UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Thiago Aparecido da Silva

EFEITO DA LECTINA ARTINM SOBRE AS CÉLULAS T $CD4^+$ MURINAS

Ribeirão Preto

2012

Thiago Aparecido da Silva

EFEITO DA LECTINA ARTINM SOBRE AS CÉLULAS T CD4^{+} MURINAS

Dissertação de Mestrado 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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Ribeirão Preto

2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thiago Aparecido da Silva

Efeito da lectina ArtinM sobre as células T $CD4^+$ murinas

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

Área: Biologia Celular e Molecular
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Aprovado em: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Assinatura_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Assinatura_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição_____Assinatura_____

DEDICO

Aos meus pais, Laércio e Delminda, que sempre confiaram em meu trabalho e independentes das minhas escolhas apoiaram integralmente com esforços sinceros para que meus objetivos pessoais e profissionais obtivessem êxitos. Ensinaram que a responsabilidade e dedicação devem constituir a essência de um homem quando este pretende atingir o sucesso e ser reconhecido pela sua capacidade.

Ao meu irmão Saulo que me fez aprender com suas demonstrações.

Essa pessoa não pode ser lembrada no tópico de agradecimentos, pois importantes conquistas na minha vida e as outras a serem contempladas sempre foram e serão marcadas pela sua inquestionável presença, Simone.

"As idéias das pessoas são pedaços da sua felicidade."
William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar minha trajetória de vida e passar tranqüilidade durante as decisões mais difíceis.

À Profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira, pela confiança depositada em meu trabalho e por garantir as condições ideais no delineamento da pesquisa. Agradeço pela atenção oferecida em todos os momentos que necessitei, além de sempre me atender de forma muito carinhosa. Obrigado pela oportunidade de conviver e aprender com uma pessoa repleta de conhecimentos, ensinamentos e com um senso crítico invejável.

À Profa. Maria Aparecida de Souza que participou ativamente da implantação e do desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pelos inúmeros ensinamentos relacionados aos procedimentos experimentais e pela disposição em sempre oferecer algo novo para o crescimento de nosso trabalho. Parabéns por demonstrar que a humilde engrandece a pessoa.

À Luciana Ruas que dedicou grande parte do seu tempo na minha introdução ao laboratório, considerando todos os aspectos necessários para o bom andamento experimental.

À Aline Ferreira, Fernanda e Marise, importantes na solução e entendimento durante as fases críticas do trabalho. Em outros momentos, o simples ato de observá-las fez com que eu aprimorasse a condução do meu trabalho.

Aos amigos Fausto e Rafael que possuem um coração enorme e elencam entre as pessoas mais prestativas e sinceras que tive contato.

À Vânia que colaborou muito para a conclusão do trabalho, desde o auxílio com reagentes até o questionamento de resultados.

Às amigas Sandra, Aninha e Tati, as quais participaram constantemente dessa jornada ressaltando os momentos de resolução dos problemas e, principalmente, nos de descontração.

Às irmãs Érica e Patrícia, pois sempre atenderam aos meus pedidos visando favorecer a progressão do trabalho, além disso, realizaram diversos favores extra laboratório.

Aos amigos de laboratório Marina, Nerry, Aline Sardinha e André, pelas sugestões ao trabalho e pela convivência harmoniosa e saudável.

Aos amigos que passaram pelo laboratório, Ita, Camila e Sílvia.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e Molecular, em especial à Rosângela, Camila, Lúcia e Dona Inês. Agradeço também à Dona Lúcia pela sua enorme paciência.

Aos órgãos financiadores FAPESP e CAPES, facilitadores da implantação e fechamento do estudo.

Aos meus melhores amigos que não participaram diretamente desse trabalho, mas particularmente sabem o seu grau de importância ao longo do mestrado: Ricart, Lisandra, Danilo, Sílvia, Saulo, Flávia, Nilson e Dilma.

Aos examinadores do trabalho por favorecer o aperfeiçoamento dessa pesquisa.

"Sentimos saudade de certos momentos da nossa vida e de
certos momentos de pessoas que passaram por ela."

Carlos Drummond de Andrade

LISTA DE ABREVIAÇÕES

4-1BB: glicoproteína transmembrânica tipo 2 pertencente à superfamília TNF.

ADAP: proteína adaptadora que promove a degranulação e adesão.

Akt: proteína quinase (serino/treonina).

AP-1:proteína de ativação 1.

APCs: células apresentadoras de antígenos.

BSA: albumina de soro bovino.

CaMK: proteína quinase dependente de Ca^{2+}/calmodulina.

CD: grupo de diferenciação.

ConA: Concanavalina A.

CRD: domínio de reconhecimento de carboidratos.

CTLA-4: antígeno-4 associado a linfócito T citotóxico.

CXCL8: interleucina-8.

CXCR2: receptor de quimiocina 2.

DAG: diacilglicerol.

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético.

ERK: quinase regulada por sinal extracelular.

FasL: ligante de Fas.

FcεR: receptor para porção Fc de anticorpos classe E.

FITC: isotiocianato de fluoresceína.

Foxp3: forkhead box p3, fator de transcrição.

GATA-3: proteína-3 ligante de GATA.

GRB2: proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento.

HCl: ácido clorídrico.

ICOS: coestimulador induzido.

IFN-γ: interferon-γ.

IgG: imunoglobulina G.

IL: interleucina.

IL-12Rβ1: cadeia β1 do receptor da interleucina-12.

IL-4Rα: cadeia α do receptor da interleucina-4.

$IP_{3:}$ inositol 1,4,5 trifosfatado.

IP_3R: receptor inositol 1,4,5 trifosfatado.

ITAMs: imunoreceptor de tirosina baseado em motif ativação.

JNK: kinase c-jun N-terminal.

LAT: proteína transmembrânica ligada à ativação das células T.

LFA-1: antígeno-1 associado à função linfocitária.

LTB_4: leucotrieno B_4.

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno.

MHC: complexo de imunohistocompatibilidade.

NFAT: fator nuclear de células T ativadas.

NF-κB: fator nuclear kappa B.

PBS: tampão fosfato salina.

PD-1: proteína 1 de morte celular programada.

PDK1: proteína quinase-1 dependente de fosfoinositídeo-3.

PE: ficoeritrina.

PHA: fitohemaglutinina.

$PI(4\text{-}5)P_2$: fosfatidilinositol 4-5 bifosfatado.

PI3K: fosfatidilinositol 3-kuinase.

PIP_2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.

PIP_3: fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfatado.

PKC: proteína kinase C.

PLCγ1: fosfolipase Cγ1.

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate.

PTK: proteína tirosina kinase.

RE: retículo endoplasmático.

RORγt: orphan nuclear receptor γt.

SFB: soro fetal bovino.

Stat: sinal transdutor e ativador de transcrição.

T-bet: fator transcrição da família T-box.

TCR: receptor de célula T.

TGF-β: fator de transformação do crescimento beta.

Th: células T helper.

TLR: receptor do tipo toll.

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa.

Treg: células T regulatórias.

ZAP-70: proteina kinase 70 associada à cadeia zeta

SUMÁRIO

Resumo 10
Abstract 13
1. Introdução 15
1.1. Lectinas 16
1.2. Atuação da lectina ArtinM em células do sistema imune 17
1.3. Atividades das células T $CD4^+$ na resposta imune 18
1.4. Funções de subpopulações celulares derivadas de linfócitos T $CD4^+$ 20
1.5. Ativação de células T $CD4^+$ 21
1.5.1. O complexo TCR/CD3 21
1.5.2. Transdução de sinal via TCR/CD3 22
1.5.3. Moléculas coestimuladoras e inibitórias 24
1.5.4. Principais moléculas sinalizadoras envolvidas na ativação das células T $CD4^+$ 26
1.6. Glicosilação de receptores de superfície nas células T $CD4^+$ 28
2. Objetivos 30
2.1. Objetivo Geral 31
2.2. Objetivos Específicos 31
3. Materiais e Métodos 32
3.1. Animais 33
3.2. Purificação da lectina ArtinM 33
3.3. Purificação das células T $CD4^+$ esplênicas de camundongos BALB/c 33
3.4. Ensaio de aglutinação, expressão de CD25 e CTLA-4 e secreção de citocinas pelas células T $CD4^+$ após a curva dose-resposta com ArtinM 34
3.5. Documentação da aglutinação das células T $CD4^+$ *in vitro* 35
3.6. Dosagem das citocinas IL-2, IFN-γ, IL-17A e IL-6 35
3.7. Marcação dos receptores CD25, CD28 e CTLA-4 36
3.8. Ensaio para a marcação intracelular de IFN-γ e IL-17 36
3.9. Ensaio citométrico de inibição por ArtinM da ligação de anticorpos específicos à receptores de superfície das células T $CD4^+$ 37
3.10. Ensaio de competição funcional entre ArtinM e os anticorpos específicos para os receptores CD3, CD28, CD45 e CD4 37

3.11. Ensaio de inibição de moléculas sinalizadoras em células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM 38
3.12. Inibição com manotriose da ligação de ArtinM à superfície das células T CD4$^+$ 38
3.13. Predição dos sítios de *N*-glicosilação nos receptores de superfície CD3, CD4, CD28 e CD45. 39
3.14. Análise estatística 39
4. Resultados 41
4.1. ArtinM promove a aglutinação de células T CD4$^+$ murinas em cultura 42
4.2. ArtinM induz células T CD4$^+$ a produzirem citocinas de perfis Th1 e Th17. 44
4.3. ArtinM induz a expressão de CD25 e CTLA-4 em células T CD4$^+$. 46
4.4. Expressão de CD28 e CTLA-4 em células T CD4$^+$ no decorrer do estímulo com ArtinM 48
4.5. Produção de citocinas por células T CD4+ no decorrer do tempo a partir do estímulo com ArtinM 51
4.6. ArtinM atua em células T CD4$^+$ originando células duplamente marcadas para IFN-γ e IL-17 52
4.7. Potenciais sítios de *N*-glicosilação em receptores de superfície relacionados à ativação das células T CD4$^+$ 54
4.8. ArtinM reconhece glicoproteína de superfície responsável pela ativação de linfócitos T CD4$^+$ 56
4.9. Inibição da ligação de anti-CD3εγ em células T CD4$^+$ através de ArtinM 58
4.10. Inibição com manotriose da ligação de ArtinM às células T CD4$^+$ 60
4.11. Moléculas de sinalização envolvidas na ativação das células T CD4$^+$ por ArtinM. ... 61
5. Discussão 63
6. Conclusões 69
7. Modelo Proposto 71
8. Referências Bibliográficas 74

Efeito da lectina ArtinM sobre as células T CD4$^+$ murinas

RESUMO

A lectina ArtinM, extraída de sementes de *Artocarpus heterophyllus* e caracterizada como um homotetrâmero constituído de subunidades de 16 kDa, tem alta afinidade de ligação a manotriose Manα 1-3 [Manα 1-6] Man, que constitui o core de *N*-glicanas. ArtinM é dotada de interessantes propriedades biológicas: (1) ativa neutrófilos a partir do reconhecimento de *N*-glicanas dos receptores CXCR2 e TLR2; (2) induz a desgranulação de mastócitos por interagir com *N*-glicanas de FcεR ou com *N*-glicanas de IgE ligadas a FcεR; (3) estimula a produção de IL-12, por reconhecer *N*-glicanas contidas no ectodomínio de TLR2 da superfície de células apresentadoras de antígeno (APCs); (4) exerce atividade imunomoduladora, que direciona o padrão de resposta para o perfil Th1; (5) confere resistência a infecções por patógenos intracelulares, como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major, Neospora caninum* e *Candida albicans*

Células T CD4$^+$ participam de funções essenciais do sistema imune; durante o estabelecimento de uma resposta imune, podem ser desenvolvidas subpopulações de células T CD4$^+$ adequadas para gerar respostas eficientes de combate a patógenos, manutenção da tolerância e regulação da imunidade. A ativação das células T CD4$^+$ depende de um primeiro sinal, desencadeado pelo complexo TCR/CD3, e de um segundo sinal, oriundo de moléculas coestimulatórias como CD28. A ativação e expansão de células T CD4$^+$ são limitadas pela ação de moléculas inibitórias, principalmente por CTLA-4.

Lectinas podem ativar as células T, sendo a fitohemaglutinina (PHA) e a Concanavalin A (ConA) os exemplos mais conhecidos. Além disso, está bem caracterizado que o alvo de reconhecimento de ConA localiza-se no complexo TCR/CD3.

No presente estudo buscou-se caracterizar os efeitos da lectina ArtinM sobre células T CD4$^+$ murinas e investigar os possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos exercidos. Foram avaliados, inicialmente, os efeitos diretos de ArtinM sobre as células T CD4$^+$, no que se refere à produção de citocinas, expressão de moléculas coestimulatórias e inibitórias e indução de diferenciação celular. Passou-se então à identificação de possíveis receptores de superfície reconhecidos por ArtinM e responsáveis pelo desencadeamento da ativação celular. Finalmente, buscou-se apontar moléculas sinalizadoras envolvidas nos efeitos diretos de ArtinM.

A primeira evidência da interação direta de ArtinM com células T $CD4^+$ foi proporcionada por aglutinação celular. Uma curva dose-resposta revelou que 5μg/ml foi a melhor concentração para adquirir significativa produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) e Th17 (IL-6 e IL-17A) pelas células T $CD4^+$. O estímulo com a concentração ótima de ArtinM mostrou que após 12 horas de incubação houve um significativo aumento nos níveis de IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A no sobrenadante celular; persistindo no curso de 48 horas de observação. A secreção concomitante de IFN-γ e IL-17A motivou a avaliação, por citometria de fluxo, da ocorrência de dupla marcação intracelular dessas citocinas. O estímulo, por 24 horas, com ArtinM, levou a importante aumento da frequência de células duplo-positivas para IFN-γ e IL-17.

Uma vez comprovado pelo padrão de citocinas secretadas que ArtinM promove a ativação das células T $CD4^+$, investigou-se a expressão das moléculas CD25 e CTLA-4. ArtinM aumentou a expressão de ambas as moléculas, de maneira dose-dependente. Curiosamente, a detecção tanto de CD28, como de CTLA-4, foi precoce e persistente, diferindo do padrão temporal de expressão proporcionado por outros ativadores de células T $CD4^+$.

Com vistas a determinar o mecanismo através do qual ArtinM atua nas células T $CD4^+$, alvos potenciais de reconhecimento foram ensaiados: CD3ε, CD3εγ, CD28, CD45 e CD4. Esses receptores foram selecionados com base em predição de potenciais sítios *N*-glicosilados. Dessa forma, anticorpos específicos para essas moléculas foram utilizados para analisar a sua capacidade de inibir a atividade de ArtinM de induzir as células T $CD4^+$ a produzir citocinas, como IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A. Apenas o anticorpo anti-CD3εγ foi capaz de impedir a secreção das citocinas induzidas por ArtinM. Além disso, esse anticorpo inibiu a marcação de células T $CD4^+$ por ArtinM biotinilada. Esses dados indicam que ArtinM exerce sua atividade sobre células T $CD4^+$ através do reconhecimento de glicanas na cadeia γ do receptor CD3, não excluindo-se, entretanto, a ocorrência da interação de ArtinM com outras glicoproteínas na superfície de linfócitos T $CD4^+$. Também foi verificado que ArtinM possui alta especificidade por glicanas na superfície dessas células, pois foram necessárias elevadas concentrações de manotriose para inibir em 50% a ligação de ArtinM à superfície das células T $CD4^+$.

Através do uso de inibidores específicos para moléculas sinalizadoras, constatou-se que PI3K, PTK, p42/44MAPK, p38MAPK, JNK e PKC estão implicadas na sinalização para a produção das citocinas de perfis Th1 e Th17, induzida por ArtinM.

Esse conjunto de resultados indica que ArtinM é um potente e rápido ativador de células T $CD4^+$. A ativação celular induzida por ArtinM está relacionada com a ligação à cadeia γ do receptor CD3 e se associa à alta expressão de moléculas coestimuladoras e inibitórias. Ademais, demonstrou-se que ArtinM promove a diferenciação das células T CD4+ naive em células Th1 e Th17, utilizando moléculas sinalizadoras que são conhecidas como críticas para a indução de citocinas que caracterizam essas subpopulações celulares.

Unitermos: Lectinas, ArtinM e células T $CD4^+$.

Effect of lectin ArtinM on murine CD4$^+$ T cells

ABSTRACT

The lectin ArtinM, extracted from seeds of *Artocarpus heterophyllus* and characterized as a homotetramer consisted of 16 kDa subunits, has high binding affinity to the manotriose Manα 1-3 [Manα 1-6] Man, which is the core of *N*-glycans. ArtinM is endowed with interesting biological properties: (1) it activates neutrophils through the recognition of *N*-glycans attached to CXCR2 and TLR2 receptors; (2) induces degranulation of mast cells by interacting with *N*-glycans of FcεR or to *N*-glycans of IgE bound to FcεR; (3) stimulates the production of IL-12 through the recognition of N-glycans of the TLR2 ectodomain, expressed on the surface of antigen presenting cells (APCs); (4) exerts immunomodulatory activity, which accounts for Th1 immunity (5) confers resistance to intracellular pathogens, such as *P. brasiliensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*, *Neospora caninum* e *Candida albicans*.

CD4$^+$ T cells participate in essential functions of the immune system. During the development of an immune response, CD4$^+$ T cells are activated and give origin to subpopulations of cells that are suitable for establishing effective responses to combat pathogens, for tolerance maintenance, and for adequate immuneregulation. The activation of CD4$^+$ T cells depends on a first signal, triggered by the TCR/CD3 complex, and a second signal, provided by costimulatory molecules. The activation and expansion of CD4$^+$ T cells is limited by the action of inhibitory molecules.

Lectins may activate T cells, and Phytohemagglutinin (PHA) and Concanavalin A (ConA) are the best know examples. Furthermore, it is well characterized that the target for ConA recognition is localized in the TCR/CD3 complex.

The present study was delineated to characterize the effects of the lectin ArtinM on murine CD4$^+$ T cells and to investigate the possible mechanisms accounting for the observed effects. It was investigated the ArtinM direct effects on CD4$^+$ T cells, concerning its ability to induce the production of cytokines, the expression of costimulatory and inhibitory molecules and cell differentiation. In addition, the possible surface receptors recognized by ArtinM and responsible for triggering cell activation were also assessed. Finally, signaling molecules involved in the direct effects of ArtinM were approached.

The first evidence of direct interaction of ArtinM with CD4$^+$ T cells was provided by cell agglutination. A dose-response curve has revealed that 5μg/ml was the best ArtinM concentration to achieve significant production of Th1 (IL-2 and IFN-γ) and Th17 (IL-6 and

IL-17A) cytokines by TCD4$^+$ cells. Stimulus with the optimum ArtinM concentration has showed that after 12 hours incubation there was a significant augmentation of IL-2, IFN-γ, IL-6 and IL-17A levels in the cell supernatant; which has persisted in the course of 48 hours observation. The concomitant secretion of IFN-γ and IL-17A led us to evaluate, by flow cytometry, the intracellular expression of these cytokines. After 24 hours stimulation with ArtinM, there was a significant increase in the frequency of cells IFN-γ$^+$IL-17$^+$.

Once the cytokines detection indicated that CD4$^+$ T cells have been activated by ArtinM, the expression of CD25 and CTLA-4 molecules was assessed. ArtinM increased the expression of both molecules, in a dose-dependent manner. Interestingly, both cell surface molecules, CD25 and CTLA-4, were early and persistently detected a temporal pattern that is distinct from the provided by other inducers of CD4$^+$ T cell activation.

In order to determine the mechanism by which ArtinM acts on CD4$^+$ T cells, potential targets of recognition were assessed: CD3εγ, CD3ε, CD28, CD45 and CD4. These receptors were selected on the basis of prediction of *N*-glycosylation sites. Specific antibodies for these molecules were assayed regarding their ability to inhibit the ArtinM of inducing TCD4$^+$ cells to produce cytokines, such as IL-2, IFN-γ, IL-6 and IL-17A. Only anti-CD3 antibody was able to prevent the cytokines secretion induced by ArtinM. In addition, anti-CD3 antibody has inhibited the T CD4$^+$ cell labeling by biotynil-ArtinM. These data indicate that ArtinM exerts its biological activity on T CD4$^+$ cells through recognition of CD3 receptor γ chain glycans, without excluding the occurrence of ArtinM interactions with other glycoproteins on the surface of T CD4$^+$ lymphocytes. The interaction of ArtinM with glycans at the surface of these cells was found to occur with great specificity, since high concentrations of the manotriose - Manα 1-3 [Manα 1-6] Man – were required to inhibit the binding.

By using specific inhibitors of signaling molecules, we have found that PI3K, PTK and p42/44MAPK are relevant cytokine production profiles of Th1 and Th17 cells after stimulation with ArtinM.

All toghether, these results indicate that ArtinM is a potent and rapid activator of CD4$^+$ T cells. The activation induced by ArtinM is triggered by its binding to the CD3 receptor γ chain, which induces high expression of costimulator and inhibitory molecules. Moreover, it was demonstrated that ArtinM promotes the differentiation of *naive* CD4$^+$ T cells into Th1 and Th17 cells by committing signaling molecules that are known as critical for the induction of cytokines that characterize these subpopulations of cells.

Keywords: Lectin, ArtinM and CD4$^+$ T cell.

1. Introdução

1.1. Lectinas

O estudo das lectinas foi iniciado por Stillmark, em 1888, ao descrever a propriedade do extrato de sementes de *Ricinus communis* de aglutinar hemácias de diferentes espécies animais (Rudiger e Gabius, 2001). A primeira aglutinina a ser isolada foi a Concanavalina A (ConA) por James Sumner, a partir do extrato salino de sementes de *Canavalia ensiformis*. Posteriormente, Sumner e Howell demonstraram que a hemaglutinação promovida por ConA era inibida por sacarose, fato pioneiro na demonstração da especificidade das lectinas por açúcar (Sumner e Howell, 1936). Vários estudos surgiram com diferentes extratos de sementes que apresentavam atividades distintas de hemaglutinação frente a eritrócitos de diferentes espécies. A constatação de que aglutininas obtidas de plantas interagiam com eritrócitos humanos de forma dependente do tipo de grupo sanguíneo fez com que recebessem a denominação de lectinas (do latim *legere*, que significa escolher, selecionar), que diz respeito à característica das lectinas de ter preferência pelo reconhecimento de certos açúcares (Boyd e Shapleigh, 1954). Os estudos sobre lectinas levaram a que elas fossem definidas como "proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um mono ou oligossacarídeo" (Peumans e Van Damme, 1995).

Os estudos sobre lectinas permitiram constatar a sua expressão ubíqua na natureza, já que são encontradas numa ampla gama de organismos, de vírus a mamíferos. As lectinas exercem muitas atividades biológicas, dentre as quais se destacam a modulação da interação célula-célula, desencadeamento de eventos da imunidade inata, direcionamento do desenvolvimento de linfócitos, indução na migração de leucócitos e promoção da adesão de patógenos a células hospedeiras (Sharon e Lis, 2004). A compreensão detalhada da interação lectina-açúcar proporciona o embasamento para sua aplicação em vários campos do conhecimento, incluindo a biomedicina. Atribui-se a atividade ligante de carboidrato a um segmento polipeptídico da lectina designado "domínio de reconhecimento de carboidrato" (CRD) (Drickamer, 1988).

Um importante achado sobre as lectinas relaciona-se a sua atividade mitogênica, como visto para a lectina conhecida como fitohemaglutinina (PHA) que estimula a proliferação de linfócitos humanos (Nowell, 1960). Ainda sobre a PHA, verificou-se que ela estimula os linfócitos humanos a secretarem interleucina-2 (IL-2), considerada um fator de crescimento para essas células (Morgan, Ruscetti *et al.*, 1976). Além da PHA, várias outras lectinas foram descritas com dotadas de atividade mitogênica, com destaque para a Concanavalina A, que

está bem caracterizada como tendo tal atividade inibida na presença de mannose (Sharon e Lis, 2004).

Há também numerosos estudos sobre a utilização de lectinas de plantas como ferramentas no estudo de tumores. Eles se baseiam na descrição de que células neoplásicas apresentam glicosilação aberrante, com isso, lectinas passaram a contribuir para a análise dos tipos de glicanas presentes na superfície dessas células.

As lectinas de plantas vêm sendo utilizadas ainda em sistemas de microarrays, com vistas a identificar possíveis alterações de glicosilação relacionadas ao estado funcional ou patológico a que as células estão submetidas. (Sharon, 2008).

