SILVA, Thiago Aparecido *et al.* CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. **Scientific Reports**, [S. l.], 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07397-0>
- DA SILVA, Thiago Aparecido *et al.* ArtinM: Purification and Evaluation of Biological Activities. In: **Methods in Molecular Biology**. [S. l.: s. n.]. p. 349–358. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0430-4_34
- DAL PORTO, Joseph M.; BURKE, Kathy; CAMBIER, John C. Regulation of BCR signal transduction in B-1 cells requires the expression of the Src family kinase Lck. **Immunity**, [S. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.018>
- DALL'OLIO, Fabio; TRINCHERA, Marco. **Epigenetic bases of aberrant glycosylation in cancer**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18050998>
- DAVIS, Randall S. FCRL regulation in innate-like B cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.12771>
- DE MELO, C. M. L. *et al.* Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. **Scandinavian journal of immunology**, [S. l.], v. 73, n. 2, p. 112–121, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02490.x>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- DE OLIVEIRA SILVA, Flávio *et al.* Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1239-x>
- DE SANTANA BRITO, Jéssica *et al.* Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, [S. l.], v. 94, p. 865–872, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.026>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- DE SIQUEIRA PATRIOTA, Leydianne Leite *et al.* Microgramma vacciniifolia (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International journal of biological macromolecules**, [S. l.], v. 103, p. 36–46, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.037>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- DE SIQUEIRA PATRIOTA, Leydianne Leite *et al.* A Review on the Immunomodulatory Effects of Plant Lectins. In: **Biochemistry Research Trends**. [S. l.]: Nova Sciences Publishers, 2019 a. p. 53–82. *E-book*.

- DE SIQUEIRA PATRIOTA, Leydianne Leite *et al.* Plant-Derived Lectins: A Review of Their Status as Alternatives to Anticancer Chemotherapy. In: **Horizons in Cancer Research**. [S. l.: s. n.]. p. 171–205. *E-book*.
- DI CARLUCCIO, Cristina *et al.* Characterisation of the Dynamic Interactions between Complex N-Glycans and Human CD22. **ChemBioChem**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbic.201900295>
- DÍAZ-ALVAREZ, Laura; ORTEGA, Enrique. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2017, n. 9247574, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/9247574>
- DIXON, H. B. F. Defining a lectin. **Nature**, [S. l.], v. 292, n. 5820, p. 192–192, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/292192e0>
- DÖRNER, Thomas *et al.* **The mechanistic impact of CD22 engagement with epratuzumab on B cell function: Implications for the treatment of systemic lupus erythematosus**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.07.013>
- DUONG, Bao Hoa *et al.* Decoration of T-independent antigen with ligands for CD22 and Siglec-G can suppress immunity and induce B cell tolerance in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20091873>
- EDELMAN, G. M. *et al.* The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2580>
- ELANTAK, Latifa *et al.* Structural basis for galectin-1-dependent Pre-B Cell Receptor (Pre-BCR) activation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395152>
- ENTERINA, Jhon R.; JUNG, Jaesoo; MACAULEY, Matthew S. **Coordinated roles for glycans in regulating the inhibitory function of CD22 on B cells**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bj.2019.07.010>
- EREÑO-ORBEA, June *et al.* Molecular basis of human CD22 function and therapeutic targeting. **Nature Communications**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00836-6>
- FAHEINA-MARTINS, Glaucia V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>
- FLEMING, Heather E.; MILNE, Craig D.; PAIGE, Christopher J. CD45-Deficient Mice Accumulate Pro-B Cells Both In Vivo and In Vitro. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2542>
- FREITAS, Mateus S. *et al.* Paracoccin Induces M1 Polarization of Macrophages via Interaction with TLR4. **Frontiers in microbiology**, [S. l.], v. 7, p. 1003, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01003>. Acesso em: 5 mar. 2018.
- FUERTES, Teresa; RAMIRO, Almudena R.; DE YEBENES, Virginia G. miRNA-Based Therapies in B Cell Non-Hodgkin Lymphoma. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 932–947, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.08.006>
- GABRIELA, Pereira-da-Silva *et al.* Jacalin has distinct immunomodulatory effects on early and late stages of experimental colon carcinogenesis. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.00246>
- GALA, Françoise A.; MORRISON, Sherie L. The role of constant region carbohydrate in the assembly and secretion of human IgD and IgA1. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M203258200>
- GANIKO, Luciane *et al.* Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 695–703, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.012>
- GENESTIER, Laurent *et al.* TLR Agonists Selectively Promote Terminal Plasma Cell Differentiation of B Cell Subsets Specialized in Thymus-Independent Responses. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7779>
- GERALDINO, Thais Herrero *et al.* Jacalin has chemopreventive effects on colon cancer development. **BioMed Research International**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/4614357>

