UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

GABRIELA PERON

Tabhys: um peptídeo com atividade lectínica extraído de *Tabernaemontana hystrix*

Ribeirão Preto
2015

GABRIELA PERON

Tabhys: um peptídeo com atividade lectínica extraído de *Tabernaemontana hystrix*

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo

Ribeirão Preto

2015

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

VERSÃO CORRIGIDA

FICHA CATALOGRÁFICA

Peron, Gabriela

Tabhys: um peptídeo com atividade lectínica extraído de *Tabernaemontana hystrix*. Ribeirão Preto, 2015.

85 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Panunto-Castelo, Ademilson.

1. *Tabernaemontana hystrix* Steud, 2. Hemaglutininas,
3. Lectinas de plantas, 4. TGF-β,
5. Peptídeos lectina-símiles.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PERON, Gabriela
Título: Tabhys: um peptídeo com atividade lectínica extraído de *Tabernaemontana hystrix*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências – Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovada em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____ Instituição: _____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia, Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro do CNPq (830699/1999-6)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, João Roberto Peron e Veridiana G. da Costa Peron, por todo o esforço em proporcionar-me uma boa educação, pela confiança depositada em mim, assim como pelas palavras de afeto, imenso carinho e compreensão e ao meu noivo Leandro Cesar da Silva Barbosa, por toda a cumplicidade, pelo amor dedicado, e principalmente, pelo apoio ao longo dessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi o resultado de uma busca intensa por especialização, aprendizado, superação de obstáculos, desde pessoais até profissionais. Dessa forma, agradeço imensamente ao meu orientador, **Prof. Dr. Ademilson Panunto-Castelo**, pela paciência, calma, confiança depositada em mim e no meu trabalho e principalmente por ter contribuído imensamente para o meu crescimento científico e pessoal. Sou eternamente grata, porque além do profissionalismo, nos momentos de dificuldade ele sempre esteve presente com conselhos e palavras sábias. É um orientador diferenciado, porque sabe como formar pessoas. Os grandes mestres além de ensinarem são o exemplo e este exemplo sempre levarei comigo. Obrigada, Professor Ademilson. Não posso me esquecer do amigo e pós-doutorando **Fabrício Freitas Fernandes**, pela amizade sincera, apoio e principalmente, por ter me ajudado de todas as maneiras possíveis, tanto tecnicamente quanto pessoalmente. Sempre prestativo e preocupado, demonstrou-me todo o respeito, dedicação e sabedoria, contribuindo muito para o meu amadurecimento profissional, responsabilidade e determinação. Agradeço também aos meus amigos e companheiros de laboratório, **Taíse N. Landgraf**, **José Renato Gatto Júnior**, **Marcelo Vieira Costa** e **Anieli Cristina Maraschi** pela amizade sincera, palavras de apoio, risadas e ajuda que foram de suma importância para a conclusão deste trabalho. Às professoras **Dra. Arlete A. Martins Coelho-Castelo** e **Dra. Maria Cristina R. A. Barreira** pelas colaborações prestadas e pelo espaço cedido em seus laboratórios para a realização de alguns experimentos. Aos técnicos **Ana Flávia Gembre**, **Izaíra Brandão**, **Ana Masson**, **Wendy Martins Rios** e **José Seminatti** por todo o auxílio prestado. Aos Professores, **Dra. Alexandra Ivo de Medeiros** e **Dr. João Atílio Jorge** pela contribuição e disponibilidade em participar da avaliação deste trabalho. Ao **Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira** pela disponibilidade, atenção e por ajudar-me na resolução de dúvidas. Em especial, agradeço à **Leomina de Jesus Silva de Souza**, funcionária da FFCLRP-USP, pelas conversas, risadas, carinho, conselhos e pelo cafezinho tão especial de todas as manhãs. Às funcionárias da FFCLRP-USP, **Andréa Carla Quiapim da Silva** e **Susie Keiko Teixeira Rocha**, por todo o auxílio e suporte. Agradeço a minha família (a minha irmã, **Viviane Peron** e meus pais **João Roberto Peron** e **Veridiana Garcia da Costa Peron**) e ao meu noivo, **Leandro César da Silva Barbosa**, pelo apoio irrestrito. A todos os familiares e amigos que contribuíram, mesmo que de maneira diferente, para o desenvolvimento deste trabalho. Finalmente, agradeço aos órgãos financiadores, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro.

“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem...”

(Guimarães Rosa)