1.2. Atuação da lectina ArtinM em células do sistema imune

O extrato salino de sementes de jaca, *Artocarpus heterophyllus*, contém pelo menos duas lectinas, Jacalina e ArtinM. A despeito da alta homologia estrutural existente entre elas, ArtinM está presente em menores concentrações no extrato de sementes, correspondendo a menos de 0.5% do conteúdo protéico desse extrato, enquanto jacalina corresponde a 30% desse conteúdo. Essas lectinas diferem ainda quanto à especificidade de ligação a açúcares: ArtinM liga-se a D-mannose e Jacalina reconhece D-galactose. ArtinM, objeto de nosso estudo, organiza-se como um homotetrâmero, constituído de subunidades de 16 kDa (Santos-De-Oliveira, Dias-Baruffi *et al.*, 1994); tem alta afinidade de ligação pela manotriose Manα 1-3 [Manα 1-6] Man, que constitui o core de *N*-glicanas.

ArtinM tem a capacidade de se ligar à superfície de neutrófilos, através do reconhecimento de glicanas dos receptores CXCR2 e TLR2, induzindo migração, transdução de sinais via proteína G, fosforilação de tirosinas, secreção de leucotrieno B4 e de CXCL8, “shedding” de L-selectinas, produção de superóxido e atividade fagocítica (Santos-De-Oliveira, Dias-Baruffi *et al.*, 1994; Ganiko, Martins *et al.*, 1998; Pereira-Da-Silva, Moreno *et al.*, 2006). O aumento do influxo de neutrófilos associa-se à propriedade da lectina de acelerar a regeneração do epitélio da córnea de coelhos, após ulceração (Chahud, Ramalho *et al.*, 2009).

ArtinM atua sobre mastócitos, por intermédio de ligação a glicanas associadas ao FcεR, que é seguida de desgranulação e liberação de mediadores, como TNF-α. A desgranulação de mastócitos promovida por ArtinM proporciona uma alça amplificadora de sua atividade de recrutar neutrófilos (Moreno, Jamur *et al.*, 2003). O reconhecimento das glicanas *N*-ligadas ao receptor FcεR pela lectina resulta na fosforilação de resíduos a tirosina

de proteínas e na liberação de mediadores β-hexosaminidase e LTB_4 pelos mastócitos. Além disso, ArtinM induziu a ativação de fatores de transcrição como NFκ-B e NAFT levando a produção de IL-4 e TNF-α (Barbosa-Lorenzi, Buranello *et al.*, 2011).

A lectina ArtinM induz macrófagos e células dendríticas a produzirem IL-12, citocina que estimula linfócitos a secretarem IFN-γ, promovendo o estabelecimento de uma resposta imune do tipo Th1 (Panunto-Castelo, Souza *et al.*, 2001; Teixeira, Cavassani *et al.*, 2006). A produção de IL-12 resulta da interação de ArtinM com glicanas de TLR2 (Coltri, Oliveira *et al.*, 2008). A capacidade de transformar uma resposta imune Th2 em Th1 faz de ArtinM uma candidata a aplicações terapêuticas em infecções por patógenos intracelulares. Nesse sentido, foi estabelecido que a administração de ArtinM confere proteção contra *Leishmania major* a camundongos BALB/c, cuja susceptibilidade à infecção, atribuída ao desenvolvimento de resposta Th2, é revertida pela lectina. Isto porque ela estimula macrófagos a produzirem IL-12 (Panunto-Castelo, Souza *et al.*, 2001), citocina direcionadora da imunidade para o padrão Th1, protetora contra o parasito. O desenvolvimento desse tipo de resposta nos animais tratados foi constatado pela detecção de secreção de altos níveis de IFN-γ e baixíssimos níveis de IL-4. Quadro similar foi induzido por ArtinM na infecção murina por *Leishmania amazonensis* (Teixeira, Cavassani *et al.*, 2006). Além disso, a administração terapêutica ou profilática da lectina conferiu proteção contra a infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* (Coltri, Oliveira *et al.*, 2008; Coltri, Oliveira *et al.*, 2010). No caso da infecção pelo parasito *Neospora caninum*, foi demonstrado que ArtinM induziu altos níveis de IgG total específica, aumento na produção de citocinas de perfil Th1, melhora na sobrevida dos animais e menor quantidade de parasitos no cérebro (Cardoso, Mota *et al.*). Outro efeito protetor conferido por ArtinM foi constatado na infecção por *Candida albicans*, atribuído ao desenvolvimento de imunidade Th1 e Th17 (Custodio, Loyola *et al.*, 2011).

1.3. Atividades das células T $CD4^+$ na resposta imune

As células T originadas de células-tronco hematopoiéticas migram para o timo em resposta a sinais oriundos de células tímicas não hematopoiéticas, como as células epiteliais do timo e os fibroblastos mesenquimais. Os precursores dessas células T, ao entrarem no timo, passam por processos de seleção negativa e positiva, baseados na checagem da afinidade do receptor de antígeno (TCR) pelos antígenos próprios, sinalizando para a morte celular aquelas dotadas de TCR de alta afinidade pelo antígeno ou direcionando para a maturação celular as que interagem com baixa afinidade. A seleção positiva gera células com

a expressão concomitante de CD4 e CD8, nomeadas de duplo positivas (DN), com posterior maturação no timo tornando-as simples positivas com a expressão de CD4 ou CD8 (Starr, Jameson *et al.*, 2003). A partir disso, os linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ *naive*s são distribuídos e recirculam nos diversos tipos de tecidos linfóides, de maneira a otimizar as chances de atuarem na resposta imune adaptativa.

As moléculas do complexo molecular de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs), estão envolvidas na apresentação de peptídeos para as células T $CD8^+$ e T $CD4^+$, respectivamente. Os peptídeos apresentados por MHC-I são originados do meio intracelular enquanto os peptídeos associados ao MHC-II provêm de antígenos exógenos, havendo distintas vias de processamento desses antígenos de maneira a propiciar a apresentação pelo MHC adequado (Neefjes, Jongsma *et al.*, 2011). O reconhecimento do complexo de peptídeos e moléculas de MHC por células T, através do complexo TCR/CD3, com participação de interações estabelecidas por moléculas coestimuladoras, constitui etapa fundamental para a ativação das células T, que resulta na expansão clonal dessas células. Em consequência, formam-se células T efetoras, processo que faz com que células T $CD4^+$ se diferenciem em diversas subpopulações efetoras e células T $CD8^+$ se difereciem em células citolíticas.

Os linfócitos T participam da regulação central do sistema imune. Nesse sentido, populações de células T $CD4^+$ exercem papéis essenciais, como o de induzir células B a produzirem anticorpos, conferir atividade microbicida a macrófagos, orquestrar a imunidade desenvolvida frente a uma ampla variedade de microorganismos através da produção de citocinas e quimiocinas que atuam no recrutamento celular (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), exercer atividades regulatória e supressora da imunidade, mediar o desenvolvimento de memória imunológica (Zhu, Yamane *et al.*, 2011).

As células T $CD4^+$ exercem suas funções principalmente pela secreção de citocinas e quimiocinas. Células T $CD4^+$ *naive* se diferenciam em diversas subpopulações efetoras, na dependência do padrão de sinais recebidos quando se inicia a interação com o peptídeo antígeno devidamente apresentado na superfície de APCs (Zhu e Paul, 2008). Assim, podem ser desenvolvidas subpopulações de células T $CD4^+$ adequadas para o estabelecimento de respostas eficientes no combate à infecção por fungos (Weaver, Harrington *et al.*, 2006), patógenos intracelulares (Mosmann e Coffman, 1989; Paul e Seder, 1994), patógenos extracelulares, incluindo helmintos (Mosmann e Coffman, 1989; Paul e Seder, 1994). Além

de atuarem no estabelecimento de resistência a patógenos, células T $CD4^+$ exercem papel crítico na manutenção da tolerância e na regulação da imunidade (Sakaguchi, 2004).

1.4. Funções de subpopulações celulares derivadas de linfócitos T $CD4^+$

A identificação de distintas populações de células $TCD4^+$ - Th1 e Th2 - foi feita inicialmente em camundongos (Mosmann, Cherwinski *et al.*, 1986; Killar, Macdonald *et al.*, 1987). Essas populações diferem quanto ao padrão de citocinas produzidas, à expressão de diferentes moléculas de superfície e aos fatores de transcrição up-regulados.

As células Th1 são caracterizadas pela secreção das citocinas IFN-γ e IL-2, bem como pelo aumento de expressão do receptor IL-12Rβ1 (Kano, Sato *et al.*, 2008). Nessa população celular há up-regulação do fator padrão de transcrição T-bet e do ativador de transcrição Stat1, sendo que T-bet relaciona-se ao processo de diferenciação para Th1 e o Stat1 participa da transdução de sinal para a produção de IFN-γ (Lighvani, Frucht *et al.*, 2001). As células Th1 são responsáveis pela resistência a patógenos intracelulares, já que IFN-γ corresponde a um importante ativador da propriedade microbicida de macrófagos (Suzuki, Orellana *et al.*, 1988). Já IL-2 atua como fator linfoproliferativo e é fundamental na formação de células T $CD4^+$ de memória (Darrah, Patel *et al.*, 2007).

As células Th2 secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, bem como expressam elevadamente o receptor IL-4Rα. Nessa subpopulação, o fator de transcrição GATA3 está up-regulado (Zhu, Guo *et al.*, 2001), bem como do transdutor de sinal Stat6 (Kaplan, Schindler *et al.*, 1996). Células Th2 contribuem para a defesa do hospedeiro contra parasitos extracelulares, incluindo helmintos (Mosmann e Coffman, 1989; Paul e Seder, 1994); respostas Th2 exacerbadas podem causar asma.

Em 2003, outra população de células T $CD4^+$ efetoras foi descrita (Aggarwal, Ghilardi *et al.*, 2003; Cua, Sherlock *et al.*, 2003; Murphy, Langrish *et al.*, 2003), caracterizada pela produção de IL-17A, IL-17F e IL-22 (Harrington, Hatton *et al.*, 2005; Park, Li *et al.*, 2005; Veldhoen, Hocking *et al.*, 2006), moléculas essas não produzidas por células Th1 ou Th2. Essa nova subpopulação celular foi denominada Th17; ela atua no estabelecimento de respostas contra bactérias extracelulares e fungos (Weaver, Harrington *et al.*, 2006). Linfócitos Th17 não expressam GATA3 e nem T-bet, mas sim altos níveis de RORγt, induzidos pelo estímulo de TCR em associação com TGF-β e IL-6 (Ivanov, Mckenzie *et al.*, 2006).

Células T reguladoras (Treg) constituem uma subpopulação das células T $CD4^+$ efetoras, capazes de manter a tolerância imunológica, bem como de regular a resposta imune (Sakaguchi, 2004). Essa função supressora é exercida através de vários mecanismos, mas geralmente ela ocorre através da produção de citocinas IL-10, TGF-β e IL-35; ressalte-se que, com certa freqüência, a atividade supressora depende de contato célula-célula (Shevach, 2006). A subpopulação caracteriza-se pelo aumento de expressão de Foxp3 em células T $CD4^+$ convencionais, levando à conversão do fenótipo para Tregs (Fontenot, Gavin *et al.*, 2003).

A heterogeneidade própria das subpopulações de células T $CD4^+$ é dotada de uma certa flexibilidade, que permite o surgimento de células com peculiaridades de mais de um perfil. A plasticidade de células Th1/Th2, por exemplo, parece ser dependente do estado de diferenciação celular (Murphy, Shibuya *et al.*, 1996), já que células Th1 que não estão completamente diferenciadas, quando expostas a condições que propiciam respostas Th2, podem se tornar capazes de produzir IL-4 (Zhu, Min *et al.*, 2004). A existência de células IFN-γ^+IL-4^+ é atribuível ao fato de que células Th1, apenas parcialmente diferenciadas, retenham a capacidade de produzir IL-4; o mesmo pode acontecer com células Th2 incompletamente diferenciadas: na presença de IL-12, elas podem iniciar a produção de IFN-γ. Em relação às células produtoras de IL-17, estas são mais instáveis no fenótipo secretor de citocinas do que as células Th1 e Th2. Verificou-se que células produtoras de IL-17, ao serem expostas a IL-12, começam a secretar IFN-γ; por outro lado, ao serem expostas a IL-4 tornam-se competentes para a produção de IL-4, ainda que se mantenham secretando IL-17 concomitantemente (Zhu e Paul, 2010). Assim são detectadas em condições inflamatórias ou homeostáticas, com frequência, células duplo-positivas IL-17^+IFN-γ^+, fato sugestivo de que exista uma relação intrínseca entre os processos de diferenciação de linfócitos Th1 e Th17 (Zhou, Chong *et al.*, 2009).

1.5. Ativação de células T $CD4^+$

1.5.1. O complexo TCR/CD3

Os estudos iniciais para identificar e caracterizar o receptor de antígeno da superfície de células T (TCR) foram baseados na utilização de anticorpos que reconhecessem os receptores responsáveis pela interação com antígeno (Allison, Mcintyre *et al.*, 1982; Haskins, Kubo *et al.*, 1983). Esse método revelou uma estrutura na superfície celular constituída por proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-CD3 e por proteínas variáveis, designadas α e β

(Borst, Coligan *et al.*, 1984). Esses estudos, somados a outros posteriores, permitiram definir o receptor da célula T como um complexo multimérico composto de um heterodímero αβ ligante de antígeno e de subunidades diméricas, constituídas por CD3εγ, CD3εδ e CD3ζζ (Meuer, Fitzgerald *et al.*, 1983; Haskins, Kappler *et al.*, 1984).

As cadeias TCRα e TCRβ possuem uma região amino-termial variável (V) e outra região carboxi-terminal constante (C), sendo que as regiões Vα e Vβ são similares aos domínios variáveis das imunoglobulinas que, juntas, formam o sítio de ligação ao complexo peptídeo-MHC (Mazza e Malissen, 2007). O heterodímero TCRαβ e os três dímeros (εγ, εδ e ζζ) das subunidades de CD3 associados constituem o complexo TCR/CD3, que é essencial para que uma resposta imune adaptativa tenha início. Análises estrutural e bioquímica das subunidades de CD3 demonstraram que o complexo TCR/CD3 possui 10 “motifs” de ativação, baseados em imunorreceptor de tirosinas (ITAMs), havendo 3 ITAMs em cada subunidade ζ e 1 ITAM nas outras subunidades de CD3. Ao serem fosforilados, os domínios intracelulares dessas subunidades promovem uma cascata de sinalização, que dá início à ativação celular. A fosforilação, por sua vez, é desencadeada pela interação do heterodímero αβ do TCR com o peptídeo antigênico presente no complexo molecular de histocompatibilidade (MHC) das células apresentadoras de antígeno (APCs) (Smith-Garvin, Koretzky *et al.*, 2009). Além disso, o coreceptor CD4 também interage com a molécula de MHC, nesse caso a de classe II, contribuindo para o estabelecimento da sinapse imunológica e propiciando a ativação das células T $CD4^+$.

1.5.2. Transdução de sinal via TCR/CD3

As etapas do processo de sinalização disparado pela interação do TCR com o peptídeo apresentado por MHC, iniciam-se com a ativação de proteína tirosina quinase (PTK) que é responsável por fosforilar os ITAMs das subunidades de CD3, culminando no recrutamento de ZAP-70. Essa molécula terá como alvos duas proteínas adaptadoras, uma delas é a proteína transmembrânica ligada à ativação das células T (LAT) e a outra é a fosfoproteína de 76 kD de leucócito ligante ao domínio SH2 (SLP-76), de localização citosólica. A perda de LAT ou SLP-76 resulta na perda completa da transdução de sinal para ativação das células T (Zhang, Sommers *et al.*, 1999; Sommers, Samelson *et al.*, 2004; Koretzky, Abtahian *et al.*, 2006). A proteína LAT, após fosforilação de seus resíduos de tirosina, associa-se a outras três proteínas: (1) domínio C-terminal de SH2 da fosfolipase-C (PLCγ1), (2) subunidade p85 do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e (3) proteína adaptadora ligada ao receptor de fator de

crescimento (GRB2) (Sommers, Samelson *et al.*, 2004). A proteína SLP-76, que corresponde ao segundo alvo de ZAP-70, é constituída de três domínios: o primeiro, na região N-terminal, contém 3 tirosinas fosforiláveis, que interagem com Vav1, Nck e tirosina quinase induzida por IL-2 (Itk); o segundo, na região C-terminal, reconhece a proteína adaptadora que promove a degranulação e adesão (ADAP); o terceiro domínio liga-se constitutivamente a Gads e PLCγ1 (Koretzky, Abtahian *et al.*, 2006). Todas essas interações caracterizam um complexo molecular, constituído principalmente pelas proteínas ZAP-70, LAT e SLP-76, que atua na amplificação do sinal para a ativação das células T.

Em decorrência da atuação desse complexo molecular, há ativação de PLCγ1 que, através das vias de sinalização dependentes de diacilglicerol (DAG) e Ca^{2+}, leva à transdução de sinal para a ativação. A PLCγ1 no estado ativado hidrolisa o lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4-5 bifosfatado ($PI(4\text{-}5)P_2$), levando à formação de diacilglicerol e IP_3 (inositol 1,4,5 trifosfatado), mensageiros importantes para a função das células T (Smith-Garvin, Koretzky *et al.*, 2009).

O mensageiro DAG está relacionado à ativação de vias que englobam PKCθ e a proteína ligante do nucleotídeo guanina (Ras). A última está envolvida no direcionamento da ativação de proteínas quinases associadas à mitose (MAPKK), como as Erk1 e Erk2, que são quinases reguladas por sinais extracelulares (Smith-Garvin, Koretzky *et al.*, 2009). Ras também está comprometida com a ativação do fator de transcrição AP-1 (proteína-1 ativadora), que corresponde a uma família de fatores de transcrição que incluem c-Jun e c-Fos; além disso, promove a up-regulação de CD69 (D'ambrosio, Cantrell *et al.*, 1994). A proteína PKCθ, pertencente à família de PKC, contém um domínio ligante de lipídeo específico para DAG, sendo essa interação fundamental na ativação de PKCθ. Esta molécula regula a ativação de NF-κB que se encontra no citosol de células quiscentes, associado ao seu inibidor IκB. No entanto, em situação de ativação das células T, IκB é fosforilado pelo complexo de quinase IκB (IKK), seguindo-se a translocação do fator NF-κB para o núcleo, que passa a atuar em genes envolvidos na função, sobrevida e homeostase das células T (Schulze-Luehrmann e Ghosh, 2006).

O mensageiro secundário IP_3, gerado pela atividade de PLCγ1, liga-se ao receptor de IP_3 (IP_3R) na membrana do retículo endoplasmático (RE), iniciando a liberação de Ca^{2+} pelo principal armazenador desse íon. O aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} resulta em ativação de calcineurina fosfatase e quinase, dependentes Ca^{2+}-calmodulina (CaMK); com isso, ocorre a indução de uma variedade de programas transcricionais (Savignac, Mellstrom *et*

al., 2007). A calcineurina fosfatase defosforila o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) no citosol, acarretando em sua ativação e translocação para o núcleo (Crabtree e Olson, 2002). NFAT pode formar um complexo cooperativo transcricional, envolvendo uma variedade de fatores de transcrição, que podem integrar vias de sinalização, como é o caso de NFAT/AP-1, que atua na produção de IL-2 (Smith-Garvin, Koretzky *et al.*, 2009). A ativação de NF-κB também ocorre na presença de Ca^{2+} junto ao DAG, mas de forma dependente de PKC (Li e Verma, 2002); além disso, altos níveis de Ca^{2+} modulam a atividade de AP-1, via quinases dependentes de Ca^{2+} (Rao, Luo *et al.*, 1997).

Essa breve descrição de como ocorre a transdução de sinal via complexo TCR torna evidente que os fatores de transcrição mais importantes na ativação de células T, via TCR, são NF-κB, NFAT e AP-1. A atividade de NF-κB nas células T está ligada à produção das citocinas IL-2, IL-6 e IFN-γ (Tak e Firestein, 2001; Caamano e Hunter, 2002); ao considerarmos NAFT, fica clara a sua associação com a secreção de IL-2, IL-3, IL-4 e IFN-γ, assim como com a expressão de FasL, CD40L e CTLA-4 (Rao, Luo *et al.*, 1997; Macian, Lopez-Rodriguez *et al.*, 2001).

A principal atividade de algumas lectinas obtidas de plantas relaciona-se ao estímulo à mitose de linfócitos. A propriedade mitogênica da fitohemaglutinina (PHA), lectina obtida de *Phaseolus vulgaris*, sobre linfócitos humanos foi descrita em 1960. Atividade mitogênica similar foi atribuída a Concanavalin A (ConA) , lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*, cuja atividade é bloqueada pelo açúcar manose (Sharon e Lis, 2004). ConA constitui-se em exemplo bem definido na literatura de lectina que se liga a glicoproteínas da superfície de linfócitos e leva à ativação celular. O alvo do reconhecimento por ConA na superfície de linfócitos é descrito como estando localizado no complexo TCR/CD3 (Kay, 1991).

1.5.3. Moléculas coestimuladoras e inibitórias

Durante o processo de ativação celular, o início da sinalização é desencadeado pelo chamado primeiro sinal. Essa etapa diz respeito ao reconhecimento pelo complexo TCR/CD3 do peptídeo antigênico apresentado por MHC na superfície de APCs. Dessa forma, ocorre a transdução de sinal para a ativação celular, conforme descrito no item anterior. O primeiro sinal tem papel central no desenrolar da ativação, no entanto, não é suficiente para que a célula seja ativada. É necessária a contribuição de um sinal adicional (segundo sinal) para que a célula não se torne anérgica, estado que compromete a resposta, tornando a célula refratária ao reestímulo com o antígeno (Smith-Garvin, Koretzky *et al.*, 2009). Dentre os receptores

capazes de fornecer o segundo sinal, destaca-se a molécula coestimuladora CD28, que promove a proliferação celular, produção de citocinas, sobrevida celular e aumento no metabolismo da célula (Acuto e Michel, 2003). A magnitude da resposta é consideravelmente aumentada pela co-ligação de CD28, sendo que camundongos deficientes desse co-receptor têm a resposta a agentes infecciosos prejudicada (Acuto e Michel, 2003). O segundo sinal oriundo de CD28 estabiliza o mRNA de citocinas e amplifica a ativação de NFAT e NF-κB (Rincon e Flavell, 1994; Karin e Ben-Neriah, 2000).

Há outras moléculas que promovem a coestimulação das células T, como os receptores CD2, CD5, CD30, 4-1BB, OX-40, ICOS e LFA-1. O coestimulador induzido de células T (ICOS) tem varias características estruturais semelhantes a CD28, incluindo o motif da cauda citoplasmática que reconhece a subunidade p85 de PI3K; a deficiência de ICOS resulta em comprometimento da resposta imune, similar ao observado em animais deficientes de CD28 (Coyle, Lehar *et al.*, 2000). Os coestimuladores distinguem-se pelo período de expressão na superfície celular, característica relacionada ao papel que cada um exerce na imunidade. A expressão de CD28 é crítica na indução inicial da resposta, enquanto a expressão de ICOS, OX-40 e 4-1BB é mais tardia, por serem receptores que atuam no sentido de prolongar e sustentar a resposta e participam da formação de células T de memória (Watts, 2005).

Por outro lado, os limites à expansão e à ativação de células T estimulada apenas por TCR são atribuídos à participação de co-receptores inibitórios, como CTLA-4 (antígeno-4 de linfócito T citotóxico) e PD-1 (Smith-Garvin, Koretzky *et al.*, 2009). Camundongos deficientes em CTLA-4 apresentam células T periféricas muito ativadas, esplenomegalia e infiltrado em órgãos não linfóides (Waterhouse, Penninger *et al.*, 1995). Na deficiência de PD-1, desenvolve-se autoimunidade (Nishimura, Okazaki *et al.*, 2001). Para propagar o sinal negativo que impede a ativação de células T, os receptores inibitórios utilizam motifs similares e vias moleculares comuns às usadas pelo TCR (Chemnitz, Parry *et al.*, 2004). Alternativamente, receptores inibitórios ligam-se às mesmas estruturas com as quais os receptores estimuladores interagem; instala-se uma competição pelo ligante ou por substratos importantes no mecanismo de ativação celular. A relação entre co-estimulação e inibição é bem ilustrada pelo fato de CTLA-4 competir pelos ligantes CD80 e CD86, alvos da ligação por CD28, interferindo na regulação de proteínas do ciclo celular e na expressão de citocinas que seriam induzidas por CD28 (Rudd, Taylor *et al.*, 2009).