- GHAZARIAN, Haike; IDONI, Brian; OPPENHEIMER, Steven B. **A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>
- GHOSH, Snigdha; BANDULET, Claudia; NITSCHKE, Lars. Regulation of B cell development and B cell signalling by CD22 and its ligands α 2,6-linked sialic acids. **International Immunology**, [S. l.], 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh402>
- GIAMPAOLO, Sabrina *et al.* B cell development is critically dependent on NFATc1 activity. **Cellular and Molecular Immunology**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0052-9>
- GIOVANNONE, N. *et al.* Galectin-9 suppresses B cell receptor signaling and is regulated by I-branching of N-glycans. **Nature Communications**, [S. l.], 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05770-9>
- GIOVANNONE, Nicholas *et al.* **Galectin-Glycan Interactions as Regulators of B Cell Immunity**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02839>
- GIOVANNONE, Nicholas *et al.* Human B Cell Differentiation Is Characterized by Progressive Remodeling of O-Linked Glycans. **Frontiers in immunology**, [S. l.], 2018 c. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02857>
- GOLDSTEIN, IRWIN J. *et al.* What should be called a lectin? **Nature**, [S. l.], v. 285, n. 5760, p. 66–66, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/285066b0>
- GORAKSHAKAR, Ajit C.; GHOSH, Kanjaksha. Use of lectins in immunohematology. **Asian journal of transfusion science**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 12–21, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0973-6247.172180>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- GORDON-ALONSO, Monica; BRUGER, Annika M.; VAN DER BRUGGEN, Pierre. Extracellular galectins as controllers of cytokines in hematological cancer. **Blood**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-846014>
- GU, Jianguo; TANIGUCHI, Naoyuki. Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator. **Cell adhesion & migration**, [S. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cam.2.4.6748>
- GUPTA, Rohitesh *et al.* A Systematic Review on the Implications of O-linked Glycan Branching and Truncating Enzymes on Cancer Progression and Metastasis. **Cells**, [S. l.], 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9020446>
- GUPTA, Rohitesh *et al.* A Systematic Review on the Implications of O-linked Glycan Branching and Truncating Enzymes on Cancer Progression and Metastasis. **Cells**, [S. l.], 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9020446>
- GUTZEIT, Cindy; CHEN, Kang; CERUTTI, Andrea. **The enigmatic function of IgD: some answers at last**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.201646547>
- HAAS, Karen M. *et al.* B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. **Immunity**, [S. l.], 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.011>
- HAAS, Karen M. B-1 lymphocytes in mice and nonhuman primates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/nyas.12760>
- HAHN, H. P. *et al.* Galectin-1 induces nuclear translocation of endonuclease G in caspase- and cytochrome c-independent T cell death. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401485>
- HARDMAN, Karl D.; AINSWORTH, Clinton F. Structure of Concanavalin a at 2.4-Å Resolution. **Biochemistry**, [S. l.], 1972. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00776a006>
- HARDY, Richard R.; KINCADE, Paul W.; DORSHKIND, Kenneth. **The Protean Nature of Cells in the B Lymphocyte Lineage**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.013>
- HASAN, Imtiaj *et al.* Mytilec, a mussel R-type lectin, interacts with surface glycan GB3 on burkitt's lymphoma cells to trigger apoptosis through multiple pathways. **Marine Drugs**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md13127071>
- HENDRICKS, Jacobus; BOS, Nicolaas A.; KROESE, Frans G. M. **Heterogeneity of memory marginal zone B**

cells. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2018024985>

HERMISTON, Michelle L.; XU, Zheng; WEISS, Arthur. CD45: A Critical Regulator of Signaling Thresholds in Immune Cells. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.140946>