RESUMO

PERON, G. **Tabhys: um peptídeo com atividade lectínica extraído de *Tabernaemontana hystrix***. 85 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Lectinas são proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um monossacarídeo ou oligossacarídeo. A capacidade de ligação a diferentes tipos de açúcares torna essas moléculas ferramentas úteis no estudo de diversos processos celulares específicos. Embora as lectinas de plantas sejam amplamente estudadas, aquelas referentes à família *Apocynaceae* ainda são pouco exploradas. Resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que extratos brutos de súber do caule da apocinácea *Tabernaemontana hystrix* Steud apresenta atividade hemaglutinante. Além de aglutinar eritrócitos do sistema ABO, a putativa aglutinina foi capaz de estimular a síntese de RNAm de IL-6 e TGF-β em células esplênicas de camundongos. À vista disso, no presente projeto tivemos como objetivo identificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar o possível potencial imunoestimulador da aglutinina de *T. hystrix*. Os extratos de *T. hystrix* obtidos por meio da farinha de raspas do súber apresentaram atividade hemaglutinante, o que não foi observado no extrato do caule destituído de súber e no extraído das folhas. Para comprovar que se tratava da atividade observada anteriormente, obtivemos a inibição da hemaglutinação com a glicoproteína fetuína, mas não houve inibição por monossacarídeos. Foi determinado um protocolo de isolamento da hemaglutinina com precipitação do extrato do súber com sulfato de amônio, cuja atividade foi recuperada no material precipitado na faixa de 30 a 60% de saturação, seguido de cromatografias sequenciais por (1) interação hidrofóbica (HiTrap Octyl), (2) troca catiônica (HiTrap SP), (3) fase reversa (EC Nucleosil C18) e (4) afinidade (Blue–Sepharose). Nessas colunas a atividade foi recuperada do (1) material não retido e dos eluatos (2 e 4) com 1M e 0,5M de NaCl, respectivamente, e (3) 83% de acetonitrila. Esse protocolo produziu uma preparação homogênea contendo um peptídeo cuja análise eletrofóretica revelou massa molecular (MM) aproximada de 3kDa e concentração hemaglutinante mínima de 50µg/mL. A fim de determinar se esse peptídeo formava estrutura quaternária (dímeros, tetrâmetros, etc.), característica da maioria das lectinas de plantas, submeteu-se a preparação a uma eletroforese em gel nativo (PAGE), não sendo observadas mudanças na MM do peptídeo e nem a presença de outras moléculas com MM maiores que pudessem estar associadas a ele, o que sugere que a aglutinina de *T. hystrix* (denominado aqui de Tabhys) é um peptídeo de MM aproximada de 3kDa. O fato da heveína, um dos peptídeos lectínicos com atividade antifúngica mais estudado, ter especificidade por quitina nos motivou a tentar o isolamento do peptídeo em coluna desse polissacarídeo. Observou-se atividade hemaglutinante e presença de peptídeo com MM de 3kDa no material eluído com Ácido acético a 0,1M da coluna de quitina. Curiosamente, nenhuma de nossas preparações foram capazes de inibir o crescimento do fungo *Trichophyton rubrum*. O peptídeo purificado foi testado quanto a sua capacidade em induzir a proliferação celular e a produção de citocinas em células esplênicas murinas. Os resultados dos ensaios de RT-PCR em tempo real e citometria de fluxo demonstraram que o a aglutinina de *T. hystrix* não foi capaz de estimular a proliferação de linfócitos, entretanto, induziu o aumento de mensagem para a citocina TGF-β, cujo pico de produção ocorreu em célula estimuladas com 37ng/mL. Neste estudo, relatamos a presença de um peptídeo no extrato de *T. hystrix* com atividade hemaglutinante, o que é relativamente raro e novo. Devido a isso, este estudo pode proporcionar novas perspectivas e paradigmas nos estudos das lectinas a nível molecular e estrutural.

Palavras-chave: *Tabernaemontana hystrix* Steud. Hemaglutininas. Lectinas de plantas. TGF-β. Peptídeos lectina-símiles.

ABSTRACT

PERON, G. **Tabhys: a peptide with lectin activity extracted from *Tabernaemontana hystrix***. 85 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Lectins are proteins that have at least one non-catalytic domain that binds specifically and reversibly to a monosaccharide or oligosaccharide. This ability to bind to different types of sugars makes these molecules useful tools in the study of various specific cellular processes. Although the plant lectins are widely studied, those belong to *Apocynaceae* family are still little explored. Previous results obtained by our research group showed that bark crude extracts from *Tabernaemontana hystrix* Steud (*Apocynaceae*) had hemagglutination activity. Besides to agglutinate erythrocytes from ABO blood group system, the putative agglutinin induced the synthesis of IL-6 and TGF-β mRNA in mouse spleen cells. Here we aim to identify, characterize biochemically and evaluate the possible immunostimulatory potential of *T. hystrix* agglutinin. The haemagglutination activity was obtained from crude extracts of bark flour, but not of flours of stems without bark and leaves. The activity of the bark extract was similar to that from the previous study, since the haemagglutination was inhibited by the glycoprotein fetuin, but not by monosaccharides. An isolation protocol was determined by using ammonium sulfate precipitation, with haemagglutination activity recovered in the range of 30-60% of saturation, and sequential chromatography procedures: (1) hydrophobic interaction (HiTrap Octyl), (2) cation-exchange (HiTrap SP), (3) reverse phase (EC Nucleosil) and (4) affinity (Blue–Sepharose) chromatography. From these columns the activity was recovered in the (1) unbound material, and eluates (2 and 4) with 1M and 0,5M of NaCl, respectively, and (3) 83% acetonitrile. On the basis of electrophoresis analysis, the protocol produced a preparation comprised of only band corresponding a peptide with molecular weight (MW) of about 3-kDa, with minimum haemagglutination concentration of 50μg/ml. To determine if this molecule arrangement had a quaternary structure arrangement, a feature of most known lectins, we submitted the preparation to a native electrophoresis. Because there was neither change in migration pattern nor presence of molecules of higher molecular mass, we suggested that *T. hystrix* peptide (Tabhys) is a peptide with MW of about 3-kDa. Since hevein, which is a most studied lectin-like peptide with antifungal activity, binds specifically to chitin, we performed an affinity chromatography in the chitin column with bark extract. We observed haemagglutination activity and the presence of peptide with MW of 3-kDa in the material bound to column and eluted with 0,1M acetic acid. Curiously, this peptide was not able to inhibit the growth of the fungus *Trichophyton rubrum*. Thereafter, when the purified peptide was used to stimulate murine spleen cells, we detected the expression of TGF-β message, with a peak production obtained in cell stimulated with 37 ng/mL of Tabhys. In the current study, we isolated a peptide from crude extract of *T. hystrix* bark with haemagglutination activity, providing new perspectives in molecular and structural researches of peptide lectins.

Keywords: *Tabernaemontana hystrix* Steud. Hemagglutinins. Plant lectins. TGF-β. Lectin-like peptides.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC –	Aloficocianina
APC-Cy 7 –	Aloficocianina Cyanine 7
AU –	Unidade de absorbância
BN-PAGE –	Eletroforese bidimensional realizada em gel de poliacrilamida sem condições dissociantes (primeira dimensão) e sob condições dissociantes (segunda dimensão/SDS-PAGE convencional)- (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)
BSA –	Albumina Sérica Bovina
CD –	Grupo de diferenciação (*Cluster of Differentiation*)
cDNA –	DNA complementar
CFSE –	Carboxifluoresceína succinimidil éster (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester)*
CMT –	Quimotripsinogênio
CO_2 –	Dióxido de carbono
ConA –	Concanavalina A
CRD –	Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
DEPC –	Dimetil pirocarbonato
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse –	Desoxirribonuclease
dNTP –	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DO –	Densidade Óptica
DTT –	Ditiotreitol
EDTA –	Ácido etilenodiamina tetra-acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
ERGIC-53 –	Proteína integral de membrana (53kDa) do compartimento intermediário do retículo endoplasmático e complexo de golgi
ERK –	Quinase regulada por sinal extracelular
FACS –	Separação celular ativada por fluorescência (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)
Fc –	Fragmento cristalizável de uma molécula de anticorpo
FLT –	Amostra não adsorvida à coluna (*Flowthrough*)
FSC –	Dispersão frontal de luz (*Foward Scatter*)
Fuc –	Fucose
Gal –	Galactose
GalNAc –	N-acetilgalactosamina
Glc –	Glicose