1.5.4. Principais moléculas sinalizadoras envolvidas na ativação das células T $CD4^+$

A transdução de sinal decorrente da ativação do complexo TCR/CD3 e de coestimuladores envolve uma rede de sinalização que engloba moléculas com funções distintas. Dentre essas proteínas, algumas se destacam pelo papel chave na manutenção da ativação das células T $CD4^+$: proteína tirosina quinase (PTK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase C (PKC), p38MAPK, p42/44MAPK (ERK1 e ERK2) e JNK (quinase N-terminal c-Jun).

Vários membros da família de proteínas tirosina quinase (PTK) são ativados pelo complexo TCR/CD3, atribuindo-se grande importância à família Src. Fyn pertence a essa família e foi encontrado em associação com as cadeias ε, γ, δ de CD3; é constituído de dois domínios, que possibilitam a interação com diversas proteínas citoplasmáticas envolvidas na sinalização (Timson Gauen, Kong *et al.*, 1992). A atividade de Fyn é intensamente elevada logo em seguida à ocorrência de cross-linking de CD3, o que leva ao aumento dos níveis de fosforilação de tirosina em uma variedade de substratos (Tsygankov, Broker *et al.*, 1992). Lck, que reside na face citoplasmática e ancora-se ao domínio de CD4, também pertence à família Src e relaciona-se à ativação celular via TCR (Veillette, Bookman *et al.*, 1988); na apresentação do antígeno ao TCR, via MHC-II, o receptor CD4 é recrutado para complementar a sinapse imunológica e, dessa maneira, a aproximação de Lck ao domínio citoplasmático do TCR é facilitada; com isso, há ativação de Lck e/ou este fosforila o substrato do TCR, desencadeando a transdução de sinal (Isakov, Wange *et al.*, 1994).

Para auxiliar no processo de ativação celular iniciada pelo complexo TCR/CD3, o coestimulador CD28 utiliza uma proteína efetora downstream, denominada PI3K. Sua subunidade reguladora p85 liga-se a um motif na cauda citoplasmática de CD28, tão logo esta molécula se associe aos seus ligantes CD80 ou CD86 nas APCs. Em seguida, a subunidade catalítica p110 de PI3K é recrutada e converte PIP_2 para fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfatado (PIP_3), na membrana celular. PIP_3 serve de alvo de reconhecimento pela proteína quinase-1 dependente de fosfoinositídeo-3 (PDK1) que, por sua vez, é alvo de Akt (Rudd, Taylor *et al.*, 2009). A ativação de Akt possibilita a translocação de NF-κB para o núcleo, exercendo efeitos positivos na expressão de genes pró-sobrevivência; além disso, Akt afeta a transcrição de genes regulados por NFAT, como os envolvidos na produção de IL-2 (Acuto e Michel, 2003).

A via MAP quinase é de responsabilidade de uma família de proteínas que fosforilam serina/treonina, característica importante na resposta imune mediada por célula. No processo de ativação das células T $CD4^+$ as subfamílias ERK (p42/44MAPK), JNK e p38MAPK

exercem funções essenciais (Gorelik e Richardson). De forma geral, a via ERK relaciona-se ao processo de divisão celular, diferenciação e crescimento (Hommes, Peppelenbosch *et al.*, 2003). Além das funções citadas, acredita-se que ERK1/2 atue na resposta inflamatória. A ativação das células T necessita de ERK1/2 em função de sua propriedade de se translocar para o núcleo, ativando fatores de transcrição como NF-κB e AP-1. ERK1/2 é ativado pelo receptor de IL-2 e por Ras após o início da resposta via complexo TCR/CD3 (Gorelik e Richardson). A molécula PKCθ pode influenciar na ativação de ERK1/2, já que ela ativa diretamente Ras; alguns autores, entretanto, discordam dessa idéia (Sun, Arendt *et al.*, 2000), enquanto outros demonstram o papel de PKCθ na ativação da via ERK1/2 em células T (Werlen, Jacinto *et al.*, 1998).

A sinalização via complexo TCR/CD3 é suficiente para induzir a expressão de JNK1 e JNK2 em células T $CD4^+$ *naive*; contudo, para haver o aumento da expressão é necessária a participação do coestimulador CD28 (Weiss, Whitmarsh *et al.*, 2000). JNK medeia a transcrição de membros da família do fator AP-1, que complementa o processo de ativação das células T $CD4^+$. Tem-se constatado, entretanto, a produção de IL-2 previamente à detecção de JNK e AP-1 ativada, sugerindo que AP-1 não seja crítica para a secreção inicial de IL-2 (Dong, Yang *et al.*, 1998; Weiss, Whitmarsh *et al.*, 2000). Aumento nos níveis da atividade de JNK pode ser verificado em células de perfil Th1; a deficiência de JNK2 prejudica a diferenciação para o perfil Th1, compromete a produção de IFN-γ e a expressão do receptor de IL-12 (Yang, Conze *et al.*, 1998).

Em vários sistemas celulares a p38MAPK associa-se à morte celular e à diferenciação; porém, nas células T $CD4^+$ a inibição ou a ativação de p38MAPK não evita e nem induz, respectivamente, a morte dessas células, (Rincon, Enslen *et al.*, 1998; Merritt, Enslen *et al.*, 2000). Além disso, a ativação de p38MAPK não afeta a resposta proliferativa das células T $CD4^+$; assim, essa via não parece envolvida na morte ou no crescimento desse tipo celular (Rincon e Pedraza-Alva, 2003). A molécula sinalizadora p38MAPK é regulada por diferentes citocinas, como TNF-α, IL-1β, IL-7, IL-12; porém, ela pode regular a expressão de genes das citocinas IL-6 e TNF-α. A inibição de p38MAPK resulta na diminuição de IFN-γ pelas células Th1 e não interfere na secreção de IL-4 pelas células Th2. Adicionalmente, a ativação persistente de p38MAPK leva ao aumento da produção de IFN-γ, demonstrando a necessidade dessa molécula para mediar a transcrição do promotor de IFN-γ (Rincon, Enslen *et al.*, 1998).

Os fatores de transcrição NF-κB, NFAT e AP-1 são todos essenciais para a ativação do gene IL-2. Sabe-se que PKCθ tem como alvo os fatores NFκB e AP-1, mas que somente

ativa esses fatores na presença de sinais decorrentes da via TCR e coestimulador CD28 (Sun, Arendt *et al.*, 2000). Como já referido, PKCθ atua na translocação do fator NFκB para o núcleo, desencadeando a expressão de genes com funções essenciais na ativação das células T $CD4^+$. Sabe-se que PKCθ tem o fator AP-1 como alvo; contudo, sua ativação depende de JNK, p38MAPK e ERK (Sun, Arendt *et al.*, 2000; Pfeifhofer, Kofler *et al.*, 2003).

1.6. Glicosilação de receptores de superfície nas células T $CD4^+$

As glicanas, de forma geral, desempenham funções que são essenciais para as proteínas às quais estão ligadas, como: dobramento e controle de qualidade das proteínas, transporte retrógrado de proteínas para o retículo endoplasmático, geração e apresentação de peptídeos antigênicos via MHC. A grande maioria das proteínas encontradas na superfície das células do sistema imune, tanto as envolvidas com a imunidade inata, como com a adaptativa, são glicosiladas, decoradas com *N*- e *O*-glicanas. Essas glicanas permitem uma proteção adicional às moléculas de superfície por impedirem o acesso de proteases; além disso, nas células T as glicanas limitam as interações não específicas entre proteína-proteína na sinapse imunológica devido ao espaço ocupado pelas glicanas no cluster central (Rudd, Elliott *et al.*, 2001).

As subunidades γ e δ de CD3 são glicosilados, ao contrário da subunidade ε que não apresenta glicanas; isso pode estar relacionado à incapacidade da cadeia ε em acomodar uma extensa glicana e ainda manter a atividade funcional sem prejudicar a interação com o compelxo TCR e as outras subunidades de CD3 (Rudd, Wormald *et al.*, 1999). Em relação ao TCR propriamente dito, verificou-se, por análise cristalográfica, que ele é altamente glicosilado em suas cadeias α e β, sendo que os oligossacarídeos atuam como espaçadores laterais que impedem a ocorrência de interações proteína-proteína não específicas (Rudd, Wormald *et al.*, 1999).

O receptor CD4 apresenta quatro domínios para reconhecimento do MHC, sendo que dois deles possuem uma flexibilidade entre si através de oligossacarídeos com um dos domínios constituído principalmente de oligomanose (Rudd, Wormald *et al.*, 1999). A molécula CD45 é crítica no desenvolvimento das células T, além de atuar no processo de ativação das células T $CD4^+$, sendo que a glicosilação de CD45 tem participação essencial nessas atividades. O receptor CD45 é diferentemente glicosilado ao longo do desenvolvimento das células T, acarretando modificações na sobrevida, ativação e função imune dessas células (Earl e Baum, 2008). CD45 possui vários sítios de *N*- e *O*- glicosilação, característica essa que fundamentou a ativação de células T por jacalina, que induziu a

secreção de citocinas de padrão misto (Th1/Th2), decorrente do aumento da atividade de fosfatase de CD45 (Baba, Yong Ma *et al.*, 2007).

De forma geral, as glicoproteínas são fatores chaves na efetividade da resposta imune, pois a adição de carboidratos é importante na síntese, estabilidade, reconhecimento e regulação das proteínas, e também em diversas interações das proteínas (Rudd, Elliott *et al.*, 2001). Tratando de forma específica dos receptores de superfície, a sua glicosilação é considerada importante na manutenção da estrutura conformacional dessas moléculas, além dos oligossacarídeos participarem na alteração e modulação da função. O fenômeno da sinapse imunológica e suas etapas antecedentes são exemplos muito consistentes que confirmam a necessidade dos açúcares na correta função e interação dos receptores. Além disso, a diversidade de glicanas tem o propósito em exercer a função de impedir a interação inespecífica entre proteína-proteína. Esse papel das glicanas, ao considerar as células T, permite que o TCR não "clusterize" evitando a sinalização de ativação celular em momentos inapropriados (Rudd, Wormald *et al.*, 1999). Isso evidencia a importância em descrever os tipos de glicosilações e quais glicanas compõem cada receptor de superfície das células T $CD4^+$, pois a alteração dessas glicoproteínas pode repercutir em prejuízos para todo o sistema imune. As lectinas podem ser usadas como importante ferramenta no processo de identificação de glicoproteínas com glicosilação alterada.

2. Objetivos

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos da lectina ArtinM sobre as células T $CD4^+$ murinas e investigar os possíveis mecanismos responsáveis por tais efeitos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Avaliar os efeitos diretamente exercidos por ArtinM sobre células T $CD4^+$, no que se refere à produção de citocinas, expressão de moléculas coestimulatórias e inibitórias e indução de diferenciação celular.

2- Identificar os possíveis receptores de superfície reconhecidos por ArtinM e relacionados à ativação das células T $CD4^+$.

3- Apontar moléculas sinalizadoras envolvidas nos efeitos diretos de ArtinM sobre células T $CD4^+$.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, machos, entre 6 e 8 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical com a finalidade em obter o baço para a purificação de células T $CD4^+$. Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com os princípios propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.

3.2. Purificação da lectina ArtinM

A lectina foi purificada de acordo com os procedimentos descritos previamente por Santos-de-Oliveira (1994). Após a remoção de jacalina do extrato bruto das sementes de jaca (*Artocarpus integrifólia*) em coluna de D-galactose acoplada a Sepharose® (Pierce Chemical Company, USA), a lectina ArtinM foi obtida em coluna de D-manose acoplada a Sepharose® (Pierce Chemical Company, USA). O material ligante nesta coluna foi eluido com solução D-mannose 0,1 M, posteriormente, ultradiafiltrado contra PBS. Os procedimentos de cromatografia foram realizados utilizando-se o sistema *AKTA Purifier* (General Electric). Após a diálise com PBS para remoção da mannose, a concentração [µg/ml] da lectina foi determinada em espectrofotômetro (280nm) para aplicar 5µg da amostra, após ser aquecida, em eletroforese de SDS-PAGE (12%), em gel corado por prata. Visando avaliar a pureza da lectina ArtinM purificada, também aplicou no gel o marcador de peso molecular e a 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 confirmado a pureza da lectina ArtinM. Finalizada essa etapa, foi determinada a concentração de ArtinM através do método de BCA.

3.3. Purificação das células T $CD4^+$ esplênicas de camundongos BALB/c

Os linfócitos T $CD4^+$ foram purificados do baço de camundongos *naive* da linhagem BALB/c. Os baços dos animais foram removidos assepticamente e macerados em peneira de nylon com 40µm para obtenção de células esplênicas totais. As células obtidas foram destituídas de hemácias pela adição de 5 mL de tampão de lise (constituído de 9 partes de cloreto de amônio a 0,16 M e 1 parte de Tris-HCl a 0,17 M), durante 10 minutos em gelo. Posteriormente, as suspensões celulares foram lavadas em PBS e adicionadas à uma solução (1ml/baço) de Nicodenz a 15% (Axis-Shield PoC, Oslo, Noruega) para separação celular em

frações de baixa e alta densidade. As células foram centrifugadas na ausência de aceleração e freio a 600g por 15 minutos e a temperatura de 4°C. Após esta etapa, foi descartada a fração celular de baixa densidade e a fração de alta densidade foi lavada duas vezes com PBS-0,5%BSA-2mM EDTA. Verificou-se a concentração celular através da contagem em câmara de Neubauer e conforme descrito no Kit (CD4^{+} T cell isolation Kit, Miltenyi Biotec, USA) ajustou-se proporcionalmente um número determinado de células ao volume de anticorpos e de "microbeads", considerando também os devidos tempos indicados para a incubação a 4°C. As células T CD4^{+} foram eluídas em colunas *Mini Macs* de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) e lavadas duas vezes com RPMI 1640 suplementado com 10% de soro. A concentração celular foi definida pela contagem em câmara de Neubauer e o grau de pureza da amostra celular obtida foi determinado por citometria de fluxo através de anticorpo específico para o receptor CD4, sendo normalmente encontrados os valores entre 90-93% de células positivas para essa marcação.

3.4. Ensaio de aglutinação, expressão de CD25 e CTLA-4 e secreção de citocinas pelas células T CD4^{+} após a curva dose-resposta com ArtinM

As células T CD4^{+} purificadas de camundongos BALB/c, conforme descrito no item 3, foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1x10^{6}células/ml em um volume de 250µl e incubadas por 48 horas. Após 2 horas das células T CD4^{+} terem sido plaqueadas, foi adicionado os devidos estímulos em triplicata. Utilizou-se a Concanavalina A [5µg/ml] como controle positivo em promover a aglutinação celular e foi usado o PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM] como controle positivo da ativação das células T CD4^{+}, o controle negativo constituiu-se de células em meio RPMI 10%. A curva dose-resposta com ArtinM foi aplicada nas seguintes concentrações [µg/ml]: 0,039; 0,156; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10. Após incubação por 48 horas foi averiguado o processo de aglutinação celular provocado pelo uso da lectina ArtinM, realizando a documentação em microscópio invertido de campo claro, conforme o item 5. Ao final dessa incubação o sobrenadante foi retirado para a dosagem das citocinas (item 6), e as células foram marcadas com anticorpos específicos para avaliar a expressão dos receptores CD25 e CTLA-4 na curva dose-resposta (item 7).

Outra análise da aglutinação das células T CD4^{+} foi realizada posterior às 12 horas de incubação, sendo utilizado 1x10^{6}células/ml em um volume de 250µl em placas de 96 poços. As células foram estimuladas com ArtinM [5µg/ml] e como controle positivo da aglutinação celular utilizou-se a Concanavalina A [5µg/ml], já o controle positivo da ativação dessas

células foi usado o PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1μM], e as células apenas com meio RPMI 10% constituiu-se o controle negativo. A documentação da aglutinação celular promovida por ArtinM nesse período de cultura considerado, foi feito em microscópio invertido de campo claro, conforme o item 5.

3.5. Documentação da aglutinação das células T $CD4^+$ *in vitro*

As imagens que demonstram a aglutinação das células T $CD4^+$ em cultura foram capturadas utilizando câmera de vídeo digital acoplada a microscópio invertido de campo claro. As imagens foram adquiridas com objetiva de 40x sendo mantida a mesma escala de contraste e brilho em todas as aquisições. Essa observação foi realizada no ensaio de dose-resposta com ArtinM (item 5), na análise da aglutinação celular após 12 horas de estímulo com ArtinM (item 5) e para o ensaio de competição funcional (item 10) entre ArtinM e os anticorpos específicos para os receptores (CD3ε, CD3εγ, CD45, CD28, CD4) de superfície das células T $CD4^+$.

3.6. Dosagem das citocinas IL-2, IFN-γ, IL-17A e IL-6

A dosagem de citocinas no sobrenadante da cultura celular foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o Kit OptEIA™ (Pharmingen, San Diego, CA, USA) nas dosagens de IL-2, IFN-γ e IL-6, conforme as instruções do fabricante. Para a citocina IL-17A utilizou-se o Kit da MABTECH (MABTECH AB, Sweden, product code: 3521-1H-20), de acordo com as instruções do fabricante.

Placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 50 μl/poço de anticorpo de captura específico para cada citocina testada, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0.1 M e pH 9.5, seguindo-se incubação por 12 horas a 4^oC. A seguir, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com solução de PBS acrescido com 10% de soro fetal bovino inativado (solução de bloqueio) (Sigma) durante 1 hora à temperatura ambiente. Aos poços das placas foram adicionadas, em duplicata, as quantidades conhecidas das citocinas recombinantes (curva-padrão) e o sobrenadante da cultura de células, seguindo-se incubação à temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e adicionados os anticorpos secundários biotinilados (anticorpo de detecção) específicos para cada citocina, diluídos, que foram pré-incubados por 15 minutos com avidina conjugada a peroxidase. A solução foi adicionada às placas e seguiu-se a incubação à temperatura

ambiente durante 1 hora. Para a dosagem de IL-17A o anticorpo secundário biotinilado (anticorpo de detecção) foi adicionado e houve a incubação por 1 hora em temperatura ambiente, em seguida realizou a etapa de lavagem e posterior adição da avidina conjugada a peroxidase por 1 hora em temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem foi adicionado o revelador tetrametilbenzidina (TMB) (Pierce) e o substrato H_2O_2. As reações foram bloqueadas após 15 minutos com ácido sulfúrico 2M e a leitura realizada a 450nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC). O cálculo dos valores em pg/ml foi realizado no programa Prisma 5.0 (Graph Pad Software) tendo como parâmetro a leitura obtida com a curva padrão.

3.7. Marcação dos receptores CD25, CD28 e CTLA-4

As células T $CD4^+$ foram incubadas por 30 minutos a 4°C com 0,5µg de anti-CD16/CD32 mAb (Fc block, clone 2.4G2, BD Pharmingen, San Diego, CA). Em seguida, foram adicionados 2,5µg/ml de anticorpos específicos para CTLA-4 (PE Rat anti-Mouse CTLA-4; clone UC10-4F10-11; BD Pharmingen™), CD25 (FITC Rat anti-Mouse CD25; clone 7D4; BD Pharmingen™) ou CD28 (PE Rat anti-Mouse CD28; clone 37.51; BD Pharmingen™) sendo incubados por 1 hora. Após esta etapa, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com PBS-formaldeído 3% para posterior análise em citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Os valores nos gráficos foram expressos em porcentagem de células positivas para a marcação específica.

3.8. Ensaio para a marcação intracelular de IFN-γ e IL-17

As células T $CD4^+$ purificadas de camundongos BALB/c, conforme descrito no item 3, foram incubadas em placas de 96 poços na concentração de $8x10^5$células/ml em um volume de 250µl por 24 horas de cultura. Essas células foram incubadas com 1µl do inibidor do transporte de proteína (BD GolgiStop™) a cada 1,5ml do volume de cultura durante as últimas 12 horas de incubação. As células T $CD4^+$ tiveram os estímulos adicionados em triplicata, com a lectina ArtinM sendo utilizada na concentração de 5µg/ml. Considerou como controles positivos a Concanavalina A [5µg/ml] e PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM], em relação ao controle negativo adotaram-se as células apenas com meio RPMI10%.

Ao final do período de incubação, as células foram lavadas, fixadas e depois permeabilizadas com 250µl por 20 minutos a 4^oC da solução de fixação/permeabilização (BD

Cytofix/Cytoperm™ Plus). Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 1ml do tampão de lavagem (BD Perm/Wash™ buffer), ressuspendendidas em 50µl de Perm/Wash com 2,5µg/ml de PE-anti-IFN-γ (clone XMG; BD Pharmingen) e 2,5µg/ml de anti-IL-17 (FITC Rat anti-Mouse IL-17; clone eBio17B7; BD Pharmingen™) por 40 minutos a 4°C. Por fim, as células foram lavadas duas vezes com Perm/Wash e ressuspendidas neste tampão para volume final de 250µl, sendo posteriormente analisado em citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System).

3.9. Ensaio citométrico de inibição por ArtinM da ligação de anticorpos específicos à receptores de superfície das células T CD4$^+$

As células T CD4$^+$ foram fixadas com paraformaldeído 3% por 20 minutos e depois tratadas com PBS-1%Glicina-10%SFB por 30 minutos. Uma quantidade de 4x10^5 células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 15µg de ArtinM em volume final de 100µl por 30 minutos. Após lavar duas vezes com PBS para retirar a lectina não ligante, as células foram incubadas por 50 minutos com 2,5µg/ml de anticorpos específicos para as seguintes moléculas de superfície: CD3ε (PE Rat Anti-Mouse CD3ε; clone 145-2C11; BD Pharmingen™), CD3εγ (PE-Cy5 Rat Anti-Mouse CD3 molecular complex; clone 17A2; BD Pharmingen™), CD28 (PE Rat Anti-Mouse CD28; clone 37.51; BD Pharmingen™), CD45.1 (Rat Anti-Mouse CD45.1/Ly5.1; clone 30-F11; BD Pharmingen™) e CD4 (PE-Cy5 Rat Anti-Mouse CD4; clone H129.19; BD Pharmingen™). Após esta etapa, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com PBS-formaldeído 3% e analisadas em citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Os valores expressos no gráfico e histogramas representam a porcentagem (%) de células positivas para cada anticorpo.

3.10. Ensaio de competição funcional entre ArtinM e os anticorpos específicos para os receptores CD3, CD28, CD45 e CD4

As células T CD4$^+$ purificadas foram incubadas com anticorpos específicos para os receptores CD4, CD45, CD28 e CD3, previamente ao estímulo com ArtinM. Para isso, alíquotas dessas células na quantidade de 12x10^5 foram incubadas com anti-CD3ε (Functional grade Purified; clone 145-2C11; BD Pharmingen™), anti-CD3εγ (Rat Anti-Mouse CD3 molecular complex; clone 17A2; BD Pharmingen™), anti-CD28 (Rat Anti-Mouse CD28; clone 37.51; BD Pharmingen™), anti-CD4 (Rat Anti-Mouse CD4; clone H129.19; BD Pharmingen™) e anti-CD45.1 (Rat Anti-Mouse CD45.1/Ly5.1; clone 30-F11; BD Pharmingen™), separadamente, na concentração de 10µg/ml durante 40 minutos.

Posteriormente, as células que foram incubadas com o mesmo anticorpo eram plaqueadas em volume de 250µl ($2x10^5$ células/poço) em placas de 96 poços e separadas em dois grupos de triplicatas, sendo um desses grupos estimulado com ArtinM na concentração de 5µg/ml. Como controle, adotou-se a mesma concentração celular em triplicata na ausência dos respectivos anticorpos, sendo submetidas ou não aos seguintes estímulos: ArtinM [5µg/ml], PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM] e Concanavalina A [5µg/ml]. Ao final de 48 horas de cultura realizou-se a documentação em microscópio invertido da presença ou ausência da aglutinação celular, em seguida retirou-se o sobrenadante para a dosagem de IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A.

3.11. Ensaio de inibição de moléculas sinalizadoras em células T $CD4^+$ estimuladas com ArtinM

As células T $CD4^+$ foram isoladas em alíquotas de $15x10^5$ células para serem adicionados, separadamente, os seguintes inibidores nas devidas concentrações: LY-294002 (inibidor de PI3K) [20µM], PD98059 (inibidor de p42/44MAPK) [20µM], Genisteina (inibidor de PTK) [20µg/ml], SB202190 (inibidor de p38MAPK) [20µM], SP600125 (inibidor de JNK) [25µM], H-7 (inibidor de PKC) [20µM]. Posteriormente, essas células foram incubadas em placas de 96 poços em um volume de 250µl ($2,5x10^5$ células/poço), sendo que as células incubadas com o mesmo inibidor foram divididas em dois grupos de triplicatas. Após 2 horas de incubação, um desses grupos foi submetido ao estímulo com ArtinM na concentração de 5µg/ml, enquanto o outro grupo permaneceu apenas em meio. Como controle positivo de ativação celular utilizou-se o PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM] e a Concanavalina A [5µg/ml]. Após 48 horas de incubação o sobrenadante foi obtido para a dosagem das citocinas IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A, conforme o iem 6.