HOBEIKA, Elias *et al.* Conditional Selection of B Cells in Mice With an Inducible B Cell Development. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 9, n. 1806, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01806>

HOEK, Kristen L. *et al.* Follicular B Cell Trafficking within the Spleen Actively Restricts Humoral Immune Responses. **Immunity**, [S. l.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.016>

HOFFMAN, William; LAKKIS, Fadi G.; CHALASANI, Geetha. B cells, antibodies, and more. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2215/CJN.09430915>

HOLANDA, Edson *et al.* Biological Applications of Plants and Algae Lectins: An Overview. In: **Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology**. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/50632>

HOLMES, Antony B. *et al.* Single-cell analysis of germinal-center B cells informs on lymphoma cell of origin and outcome. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/JEM.20200483>

HOSONO, Masahiro *et al.* Binding profiles and cytokine-inducing effects of fish rhamnose-binding lectins on Burkitt's lymphoma Raji cells. **Fish Physiology and Biochemistry**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9948-1>

HOSTANSKA, K. *et al.* A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **Natural Immunity**, [S. l.], 1995.

HUANG, Chuanxin. Germinal Center Reaction. In: WANG, Ji-Yang (org.). **B Cells in Immunity and Tolerance**. [S. l.: s. n.]. p. 47–53. E-book. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3532-1_4

HUANG, Li *et al.* Characterization of lectin isolated from *Momordica charantia* seed as a B cell activator. **Immunology Letters**, [S. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.10.004>

INLAY, Matthew A. *et al.* Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. **Genes and Development**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.1836009>

ION, G. *et al.* Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in galectin-1-induced cell death. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 1145–1147, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401628>

JANDÚ, Jannyson J. B. *et al.* Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 8, n. 671, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00671>

JELLUSOVA, Julia; NITSCHKE, Lars. **Regulation of B cell functions by the sialic acid-binding receptors Siglec-G and CD22**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00096>

JOUAULT, Thierry *et al.* Specific Recognition of *Candida albicans* by Macrophages Requires Galectin-3 to Discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and Needs Association with TLR2 for Signaling. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 177, n. 7, p. 4679–4687, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4679>

KALISZ, Kevin *et al.* **An update on Burkitt lymphoma: a review of pathogenesis and multimodality imaging assessment of disease presentation, treatment response, and recurrence**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0733-7>

KAWANO, Tasuku *et al.* Globotriaosylceramide-expressing Burkitt's lymphoma cells are committed to early apoptotic status by rhamnose-binding lectin from catfish eggs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1248/bpb.32.345>

KENNEL, Amy Sm; GOULD, Keith G.; SALAMAN, Myer R. Proliferation assay amplification by IL-2 in model primary and recall antigen systems. **BMC Research Notes**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-662>