GlcNAc – N-acetilglicosamina
HCl – Ácido clorídrico
IFN – Interferon
IL – Interleucina
KCl – Cloreto de potássio
$KHCO_3$ – Bicarbonato de potássio
LPS – Lipopolissacarídeo
LysM – Motivo de Lisina (*Lysin Motif)*
M – Concentração Molar
Man – Manose
MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio
ML – Lectina de visco (*Mistletoe lectin*)
MM – Massa Molecular
MS – Espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*)
NaCl – Cloreto de Sódio
NH_4Cl – Cloreto de amônio
$(NH4)_2SO_4$ – Sulfato de amônio
NK – Células matadoras naturais (*Natural Killer*)
PBS – Tampão fosfato tamponado (*Phosphate Buffered Solution)*
PCR – Reação em cadeia da polymerase (*Polymerase Chain Reaction*)
PHA – Fito-hemaglutinina
qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa com o uso de transcriptase reversa (*Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)*
RIP – Proteína de Inativação Ribossômica
RNA – Ácido Ribonucléico
RNAse – Ribonuclease
RPMI 1640 – Meio de cultura (Roswell Park Memorial Institute)
TA – Temperatura ambiente
TFA – Ácido trifluoracético
TGF – Fator de crescimento e transformação
Th 1 – Célula T auxiliar do tipo 1
Th 2 – Célula T auxiliar do tipo 2
TLR – Receptor semelhante ao Toll (*Toll-like Receptor*)
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TxLC-I – Lectina do bulbo de *Tulipa* cv
SBF – Soro Fetal Bovino (Serum Bovine Fetal)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Ser/Thr – Serina/Treonina

Sia – Ácido siálico

SSC – Dispersão lateral de luz (*Side Scatter*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
1.1 Lectinas 15
1.1.1 Histórico e aspectos gerais 15
1.1.2 Lectinas de plantas 18
1.1.3 Lectinas e o sistema imunológico 23
1.2 Família *Apocynaceae* 26
1.2.1 Aspectos gerais 26
1.2.2 *Tabernaemontana. hystrix* Steud. 27

2 OBJETIVOS 29

3 MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1 Preparo de extratos de *T. hystrix* 30
3.2 Determinação de atividade hemaglutinante 30
3.2.1 Eritrócitos 30
3.2.2 Hemaglutinação 30
3.3 Purificação da hemaglutinina de *T. hystrix* 31
3.3.1 Precipitação com sulfato de amônio 31
3.3.2 Cromatografia líquida 31
3.3.2.1 Cromatografia convencional 32
3.3.2.2 Cromatografia automatizada 33
3.4 Análise eletroforética 34
3.5 Quantificação proteica 34
3.6 Análise de complexos multiproteicos 35
3.7 Ensaio de atividade antifúngica 35
3.8 Identificação da aglutinina de *T. hystrix* 35
3.9 Animais 36
3.10 Coleta e obtenção de células do baço 36
3.11 Estimulação *in vitro* de células esplênicas com Tabhys 36
3.11.1 Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE 36
3.11.2 Citometria de fluxo 37
3.11.3 Quantificação de mensagem de citocinas por reação em cadeia da polimerase em tempo real dos transcritos reversos (qRT-PCR). 38

3.11.3.1 Obtenção do RNA total de células do baço de camundongos 38
3.11.3.2 Síntese de cDNA fita simples 38
3.11.3.3 qRT-PCR 39
3.12 Análise estatística 40

4 RESULTADOS 41
4.1 Extrato do súber, mas não da folha e do caule de *T. hystrix*, apresenta atividade hemaglutinante 41
4.2 A aglutinina do súber de *T. hystrix* é inibida pela glicoproteína fetuína. 41
4.3 O extrato bruto do súber de *T. hystrix* apresenta baixo conteúdo proteico. 42
4.4 O extrato bruto de *T. hystrix* apresenta proteínas de baixa e alta massas moleculares com possível atividade hemaglutinante. 43
4.5 Extrato bruto de súber de *T. hystrix* apresenta peptídeos de aproximadamente 3kDa e 7kDa com possível atividade hemaglutinante. 45
4.6 Peptídeo de aproximadamente 3kDa presente no extrato bruto de súber de *T. hystrix* como uma provável hemaglutinina. 48
4.7 Purificação em coluna de quitina 54
4.8 Sequenciamento do peptídeo 56
4.9 A aglutinina de *T. hystrix* não é capaz de induzir a proliferação de células do sistema imunológico 56
4.10 A aglutinina de *T. hystrix* estimula a expressão de TGF-β por células esplênicas 58

5 DISCUSSÃO 59

6 CONCLUSÕES 69

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Histórico e aspectos gerais

Ao final do século 19, evidências da presença na natureza de proteínas que possuíam a habilidade de aglutinar eritrócitos iniciaram a história da pesquisa com lectinas. Tais proteínas foram denominadas hemaglutininas ou fito-hemaglutininas, dado que foram primeiramente descobertas em plantas (Sharon & Lis, 2004).

Estudos pioneiros de descrição das hemaglutininas advêm de 1888, através da descoberta da ricina, uma lectina altamente tóxica extraída de sementes da mamona (*Ricinus communis*), por Peter Hermann Stillmark (Sell & da Costa, 2000; Sharon &Lis, 2004; Sharon, 2007; Sharon & Lis, 2007). Trinta e um anos após a descoberta da ricina, James B. Sumner, isolou da semente de uma leguminosa (*Canavalia ensiformis*), uma proteína com atividade hemaglutinante, denominada concanavalina A (ConA) (Sharon & Lis, 2004), no entanto somente após duas décadas (1936) foi descoberta a capacidade de ConA em aglutinar outros tipos de células, como leveduras, e em precipitar determinados tipos de carboidratos e glicoproteínas (Sumner & Howell, 1936). A partir desses dados e de outros trabalhos, os pesquisadores observaram que as lectinas reagiam de maneiras diferentes aos tipos de células sanguíneas, sendo a especificidade entre elas variável.