3.12. Inibição com manotriose da ligação de ArtinM à superfície das células T $CD4^+$

As células T $CD4^+$ após a purificação foram fixadas com PBS-paraformaldeído 3% durante 30 minutos, em seguida essas células eram tratadas com PBS-1%Glicina-10%SFB por 30 minutos e lavadas duas vezes com PBS, sendo utilizado nesse procedimento $5x10^5$ células. A lectina ArtinM acrescentada à essas células foi incubada com manotriose da seguinte forma: 5µg de ArtinM monomérica biotinilada foi incubada com manotriose 10µM, 50µM, 100µM, 500µM e 1mM em uma solução de 100µl por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período de incubação entre ArtinM e as várias concentrações de manotriose, adicionaram-se as células ($5x10^5$/tubo) em duplicata e incubou por 30 minutos a

temperatura ambiente, depois fez-se duas lavagens com PBS. Por fim, adicionou-se estreptavidina conjugada a FITC durante 40 minutos a temperatura ambiente em uma concentração final de 10µg/ml. Em seguida, realizaram-se duas lavagens com PBS e analisou a ligação de ArtinM por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Como controle utilizou-se a mesma quantidade de ArtinM biotinilada sem a prévia incubação com manotriose, além disso, outro controle utilizado foi a incubação de ArtinM biotinilada com um açúcar não específico, neste caso a Galactose [50mM]. Em adição a esses controles, consideraram-se na análise as células T $CD4^+$ sem incubação com ArtinM biotinilada e também apenas as células incubadas com estreptavidina-FITC. Em todos esses controles foi utilizado o mesmo procedimento, citado anteriormente, para a adição de estreptavidina conjugada a FITC. Os dados plotados no gráfico demonstrando a porcentagem de inibição da ligação de ArtinM pela manotriose, foi obtido após a relação entre a porcentagem de células positivas incubadas com ArtinM biotinilada e a porcentagem de células positivas na presença de ArtinM biotinilada que foi previamente incubada com manotriose.

3.13. Predição dos sítios de *N*-glicosilação nos receptores de superfície CD3, CD4, CD28 e CD45

Para a predição dos sítios de *N*-glicosilação, foi utilizada a sequência de aminoácidos no formato FASTA que foi obtida no banco de proteínas do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein), considerando as seqüências de aminoácidos dos receptores específicas para a espécie *Mus musculus*. Essas seqüências foram transferidas para um preditor de domínio público (NetNGlyc 1.0 Server; http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) que informa os potenciais sítios de N-glicosilação, com base no sequon Asn-Xaa-Ser/Thr (onde Xaa denota qualquer aminoácido, exceto a prolina). Os resultados dessa análise foram expressos em gráficos, nos quais se indica a posição do sítio de glicosilação e considera-se como potencial sítio de *N*-glicosilação aquele que atingir valor superior ao threshold previamente estabelecido. O estudo de predição foi realizado para CD3ε, CD3γ, CD3δ, CD4, CD28, CD45 isoforma 1 e CD45 isoforma 2.

3.14. Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa Prisma 5.0 (Graph Pad Software). Todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. O teste aplicado foi One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados estão expressos

em média ± EPM (erro padrão da média), com as diferenças observadas sendo consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

4. Resultados

4.1. ArtinM promove a aglutinação de células T $CD4^+$ murinas em cultura

A primeira evidência de que ArtinM interage com células T $CD4^+$ foi proporcionada pela aglutinação dessas células pela lectina, ensaiada em concentrações que variaram de 0,039µg/ml a 10µg/ml. Para tanto, foram utilizadas células T $CD4^+$ murinas purificadas, cultivadas a partir de uma suspensão de $1x10^6$células/ml. Concanavalin A e PMA (phorbol myristate acetate)+Ionomicina constituíram os controles positivos de aglutinação e ativação celular, respectivamente, enquanto meio, apenas, foi utilizado como controle negativo. A leitura da reação foi feita em microscópio de campo claro com aumento de 40 vezes após 48 horas de incubação (Figura 1). ArtinM promoveu aglutinação celular evidente a partir de 1,25µg/ml, positiva até a maior concentração utilizada. A Concanavalina A determinou aglutinação semelhante à proporcionada por 1,25µg/ml de ArtinM (Figura 1). No caso dos linfócitos incubados com PMA+Ionomicina foi observado clusters de ativação e não houve aglutinação no controle negativo, com apenas o meio (Figura 1).

A análise da aglutinação das células T $CD4^+$ causada por ArtinM após 48 horas de incubação não permitiu uma distinção clara entre a aglutinação promovido pela lectina e os clusters de ativação provocado por PMA+Ionomicina. Para isso, observou-se em um curto período de incubação, perfazendo 6 horas, se haveria a formação da aglutinação celular através de ArtinM e se “clusters” de ativação celular na presença de PMA+Ionomicina seriam formados. Ficou evidente que ArtinM na concentração de 5µg/ml promove a aglutinação celular da mesma forma que a Concanavalina A utilizada como controle positivo (Figura 2). No entanto, as células T $CD4^+$ não formaram “clusters” de ativação para o mesmo período que se verificou a aglutinação celular, isso permite afirmar que os efeitos de ArtinM vistos nas 48 horas de incubação realmente tratava-se de aglutinação das células T $CD4^+$ (Figura 2).

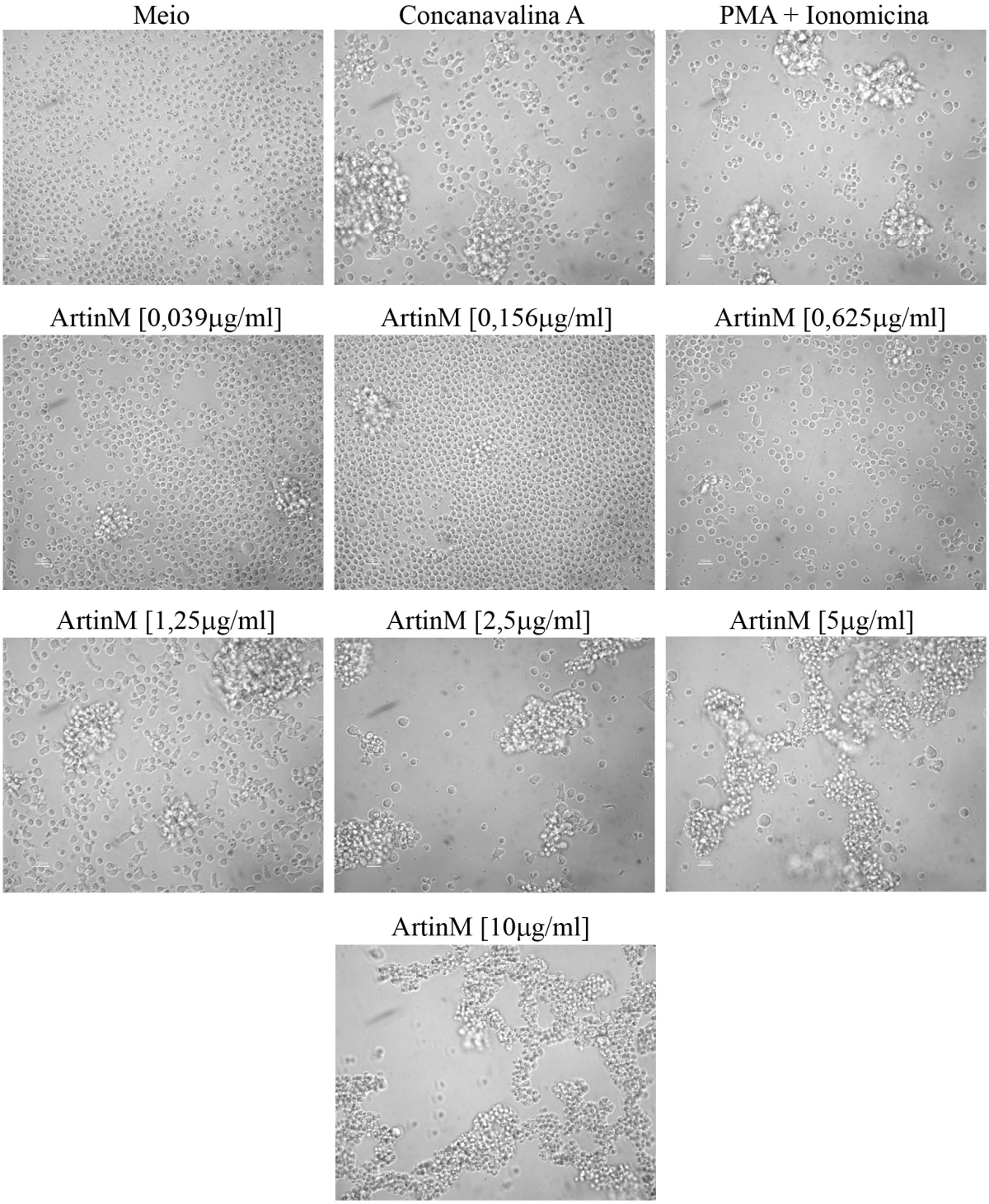

Figura 1. Aglutinação de linfócitos T CD4$^+$ por ArtinM após 48 horas de incubação. Células T CD4$^+$ foram purificadas a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c e ressuspensas em 250µl de RPMI 10%, de maneira a proporcionar 1x10^{6}células/ml. Seguiu-se a incubação por 48 horas à 37°C com ArtinM nas concentrações indicadas, tendo como controles positivos Concanavalina A [5µg/ml], PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM], e meio como controle negativo. Aglutinação celular foi observada em microscópio invertido de campo claro, utilizando-se objetiva de 40x.

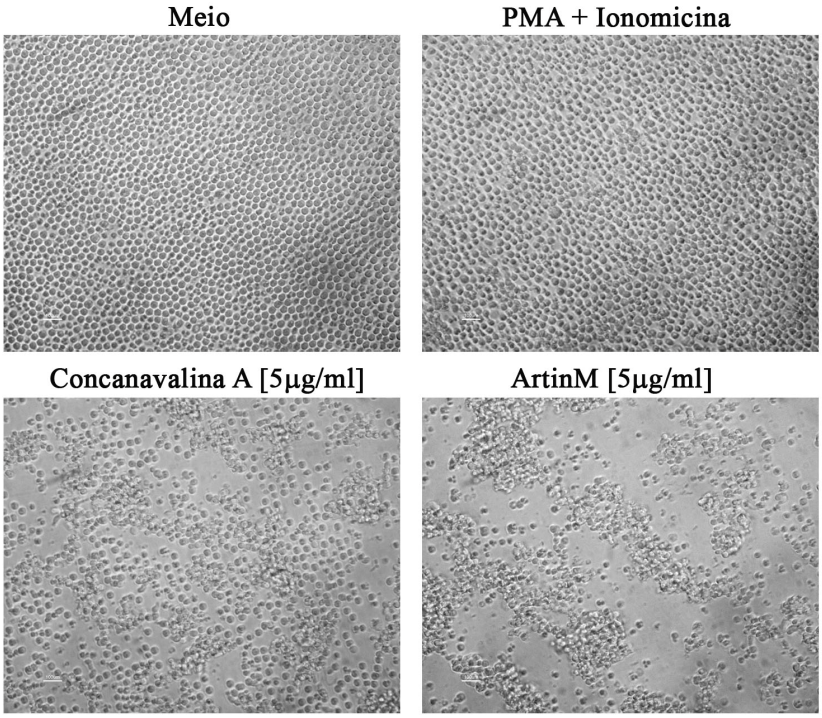

Figura 2. Aglutinação de linfócitos T CD4$^+$ por ArtinM após 6 horas de incubação. Células T CD4$^+$ foram purificadas a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c e ressuspensas em 250µl de RPMI 10%, de maneira a proporcionar 1x10^{6}células/ml. Seguiu-se a incubação por 6 horas à 37°C com ArtinM nas concentrações indicadas, tendo como controles positivos Concanavalina A [5µg/ml], PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] e meio como controle negativo. A aglutinação celular foi observada em microscópio invertido de campo claro, utilizando-se objetiva de 40x.

4.2. ArtinM induz células T CD4$^+$ a produzirem citocinas de perfis Th1 e Th17.

A capacidade de aglutinar linfócitos T CD4$^+$ suscitou a hipótese de que ArtinM reconhece glicanas na superfície celular, glicanas essas que poderiam ser constituintes de receptor(es) envolvidos em sinalização e ativação celular. Testamos tal hipótese através de ensaios de produção de citocinas pelos linfócitos T CD4$^+$ estimulados com ArtinM, na tentativa de verificar se a interação induziria, de maneira direta, a ativação e a diferenciação das células T CD4$^+$ *naive*. Com base em observações anteriores de que ArtinM favorece o estabelecimento de respostas Th1 e Th17, foi determinada a concentração de citocinas que caracterizam esses perfis de resposta no sobrenadante das células estimuladas.

Linfócitos T CD4$^+$, sob estímulo de diferentes concentrações de ArtinM (0,039µg/ml a 10µg/ml), produziram quantidades de IL-2 e IFN-γ significativamente ($p<0,05$) superiores às produzidas por células não estimuladas (Figura 3), e que foram máximas quando concentrações próximas de 2,5 µg/ml de ArtinM foram utilizadas como estímulo. No caso de IL-2, sua produção atingiu níveis que corresponderam a cerca de 50% dos determinados pelos controles positivos (ConA ou PMA+ionomicina). No que concerne às concentrações de IFN-γ, elas foram similares às determinadas pelos controles positivos (Figura 3).

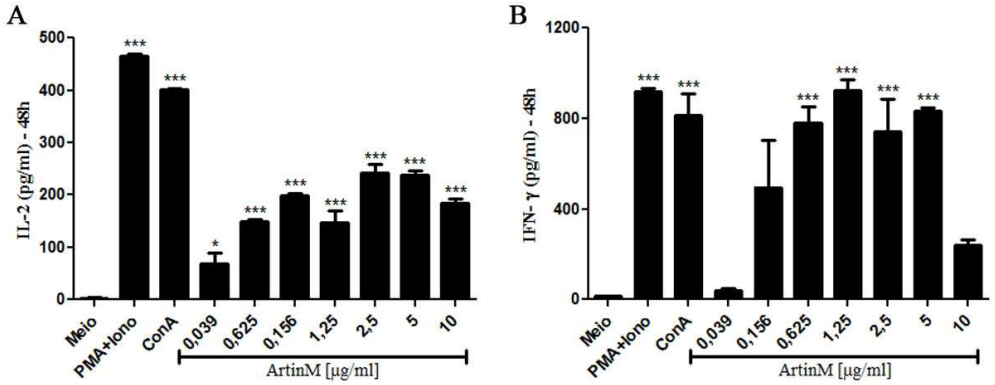

Figura 3. ArtinM induz a produção de IL-2 e IFN-γ por linfócitos T CD4$^+$ em cultura. Células T CD4$^+$ foram purificadas a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c e ressuspensas em 250µl de RPMI 10%, de maneira a proporcionar 1x10^{6}células/ml. As células foram incubadas por 48 horas à 37°C sob estímulo com ArtinM, nas concentrações indicadas. Concanavalina A [5µg/ml] ou PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] foram utilizadas como controles positivos, tendo apenas meio como controle negativo. As concentrações de IL-2 (painel A) e IFN-γ (painel B) no sobrenadante dessas células foram determinadas por ELISA. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Os níveis de IL-6 e IL-17A secretados pelas mesmas células T CD4$^+$ em resposta ao estímulo com ArtinM, em diferentes concentrações, são mostrados na Figura 4. Os níveis de IL-6 aumentaram gradativamente em função da concentração de ArtinM utilizada, enquanto os de IL-17 desenharam uma curva dose-resposta em sino, cujo pico associou-se ao estímulo com 2,5µg/ml de ArtinM (Figura 4B).

Esse conjunto de resultados sugere que a interação direta de ArtinM com linfócitos T CD4$^+$ induza a diferenciação de células Th *naives* para Th1 e Th17.

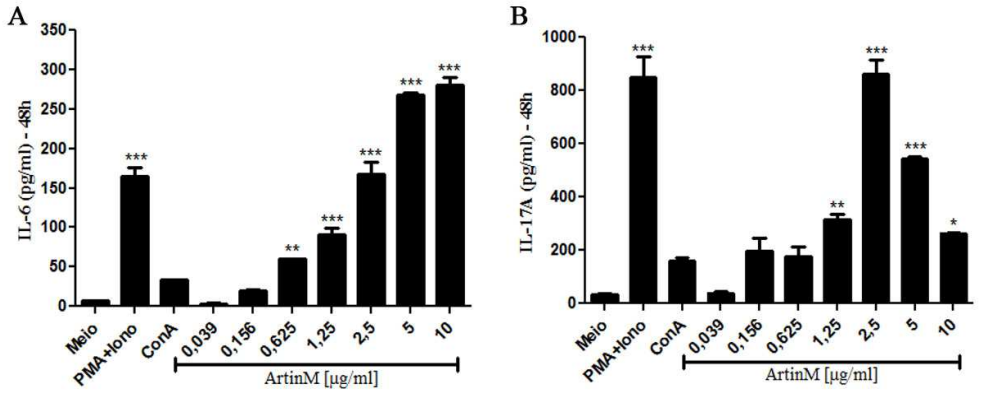

Figura 4. ArtinM induz a produção de IL-6 e IL-17A por linfócitos T CD4$^+$ em cultura. Células T CD4$^+$ foram purificadas a partir de células esplênicas de camundongos BALB/c e ressuspensas em 250µl de RPMI 10%, de maneira a proporcionar 1x10^{6}células/ml. As células foram incubadas por 48 horas à 37°C sob estímulo com ArtinM, nas concentrações indicadas. Concanavalina A [5µg/ml] ou PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] foram utilizadas como controles positivos, tendo apenas meio como controle negativo. As concentrações de IL-6 (painel A) e IL-17 (painel B) no sobrenadante dessas células foram determinadas por ELISA. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

4.3. ArtinM induz a expressão de CD25 e CTLA-4 em células T CD4$^+$.

A alta produção de IL-2 e IFN-γ, estimulada com ArtinM em células T CD4$^+$, indicou a ocorrência de ativação celular. Assim, células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM, em diferentes concentrações, foram avaliadas, por citometria de fluxo, quanto à expressão de CD25 (cadeia α do receptor de IL-2) e CD152 (CTLA-4, receptor para B7.1 e B7.2, ou CD80 e CD86), ambos utilizados como marcadores de ativação celular (não expressos em células T em repouso).

A figura 5 mostra que ArtinM induziu importante incremento na proporção de células T CD4$^+$ que expressavam CD25 (painel A) e CTLA-4 (painel B), aumento esse que foi determinado a partir da concentração de 0,625μg/ml de ArtinM, no caso de CD25, e a partir de 2,5 μg/ml, no caso de CTLA-4. Em ambos os casos a porcentagem de células positivas foi próxima à determinada pelos controles positivos.

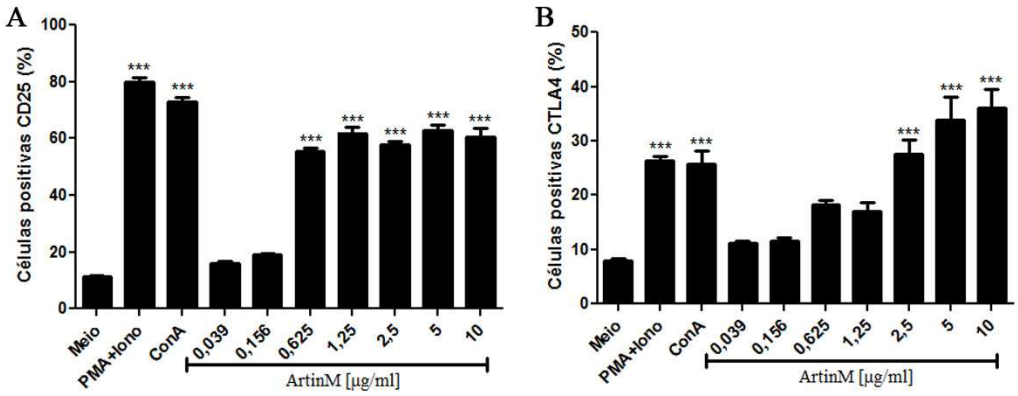

Figura 5. Expressão de marcadores de ativação por células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM. Analisou-se, por citometria de fluxo, a porcentagem de células T CD4$^+$ que expressam CD25 (painel A) ou CTLA-4 (painel B) em resposta ao estímulo com ArtinM, por 48 horas, nas concentrações indicadas. Concanavalina A [5μg/ml] ou PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1μM] foram utilizadas como controles positivos, tendo apenas meio como controle negativo. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Avaliou-se ainda a ocorrência de células duplo-marcadas para CD25 e CTLA-4. As proporções mais altas de células duplo-positivas foram determinadas por concentrações de ArtinM de 2,5-10,0 μg/ml; as proporções atingidas foram significativamente ($p<0,001$) diferentes do controle negativo, bem como similares (2,5 e 5,0 μg/ml) ou superior (10,0 μg/ml) às determinadas pelos controles positivos (Figura 6, painel B). Concentrações inferiores associaram-se à queda progressiva das proporções de células duplo-positivas, que passaram a ser próximas às proporcionadas pelo controle negativo. Os gráficos de pontos incluídos na figura 6 (painel A) ilustram a leitura citométrica proporcionada por uma dentre as

três amostras analisadas. Por outro lado, o gráfico de barras (painel B) mostra a média e o erro padrão da média das leituras proporcionadas pelo total de amostras analisadas.

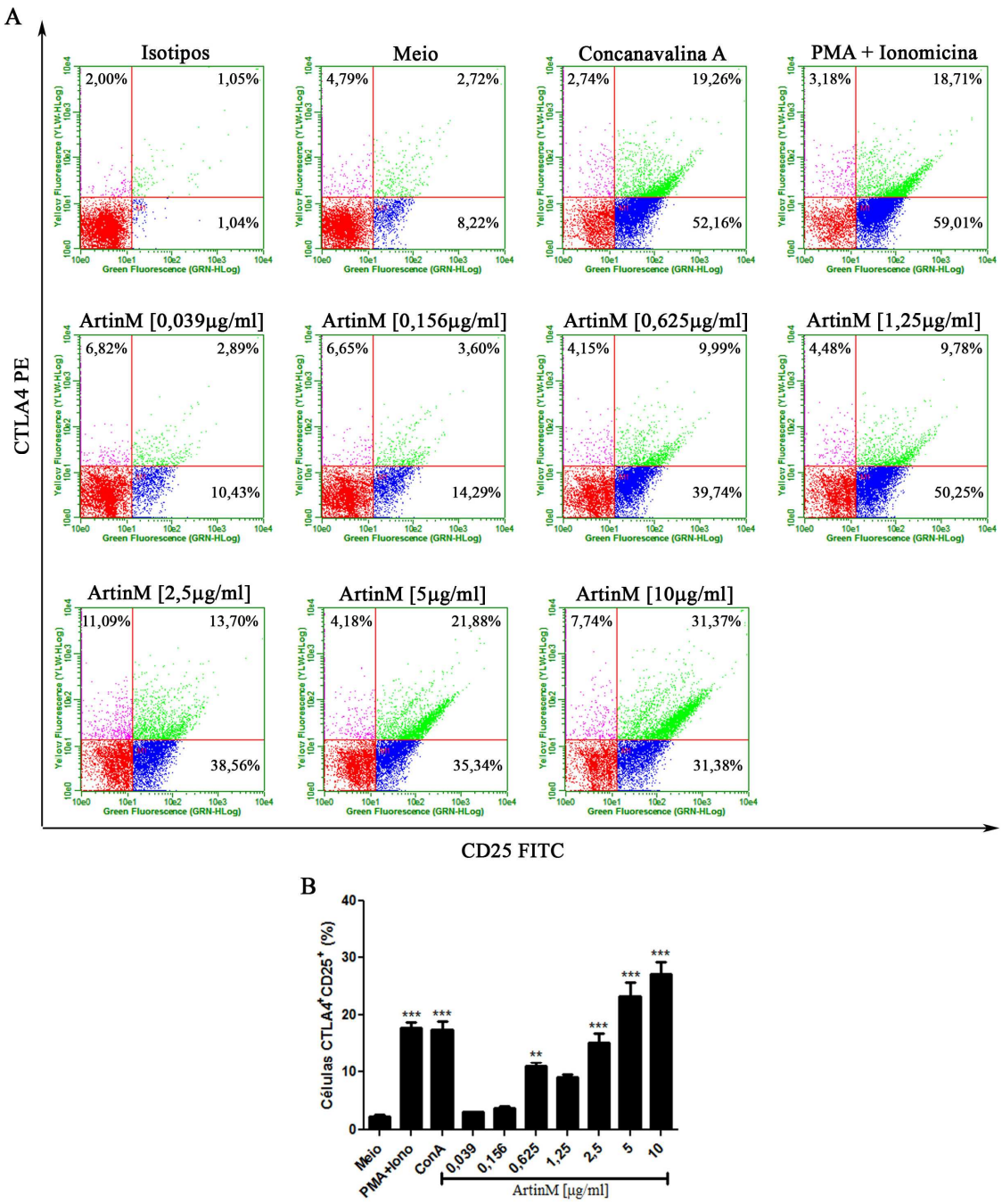

Figura 6. Dupla positividade para CD25 e CTLA-4 em células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM. O painel A mostra o perfil citométrico de células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM, nas concentrações indicadas, por 48 horas. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD25 marcados com FITC e anti-CTLA-4 marcados com PE. Concanavalina A [5µg/ml] ou PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] foram utilizadas como controles positivos, tendo apenas o meio como controle negativo. As porcentagens de células simples-positivas e duplo-positivas estão indicadas nos quadrantes respectivos. No painel A, o perfil mostrado corresponde à citometria de uma das amostras analisadas. O painel B refere-se à porcentagem média de células T CD4$^+$ duplo-positivas para CD25 e CTLA-4, detectadas em 3 diferentes amostras da preparação de células. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

4.4. Expressão de CD28 e CTLA-4 em células T $CD4^+$ no decorrer do estímulo com ArtinM

Uma vez que a molécula CTLA-4, no decorrer do processo de ativação celular, é normalmente expressa subsequentemente à ligação da molécula CD28 a CD80 e CD86, avaliou-se a expressão, no decorrer do tempo (12, 24 e 48 horas), de CD28 e CTLA-4 nas células T $CD4^+$ a partir do estímulo com ArtinM (5µg/ml). PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM] e Concanavalina A-ConA-[5µg/ml] foram utilizados como controles positivos, e apenas meio como controle negativo.