- KILPATRICK, D. C.; MCCURRACH, P. M. Wheat Germ Agglutinin is Mitogenic, Non-Mitogenic and Anti-Mitogenic for Human Lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 343–348, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1987.tb02199.x>
- KOCOUREK, J.; HOREJSI, V. A note on the recent discussion on definition of the term “lectin”. In: **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry Vol. 3**. [S. l.: s. n.]. p. 3–6. *E-book*.
- LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: Proteins with diverse applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. 1–18, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>
- LI, J.; YUAN, J. **Caspases in apoptosis and beyond**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
- LI, Wenzhe *et al.* Core fucosylation of μ heavy chains regulates assembly and intracellular signaling of precursor B cell receptors. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303123>
- LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. **Glycobiology of cell death: When glycans and lectins govern cell fate**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.50>
- LIU, Scot D. *et al.* Endogenous galectin-1 enforces class I restricted TCR functional fate decisions in thymocytes. **Blood**, [S. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-114181>
- LIU, Scot D. *et al.* Galectin-1 Tunes TCR Binding and Signal Transduction to Regulate CD8 Burst Size. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803811>
- LIU, Y. *et al.* Glycan microarray analysis of the carbohydrate-recognition specificity of native and recombinant forms of the lectin ArtinM. **Data in Brief**, [S. l.], v. 5, p. 1035–1047, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.11.014>
- LUO, Yu *et al.* Cloning of a novel lectin from artocarpus lingnanensis that induces apoptosis in human B-lymphoma cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1415127>
- MA, Bruce Yong *et al.* The lectin Jacalin induces human B-lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45. **Immunology**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02977.x>
- MAJTNEROVÁ, Pavlína; ROUŠAR, Tomáš. **An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>
- MARIANO, Vania Sammartino *et al.* Recognition of TLR2 N-glycans: Critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098512>
- MARIANO, Vania Sammartino *et al.* Recognition of TLR2 N-glycans: Critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS ONE**, [S. l.], 2014 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098512>
- MATSUBARA, Naoko *et al.* CD22-binding synthetic sialosides regulate B lymphocyte proliferation through CD22 ligand-dependent and independent pathways, and enhance antibody production in mice. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00820>
- MAZOLA, Yuliet; CHINEA, Glay; MUSACCHIO, Alexis. **Glycosylation and bioinformatics: Current status for glycosylation prediction tools**. [S. l.: s. n.]
- MCELROY, Craig A. *et al.* Structural reorganization of the interleukin-7 signaling complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1116582109>
- MCELROY, Craig A.; DOHM, Julie A.; WALSH, Scott T. R. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7R α Complex. **Structure**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.019>
- MCMANUS, Shane *et al.* The transcription factor Pax5 regulates its target genes by recruiting chromatin-modifying proteins in committed B cells. **EMBO Journal**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.140>
- MEDVEDOVIC, Jasna *et al.* Pax5: A Master Regulator of B Cell Development and Leukemogenesis. In:

Advances in Immunology. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385991-4.00005-2>

MENDONÇA-NATIVIDADE, Flávia Costa *et al.* Receptor heterodimerization and co-receptor engagement in TLR2 activation induced by MIC1 and MIC4 from *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20205001>

MESIN, Luka; ERSCHING, Jonatan; VICTORA, Gabriel D. **Germinal Center B Cell Dynamics**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.09.001>

MEYER, Sarah J. *et al.* **B Cell Siglecs-News on Signaling and Its Interplay With Ligand Binding**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02820>

MICHAEL LORD, J.; SPOONER, Robert A. Ricin trafficking in plant and mammalian cells. **Toxins**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins3070787>

MITCHELL, Carter A.; RAMESSAR, Koreen; O'KEEFE, Barry R. **Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.03.007>

MLYNARCZYK, Coraline; FONTÁN, Lorena; MELNICK, Ari. **Germinal center-derived lymphomas: The darkest side of humoral immunity**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12755>

MORENO, A. N. *et al.* Mast cell degranulation induced by lectins: Effect on neutrophil recruitment. **International Archives of Allergy and Immunology**, [S. l.], 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000074303>

MOTRAN, Claudia C. *et al.* Galectin-1 functions as a Th2 cytokine that selectively induces Th1 apoptosis and promotes Th2 function. **European Journal of Immunology**, [S. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200838295>

MUNKLEY, Jennifer; ELLIOTT, David J. Hallmarks of glycosylation in cancer. **Oncotarget**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8155>

NAGAE, Masamichi *et al.* 3D Structure and Function of Glycosyltransferases Involved in N-glycan Maturation. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 437, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21020437>