No final de 1940, dois trabalhos independentes de William C. Boyd, nos EUA, e Karl O. Renkonen, na Finlândia, relataram em extratos de *Phaseolus limensis*, *Vicia cracca* e *Lotus tetragonolobus* a especificidade de aglutininas a determinados tipos de antígenos do grupo sanguíneo humano ABO (Sharon & Lis, 2007). Essas observações foram corroboradas e extendidas, entre 1954 a 1956, por Olavi Mäkelä, o qual examinou 743 extratos de sementes de diferentes tipos de plantas da família *Leguminosae* e detectou, em aproximadamente um décimo delas, atividade hemaglutinante específica à tipagem sanguínea humana (Sharon & Lis, 2004).

A descoberta de especificidade das aglutininas de plantas aos diferentes tipos de carboidratos presentes nas células sanguíneas humanas foi importante para o estudo dos antígenos do sistema sanguíneo ABO humano. No trabalho de Morgan *et al*., em 1950, estes conseguiram identificar os açúcares que determinavam esta especificidade em cada tipo sanguíneo humano (Aminoff *et al*., 1950; Morgan & Watkins, 2000).

Em 1954, Boyd e Shapleigh propuseram o termo lectina, do latim *lectus* (partícipio passado do verbo *legere* - que significa escolher ou selecionar), devido a habilidade das aglutininas em distinguir entre eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos (Boyd & Shapleigh, 1954). Este termo foi generalizado, mais tardiamente, em 1980, por Goldstein, que definiu lectinas com "proteína de origem não imunológica ligante de açúcar que aglutina células ou precipita glicoconjugados" (Goldstein *et al*., 1980).

O interesse pelas lectinas aumentaram significativamente a partir da década de 1960, com a descoberta da lectina de *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fito-hemaglutinina (PHA). Peter C. Nowell, observou que além de aglutinar eritrócitos, PHA também possuía atividade mitogênica em linfócitos (Nowell, 1960), fenômeno que até então era desconhecido no âmbito imunológico, uma vez que se acreditava que o linfócito ao alcançar o estágio final de desenvolvimento não era capaz de ser estimulado a proliferar e diferenciar-se (Liener *et al*., 1986 *apud* Sharon & Lis, 2007). À vista disso, uma variedade de outras lectinas com atividade mitogênica foram descobertas.

O estudo das lectinas como substâncias mitôgenicas, juntamente com suas aplicações práticas como marcadores estruturais, permitiu a expansão de estudos sobre as características biológicas das células, principalmente no âmbito de organização e alteração de suas moléculas de superfície em casos de malignidade. Na década de 60 e 70, descobriu-se a habilidade das aglutininas de gérmen de trigo (WGA), da soja (SBA) e ConA em aglutinar, preferencialmente, células cancerosas (Aub *et al*., 1963, 1965; Inbar & Sachs, 1969; Inbar *et al*., 1972; Sela *et al*., 1971). Tais descobertas resultaram em inovações no campo da biologia experimental, sendo as lectinas utilizadas para distinção de populações de células específicas e em técnicas para caracterização, sequenciamento e purificação de carboidratos e glicoproteínas. A partir de então, com o avanço nas técnicas bioquímicas de isolamento e separação de lectinas baseadas na afinidade e capacidade de reagirem reversivelmente com carboidratos, ocorreu a intensificação de estudos pela descoberta de novas lectinas provenientes de outros grupos taxonômicos, incluindo vertebrados.

A primeira lectina de mamíferos, um receptor de asialoglicoproteínas específico para galactose com função de controle de meia-vida de glicoproteínas presentes na circulação sanguínea, foi descoberta a partir de células do fígado de coelhos (Ashwell & Morell, 1974). Concomitantemente, a partir de extratos de determinados tecidos de *Electrophorus electricus* (enguia), foi isolada uma lectina, solúvel e/ou parcialmente ligada a membrana, com especificidade à dissacarídeos contendo β-D-galactose. Tal lectina foi a primeira galectina de animais a ser descoberta (Teichberg *et al*., 1975). Com isso, à medida que se intensificou as

purificações e os estudos de lectinas de animais, dado a descoberta de uma variedade de funções, os parâmetros físico-químicas dessas proteínas também foram alvos de interesse para o entendimento de suas atividades a níveis moleculares. Estes parâmetros, juntamente com a determinação das sequências primárias e conformações tridimensionais das lectinas, começaram a ser elucidados no início da década de 70. A primeira lectina a ter a sua sequência primária elucidada foi ConA (Edelman *et al*., 1972), seguida da aglutinina de gérmen de trigo (WGA) (Wright, 1977). À vista disso, uma variedade de estruturas primárias de lectinas foram identificadas, sendo fundamentais para a identificação de homologias dentro de agrupamentos taxonômicos de lectinas (Sharon & Lis, 2004).

Baseando-se na análise das sequências de aminoácidos das lectinas, descobriu-se que na maioria delas havia uma sequência polipeptídica que compartilhava um padrão de resíduos de aminoácidos altamente conservados e que eram responsáveis pela interação com os carboidratos, denominada domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (Drickamer, 1988; Drickamer & Taylor, 1993; Sharon & Lis, 1990; Loris *et al*., 1998; Dodd & Drickamer, 2001). A descoberta dos CRDs, particularmente de lectinas com apenas um CRD, e de outros domínios não ligantes de carboidratos com atividade catalítica, restringiram ainda mais as propostas de definições para essas proteínas (Van Damme *et al*., 1998). Assim, a definição original foi extendida por Peumans e Van Damme (1995) – para incluir entre as lectinas as proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um monossacarídeo ou oligossacarídeo (Peumans & Van Damme, 1995).

A especificidade das lectinas aos diferentes tipos de carboidratos é devido principalmente a complementaridade gerada por interações fracas (interações eletrostática, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas) (Drickamer & Taylor, 1993; Elgavish & Shaanan, 1997) entre alguns de seus resíduos de aminoácidos e os diferentes tipos de carboidratos, sendo que uma mudança relativa em um ou dois grupos hidroxilas (epimerização) pode alterar substancialmente esse processo de reconhecimento (Gabius *et al*., 2011).