As Figuras 7 e 8 mostram, respectivamente, que a expressão de ambas as moléculas, CD28 e CTLA-4, em células não estimuladas (meio), foi baixa e estável durante todo o decorrer do tempo. Células T $CD4^+$ estimuladas com PMA+Ionomicina (controle positivo) aumentaram a expressão de CD28 a partir de 24 horas e de CTLA-4 com 48 horas de estímulo. No caso do estímulo com ConA, a expressão de ambas as moléculas só aumentou significativamente ($p<0,001$) com 48 horas de estímulo. O estímulo com ArtinM determinou expressões mais altas e mais precoces de ambos os coestimuladores: a proporção de células positivas foi de 30% já nas primeiras 12 horas de estímulo, tempo no qual os controles positivos determinaram uma proporção máxima de 10% de células positivas. As proporções de células positivas determinadas por ArtinM mantiveram-se altas durante todo o período do estudo, sendo que, em 48 horas, aproximadamente 40% das células expressavam CTLA-4 (Figura 8).

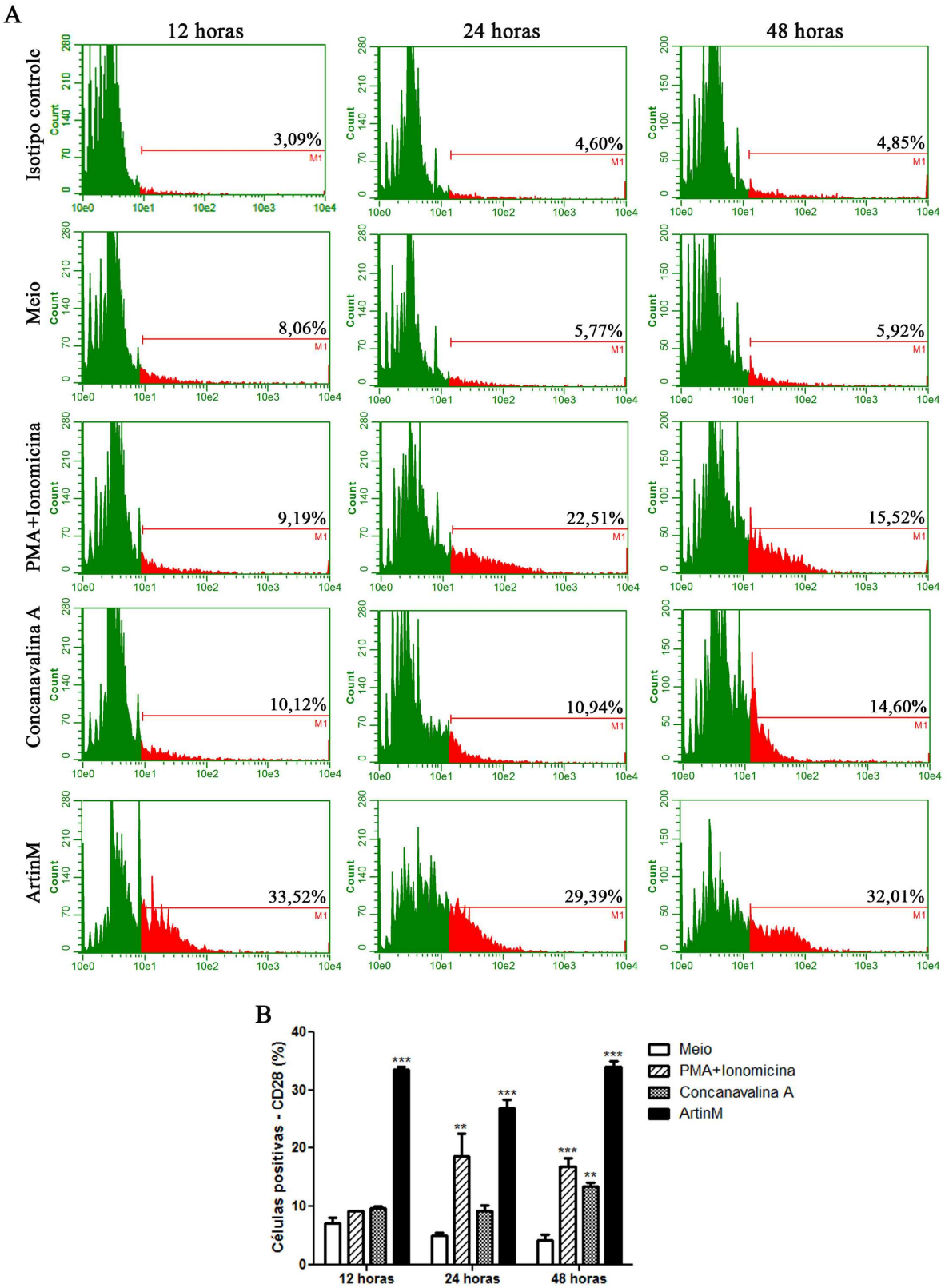

Figura 7. Expressão de CD28 em células T CD4^{+} nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo com ArtinM. A expressão foi analisada por citometria de fluxo, sendo demonstrada em histogramas (A) e gráfico (B) a porcentagem de células positivas para CD28. A concentração de ArtinM utilizada foi de 5µg/ml, já os controles positivos constituíram-se de Concanavalina A –ConA- [5µg/ml] e PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM]. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio referente ao mesmo período, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

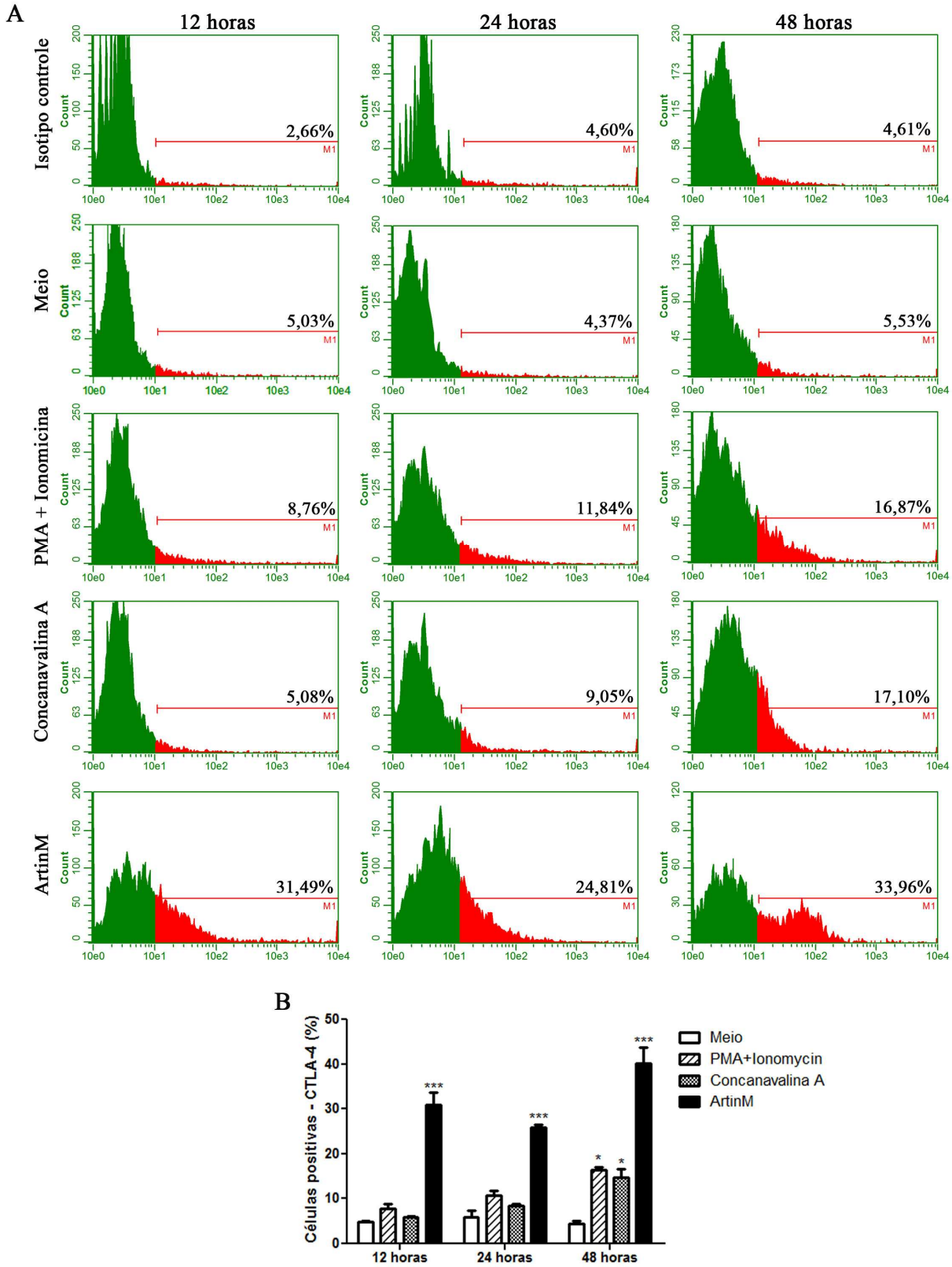

Figura 8. Expressão de CTLA-4 em células T CD4$^+$ nos períodos de 12, 24 e 48 horas após o estímulo com ArtinM. A expressão foi analisada por citometria de fluxo, sendo demonstrada em histogramas (A) e gráfico (B) a porcentagem de células positivas para CTLA-4. A concentração de ArtinM utilizada foi de 5µg/ml, já os controles positivos constituíram-se de Concanavalina A –ConA- [5µg/ml] e PMA[50ng/ml]+Ionomicina[1µM]. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio referente ao mesmo período, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

4.5. Produção de citocinas por células T CD4+ no decorrer do tempo a partir do estímulo com ArtinM

A precocidade da expressão de CTLA-4 e CD28 por células T $CD4^+$ a partir do estímulo com ArtinM motivou a avaliação cinética de produção de citocinas por essas células, a partir do estímulo com a lectina. As citocinas avaliadas foram as próprias dos padrões Th1 e Th17, produzidas por células T $CD4^+$ sob estímulo com ArtinM (veja item 2 deste capítulo de Resultados).

O estímulo com ArtinM (5µg/ml) resultou em produção estável de IL-2, em níveis que foram similares aos determinados pelos controles positivos nos períodos de 12 e 24 horas, e menores do que os detectados nos controles com 48 horas de estímulo (Figura 9A). A secreção de IFN-γ por células T $CD4^+$ sob estímulo de ArtinM cresceu gradativamente no decorrer do tempo de cultura (Figura 9B). Ainda assim, seus níveis foram, em todos os tempos, inferiores aos determinados pelos controles positivos. A comparação dos perfis cinéticos determinados por ArtinM e por outros estímulos não demonstrou haver uma associação clara entre os processos de ativação celular e de produção de citocinas Th1. No caso da cinética de produção de IFN-γ, é válido supor que a expressão precoce de CTLA-4 por linfócitos T $CD4^+$ estimulados com ArtinM esteja implicada, através de seu efeito inibitório da ativação celular, na produção menor da citocina, em todos os tempos, do que a verificada nos controles.

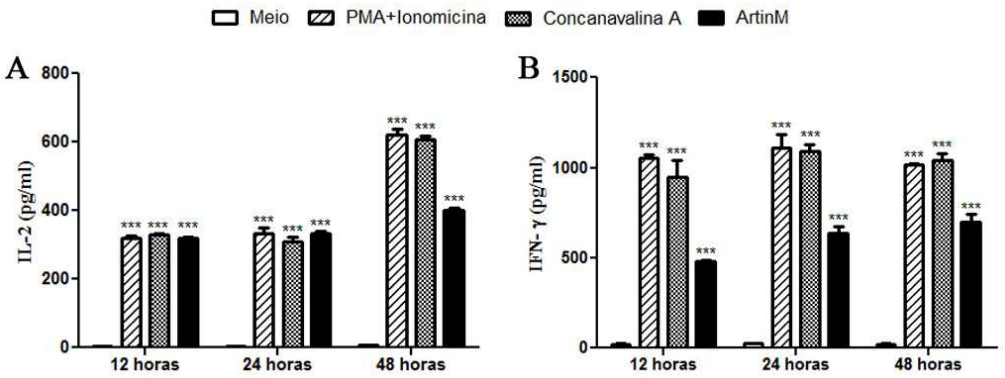

Figura 9. Produção de citocinas Th1 por células T $CD4^+$ no decorrer do tempo a partir do estímulo com ArtinM. Níveis de IL-2 (A) e de IFN-γ (B) detectados, por ELISA, no sobrenadante de células T $CD4^+$ cultivadas sob estímulo de ArtinM [5µg/ml]. As amostras foram coletadas 12, 24 e 48 horas após o estímulo. Concanavalina A –ConA- [5µg/ml] e PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] correspondem a controles positivos; o meio, ao controle negativo. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio referente ao mesmo período, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

ArtinM induziu a produção de ambas as citocinas, IL-17A e IL-6, detectadas em níveis significativamente ($p<0,001$) superiores aos proporcionados pelos controles negativos, em todos os períodos de estímulo avaliados. A produção de IL-17A foi estável durante todo o período do estudo, enquanto a produção de IL-6 foi maior com 12 horas de estímulo, decrescendo a seguir (Figura 10). Os níveis de IL-17A induzidos por ArtinM foram superiores aos obtidos com ConA nas 12 e 24 horas de estímulo, tornando-se semelhante após 48 horas; em comparação aos valores obtidos por PMA+Ionomicina os níveis proporcionados por ArtinM foram inferiores (Figura 10A). Esses mesmos controles positivos induziram menor produção de IL-6 do que a promovida por ArtinM, em todos os períodos ensaiados (Figura 10B). A comparação dos perfis cinéticos determinados por ArtinM e por outros estímulos não demonstra haver uma associação clara entre os processos de ativação celular e de produção de citocinas Th17, da mesma maneira que o observado com relação a citocinas Th1.

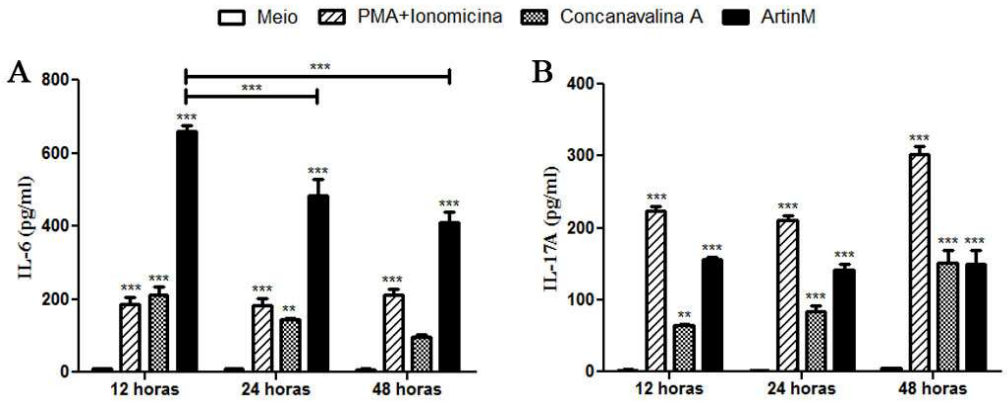

Figura 10. Produção de citocinas Th17 por células T CD4$^+$ no decorrer do tempo a partir do estímulo com ArtinM. Níveis de IL-6 (A) e de IL-17A (B) detectados, por ELISA, no sobrenadante de células T CD4$^+$ cultivadas sob estímulo com ArtinM [5µg/ml]. As amostras foram coletadas 12, 24 e 48 horas após o estímulo. Concanavalina A –ConA- [5µg/ml] e PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] correspondem a controles positivos; o meio, ao controle negativo. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio referente ao mesmo período, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

4.6. ArtinM atua em células T CD4$^+$ originando células duplamente marcadas para IFN-γ e IL-17

A observação de que células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM produzem citocinas características de subpopulações celulares Th1 (IFN-γ) e Th17 (IL-17), associada a dados de literatura indicativos de que IFN-γ, considerada uma citocina Th1 típica, pode ser também definida em células de perfil Th17, conduziu à avaliação da ocorrência de células duplo positivas para ambas as citocinas em resposta ao estímulo com ArtinM. Para tanto, células T

CD4$^+$ foram cultivadas na presença de ArtinM (5µg/ml) por 24 horas, sendo que, com 12 horas de cultivo, acrescentou-se um inibidor de transporte de maneira a reter as citocinas no meio intracelular e tornar sua marcação mais evidente. O estímulo com ArtinM resultou em aumento significativo ($p<0,001$) de células duplo-positivas para IFN-γ e IL-17 (Figura 11 e 12C), bem superior ao aumento propiciado por PMA+Ionomicina (ConA não teve efeito sobre a frequência dessas células). A frequência de células T CD4$^+$ positivas apenas para IFN-γ foi maior nos controles positivos do que frente ao estímulo com ArtinM (Figura 12A), enquanto um padrão inverso foi revelado por células positivas apenas para IL-17 (Figura 12B). Assim, ambas as lectinas usadas como estímulo, ArtinM e Concanavalin A, levaram à intensa marcação intracelular de IFN-γ. Dentre elas, entretanto, apenas ArtinM promoveu aumento de marcação para IL-17, isolada ou em associação com IFN-γ.

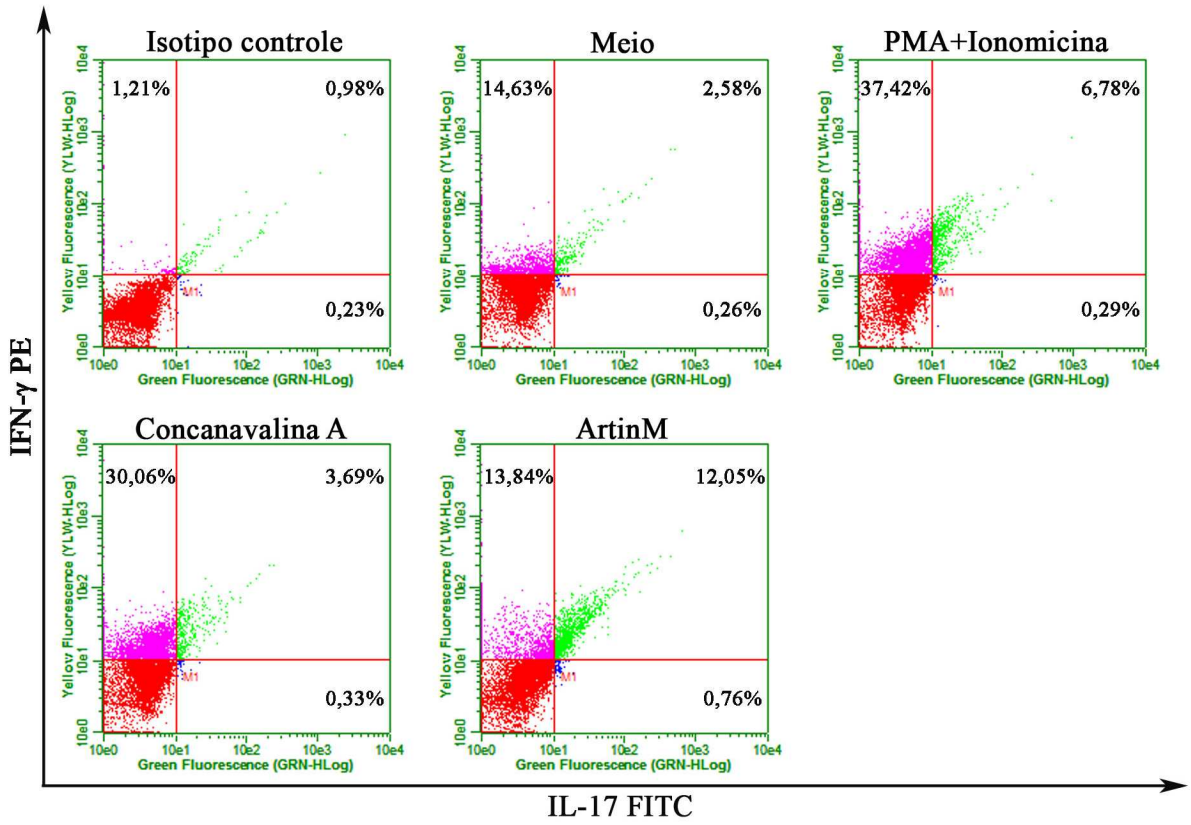

Figura 11. Histogramas que representam a freqüência de células T CD4$^+$ marcadas intracelularmente para IFN-γ e/ou IL-17, em resposta ao estímulo com ArtinM. Após 24 horas de cultura sob o estímulo de ArtinM [5µg/ml], as células foram permeabilizadas e incubadas com anticorpos específicos para IFN-γ (conjugados a PE) e IL-17 (conjugados a FITC). As freqüências de células positivas para IFN-γ, IL-17 ou ambas as citocinas foram determinadas a partir de análise por citometria de fluxo e indicadas em porcentagem nos quadrantes respectivos. A figura mostra o resultado proporcionado por apenas uma das amostras analisadas. Concanavalina A –ConA- [5µg/ml] e PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] correspondem a controles positivos, tendo o meio como controle negativo.