NASCIMENTO, Kelany S. *et al.* An overview of lectins purification strategies. In: 2012, **Journal of Molecular Recognition**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmr.2200>

NEW, J. Stewart; KING, R. Glenn; KEARNEY, John F. **Manipulation of the glycan-specific natural antibody repertoire for immunotherapy**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imr.12397>

NOLTE, Stefanie *et al.* BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 81–85, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.10.012>

NOVAK, Bela *et al.* **Regulated protein kinases and phosphatases in cell cycle decisions**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.07.001>

OHBA, Hideki *et al.* Plant-derived abrin-a induces apoptosis in cultured leukemic cell lines by different mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S. l.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.11.018>

OLIVEIRA-BRITO, P. K. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; DA SILVA, T. A. The Response of IL-17-Producing B Cells to ArtinM is independent of its interaction with TLR2 and CD14. **Molecules**, [S. l.], v. 23, p. 1–8, 2018 a.

OLIVEIRA-BRITO, Patrícia Kellen Martins; ROQUE-BARREIRA, Maria Cristina; DA SILVA, Thiago Aparecido. The response of IL-17-producing B cells to ArtinM is independent of its interaction with TLR2 and CD14. **Molecules**, [S. l.], 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23092339>

OLIVEIRA BRITO, Patrícia Kellen Martins *et al.* Systemic effects in naïve mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, p. 1–19, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151>

OLIVEIRA BRITO, Patrícia Kellen Martins *et al.* Systemic effects in naïve mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. **PLoS ONE**, [S. l.], 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187151>

- OLIVEIRA, Wesley F. *et al.* Evaluating glucose and mannose profiles in *Candida* species using quantum dots conjugated with Cramoll lectin as fluorescent nanoprobe. **Microbiological Research**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126330>
- OSUGUI, Lika *et al.* B-1 cells and B-1 cell precursors prompt different responses to Wnt signaling. **PLoS ONE**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199332>
- PALHARINI, Julio G. *et al.* Eutirucallin: A lectin with antitumor and antimicrobial properties. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00136>
- PANUNTO-CASTELO, A. *et al.* KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, [S. l.], v. 11, n. 12, p. 1035–1042, 2001.
- PATTON, Daniel T.; PLUMB, Adam W.; ABRAHAM, Ninan. The Survival and Differentiation of Pro-B and Pre-B Cells in the Bone Marrow Is Dependent on IL-7R α Tyr 449. **The Journal of Immunology**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302925>
- PEREIRA-DA-SILVA, Gabriela *et al.* Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1760, n. 1, p. 86–94, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.09.011>
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. **Lectins as plant defense proteins**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- PIEPER, Kathrin; GRIMBACHER, Bodo; EIBEL, Hermann. **B-cell biology and development**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
- PINEAU, N. *et al.* Jacalin: A lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. **Clinical and Experimental Immunology**, [S. l.], 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1990.tb03304.x>
- PINHO, Salomé S.; REIS, Celso A. **Glycosylation in cancer: Mechanisms and clinical implications**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3982>
- PISTRITTO, Giuseppa *et al.* **Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- POIROUX, Guillaume *et al.* Morniga-G, a T/Tn-specific lectin, induces leukemic cell death via caspase and DR5 receptor-dependent pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20010230>
- POPI, Ana F.; LONGO-MAUGÉRI, Ieda M.; MARIANO, Mario. **An overview of B-1 cells as antigen-presenting cells**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00138>
- PROCÓPIO, Tamara Figueiredo *et al.* CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International journal of biological macromolecules**, [S. l.], v. 98, p. 419–429, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.019>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- QUEIROZ, Alexandre F. S. *et al.* Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0825-4>
- QUINTANA, Maria del Pilar *et al.* **Endemic Burkitt lymphoma – an aggressive childhood cancer linked to *Plasmodium falciparum* exposure, but not to exposure to other malaria parasites**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/apm.13018>
- RABINOVICH, Gabriel A.; CROCI, Diego O. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. **Immunity**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 322–335, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.004>
- REED, J. C. *et al.* Effect of wheat germ agglutinin on the interleukin pathway of human T lymphocyte activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [S. l.], 1985.
- REILY, Colin *et al.* **Glycosylation in health and disease**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>
- REVILLA-I-DOMINGO, Roger *et al.* The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional

programmes in early and late B lymphopoiesis. **EMBO Journal**, [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.155>