O reconhecimento de inúmeras estruturas de glicanas por lectinas envolve a estrutura tridimensional desses carboidratos, sendo diretamente relacionada às configurações anoméricas no carbono 1 (α/β), às posições das ligações glicosídicas, às configurações espaciais (piranose ou furanose), assim como às associações e modificações (acetilação, fosforilação, sulfatação e metilação) das estruturas de todos os carboidratos (Pilobello & Mahal, 2007; Gabius *et al*., 2011). Dessa forma, os carboidratos, diferentes de outras classes de macromoléculas (DNA, RNA), formam estruturas complexas que os proporcionam alta

diversidade, tornando-os um detentor de informações maciço (Pilobello & Mahal, 2007). Tais informações ou glicocódigos, apesar de pouco conhecidos (Varki *et al*., 2009) são decifrados pelas lectinas (Sharon & Lis, 1989; Drickamer & Taylor, 1993; Elgavish & Shaanan, 1997, Naeem *et al*., 2007).

As lectinas, embora sejam ligantes específicos de carboidratos, possuem uma afinidade relativamente baixa por monossacarídeos, com constante de dissociação baixa, na faixa de 10^{-4} a 10^{-3} M (Rini, 1995; Drickamer, 1995; Elgavish & Shaanan, 1997, Gabius *et al*.,2011). A força de ligação é aumentada em função de múltiplos sítios de ligações adicionais (avidez), os quais determinam a especificidade das lectinas (Bundle & Young, 1992). A multiplicidade de ligações é proporcionada por subsítios de ligação (ou sítios estendidos) ou por subunidades multivalentes que são formadas por mais de uma unidade de cadeias polipeptídicas semelhantes ou por oligômeros (Rini, 1995; Elgavish e Shaanan, 1997, Sharon & Lis, 2007).

1.1.2 Lectinas de plantas

Embora as lectinas estejam presentes em todos os seres vivos, inclusive em alguns vírus, as derivadas de plantas são as mais abundantes, sendo encontradas com frequência em muitas famílias, dentre elas destacam-se *Fabaceae* e *Euphorbiaceae*. Elas podem estar presentes tanto em cotilédones ou endospermas de sementes (correspondendo de 0,1 a 5% do total de proteínas nestes tecidos), quanto em tecidos vegetativos como em folhas, cascas, bulbos, rizomas, raízes de flores, caule, frutos, floema, néctar e látex (Van Damme, 2008; Dias *et al*., 2015). À vista disso, formam um grupo heterogêneo de proteínas que se diferenciam entre si em estrutura molecular, especificidade e atividade biológica (Van Damme *et al*., 1998; Peumans *et al*., 2001; Peumans & Van Damme, 1998). Baseando-se na estrutura global das lectinas de plantas e no número de CRDs que as compõem, estas foram classificadas em quatro grupos: hololectinas, merolectinas, quimerolectinas e superlectinas (Peumans & Van Damme, 1995, 2001; Naeem *et al*., 2007) (Figura 1).

As lectinas classificadas como merolectinas possuem somente um CRD e devido a isso não são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. Um exemplo clássico é a heveína, um peptídeo de aproximadamente 4.7kDa ligante de quitina extraído do látex de *Hevea brasiliensis* (Van Parijs *et al.*, 1991; Porto *et al*., 2012). Já as hololectinas possuem dois ou mais CRDs estruturalmente similares e, portanto, ao contrário das merolectinas, são capazes de aglutinar células e precipitar glicoconjugados (Peumans & Van Damme, 1998). A

maioria das lectinas de plantas pertencem ao subgrupo das hololectinas, como por exemplo, ConA, PHA, WGA e etc. As quimerolectinas possuem um ou mais CRDs e um domínio não relacionado. Esse domínio não relacionado pode ter atividade catalítica, dentre outras, atuando independentemente do CRD. As quimerolectinas ora comportam-se como merolectinas, como no caso das quitinases de classe I, contendo apenas um CRD, ora como hololectinas, como no caso das proteínas de inativação ribossômica (RIP) do tipo 2, as quais possuem dois CRDs (Van Damme *et al*., 1998). E por último, as superlectinas, um grupo específico de quimerolectinas que possuem dois ou mais CRDs, estruturalmente e funcionalmente diferentes que reconhecem açúcares diferentes. A lectina TxLC-I é um exemplo de superlectina, pois possui domínios com afinidade à manose e à N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Van Damme *et al*., 1996).

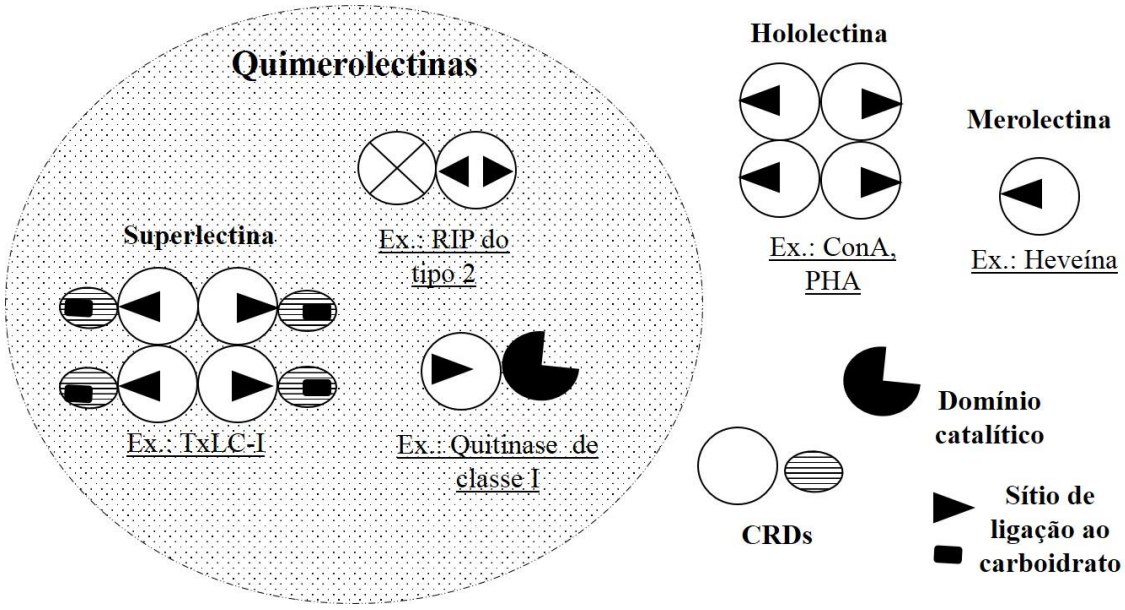

Figura 1: Representação esquemática das estruturas de diferentes subclasses das lectinas de plantas, baseado na composição de seus domínios. TxLC- lectina do bulbo de *Tulipa* cv. PHA- fito-hemaglutinina. ConA- concanavalina A. RIP do tipo 2: lectina de *Viscum album.* Adaptado de Van Damme *et al*. 1998 e Peumans *et al*., 2001.