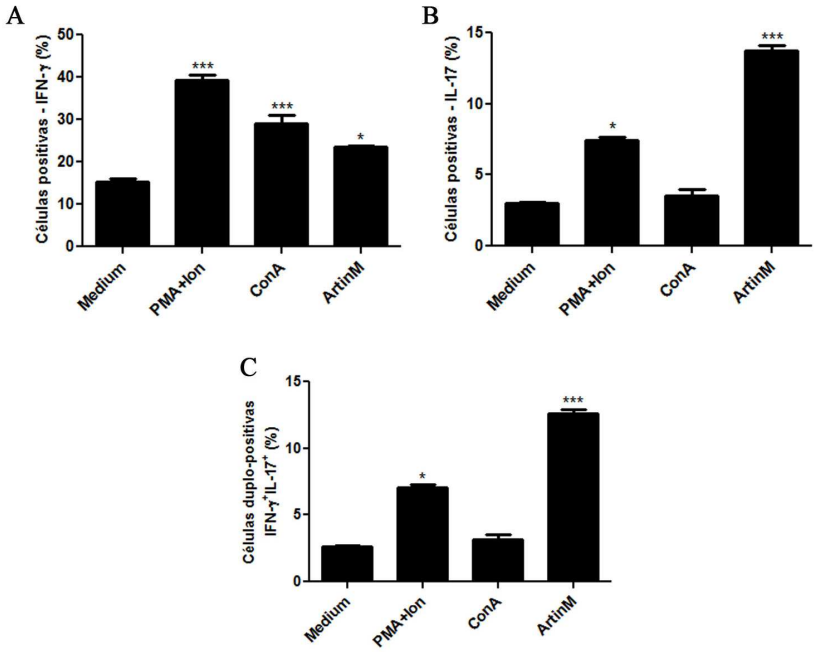

Figura 12. Freqüência média de células T CD4$^+$ marcadas intracelularmente para IFN-γ e/ou IL-17, em resposta ao estímulo com ArtinM. Freqüência de células T CD4$^+$ positivas para a marcação intracelular de IFN-γ (A), IL-17 (B) ou duplo-positivas para IFN-γ$^+$IL-17$^+$ (C). Análise realizada por citometria de fluxo, em triplicata, após 24 horas de cultura sob o estímulo de ArtinM [5µg/ml] e pelos controles positivos de Concanavalina A –ConA- [5µg/ml] e PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM]. Valores com diferenças significativas em relação ao Meio, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

4.7. Potenciais sítios de *N*-glicosilação em receptores de superfície relacionados à ativação das células T CD4$^+$

Diante das evidências de que ArtinM estimula diretamente linfócitos T CD4$^+$, buscou-se identificar o(s) glicoalvo(s) reconhecido(s) pela lectina na superfície celular, responsável(eis) por desencadear a ativação e diferenciação celular e a produção de citocinas. Dessa forma, investigaram-se os receptores responsáveis pela transdução de sinal para ativação das células T CD4$^+$, ou seja, CD3, CD28, CD45 e CD4. A análise da glicosilação nestas moléculas de superfície teve como foco as predições para *N*-glicanas, visto a especificidade da lectina ArtinM por esse tipo de glicosilação.

O primeiro receptor a ser observado foi o CD3 por constituir o complexo TCR que está relacionado com o primeiro sinal para a ativação das células T CD4$^+$. Analisaram-se separadamente as cadeias de CD3 e ficou demonstrada a presença de potenciais sítios de *N*-glicosilação nas cadeias delta (δ) e gamma (γ), porém a cadeia epsilon (ε) não apresentou potenciais *N*-glicanas (Figura 13). A molécula CD4 tem importante participação na transdução de sinal durante a interação do MHC com o TCR, e com o estudo de predição também se verificou potenciais sítios de *N*-glicosilação em CD4 (Figura 14A).

Ao considerar a indução da expressão de CTLA-4 e CD28 após as células T CD4$^+$ serem estimuladas com ArtinM, optou-se por investigar a glicosilação da molécula CD28. Isso se justifica pela relação existente entre CD28 e o receptor inibitório CTLA-4 durante o processo de ativação e expansão celular. Em acréscimo a isso, o papel coestimulador da molécula CD28 é fundamental por corresponder ao segundo sinal necessário para a ativação das células T CD4$^+$. Como se verifica na Figura 14B, o receptor CD28 possui quatro potenciais sítios de *N*-glicosilaçaõ (Figura 14B). O mesmo tipo de análise aplicada a duas isoformas de CD45 (Figura 14 C e D), que correspondem a outro receptor associado ao processo de ativação de TCD4$^+$ - o qual exerce função de fosfatase -, demonstrou a existência de numerosos sítios potenciais de N-glicosilação.

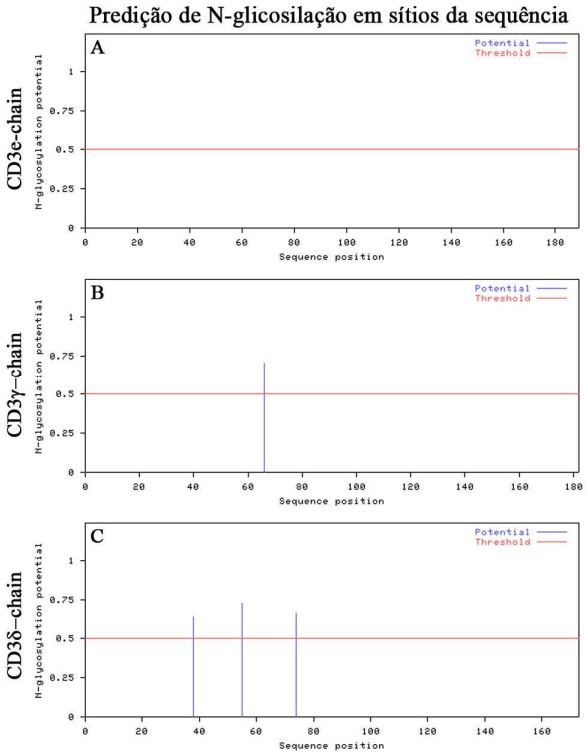

Figura 13. Predição de potenciais sítios de *N*-glicosilação nas cadeias do receptor CD3. Gráficos demonstrando a posição de potenciais sítios de *N*-glicanas nas cadeias epsilon (A), gamma (B) e delta (C) do receptor CD3. A sequência de aminoácidos das cadeias do receptor foram adicionadas ao NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) no formato FASTA e submetido para análise. Foi fornecida a predição dos potenciais sítios de *N*-glicosilação que são representados em gráficos. No gráfico, quando o threshold, visto pela linha vermelha, for ultrapassado pelo potencial (linha azul) tem-se uma predição de N-glicosilação em determinada posição na sequência de aminoácido (eixo x). Dessa forma, a cadeia epsilon não apresentou potenciais sítios de *N*-glicosilação (A), enquanto as cadeias gamma (B) e delta (C) possuem, respectivamente, um e três sítios de *N*-glicosilação.

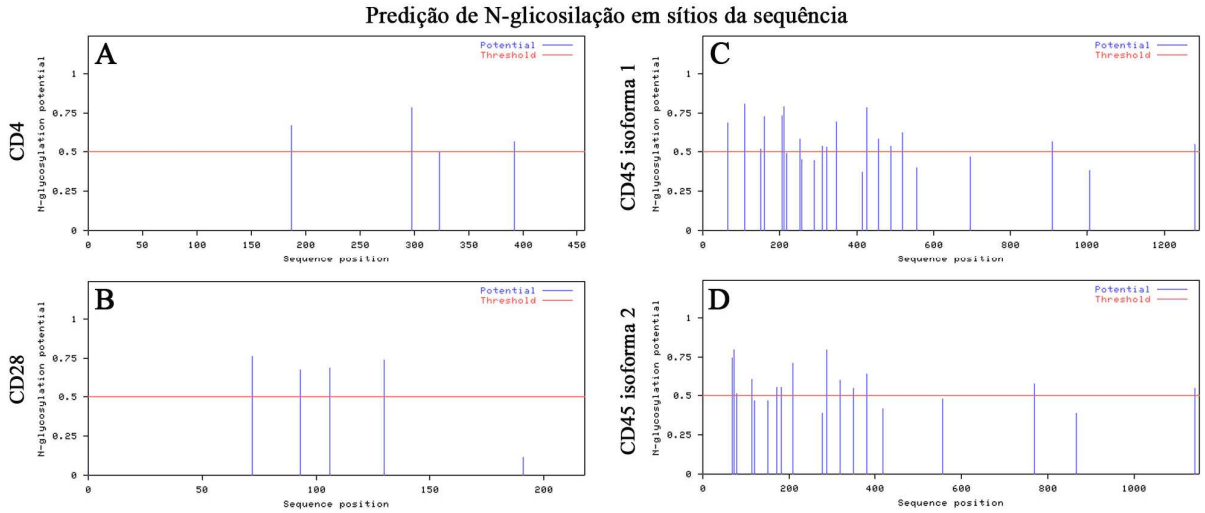

Figura 14. Predição de potenciais sítios de *N*-glicosilação nos receptores CD4, CD28 e CD45. Gráficos demonstrando a posição de potenciais sítios de *N*-glicanas nos receptores CD4 (A), CD28 (B), isoforma 1 de CD45 (C) e isoforma 2 de CD45 (D). A sequência de aminoácidos dos receptores foram adicionadas ao NetNGlyc 1.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) no formato FASTA e submetido para análise. Foi fornecida a predição dos potenciais sítios de *N*-glicosilação que são representados em gráficos. No gráfico, quando o threshold, visto pela linha vermelha, for ultrapassado pelo potencial (linha azul) tem-se uma predição de *N*-glicosilação em determinada posição na sequência de aminoácido (eixo x). Dessa forma, o receptor CD4 possui três potenciais sítios de *N*-glicosilação (A), enquanto a isoforma 1 (C) e 2 (D) do receptor CD45 apresentam, respectivamente, 15 e 12 sítios. Para a molécula coestimuladora CD28 (B) foi identificado quatro potenciais sítios de *N*-glicosilação.

4.8. ArtinM reconhece glicoproteína de superfície responsável pela ativação de linfócitos T CD4$^+$

Considerando a presença predita de *N*-glicanas em receptores relacionados com a transdução de sinal para a ativação das células T CD4$^+$, foi ensaiada a existência de competição entre ArtinM e os anticorpos específicos para CD3ε, CD3εγ, CD28, CD45 e CD4 (conforme o item 10 do capítulo Materiais e Métodos); com intuito de identificar o(s) provável(eis) alvo(s) da lectina ArtinM. Para isso, procurou-se discriminar o(s) anticorpo(s) capaz(es) de inibir a produção das citocinas de perfis Th1 e Th17 desencadeada pelo estímulo com ArtinM (5µg/ml), após 48 horas de incubação. Esse ensaio de competição funcional revelou que apenas o anticorpo específico para o complexo εγ do receptor CD3 inibiu de forma significativa ($p<0,001$) a propriedade da lectina de estimular a produção das citocinas de ambos os perfis, enquanto que os anticorpos anti-CD3ε, anti-CD28, anti-CD45 e anti-CD4 não exerceram qualquer efeito sobre os níveis das citocinas produzidas sob estímulo de ArtinM (Figura 15). Ressalte-se ainda que, na ausência de ArtinM, apenas o anticorpo específico para CD3ε foi capaz de desencadear a produção de citocinas, fato coerente com a aplicação desse anticorpo em ensaios funcionais; os demais anticorpos não têm esse tipo de aplicação, fato que não interfere com sua capacidade de competir com ArtinM. O ensaio

funcional realizado sugere fortemente que a cadeia CD3γ contenha a *N*-glicana alvo de ArtinM e responsável pelo desencadeamento da produção de citocinas pela células TCD4+.

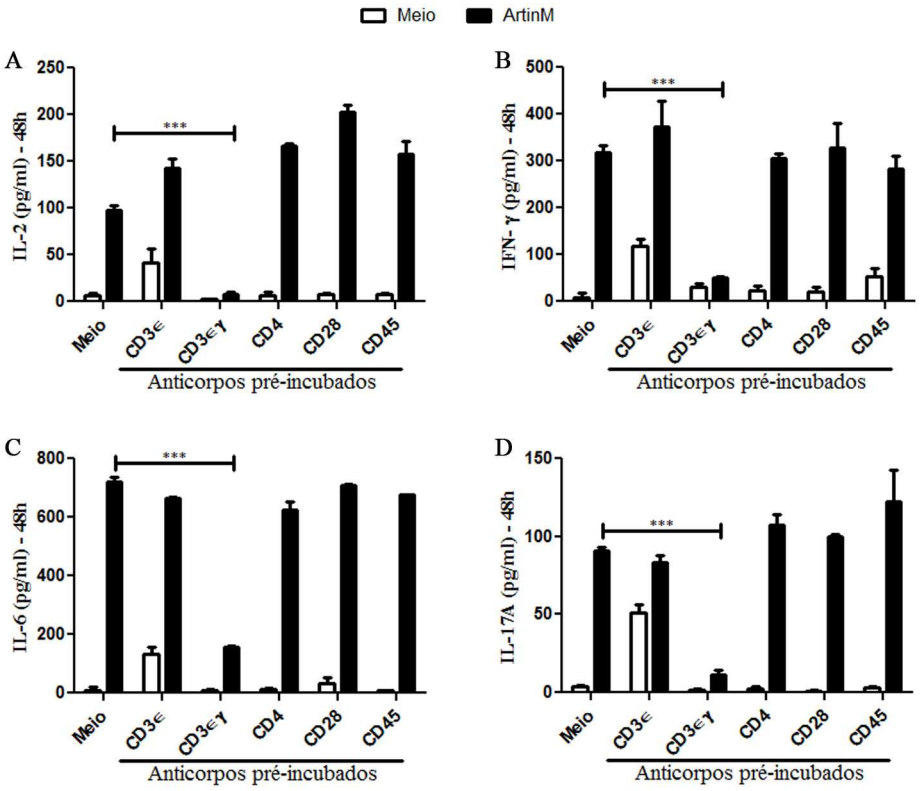

Figura 15. Produção de citocinas por células T CD4$^+$ estimuladas com ArtinM após uma pré-incubação com anticorpos específicos de receptores implicados na transdução de sinal para ativação celular. Anticorpos específicos para CD3ε, CD3εγ, CD28, CD45 e CD4, na concentração de 10µg/ml, foram incubados, por 40 minutos, cada qual com uma quantidade de 12x10^5 células T CD4$^+$. Seguiu-se a incubação em triplicata de 2x10^5 células, por 48 horas, na ausência ou na presença do estímulo com ArtinM [5µg/ml]. O estímulo apenas com ArtinM (na ausência de anticorpos) correspondeu ao controle positivo, o meio sem anticorpo refere-se ao controle negativo. Os níveis de IL-2 (painel A), IFN-γ (painel B), IL-6 (painel C) e IL-17A (painel D) no sobrenadante de cada poço da cultura foram determinados por ELISA. Valores com diferenças significativas em relação ao estímulo com ArtinM na ausência de anticorpos, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). A utilização de PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] e Concanavalina A [5µg/ml] demonstraram níveis elevados, de forma significativa, dessas citocinas secretadas pelas células T CD4$^+$, dados não apresentados.

Além do ensaio de competição funcional, avaliou se a capacidade de aglutinar células T CD4$^+$ seria afetada pela prévia incubação das células com os anticorpos específicos para CD3ε, CD3εγ, CD28, CD45 e CD4. Mais uma vez, apenas anti-CD3εγ inibiu a aglutinação de células T CD4$^+$ promovida por ArtinM (Figura 16), e não o anti-CD3ε. Dessa maneira, ficou reforçada a idéia de que a cadeia γ do receptor CD3 contenha a(s) *N*-glicana(s) alvo(s) de ArtinM, passível(eis) de propiciar interação que desencadeia sinalização celular e resulta em ativação e diferenciação de células T CD4$^+$, bem como em produção de citocinas (Figura 15).

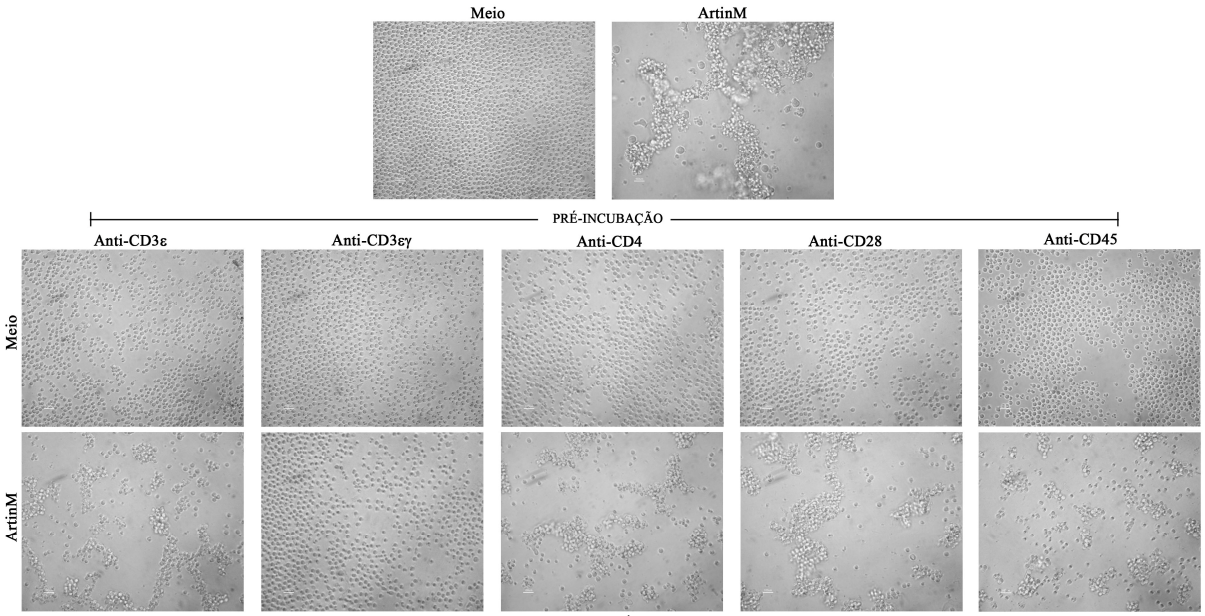

Figura 16. Inibição da aglutinação de células T CD4$^+$ por ArtinM após uma pré-incubação com anticorpos específicos de receptores implicados na transdução de sinal para ativação celular. Ensaio de inibição da aglutinação de células T CD4$^+$, promovida por ArtinM, com os anticorpos específicos para CD3ε, CD3εγ, CD4, CD28 e CD45. As células eram pré-incubadas a 4°C com os anticorpos específicos CD3ε, CD3εγ, CD28, CD45 ou CD4, separadamente, na concentração de 10µg/ml por 40 minutos. Seguiu-se novo período de incubação, na presença ou ausência de ArtinM [5µg/ml]. Após 48 horas, as culturas foram examinadas em microscópio invertido de campo claro em objetiva de 40x. Como controle, as células foram submetidas apenas à incubação com ArtinM [5µg/ml], sem serem submetidas a contato prévio com os anticorpos. Como controle positivo da aglutinação utilizou-se a Concanavalin A [5µg/ml] e como controle da formação de cluster de ativação usou-se o PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM], controles não demonstrados nessa figura.

4.9. Inibição da ligação de anti-CD3εγ em células T CD4$^+$ através de ArtinM

Visando complementar a idéia de que ArtinM reconheça glicanas da cadeia γ do receptor CD3 e, dessa maneira, origine as várias respostas observadas nas células T CD4$^+$, avaliou-se, por citometria de fluxo, se ArtinM impediria a ligação de anti-CD3εγ ao seu alvo específico. A freqüência de células coradas por anti-CD3ε não foi alterada quando as células foram pré-incubadas com ArtinM (Figura 17 e 18); no entanto, a porcentagem de células coradas com anti-CD3εγ diminuiu significativamente ($p<0,001$) quando as células foram pré-incubadas com ArtinM (Figura 17 e 18). Por outro lado, a frequência de marcação pela reação de anticorpos específicos com os receptores CD28, CD45 e CD4 não foi alterada pela pré-incubação das células T CD4$^+$ com ArtinM (Figura 17), corroborando com os dados obtidos pelo ensaio de competição funcional entre esses anticorpos e a lectina (item 8 desse capítulo).

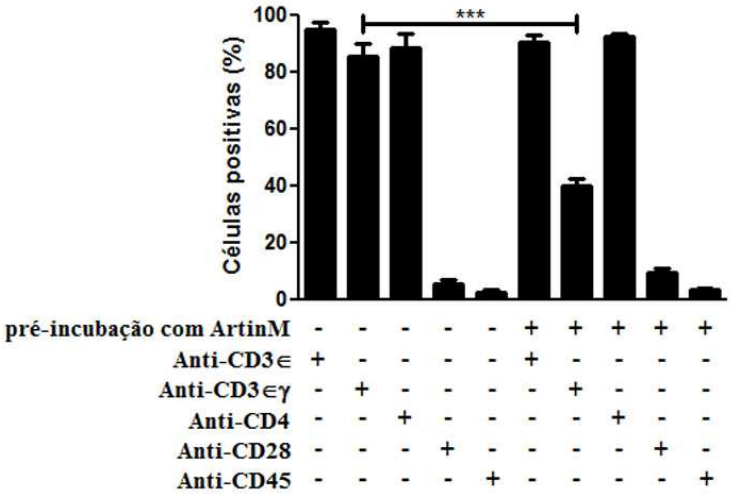

Figura 17. Porcentagem de células positivas após inibição por ArtinM da ligação de anticorpos específicos para CD3ε, CD3εγ, CD4, CD28 e CD45 nas células T CD4$^+$. O gráfico, em barras, representa a frequência média de marcação de três amostras de células T CD4$^+$, que foram ou não pré-incubadas com ArtinM, por anticorpos específicos para CD3ε, CD3εγ, CD28, CD4 e CD45. Valores com diferenças significativas ao comparar para o mesmo receptor a porcentagem de células positivas pré-incubadas ou não com ArtinM, apresentando $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

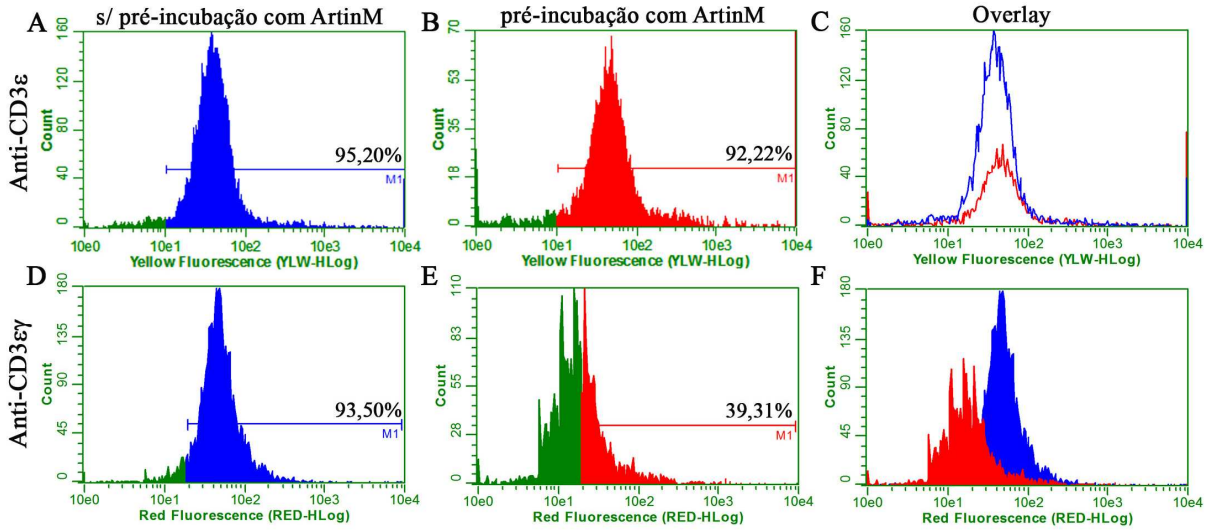

Figura 18. Inibição por ArtinM da ligação de anti-CD3ε e anti-CD3εγ nas células T CD4$^+$. Os histogramas A e D mostram a porcentagem de células marcadas por anti-CD3ε e anti-CD3εγ, respectivamente. Os histogramas B e E mostram a frequência da marcação para anti-CD3ε e anti-CD3εγ, respectivamente, em células T CD4$^+$ previamente incubadas com ArtinM. No painel C está representada a sobreposição dos histogramas A e B, já o painel F demonstra a sobreposição dos histogramas D e E. Os histogramas foram obtidos por citometria de fluxo.

4.10. Inibição com manotriose da ligação de ArtinM às células T CD4$^+$

Diante das consistentes demonstrações de que ArtinM reconhece glicanas na superfície das células T CD4$^+$, em particular as associadas à cadeia γ do receptor CD3, optou-se por tentar inibir com um açúcar sabidamente específico para ArtinM – a manotriose Manα 1-3 [Manα 1-6] Man - a ligação da lectina à superfície de células TCD4$^+$. Através de citometria de fluxo, avaliou-se a capacidade de diferentes concentrações de manotriose de inibir a interação de ArtinM com células TCD4$^+$ (procedimento descrito no item 12 do capítulo de Materiais e Métodos). Para inibir 50% da ligação de ArtinM foi necessária a concentração de 1mM de manotriose (Figura 19). Essa molaridade pode ser considerada muito alta, já que habitualmente as interações estabelecidas por ArtinM com ligantes diversos são inibidas por concentrações de manotriose que se situam na faixa de 10 e 30µM. O resultado obtido sugere que ArtinM encontre glicanas na superfície das células T CD4$^+$, possivelmente associadas à cadeia γ do receptor CD3, que sejam reconhecidas com altíssima especificidade. D-galactose, utilizada em concentrações similares como controle negativo, não teve efeito sobre a ligação de ArtinM à superfície de células TCD4$^+$ (Figura 19).