RHEINLÄNDER, Andreas; SCHRAVEN, Burkhardt; BOMMARDT, Ursula. **CD45 in human physiology and clinical medicine**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.01.009>

RICCI-AZEVEDO, R. *et al.* Human neutrophils are targets to paracoccin, a lectin expressed by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Inflammation Research**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1093-8>

RICCI-AZEVEDO, Rafael *et al.* Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS neglected tropical diseases**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e0004609, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004609>. Acesso em: 20 fev. 2018.

RICCI-AZEVEDO, Rafael; ROQUE-BARREIRA, Maria-Cristina; GAY, Nicholas J. Targeting and Recognition of Toll-Like Receptors by Plant and Pathogen Lectins. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 8, p. 1820, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01820>. Acesso em: 27 fev. 2018.

ROBAINA, Marcela Cristina; MAZZOCOLI, Luciano; KLUMB, Claudete Esteves. **Germinal Centre B Cell Functions and Lymphomagenesis: Circuits Involving MYC and MicroRNAs**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8111365>

ROCO, Jonathan A. *et al.* Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. **Immunity**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.001>

ROSENFELD, Sam M. *et al.* B-1b Cells Secrete Atheroprotective IgM and Attenuate Atherosclerosis. **Circulation Research**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.306044>

ROSKOSKI, Robert. **Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.03.012>

RUAS, Luciana P. *et al.* Effect of ArtinM on human blood cells during infection with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 867, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00867>

SALEH, Khalil *et al.* **Burkitt and Burkitt-Like Lymphomas: a Systematic Review**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11912-020-0898-8>

SANDER, Sandrine *et al.* Synergy between PI3K Signaling and MYC in Burkitt Lymphomagenesis. **Cancer Cell**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.012>

SANTOS-DE-OLIVEIRA, Ricardo *et al.* A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 153, p. 1798–1897, 1994.

SANTUCCI, Luca *et al.* Galectin-1 exerts immunomodulatory and protective effects on Concanavalin A-induced hepatitis in mice. **Hepatology**, [S. l.], 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/hep.510310220>

SARVOTHAMAN, Shilpa *et al.* **Apoptosis: Role in myeloid cell development**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.5045/br.2015.50.2.73>

SCHMITZ, Roland *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. **Nature**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11378>

SCHNAAR, Ronald L. **Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.057>

SCHNEIDER, Dunja *et al.* Lectins from opportunistic bacteria interact with acquired variable-region glycans of surface immunoglobulin in follicular lymphoma. **Blood**, [S. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-609404>

SCHROEDER, Harry; RADBRUCH, Andreas; BEREK, Claudia. B-Cell Development and Differentiation. **Clinical Immunology**, [S. l.], v. Fifth Edit, p. 107- 118.e1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00007-7>

SCHULZE-OSTHOFF, Klaus *et al.* Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. **Journal of Cell Biology**, [S. l.], 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1083/jcb.127.1.15>

SCHWEIGHOFFER, Edina; TYBULEWICZ, Victor LJ. **Signalling for B cell survival**. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.10.002>

SCIACCHITANO, Salvatore *et al.* Galectin-3: One molecule for an alphabet of diseases, from A to Z.