Por outro lado, o rápido progresso nas análises estruturais e na clonagem dos genes das lectinas de plantas permitiu que estas fossem agrupadas, atualmente, em doze famílias evolutivamente e estruturalmente próximas (De Schutter & Van Damme, 2015) (Tabelas 1 e 2). As famílias são: lectinas (1) de *Amaranthaceae*, (2) similares à aglutinina de *Nicotiana tabacum* (Nictaba) (Chen *et al*., 2002; Van Damme *et al*., 2004; Lannoo *et al*., 2006; Lannoo & Van Damme, 2010); (3) com domínios tipo heveína; (4) similares à aglutinina de *Galanthus nivalis* (família GNA), (5) similares à jacalina, (6) de leguminosas; (7) com

domínio Ricina-B (Família Ricina-B); (8) similares à aglutinina de *Agaricus bisporus*, até então, detectadas exclusivamente em fungos (Peumans *et al*., 2007); (9) similares às quitinases de classe V com atividade lectínica (Van Damme *et al*., 2007); (10) similares à cianovirina-N (Percudani *et al*., 2005; Koharudin *et al*., 2008; 2009); (11) com domínios similares ao da aglutinina de *Euonymus europaeus* (EUA) (Fouquaert *et al*., 2008, 2009; Fouquaert & Van Damme, 2012); e (12) aquelas com domínio LysM (Família LysM) (Gust *et al*., 2012).

Tabela 1. Nome, especificidade e características das famílias das lectinas de plantas.

Família de lectinas	Especificidade	Características
Similares à quitinase	Complexo N-glicanas/alto conteúdo de Man	Lectina extraída do súber de *Robinia Pseudoacacia* que apresenta alta identidade com quitinases de classe V, no entanto, é desprovida de atividade catalítica. Alguns genes homólogos ao dessa lectina são encontrados na família Fabaceae, mas não em outras famílias de plantas (Van Damme *et al*., 2007).
Com domínios similares ao de EUA	Gal e complexo N-glicanas/alto conteúdo de Man	Aglutininas similares a de *Euonymus europaeus* (EUA) com especificidade variável (Fouquaert & Van Damme, 2012).
Amaranthaceae	Galβ(1,3)/GalNAc e GalNAc	Grupo pequeno de lectinas encontradas em espécies de *Amaranthus* (Peumans *et al*., 2001).
Similares à cianovirina-N	Man	Cianovirina-N (CVN) é uma lectina extraída da cianobactéria *Nostoc ellipsosporum* com um alto potencial antiviral. Atualmente, lectinas homólogas à CVN (CVNH) têm sido relatadas em algumas espécies de plantas e fungos (Percudani *et al*., 2005; Koharudin *et al*., 2009).
Similares à Nictaba	$(GlcNAc)_n$, alto conteúdo de Man e N-glicanas complexas	Grupo de lectinas similares à aglutinina extraída da folha de *Nicotiana tabacum* (Nictaba). A expressão dessa aglutinina é induzida por alguns hormônios ou insetos herbívoros não sendo detectada em condições normais nas espécies de *Nicotiana* (Chen *et al*., 2002; Lannoo *et al*., 2006, 2007). O domínio Nictaba também está presente nas lectinas do floema de Cucurbitaceae, as quais representam um subgrupo de aglutininas similares à Nictaba.
Similares à heveína	$(GlcNAc)_n$ e N-glicanas	Lectinas com um ou mais domínios heveína. O domínio heveína foi primeiramente identificado em um peptídeo extraído do látex de *Hevea brasiliensis*, nomeado heveína, com especificidade à quitina (Van Parijs *et al*., 1991; Peumans *et al*., 2001; Van Damme, 2008).

Man – manose, Glc – glicose, Gal – galactose, GalNAc – N-acetil-galactosamina, GlcNAc – N-acetil-glicosamina. Adaptado de De Schutter & Van Damme (2015).

Tabela 2: Continuação da tabela 1.

Família de lectinas	Especificidade	Características
Leguminosas	Man/Glc, Gal/GalNAc, (GlcNAc)n, Fuc e Siaα2-3Gal/GalNAc	Lectinas identificadas em sementes de plantas da família de leguminosas (Fabaceae). Atualmente, as lectinas da família Lamiaceae também estão inclusas neste grupo (Wang *et al*., 2003, Sharon & Lis, 1990).
Com domínio Ricina-B	Gal/GalNAc ou Siaα2-6Gal/GalNAc	Grupo de lectinas de plantas previamente referidas como proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) em eucariotos com domínio catalítico de remoção de um resíduo de adenina conservado. Entretanto, nem todas as RIPs são consideradas lectinas, apenas as RIPs do tipo 2, as quais possuem uma cadeia B com dois CRDs. Esta cadeia, denominada de domínio ricina-B, foi primeiramente identificada na ricina, uma lectina altamente tóxica isolada da semente de *Ricinus communis* (mamona) (Van Damme *et al*., 2001; Stirpe & Battelli, 2006; Van Damme, 2008).
Similares à aglutinina de *Agaricus bisporus*	GlcNAc/GalNAc e Gal	Aglutinina originalmente reportada no fungo *A. bisporus* (ABA). Atualmente, aglutininas homólogas à ABA foram encontradas em algumas espécies de plantas mais basais como *Marchantia polymorpha* (MarpoABA) e o musgo *Tortula ruralis* (Lannoo & Van Damme, 2010).
Similares à GNA	Man e N-glicanas	Refere-se à lectina extraída do bulbo de *Galanthus nivalis* com especificidade à manose. À medida que novas lectinas estruturalmente similares a GNA em monocotiledôneas foram descobertas, estas foram agrupadas na família de lectinas ligadoras de manose de monocotiledôneas (Peumans & Van Damme, 1998). No entanto, atualmente, com a descoberta de lectinas similares à GNA em briófitas, bactérias e animais esta família foi nomeada de lectinas similares à GNA.
Similares à Jacalina	Gal, Galβ(1,3)/GalNAc, Man e N-glicanas	Proteínas com um ou mais domínios que são estruturalmente similares ao domínio da jacalina, uma lectina com especificidade à galactose extraída da semente da jaca (*Artocarpus integrifolia*) (Kabir, 1998).
Com domínio LysM	Quitina, peptideoglicanas	O domínio LysM foi primeiramente descoberto na lisozima de um fago, a qual degrada a parede celular de algumas bactérias. Está presente em todos os eucariotos, incluindo plantas e humanos (Buist *et al*., 2008; Ponting *et al*., 1999). Em plantas, as lectinas com domínios LysM extracelulares têm sido identificadas como receptores de superfície que medeiam a interação entre bactérias e leguminosas. Nas espécies de *Arabidopsis*, receptores similares a cinases que contém domínios LysM estão envolvidos no reconhecimento e defesa contra fungos patogênicos (Miya *et al*., 2007; Wan *et al*., 2008).