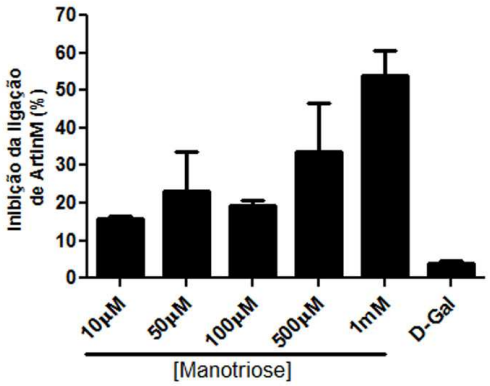

Figura 19. Inibição com manotriose da ligação de ArtinM às células T CD4$^+$. No ensaio de inibição da ligação de ArtinM, 5µg da lectina biotinilada foi incubada por 30 minutos com as diferentes molaridades de Manotriose (10, 50, 100, 500 e 1000µM) e 50mM de D-Galactose, em 100µl de solução. Em seguida, as células T CD4$^+$, na quantidade de 5x10^5, foram adicionadas em duplicata dentre as diferentes concentrações do açúcar, ficando incubadas por 30 minutos. Como controle positivo, utilizaram-se células incubadas com ArtinM biotinilada sem prévia incubação com o açúcar. Após esse período, as células eram lavadas com PBS e adicionado estreptavidina conjugada a FITC, após 40 minutos fez-se nova etapa de lavagem. Através da citometria de fluxo realizou a leitura do material. O cálculo da inibição da ligação é obtido pela relação da intensidade média de fluorescência entre as células associadas com ArtinM previamente incubadas com açúcar e aquelas do controle positivo.

4.11. Moléculas de sinalização envolvidas na ativação das células T CD4$^+$ por ArtinM.

Em acréscimo à identificação do receptor de alta especificidade com ArtinM, estudaram-se as vias de sinalização celular potencialmente implicadas na ativação de células T CD4$^+$ pela lectina. Foram avaliadas algumas moléculas sinalizadoras relacionadas às atividades biológicas que foram constatadas serem desencadeadas por ArtinM nessas células, bem como outras moléculas que, sabidamente, participam da transdução de sinal no processo de ativação de células T CD4$^+$. Essas células foram tratadas com inibidores de moléculas sinalizadoras e cultivadas, por 48 horas, sob estímulo com ArtinM. Foi avaliado através de cada inibidor a participação de moléculas sinalizadoras na produção de citocinas de perfis Th1 e Th17 promovido com o estímulo por ArtinM.

Os inibidores utilizados foram LY-294002 [20μM], PD98059 [20μM], Genisteína [20μg/ml], SB202190 [20μM], SP600125 [25μM] e H-7 [20μM]; atuando, respectivamente, nas seguintes moléculas sinalizadoras: PI3K, p42/44MAPK, PTK, p38MAPK, JNK e PKC. Os níveis de IL-2 (Figura 20A) e IFN-γ (Figura 20B) detectados no sobrenadante das células T CD4$^+$, sugerem que todas as moléculas sinalizadoras ensaiadas participam no processo de ativação celular induzido por ArtinM. Merecem especial destaque os resultados proporcionados pelo uso dos inibidores PD98059 e SP600125, que diminuíram em mais de 90% a secreção de IL-2 induzida por ArtinM (Figura 21A), fato indicativo de que as moléculas p42/44MAPK e JNK são fundamentais no processo linfoproliferativo. Além disso, p42/44MAPK mostra-se como uma das moléculas sinalizadoras mais relevantes na produção de IFN-γ, já que tal produção foi reduzida e mais de 80% pela utilização de PD98059 (Figura 21A). Em relação às citocinas IL-6 e IL-17A também se verificou que todas as moléculas sinalizadoras ensaiadas desempenham um papel importante na produção induzida por ArtinM. Ressalte-se, que as moléculas p38MAPK, JNK e PKC, determinam diminuição superior a 90% da secreção de IL-6 (Figura 21B). A molécula p42/44MAPK mostrou-se importante tanto para a produção de IL-2 e IFN-γ como para a produção de IL-17A, já que o inibidor PD98059 desencadeou redução de cerca de 90% da produção das três citocinas. (Figura 21B).

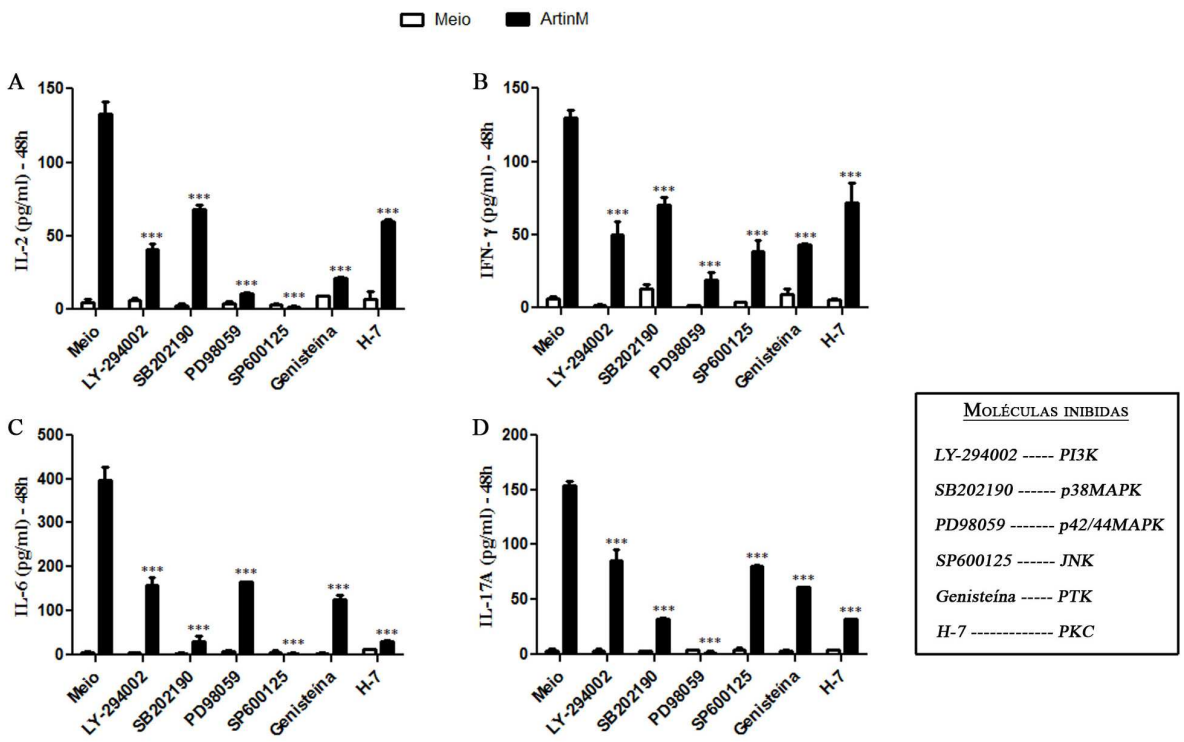

Figura 20. Efeito de inibidores de moléculas sinalizadoras sobre as citocinas de perfis Th1 e Th17 induzidas por ArtinM. Amostras de células T CD4$^+$ foram pré-tratadas, ou não, com uma das seguintes substâncias: LY-294002 que inibe PI3K (painel A), PD98059 que inibe p42/44MAPK (painel B), Genistein que inibe PTK (painel C), SB202190 que inibe p38MAPK (painel D), SP600125 que inibe JNK (painel E), H-7 que inibe PKC (painel F). Seguiu-se o cultivo celular sob estímulo de ArtinM [5µg/ml]. ConA [5µg/ml] e PMA [50ng/ml]+Ionomicina [1µM] foram utilizados como controles positivos, tendo apenas o meio como controle negativo. Os níveis de IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A determinados por ELISA, no sobrenadante das culturas (triplicatas) serviram como parâmetro. Os gráficos demonstram os níveis das citocinas sendo representado no eixo X a ausência (Meio) ou presença dos inibidores, acompanhado pelo estímulo com ArtinM (barra preta) ou na ausência deste (barra branca). Valores com diferenças significativas dos níveis das citocinas obtidos sob estímulo com ArtinM, ao comparar os valores atingidos na ausência dos inibidores com os encontrados na presença dos inibidores, apresentaram $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

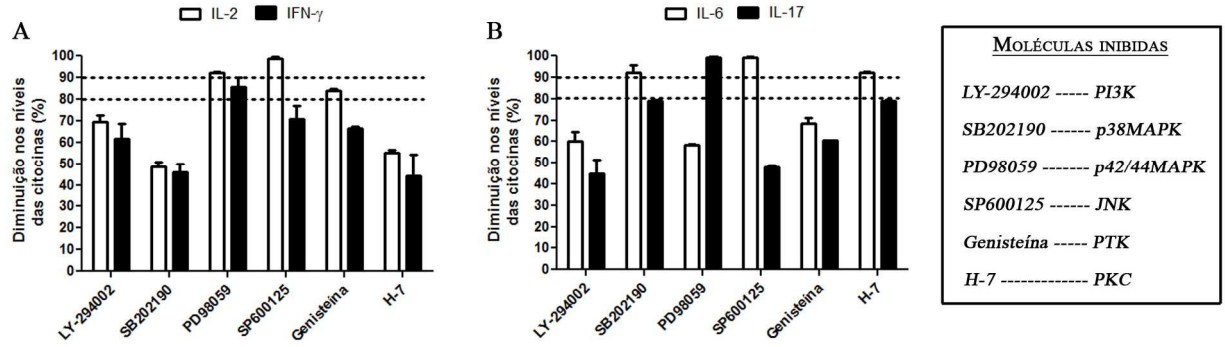

Figura 21. Porcentagem de diminuição nos níveis das citocinas de perfis Th1 e Th17 induzidas por ArtinM após o efeito de inibidores de moléculas sinalizadoras. Os valores adotados para determinar a porcentagem de diminuição dos níveis dessas citocinas são os mesmos utilizados na montagem da Figura 20, sendo processados da seguinte forma: fez-se a relação entre o valor médio obtido pelo estímulo de ArtinM na ausência de inibidores com os valores (triplicata) obtidos pelo estímulo de ArtinM na presença de cada inibidor. Os valores não foram submetidos à análise estatística, utilizando os dados apenas para comparação entre os diferentes inibidores, aplicando como pontos referenciais nessa relação as linhas tracejadas nas faixas de 80% e 90%.

5. Discussão

Como já descrito, ArtinM direciona a resposta imune para o perfil Th1, caracterizado por altos índices na secreção de IFN-γ por linfócitos que receberam o estímulo de IL-12, produzida por macrófagos e células dendríticas. Em conseqüência, ArtinM torna resistentes camundongos submetidos a algumas infecções por patógenos intracelulares, como demonstrado na literatura. São conhecidos alguns mecanismos pelos quais ArtinM exerce essa imunomodulação (Panunto-Castelo, Souza *et al.*, 2001; Coltri, Oliveira *et al.*, 2008; Coltri, Oliveira *et al.*, 2010). No entanto, não foi investigado o efeito da lectina sobre células T $CD4^+$, que são exatamente as que definem o perfil Th1. Assim, optamos por buscar informações dos efeitos direto de ArtinM sobre essas células e, só num segundo momento, explorar *in vivo* as observações feitas *in vitro*.

A primeira abordagem utilizada diz respeito à demonstração da ligação de ArtinM à superfície de células T $CD4^+$, manifesta por aglutinação celular. O resultado positivo proporcionado por ArtinM foi similar ao verificado com a utilização de Concanavalina A, fato que motivou a avaliação da atividade mitogênica de ArtinM sobre as células T $CD4^+$. Essa avaliação adotou como parâmetro os níveis de secreção de IL-2. Eles foram significativamente altos, mesmo com utilização de baixas concentrações da lectina, demonstrando a atividade mitogênica de ArtinM sobre esse tipo celular. A literatura mostra que jacalina, lectina ligante de D-galacose, e também contida na semente de *Artocarpus heterophyllus*, é capaz de induzir altos níveis de liberação de IL-2 por células Jurkat (Baba, Yong Ma *et al.*, 2007); entretanto, nesse caso, foram necessárias altas concentrações de jacalina para a obtenção de níveis de secreção similares aos induzidos por ArtinM nas células T $CD4^+$.

As lectinas originalmente descritas como dotadas de atividade mitogênica foram a fitohemaglutinina (PHA) e a Concanavalin A (ConA), atuando sobre os linfócitos humanos e de camundongos, respectivamente. Subsequentemente, outras lectinas de plantas foram também descritas como exercendo atividade mitogênica. É o caso da lectina da semente de *Parkia speciosa*, que promove o aumento da taxa de proliferação de linfócitos humanos (Suvachittanont e Jaranchavanapet, 2000). Uma lectina obtida do tubérculo de *Arisaema flavum*, ligante de asialofetuina, mostrou potente atividade mitogênica sobre células esplênicas de camundongos BALB/c e linfócitos de humanos (Singh e Kamboj, 2004). Alguns outros exemplos de lectinas de plantas dotadas de atividade mitogênica são as obtidas de *Gonatanthus pumilus* (Kamboj, Shangary *et al.*, 1995), *Sauromatum guttatum* (Kamboj, Shangary *et al.*, 1995) e *Sauromatum venosum* (Singh Bains, Singh *et al.*, 2005).

Além de aumentarem a secreção de IL-2, células T $CD4^+$ estimuladas com ArtinM produziram níveis elevados de IFN-γ, confirmando a sua condição de células ativadas. O aumento da produção de IFN-γ foi determinado por várias concentrações de ArtinM e ocorreu depois de diferentes períodos de estímulo. A lectina foi capaz de induzir células T $CD4^+$ isoladas a produzirem IFN-γ, na ausência de IL-12, indicando sua atuação direta sobre as células T $CD4^+$ *naive*, diferenciando-as em células Th1. Esse achado amplia o conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pelo efeito imunomodulatório de ArtinM, demonstrando que a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ se faz por dupla via. A indireta é disparada por IL-12, cuja produção por APCs é atribuída à ligação de ArtinM a *N*-glicanas de TLR2. A direta é disparada pela ativação do próprio linfócito T $CD4^+$, atribuída à ligação de ArtinM a glicanas da superfície celular, possivelmente associadas a cadeia γ de CD3, como constata o presente trabalho.

Há estudos que demonstram a plasticidade das células T $CD4^+$ diferenciadas através da relação entre as diferentes subpopulações geradas (Zhou, Chong *et al.*, 2009); dessa maneira foi estabelecida uma relação recíproca entre as células Th17 e Th1. A existência dessa relação foi reforçada a partir de resultados obtidos com células de seres humanos, sugestivos de que IL-17 e IFN-γ possam ser produzidas pela mesma célula (Annunziato, Cosmi *et al.*, 2007). Por outro lado, os trabalhos que demonstraram o efeito protetor de ArtinM em infecções por *P. brasiliensis* (Coltri, Oliveira *et al.*, 2008; Coltri, Oliveira *et al.*, 2010) e *Candida albicans* (Custodio, Loyola *et al.*, 2011) levantam a hipótese de que haja a indução de resposta Th17. Dessa maneira, ArtinM, além de modular a diferenciação para o perfil Th1, poderia induzir também o perfil Th17. Essa hipótese foi reforçada pelo achado, em animais tratados com a lectina, de produção de citocinas não somente características do perfil Th1, mas também próprias de polarização para Th17 (IL-17A e IL-6). O aumento na freqüência de células duplo-positivas para IFN-γ e IL-17 após estímulo com ArtinM, verificada no presente trabalho, deu consistência ainda maior à hipótese. A importância do fenótipo Th17 na resposta adaptativa contra fungos (Lee, Mukasa *et al.*, 2009) favorece a idéia de que a proteção contra a paracoccidioidomicose experimental conferida pela administração terapêutica e profilática de ArtinM (Coltri, Oliveira *et al.*, 2008; Coltri, Oliveira *et al.*, 2010) possa ter recebido relevante contribuição da diferenciação celular para o perfil Th17.

A molécula CD28 é constitutivamente expressa em células T *naive* ou ativadas e sua expressão é necessária para que o linfócito produza citocinas e prolifere (Bluestone, 1995;

Thompson, 1995). Já a molécula CTLA-4 tem sua expressão restrita a células T ativadas ou de memória, funcionando como um potente regulador negativo na resposta de linfócitos T (Walunas, Lenschow *et al.*, 1994; Krummel e Allison, 1996). No presente trabalho, foi constatado que ArtinM ativa células T $CD4^+$ e as manifestações desse fato incluíram o aumento de expressão de CTLA-4 e CD28, que ocorreu mais precocemente e foi mais persistente do que o verificado entre os controles positivos.

A tentativa de relacionar temporalmente a expressão desses receptores e a secreção das citocinas não foi muito conclusiva. Os níveis de IL-2 e de IL-17A não foram afetados pela expressão de CTLA-4; isso seria esperado, já que esse receptor controla a ativação das células T $CD4^+$, repercutindo nos níveis de produção dessas citocinas. A relação temporal entre a expressão desses receptores e a produção de IFN-γ e IL-6 ficou mais clara e dentro das expectativas. Os níveis de IFN-γ foram sempre inferiores aos verificados nos controles, e assim se mantiveram, refletindo, possivelmente, o controle propiciado por CTLA-4. No que diz respeito à IL-6, foi demonstrada uma queda significativa de seus níveis de produção a partir de 12 horas do estímulo com ArtinM, indicando um possível papel de CTLA-4 no balanço dessa citocina.

A suposição é de que todos os efeitos exercidos por ArtinM em células T $CD4^+$ sejam disparados pelo reconhecimento de glicanas associadas a receptor implicado na sinalização para ativação das células T $CD4^+$. Estudos de predições de glicosilação indicam como candidatos os receptores CD3, CD45 e CD4, todos *N*-glicosilados; o receptor CD28 também deve ser considerado, já que ArtinM induz níveis elevados de expressão de CTLA-4. Os resultados do ensaio de competição funcional e inibição por ArtinM da ligação de anticorpos específicos para esses receptores, constituem-se em forte indicativo de que a cadeia γ do receptor CD3 corresponda ao alvo preferencial de reconhecimento por ArtinM. Isso não exclui a possibilidade de que ArtinM reconheça glicanas de outros receptores, porém a interação com CD3γ parece ter o mais importante reflexo funcional. Concanavalina A é um exemplo bem caracterizado na literatura da ligação de uma lectina a glicoproteínas do complexo TCR/CD3, fato que comprovadamente repercute na ativação de linfócitos (Kay, 1991). Isso explica uma das maneiras que ArtinM possa estar atuando nas células T $CD4^+$, pois a transdução de sinal, principalmente do originado no complexo TCR/CD3, é marcante na proliferação e diferenciação entre os diferentes tipos de células efetoras (Farber, 2009).

A interação de ArtinM com glicanas na superfície das células T $CD4^+$ apresentou uma alta especificidade, pois na tentativa de inibir a ligação de ArtinM à superfície dessas células

foi necessário uma quantidade muito elevada de manotriose para atingir 50% de inibição da ligação de ArtinM. Como foi verificada uma íntima relação entre a interação de ArtinM com a subunidade γ do receptor CD3 e a atividade funcional promovida pela lectina, criou-se a hipótese de que as glicanas constituintes dessa subunidade correspondam ao alvo principal de ArtinM. Dessa forma, são grandes as chances de ArtinM estar reconhecendo apenas as glicanas da cadeia γ de CD3.

Ao assumir que ArtinM ative células T $CD4^+$ via interação com o complexo TCR/CD3, assume-se também que a transdução de sinal envolva a atividade enzimática de PI3K, necessária para a via de sinalização disparada pelo complexo TCR-CD3, bem como pelos receptores CD28, CTLA4 (Rudd, Taylor *et al.*, 2009), Ademais, a ativação de TCR é essencial para a fosforilação de CD28 e recrutamento de PI3K. Esta quinase é ativada segundos após a ligação de agonista adequado ao complexo TCR (Harriague e Bismuth, 2002). Alguns estudos indicam a necessidade da ligação de PI3K a CD28 para que ocorra a produção de IL-2, induzida por anti-CD3 (Pages, Ragueneau *et al.*, 1994). Levando em consideração essas descrições e o fato de ArtinM na presença do inibidor de PI3K ter prejuízo de sua atividade de induzir a ativação das células T $CD4^+$, a hipótese de ArtinM estar usando o complexo TCR/CD3 para promover seus efeitos ganha ainda mais corpo.

Como se pressupõe que ArtinM está interagindo com receptor que necessita da fosforilação de tirosina para ter início a rede de sinalização na ativação celular, avaliou-se a possibilidade de que a inibição das proteínas tirosina quinase (PTK) tivesse alguma repercussão; como esperado, houve prejuízo da ação de ArtinM em induzir IL-2. O reflexo da inibição de PTK foi visto nas citocinas de perfis Th1 e Th17, mostrando que a indução de IL-6 e IL-17A depende da interação de ArtinM com um receptor associado à PTK.

Assim foi dada continuidade ao trabalho de identificar os mecanismos responsáveis pelos efeitos de ArtinM sobre células T $CD4^+$. Dentre as moléculas sinalizadoras analisadas, tornou-se patente a participação de ERK1/2 (p42/44MAPK) na transdução do sinal desencadeado por ArtinM, sendo que ERK1/2 tem a propriedade de se translocar para o núcleo ativando fatores de transcrição com NF-κB e AP-1, o que resulta na produção de IL-2. ERK1/2 é ativado pelo receptor de IL-2 e por Ras, após o início da resposta via complexo TCR/CD3 (Gorelik e Richardson), ficando constatado que essa molécula sinalizadora também é fundamental na produção de IFN-γ e IL-17A após o estímulo com ArtinM. Isso demonstra a participação de p42/44MAPK na indução de citocinas importantes para os perfis Th1 e Th17.

Já é descrito na literatura que a molécula p38MAPK não interfere na resposta proliferativa das células T $CD4^+$ (Rincon e Pedraza-Alva, 2003); porém, o estímulo de ArtinM foi acompanhado de inibição dessa molécula: houve uma diminuição em 50% da secreção de IL-2, citocina linfoproliferativa. O estímulo com ArtinM de células T $CD4^+$ que tiveram inibida a molécula p38MAPK associou-s a uma queda drástica dos níveis de IL-6, IL-17A e IFN-γ, corroborando com trabalhos que demonstram ser p38MAPK reguladora da expressão de genes envolvidos com as citocinas IL-6 e IFN-γ (Rincon, Enslen *et al.*, 1998). Em adição a isso, percebe-se que p38MAPK tem maior envolvimento com as citocinas de perfil Th17, pois a inibição dessa molécula comprometeu mais a secreção de IL-6 e IL-17A do que de IFN-γ.

Sabe-se que JNK medeia a transcrição de membros do fator AP-1, complementando o processo de ativação das células T $CD4^+$ devido a importância dessas moléculas na produção de IL-2. Isso ficou evidente ao constatar que o estímulo com ArtinM não desencadeava a produção de IL-2 por células que tiveram a molécula JNK inibida. Assim como há trabalhos que demonstram o aumento da atividade de JNK em células de perfil Th1 (Yang, Conze *et al.*, 1998), também se verificou no presente trabalho haver uma relação entre JNK e secreção de IFN-γ em resposta ao estímulo de ArtinM.

Em relação à participação da molécula PKC na cascata de sinalização promovida por ArtinM nas células T $CD4^+$, é importante ressaltar o efeito de PKC na indução das citocinas de perfil Th17, IL-6 e IL-17A, as quais foram as mais afetadas com a inibição dessa molécula. Como esperado, ao analisar a secreção de IL-2 observou-se uma importante queda nos níveis dessa citocina com a inibição de PKC.

Os efeitos promovidos por ArtinM nas células T $CD4^+$ instiga a continuidade do estudo com essas células para elucidar a atuação da lectina na sua sobrevida e qual(s) resíduo(s) presente(s) em *N*-glicanas na superfície celular é responsável em promover a alta especificidade de ArtinM. A relação entre ArtinM e as células T $CD8^+$ constitui outra linha de interesse a ser explorada, pois possivelmente a lectina desencadeará efeitos importantes nessa célula. Uma das perspectivas de aplicação com esses estudos, seria a realização do estímulo *in vitro* dessas células T com ArtinM e, em seguida, a transferência adotiva para algum modelo de infecção. No entanto, isso apenas será considerado após um levantamento minucioso dos benefícios e prejuízos ocasionados por ArtinM à essas células T.