- International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 379, p. 1–59, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19020379>
- SHAFFER, Arthur L.; YOUNG, Ryan M.; STAUDT, Louis M. **Pathogenesis of human B cell lymphomas**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075027>
- SHAIN, K. H.; TAO, J. **The B-cell receptor orchestrates environment-mediated lymphoma survival and drug resistance in B-cell malignancies**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.379>
- SHARON, N.; LIS, H. History of Lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, [S. l.], v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.
- SHATNYEVA, Olga M. *et al.* Modulation of the CD95-induced apoptosis: The role of CD95 N-glycosylation. **PLoS ONE**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019927>
- SILVA, Marco Aurélio Chiara *et al.* Immunomodulatory action of jacalin from artocarpus integrifolia and mannoprotein from saccharomyces uvarum on the humoral immunity of laying hens. **Ciencia Rural**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190700>
- SINGH, Himansha; SARATHI, Sai Partha. Insight of Lectins- A review. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, [S. l.], 2012.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 150, p. 76–85, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- SOUZA, Maria A. *et al.* **The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10719-012-9464-4>
- SOWA-ROGOZIŃSKA, Natalia *et al.* **Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins11060350>
- STEBEGG, Marisa *et al.* **Regulation of the germinal center response**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02469>
- STEIN, Merle *et al.* A defined metabolic state in pre B cells governs B-cell development and is counterbalanced by Swiprosin-2/EFhd1. **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.52>
- STOLFA, Gino *et al.* Using CRISPR-Cas9 to quantify the contributions of O-glycans, N-glycans and Glycosphingolipids to human leukocyte-endothelium adhesion. **Scientific Reports**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep30392>
- SU, Yi Ling *et al.* Site-specific N-glycan characterization of grass carp serum IgM. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02645>
- SUGAWARA, Shigeki *et al.* Binding of Silurus asotus lectin to Gb3 on Raji cells causes disappearance of membrane-bound form of HSP70. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.10.005>
- SUMNER, James B.; HOWELL, Stacey F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], 1936. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.32.2.227-237.1936>
- TALAB, Fatima *et al.* LCK is an important mediator of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia cells. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-12-0415-T>
- TANIGUCHI, Naoyuki; KIZUKA, Yasuhiko. Glycans and cancer: Role of N-Glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. In: **Advances in Cancer Research**. [S. l.: s. n.]. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.11.001>
- TAYLOR, Maureen E. *et al.* **Discovery and Classification of Glycan-Binding Proteins**. [S. l.: s. n.]. E-book.
- TEIXEIRA, Clarissa R. *et al.* Potential of KM+ lectin in immunization against Leishmania amazonensis infection. **Vaccine**, [S. l.], v. 24, n. 15, p. 3001–3008, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.067>
- THAKUR, Kshema *et al.* Exploration of carbohydrate binding behavior and anti-proliferative activities of Arisaema tortuosum lectin. **BMC Molecular Biology**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12867-019-0132-0>