Man – manose, Glc – glicose, Gal – galactose, Fuc – fucose, GalNAc – N-acetil-galactosamina, GlcNAc – N-acetil- glicosamina, Sia – ácido siálico, RIPs – proteínas inativadoras de ribossomos. Adaptado de De Schutter & Van Damme (2015).

Embora as lectinas de plantas estejam agrupadas em diferentes famílias estruturalmente relacionadas, estas compartilham similaridades com as estruturas terciárias de lectinas provenientes de outros grupos. Tais similaridades são detectadas em dobramentos observados primeiramente em lectinas de legumes, como "rocambole" ou dobramento das lectinas, composto de fitas betas antiparalelas arranjadas em duas folhas betas, os quais estão presentes em monômeros de lectinas de animais (ERGIC-53) e humanas (galectina humana 7) (Sharon & Lis, 2004). Dessa forma, o grupo das lectinas possuem diferentes tipos de dobramentos, dentre os quais os mais comuns em plantas são: beta prisma I e II, beta trevo, domínio das heveínas e domínio das lectinas de leguminosas ("rocambole") (Rini, 1995; Wright, 1997; Loris, 2002; Sinha *et al*., 2007; Gabius, 2013).

Devido a essa ampla diversidade estrutural, as lectinas exercem diversas funções. Dentre elas, destacam-se como moléculas de reconhecimento importantes na infecção de células hospedeiras por algumas bactérias e vírus (Park & Novak, 2009; Wang *et al*., 2014). Nos animais são responsáveis pelo controle da biossíntese de glicoproteínas (ERGIC-53, calnexina e calreticulina), pelo direcionamento de linfócitos e leucócitos aos sítios de inflamação (selectinas), além de atuarem como moléculas de defesa e reconhecimento de patógenos (dectina e colectina), regularem o crescimento, ciclo e apoptose das células (galectinas) e serem mediadoras nas interações entre células da imunidade inata e neurais (siglecs) (Drickamer & Taylor, 1993; Dod & Drickamer, 2001; Sharon & Lis, 2004).

Diferente das lectinas de animais, as funções biológicas das lectinas de plantas ainda não estão totalmente elucidadas. Estudos indicam que elas podem ser secretadas sob condições de estresse (seca, altas concentrações de sais, ferimento, etc.) em compartimentos intracelulares como citoplasma e núcleo (Zhang *et al*., 2000; Chen *et al*., 2002, Van Damme *et al*., 2004). Em contrapartida, diversos estudos demonstram o papel das lectinas de plantas na defesa contra micro-organismos e insetos fitopatogênicos, assim como contra animais predadores (Janzen *et al*., 1976; Barkai-Golan *et al*., 1978; Brambl & Gade, 1985; Chrispeels & Raikhel, 1991; Peumans & Van Damme, 1995; Ripoll *et al*., 2003; Van Damme, 2008; Dias *et al*., 2015). Recentemente, a descoberta de peptídeos ou proteínas antimicrobianos com domínios heveína contribuíram ainda mais para a elucidação da função de defesa dessas proteínas nas plantas (Odintsova *et al*., 2009; Zhao *et al*., 2011; Porto *et al*., 2012). Ainda, na década de 70, surgiu a hipótese de que as lectinas de plantas leguminosas podem ser responsáveis pela associação entre bactérias fixadoras de nitrogênio (rhizobia) e a raiz dessas plantas (Hamblin & Kent, 1973; Bohlool & Schmidt, 1974). Tal hipótese ainda não foi comprovada, pois não é válida para todas as leguminosas, além disso existem poucos estudos

que demonstrem essa relação entre lectinas em raízes de plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio (Sharon & Lis, 2004).

Diante do exposto, a disponibilidade de um grande número de lectinas de plantas com especificidades glicídicas distintas possibilitou que essas fossem utilizadas como ferramentas úteis na pesquisa, principalmente nos âmbitos da medicina, biologia e biotecnologia (Tabela 3). Vale ressaltar que após a descoberta da atividade mitogênica da PHA e de outras lectinas imunoestimuladoras, essas proteínas têm se mostrado como ferramentas muito interessantes em pesquisas na área de imunologia.

Tabela 3. Aplicações das lectinas de plantas.

BIOLOGIA
- Purificação, caracterização e quantificação de glicoconjugados e/ou glicanas por meio de cromatografia de afinidade com lectinas imobilizadas e em ensaios de ligação de lectinas conjugadas às enzimas (ELLA) - Quantificação das atividades de glicosiltransferases/glicosidases por detecção de produtos enzimáticos com o uso de lectinas - Análise de glicomas (glicômica) - Detecção de epítopos definidos de carboidratos de glicoconjugados em *blots* ou em placas de cromatografia de camada delgada - Caracterização do perfil de glicoconjugados de superfície celular e os seus precedentes de organização intracelular e rotas em células normais e geneticamente modificadas - Análise de mecanismos envolvidos na glicosilação correta de variantes celulares resistentes às lectinas; - Fracionamento de populações celulares - Modulação dos perfis de ativação e proliferação de células - Estudos de processos celulares de agregação e adesão por meio do uso de lectinas como modelos de substratos
MEDICINA
- Detecção e quantificação de aberrações de glicanas de superfícies celulares relacionadas com doenças, por exemplo, malignidade de células tumorais - Tipagem de grupo sanguíneo e definição dos perfis de secreção - Estudos de marcadores celulares para diagnóstico inclusive de agentes infecciosos como vírus, bactérias, fungos e parasitos
BIOTECNOLOGIA
- Produção de drogas e inseticidas contra pragas agrícolas

Adaptado de Rüdiger & Gabius, 2001.