6. Conclusões

- As células T $CD4^+$ purificadas do baço de camundongos BALB/c têm na sua superfície alvos que são reconhecidos por ArtinM, ocasionando aglutinação celular evidente.
- A interação de ArtinM com os alvos da superfície de células $TCD4^+$ murinas leva à potente e rápida ativação celular, fato comprovado pela alta expressão de receptores próprios desse estado da célula.
- ArtinM induz a diferenciação de células T $CD4^+$ *naive* em células Th1 e Th17, como demonstra o padrão de citocinas secretadas e marcadas intracelularmente.
- O reconhecimento de glicanas associadas à cadeia γ do receptor CD3 é responsável pelos efeitos de ArtinM sobre as células T $CD4^+$; essa interação parece ser de altíssima especificidade, já que foram necessárias altas concentrações de manotriose para inibir em 50% a ligação da lectina à superfície celular.
- A ativação induzida por ArtinM foi crucialmente dependente das moléculas sinalizadoras PTK, PI3K, p38MAPK, p42/44MAPK, JNK e PKC, fato coerente com a transdução de sinal disparada para a ativação celular via complexo TCR/CD3, para a produção de citocinas de perfil Th1 e de perfil Th17.

7. Modelo Proposto

O conjunto de resultados obtidos - de caracterização dos efeitos de ArtinM sobre células T $CD4^+$ murinas e de definição dos possíveis mecanismos responsáveis por tais efeitos - permitiu que delineássemos um modelo que sumariza os eventos relacionados à ativação celular promovida pela lectina. Nesse modelo, parte-se da identificação do reconhecimento por ArtinM de glicanas *N*-ligadas à cadeia γ do receptor CD3, indicando-se a repercussão desse evento sobre a produção de citocinas de perfil Th1 e Th17. Além disso, destaca-se a indução por ArtinM da expressão de CD25, CD28 e CTLA-4, que ocorre de maneira precoce e rápida. As moléculas sinalizadoras chaves no processo de ativação das células T $CD4^+$ como p38MAPK, p42/44MAPK, JNK, PTK, PI3K e PKC são indicadas, por participarem ativamente da transdução de sinal desencadeada por ArtinM, que culmina com a produção de IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A.

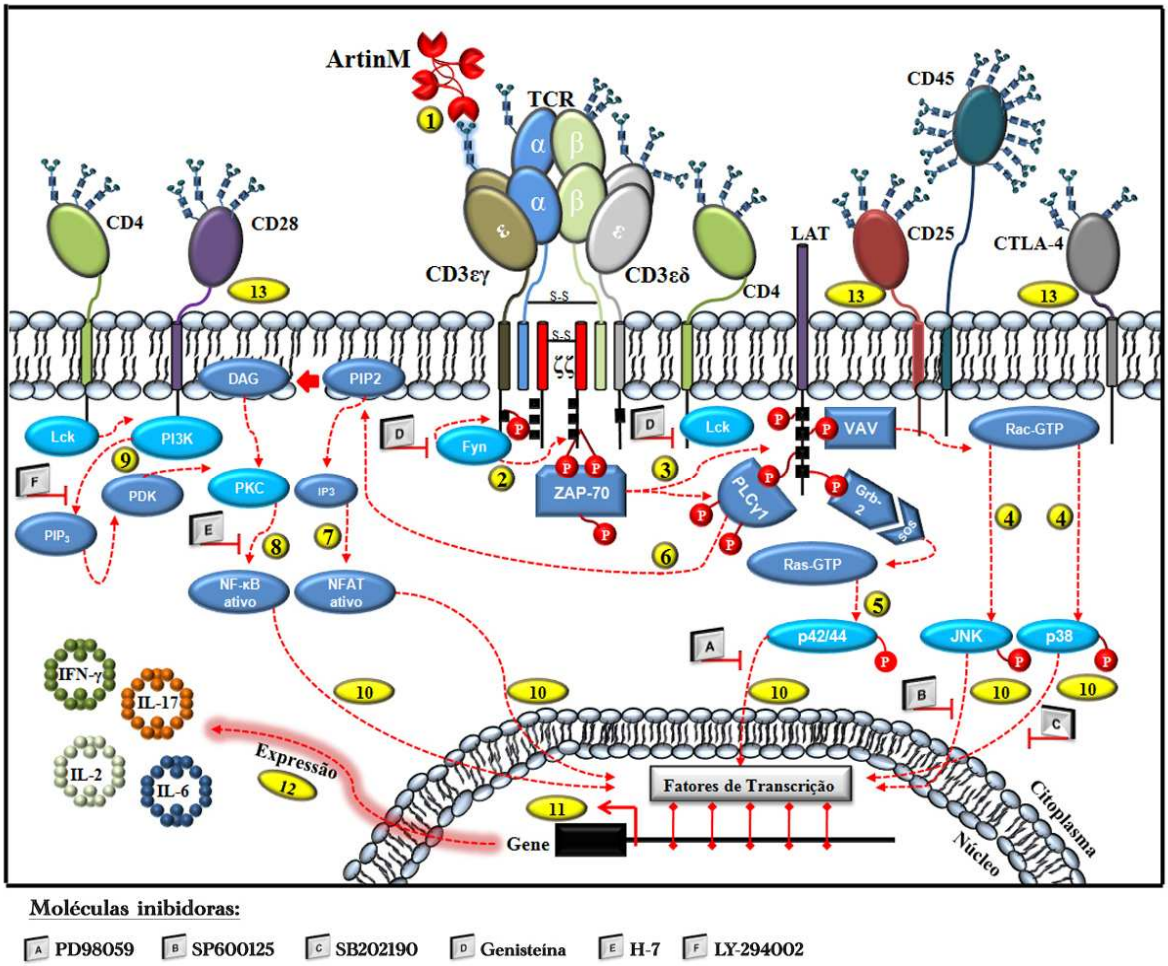

Figura 22. Modelo proposto que caracteriza os efeitos da lectina ArtinM sobre as células T CD4$^+$ murinas. ArtinM reconhece glicanas N-ligadas à cadeia γ do receptor CD3 (**1**), desencadeando a fosforilação de ITAMs da cauda citoplasmática do receptor CD3εγ e de ζζ pela proteína tirosina quinase –Fyn- que está associada à ao domínio de CD3εγ (**2**). Com a adição de dois fosfatos nos ITAMs em ζζ há ligação de ZAP-70, tornando essa molécula ativa e capaz de promover a fosforilação do ITAMs na cauda citoplasmática de LAT, permitindo a ligação de Vav, PLCγ1 e Grb-2+Sos (**3**). O recrutamento e a ativação de Vav, GTP/GDP de troca, atua sobre a Rac que inicia uma cascata de sinalização de MAP-quinase, resultando na ativação de JNK e p38MAPK (**4**). Em paralelo, o ancoramento de Grb-2 e Sos na proteína adaptadora LAT leva a formação de Ras-GTP, que gera ativação seqüencial e resulta na forma ativa de p42/44MAPK (**5**). Como mostrado em (**3**) a ZAP-70 leva à fosforilação da isoforma γ1 da enzima fosfolipase C; desse modo, a PLCγ1 torna-se ativa e catalisa a hidrólise de um fosfolipídeo de membrana denominado fosfatidilinositol 4,5-bifosfato – PIP_2- gerando o inositol 1,4,5-trifosfato – IP_3- e o diacilglicerol – DAG (**6**). O IP_3 produz um rápido aumento do Ca2+ citosólico livre, que age como molécula de sinalização ao ligar-se em calmodulina; esse complexo ativa a calcineurina que é um importante ativador do fator de transcrição NFAT (**7**). O diacilglicerol ativa a enzima PKC que, por sua vez, participa da geração do fator de transcrição na forma ativa, neste caso NF-κB (**8**). A fosfatidilinositol-3 quinase – PI3K- pode ser recrutada pelo complexo TCR/CD3, associar-se às proteínas adaptadoras e gerar PIP_3 a partir de bifosfatos da membrana, auxiliando na sinalização que envolve as Itks (via não demonstrada). PI3K também está relacionada à sinalização via CD28, podendo ser ativada por Fyn; com a formação de PIP_3 há recrutamento da proteína quinase-1 dependente de fosfoinositídeo-3 – PDK1- que atuará em PKC (**9**). Na etapa (**10**) os fatores de transcrição ativos NFAT e NF-κB são translocados para o núcleo; além disso, as quinases p38, p42/44 e JNK atuam na formação de outros fatores de transcrição, como AP-1, que participam na ativação celular. Por fim, há a formação de mRNAs (**11**) específicos para a expressão de IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A (**12**). Em adição a todo o mecanismo que ocasiona a produção dessas citocinas, ArtinM também foi capaz de induzir o aumento da expressão dos receptores CD25, CD28 e CTLA-4 (**13**). As indicações com as letras **A**, **B**, **C**, **D**, **E** e **F**, representam os inibidores específicos para cada molécula sinalizadora, conforme mostrado na legenda. Os inibidores demonstraram que as moléculas sinalizadoras destacadas em azul claro participam ativamente da expressão das citocinas IL-2, IFN-γ, IL-6 e IL-17A, após o estímulo com ArtinM.

8. Referências Bibliográficas

Acuto, O. e F. Michel. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. Nat Rev Immunol, v.3, n.12, Dec, p.939-51. 2003.

Aggarwal, S., N. Ghilardi, *et al.* Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem, v.278, n.3, Jan 17, p.1910-4. 2003.

Allison, J. P., B. W. Mcintyre, *et al.* Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. J Immunol, v.129, n.5, Nov, p.2293-300. 1982.

Annunziato, F., L. Cosmi, *et al.* Phenotypic and functional features of human Th17 cells. J Exp Med, v.204, n.8, Aug 6, p.1849-61. 2007.

Ashford, D. A., C. D. Alafi, *et al.* Site-specific glycosylation of recombinant rat and human soluble CD4 variants expressed in Chinese hamster ovary cells. J Biol Chem, v.268, n.5, Feb 15, p.3260-7. 1993.

Baba, M., B. Yong Ma, *et al.* Glycosylation-dependent interaction of Jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. J Leukoc Biol, v.81, n.4, Apr, p.1002-11. 2007.

Barbosa-Lorenzi, V. C., P. A. Buranello, *et al.* The lectin ArtinM binds to mast cells inducing cell activation and mediator release. Biochem Biophys Res Commun, v.416, n.3-4, Dec 16, p.318-24. 2011.

Bluestone, J. A. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. Immunity, v.2, n.6, Jun, p.555-9. 1995.

Borst, J., J. E. Coligan, *et al.* The delta- and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides. Nature, v.312, n.5993, Nov 29-Dec 5, p.455-8. 1984.

Boyd, W. C. e E. Shapleigh. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). Science, v.119, n.3091, Mar 26, p.419. 1954.

Caamano, J. e C. A. Hunter. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. Clin Microbiol Rev, v.15, n.3, Jul, p.414-29. 2002.

Cardoso, M. R., C. M. Mota, *et al.* ArtinM, a D-mannose-binding lectin from Artocarpus integrifolia, plays a potent adjuvant and immunostimulatory role in immunization against Neospora caninum. Vaccine, v.29, n.49, Nov 15, p.9183-93.

Chahud, F., L. N. Ramalho, *et al.* The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. Int J Exp Pathol, v.90, n.2, Apr, p.166-73. 2009.

Chemnitz, J. M., R. V. Parry, *et al.* SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. J Immunol, v.173, n.2, Jul 15, p.945-54. 2004.

Coltri, K. C., L. L. Oliveira, *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. Am J Pathol, v.173, n.2, Aug, p.423-32. 2008.

_____. Protection against Paracoccidioides brasiliensis infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. Med Mycol, v.48, n.6, Sep, p.792-9. 2010.

Coyle, A. J., S. Lehar, *et al.* The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. Immunity, v.13, n.1, Jul, p.95-105. 2000.

Crabtree, G. R. e E. N. Olson. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell, v.109 Suppl, Apr, p.S67-79. 2002.

Cua, D. J., J. Sherlock, *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature, v.421, n.6924, Feb 13, p.744-8. 2003.

Custodio, L. A., W. Loyola, *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. Int Immunopharmacol, May 24. 2011.

D'ambrosio, D., D. A. Cantrell, *et al.* Involvement of p21ras activation in T cell CD69 expression. Eur J Immunol, v.24, n.3, Mar, p.616-20. 1994.

Darrah, P. A., D. T. Patel, *et al.* Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. Nat Med, v.13, n.7, Jul, p.843-50. 2007.

Dong, C., D. D. Yang, *et al.* Defective T cell differentiation in the absence of Jnk1. Science, v.282, n.5396, Dec 11, p.2092-5. 1998.

Drickamer, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. J Biol Chem, v.263, n.20, Jul 15, p.9557-60. 1988.

Earl, L. A. e L. G. Baum. CD45 glycosylation controls T-cell life and death. Immunol Cell Biol, v.86, n.7, Oct, p.608-15. 2008.

Farber, D. L. Biochemical signaling pathways for memory T cell recall. Semin Immunol, v.21, n.2, Apr, p.84-91. 2009.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin, *et al.* Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol, v.4, n.4, Apr, p.330-6. 2003.

Ganiko, L., A. R. Martins, *et al.* Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. Glycoconj J, v.15, n.5, May, p.527-30. 1998.

Gorelik, G. e B. Richardson. Key role of ERK pathway signaling in lupus. Autoimmunity, v.43, n.1, Feb, p.17-22.

Harriague, J. e G. Bismuth. Imaging antigen-induced PI3K activation in T cells. Nat Immunol, v.3, n.11, Nov, p.1090-6. 2002.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol, v.6, n.11, Nov, p.1123-32. 2005.

Haskins, K., J. Kappler, *et al.* The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. Annu Rev Immunol, v.2, p.51-66. 1984.

Haskins, K., R. Kubo, *et al.* The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody. J Exp Med, v.157, n.4, Apr 1, p.1149-69. 1983.

Hommes, D. W., M. P. Peppelenbosch, *et al.* Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. Gut, v.52, n.1, Jan, p.144-51. 2003.

Isakov, N., R. L. Wange, *et al.* The role of tyrosine kinases and phosphotyrosine-containing recognition motifs in regulation of the T cell-antigen receptor-mediated signal transduction pathway. J Leukoc Biol, v.55, n.2, Feb, p.265-71. 1994.

Ivanov, Ii, B. S. Mckenzie, *et al.* The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell, v.126, n.6, Sep 22, p.1121-33. 2006.

Kamboj, S. S., S. Shangary, *et al.* New lymphocyte stimulating monocot lectins from family Araceae. Immunol Invest, v.24, n.5, Aug, p.845-55. 1995.

Kano, S., K. Sato, *et al.* The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon-gamma-interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. Nat Immunol, v.9, n.1, Jan, p.34-41. 2008.

Kaplan, M. H., U. Schindler, *et al.* Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. Immunity, v.4, n.3, Mar, p.313-9. 1996.

Karin, M. e Y. Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol, v.18, p.621-63. 2000.

Kay, J. E. Mechanisms of T lymphocyte activation. Immunol Lett, v.29, n.1-2, Jul, p.51-4. 1991.

Killar, L., G. Macdonald, *et al.* Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce interleukin 4(IL 4)/B cell stimulatory factor 1(BSF-1) fail to help antigen-specific B cells. J Immunol, v.138, n.6, Mar 15, p.1674-9. 1987.

Koretzky, G. A., F. Abtahian, *et al.* SLP76 and SLP65: complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. Nat Rev Immunol, v.6, n.1, Jan, p.67-78. 2006.

Krummel, M. F. e J. P. Allison. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. J Exp Med, v.183, n.6, Jun 1, p.2533-40. 1996.

Lee, Y. K., R. Mukasa, *et al.* Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. Curr Opin Immunol, v.21, n.3, Jun, p.274-80. 2009.

Li, Q. e I. M. Verma. NF-kappaB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol, v.2, n.10, Oct, p.725-34. 2002.

Lighvani, A. A., D. M. Frucht, *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.26, Dec 18, p.15137-42. 2001.

Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, *et al.* Partners in transcription: NFAT and AP-1. Oncogene, v.20, n.19, Apr 30, p.2476-89. 2001.

Mazza, C. e B. Malissen. What guides MHC-restricted TCR recognition? Semin Immunol, v.19, n.4, Aug, p.225-35. 2007.

Merritt, C., H. Enslen, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in vivo selectively induces apoptosis of CD8(+) but not CD4(+) T cells. Mol Cell Biol, v.20, n.3, Feb, p.936-46. 2000.

Meuer, S. C., K. A. Fitzgerald, *et al.* Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. J Exp Med, v.157, n.2, Feb 1, p.705-19. 1983.

Moreno, A. N., M. C. Jamur, *et al.* Mast cell degranulation induced by lectins: effect on neutrophil recruitment. Int Arch Allergy Immunol, v.132, n.3, Nov, p.221-30. 2003.

Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, *et al.* Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. Science, v.193, n.4257, Sep 10, p.1007-8. 1976.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol, v.136, n.7, Apr 1, p.2348-57. 1986.

Mosmann, T. R. e R. L. Coffman. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, v.7, p.145-73. 1989.

Murphy, C. A., C. L. Langrish, *et al.* Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J Exp Med, v.198, n.12, Dec 15, p.1951-7. 2003.

Murphy, E., K. Shibuya, *et al.* Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation. J Exp Med, v.183, n.3, Mar 1, p.901-13. 1996.

Neefjes, J., M. L. Jongsma, *et al.* Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. Nat Rev Immunol, v.11, n.12, Dec, p.823-36. 2011.

Nishimura, H., T. Okazaki, *et al.* Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. Science, v.291, n.5502, Jan 12, p.319-22. 2001.

Nowell, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res, v.20, May, p.462-6. 1960.

Pages, F., M. Ragueneau, *et al.* Binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to CD28 is required for T-cell signalling. Nature, v.369, n.6478, May 26, p.327-9. 1994.

Panunto-Castelo, A., M. A. Souza, *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, v.11, n.12, Dec, p.1035-42. 2001.

Park, H., Z. Li, *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol, v.6, n.11, Nov, p.1133-41. 2005.

Paul, W. E. e R. A. Seder. Lymphocyte responses and cytokines. Cell, v.76, n.2, Jan 28, p.241-51. 1994.

Pereira-Da-Silva, G., A. N. Moreno, *et al.* Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. Biochim Biophys Acta, v.1760, n.1, Jan, p.86-94. 2006.

Peumans, W. J. e E. J. Van Damme. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol, v.109, n.2, Oct, p.347-52. 1995.

Pfeifhofer, C., K. Kofler, *et al.* Protein kinase C theta affects Ca2+ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells. J Exp Med, v.197, n.11, Jun 2, p.1525-35. 2003.

Rao, A., C. Luo, *et al.* Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. Annu Rev Immunol, v.15, p.707-47. 1997.

Rincon, M., H. Enslen, *et al.* Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. EMBO J, v.17, n.10, May 15, p.2817-29. 1998.

Rincon, M. e R. A. Flavell. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. EMBO J, v.13, n.18, Sep 15, p.4370-81. 1994.

Rincon, M. e G. Pedraza-Alva. JNK and p38 MAP kinases in CD4+ and CD8+ T cells. Immunol Rev, v.192, Apr, p.131-42. 2003.

Rudd, C. E., A. Taylor, *et al.* CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunol Rev, v.229, n.1, May, p.12-26. 2009.

Rudd, P. M., T. Elliott, *et al.* Glycosylation and the immune system. Science, v.291, n.5512, Mar 23, p.2370-6. 2001.

Rudd, P. M., M. R. Wormald, *et al.* Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. J Mol Biol, v.293, n.2, Oct 22, p.351-66. 1999.

Rudiger, H. e H. J. Gabius. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconj J, v.18, n.8, Aug, p.589-613. 2001.

Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol, v.22, p.531-62. 2004.

Santos-De-Oliveira, R., M. Dias-Baruffi, *et al.* A neutrophil migration-inducing lectin from Artocarpus integrifolia. J Immunol, v.153, n.4, Aug 15, p.1798-807. 1994.

Savignac, M., B. Mellstrom, *et al.* Calcium-dependent transcription of cytokine genes in T lymphocytes. Pflugers Arch, v.454, n.4, Jul, p.523-33. 2007.

Schulze-Luehrmann, J. e S. Ghosh. Antigen-receptor signaling to nuclear factor kappa B. Immunity, v.25, n.5, Nov, p.701-15. 2006.

Sharon, N. Lectins: past, present and future. Biochem Soc Trans, v.36, n.Pt 6, Dec, p.1457-60. 2008.

Sharon, N. e H. Lis. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, v.14, n.11, Nov, p.53R-62R. 2004.

Shevach, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. Immunity, v.25, n.2, Aug, p.195-201. 2006.

Singh Bains, J., J. Singh, *et al.* Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (Sauromatum venosum). Biochim Biophys Acta, v.1723, n.1-3, May 25, p.163-74. 2005.

Singh, J. e S. S. Kamboj. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, Arisaema flavum. Biochem Biophys Res Commun, v.318, n.4, Jun 11, p.1057-65. 2004.

Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, *et al.* T cell activation. Annu Rev Immunol, v.27, p.591-619. 2009.

Sommers, C. L., L. E. Samelson, *et al.* LAT: a T lymphocyte adapter protein that couples the antigen receptor to downstream signaling pathways. Bioessays, v.26, n.1, Jan, p.61-7. 2004.

Starr, T. K., S. C. Jameson, *et al.* Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol, v.21, p.139-76. 2003.

Sumner, J. B. e S. F. Howell. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. J Bacteriol, v.32, n.2, Aug, p.227-37. 1936.

Sun, Z., C. W. Arendt, *et al.* PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. Nature, v.404, n.6776, Mar 23, p.402-7. 2000.

Suvachittanont, W. e P. Jaranchavanapet. Mitogenic effect of Parkia speciosa seed lectin on human lymphocytes. Planta Med, v.66, n.8, Dec, p.699-704. 2000.

Suzuki, Y., M. A. Orellana, *et al.* Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii. Science, v.240, n.4851, Apr 22, p.516-8. 1988.

Tak, P. P. e G. S. Firestein. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest, v.107, n.1, Jan, p.7-11. 2001.

Teixeira, C. R., K. A. Cavassani, *et al.* Potential of KM+ lectin in immunization against Leishmania amazonensis infection. Vaccine, v.24, n.15, Apr 5, p.3001-8. 2006.

Thompson, C. B. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? Cell, v.81, n.7, Jun 30, p.979-82. 1995.

Timson Gauen, L. K., A. N. Kong, *et al.* p59fyn tyrosine kinase associates with multiple T-cell receptor subunits through its unique amino-terminal domain. Mol Cell Biol, v.12, n.12, Dec, p.5438-46. 1992.

Tsygankov, A. Y., B. M. Broker, *et al.* Activation of tyrosine kinase p60fyn following T cell antigen receptor cross-linking. J Biol Chem, v.267, n.26, Sep 15, p.18259-62. 1992.

Veillette, A., M. A. Bookman, *et al.* The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. Cell, v.55, n.2, Oct 21, p.301-8. 1988.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, *et al.* TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity, v.24, n.2, Feb, p.179-89. 2006.

Walunas, T. L., D. J. Lenschow, *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. Immunity, v.1, n.5, Aug, p.405-13. 1994.

Waterhouse, P., J. M. Penninger, *et al.* Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. Science, v.270, n.5238, Nov 10, p.985-8. 1995.

Watts, T. H. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. Annu Rev Immunol, v.23, p.23-68. 2005.

Weaver, C. T., L. E. Harrington, *et al.* Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. Immunity, v.24, n.6, Jun, p.677-88. 2006.

Weiss, L., A. J. Whitmarsh, *et al.* Regulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase (Jnk) gene expression during T cell activation. J Exp Med, v.191, n.1, Jan 3, p.139-46. 2000.

Werlen, G., E. Jacinto, *et al.* Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. EMBO J, v.17, n.11, Jun 1, p.3101-11. 1998.

Yang, D. D., D. Conze, *et al.* Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2. Immunity, v.9, n.4, Oct, p.575-85. 1998.

Zhang, W., C. L. Sommers, *et al.* Essential role of LAT in T cell development. Immunity, v.10, n.3, Mar, p.323-32. 1999.

Zhou, L., M. M. Chong, *et al.* Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. Immunity, v.30, n.5, May, p.646-55. 2009.

Zhu, J., L. Guo, *et al.* Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. J Immunol, v.166, n.12, Jun 15, p.7276-81. 2001.

Zhu, J., B. Min, *et al.* Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. Nat Immunol, v.5, n.11, Nov, p.1157-65. 2004.

Zhu, J. e W. E. Paul. CD4 T cells: fates, functions, and faults. Blood, v.112, n.5, Sep 1, p.1557-69. 2008.

_____. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. Cell Res, v.20, n.1, Jan, p.4-12. 2010.

Zhu, J., H. Yamane, *et al.* Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol, v.28, Mar, p.445-89. 2011.

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Silva, Thiago Aparecido

Efeito da lectina ArtinM sobre as células T $CD4^+$ murinas

Ribeirão Preto, 2012. 82f. :il. 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientadora: Roque-Barreira, Maria Cristina

1. Lectinas; 2. ArtinM; 3. Células T $CD4^+$