- THIEL, Nadine *et al.* **Viral interference with functions of the cellular receptor tyrosine phosphatase CD45.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v7031540>
- TOBÓN, Gabriel J.; IZQUIERDO, Jorge H.; CAÑAS, Carlos A. **B lymphocytes: Development, tolerance, and their role in autoimmunity - Focus on systemic lupus erythematosus.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/827254>
- TOLEDO, Karina Alves *et al.* Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, [*S. l.*], v. 123, n. 1, p. 14–20, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.01.009>
- TRAN, Duy T.; TEN HAGEN, Kelly G. **Mucin-type o-glycosylation during development.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.418558>
- TREANOR, Bebhinn. **B-cell receptor: From resting state to activate.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03564.x>
- TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, [*S. l.*], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>
- TSAPOGAS, Panagiotis *et al.* IL-7 mediates Ebf-1-dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. **Blood**, [*S. l.*], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332189>
- VALLA, Kelly; FLOWERS, Christopher R.; KOFF, Jean L. Targeting the B cell receptor pathway in non-Hodgkin lymphoma. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [*S. l.*], v. 27, n. 6, p. 513–522, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13543784.2018.1482273>
- VALLE-MENDIOLA, Arturo *et al.* **Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/2849523>
- VAN DAMME, E. J. M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. **Advances in Botanical Research**, [*S. l.*], v. 48, p. 107–209, 2008.
- VAN DAMME, Els J. M. *et al.* Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [*S. l.*], v. 17, p. 575–692, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0735-2689\(98\)00365-7](https://doi.org/10.1016/S0735-2689(98)00365-7)
- VAN DAMME, Els J. M. **History of plant lectin research.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6_1
- VARKI, Ajit *et al.* **Essentials of glycobiology, third edition.** [*S. l.: s. n.*]. *E-book*.
- VASTA, Gerardo R. Roles of galectins in infection. **Nature Reviews Microbiology**, [*S. l.*], v. 7, n. 6, p. 424–438, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2146>
- VICTORA, Gabriel D.; NUSSENZWEIG, Michel C. **Germinal centers.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
- WADA, Teiji; PENNINGER, Josef M. **Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation.** [*S. l.: s. n.*] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207556>
- WALSH, Scott T. R. A biosensor study indicating that entropy, electrostatics, and receptor glycosylation drive the binding interaction between interleukin-7 and its receptor. **Biochemistry**, [*S. l.*], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi101050h>
- WALSH, Scott T. R. Structural insights into the common γ -chain family of cytokines and receptors from the interleukin-7 pathway. **Immunological Reviews**, [*S. l.*], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01160.x>
- WASIM, Laabiah *et al.* N-linked glycosylation regulates CD22 organization and function. **Frontiers in Immunology**, [*S. l.*], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00699>
- WILHELM, Isabel *et al.* Carbohydrate-dependent B cell activation by fucose-binding bacterial lectins. **Science Signaling**, [*S. l.*], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aao7194>
- WINKLER, Thomas H.; MÅRTENSSON, Inga-Lill. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. **Frontiers in Immunology**, [*S. l.*], v. 9, n. 2423, p. 1–10, 2018.
- WOLFERT, Margreet A.; BOONS, Geert Jan. Adaptive immune activation: Glycosylation does matter. **Nature**

Chemical Biology, [S. l.], v. 9, p. 776–784, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.1403>

YAM-PUC, Juan Carlos *et al.* **Role of B-cell receptors for B-cell development and antigen-induced differentiation [version 1; referees: 2 approved]**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.13567.1>

YANG, Shuang *et al.* Simultaneous analyses of N-linked and O-linked glycans of ovarian cancer cells using solid-phase chemoenzymatic method. **Clinical Proteomics**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9137-1>

YILMAZ, Gokhan; BECER, C. Remzi. **Glyconanoparticles and their interactions with lectins**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5py00089k>

YU, Mei *et al.* PLC γ -dependent mTOR signalling controls IL-7-mediated early B cell development. **Nature Communications**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01388-5>

YUE, Wen *et al.* The regulators of BCR signaling during B cell activation. **Blood Science**, [S. l.], v. 1, p. 119–129, 2019. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/BS9.0000000000000026>

ZABCZYŃSKA, Marta; KOZŁOWSKA, Kamila; POCHĘĆ, Ewa. **Glycosylation in the thyroid gland: Vital aspects of glycoprotein function in thyrocyte physiology and thyroid disorders**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19092792>

ZHANG, Jian Hua; XU, Ming. **DNA fragmentation in apoptosis**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290049>

ZHANG, Jianhua *et al.* Resistance to DNA fragmentation and chromatin condensation in mice lacking the DNA fragmentation factor 45. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12480>

ZHANG, Jing *et al.* Identification of clinical molecular targets for childhood Burkitt lymphoma. **Translational Oncology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 100855, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100855>

ZHAO, Yan Yang *et al.* **Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00839.x>

ZHOU, Raymond W. *et al.* N-glycosylation bidirectionally extends the boundaries of thymocyte positive selection by decoupling Lck from Ca²⁺ signaling. **Nature Immunology**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.3007>

ZIKHERMAN, Julie *et al.* Quantitative differences in CD45 expression unmask functions for CD45 in B-cell development, tolerance, and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1117374108>