1.1.3 Lectinas e o sistema imunológico

Desde a descoberta, em 1960, da capacidade da PHA e ConA em induzir a proliferação de linfócitos, as lectinas de plantas têm sido utilizadas extensivamente como ferramentas úteis no estudo de processos biológicos celulares específicos, visto que elas podem interagir com os diferentes açúcares presentes nos receptores de superfície das células

e, consequentemente, podem desencadear inúmeras vias de sinalizações e respostas bioquímicas em células específicas (Souza *et al*., 2013). Como exemplo, podemos citar as lectinas mitogênicas que interagem com os glicanas dos receptores de linfócitos B e T e induzem a expansão policlonal, o aumento da síntese de DNA, alterações morfológicas e fenotípicas e secreção de citocinas. Nas células B pode ainda ocorrer a secreção de imunoglobulinas por essas células (Whisler & Yates, 1980; Sell & Costa, 2000). Embora seja conhecido que algumas dessas lectinas induzem a produção e a secreção de IL-2, citocina responsável pela sobrevivência e expansão dos linfócitos, os mecanismos subjacentes a essa atividade mitogênica ainda não são totalmente conhecidos. Evidências indicam que essas proteínas diferem entre si quanto a capacidade de induzir a proliferação de linfócitos.

As diferentes isoformas da PHA, isolectinas compostas de subunidades que possuem uma cadeia E reativa à eritrócitos, e/ou outra cadeia L com alta afinidade para os receptores de linfócitos (Chrispeels & Raikhel, 1991; Movafagh *et al*., 2013), possuem capacidades diferentes em interagir com linfócitos e estimular a proliferação dessas células (Sharon & Lis, 2004). Em experimentos de comparação dos efeitos mitogênicos entre as diferentes isolectinas de PHA e de outras lectinas mitogênicas, observou-se que somente algumas isoformas de PHA foram capazes de induzir um alto índice mitótico em linfócitos humanos (Sofuni & Yoshida, 1992).

Além de induzirem a proliferação de linfócitos, as lectinas de plantas também podem ativar células do sistema imunológico como macrófagos, mastócitos, células dendríticas, neutrófilos a estimular a produção de citocinas por essas células. No trabalho de Dong *et al*. (2011), observou-se que a lectina extraída do bulbo do alho foi capaz de estimular a produção de IL-12 e IFN-γ por macrófagos e células esplênicas murinas via ativação das cinases MAPK ou ERK. Stojanović *et al*. (2010) observaram que a lectina recombinante de banana (rBanLec), além de estimular a proliferação de linfócitos T, foi capaz de induzir a produção e secreção das citocinas IL-4 e IL-10 por essas células. Muraille *et al*. (1999) observaram a produção de IL-12 e IFN-γ por células esplênicas murinas estimuladas com lectinas de plantas mitogênicas como ConA, lectina de lentilha (LCA), PHA-E e lectina de ervilha (PSA). Hajto *et al*. (1998) observaram aumento da expressão de IL-12 por células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) e da atividade citotóxica de células NK estimuladas com a aglutinina recombinante de *Viscum album* (ML-I). No trabalho de Pelletier *et al*. (2001), observou-se que a mesma lectina citada anteriormente (ML-1) pode reverter alguns dos efeitos pró-inflamatórios da citocina IL-15 sobre os neutrófilos, além de aumentar a habilidade de fagocitose dessas células. No trabalho de Figueiredo *et al*. (2009), injeções

intraperitoneais de ratos com diferentes doses da lectina da semente de *Dioclea rostrata* (DrosL) estimulou a migração de neutrófilos e a produção e secreção das citocinas IL-1β e TNF-α. Moreno *et al.* (2003) demonstraram a capacidade da lectina KM^+ extraída da semente da jaca (*Artocarpus integrifólia*), atualmente denominada ArtinM, em ativar e estimular a degranulação de mastócitos.

A atividade imunomoduladora de lectinas de plantas, principalmente na indução de um padrão de resposta imunológica protetor em determinados modelos de patogênese ou doença, tem sido amplamente estudada. Nosso grupo de pesquisa, mostrou que a lectina ligante de manose ArtinM, é capaz de induzir a produção de IL-12 por macrófagos através da ligação a receptor do tipo Toll (TLR) 2, e assim mudar o padrão de resposta imunológica de células T do tipo 2 (Th2), produtoras de IL-4, para o padrão de células Th1, produtoras de IFN-γ (Panunto-Castelo *et al.*, 2001; Coltri *et al.*, 2008; 2010). Quando investigado o potencial dessa lectina em modelos experimentais de infecção de *Leishmania major* (Panunto-Castelo *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* (Coltri *et al.*, 2008; 2010; Ruas *et al*., 2012; Souza *et al*., 2013) e *Listeria monocytogenes* (Conrado *et al.* relatado em Pereira-da-Silva *et al.*, 2008), cuja proteção é dependente do desenvolvimento de um padrão de resposta Th1, ArtinM mostrou-se protetora. O efeito de ArtinM pode ser observado quando testada profilaticamente em camundongos infectados com *L. major* (Panunto-Castelo *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2006) e profilática e terapeuticamente em modelo experimental murino de paracoccidiodomicose (Coltri *et al*., 2008; 2010).

Recentemente, tem sido identificado em plantas diversos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) solúveis ou de membrana que apresentam domínios de lectinas e são capazes de identificar patógenos e desencadear uma resposta de defesa neste grupo (De Schutter & Van Damme, 2015). Embora um número limitado desses PRRs de plantas tenha sido caracterizado funcionalmente, aqueles ligados à membrana ou de superfície carregam um ou mais domínios de lectinas extracelulares que estão acoplados a domínios de Ser/Thr cinases citoplasmáticos (De Schutter & Van Damme, 2015). Dessa forma, esses PRRs são denominados receptores similares a cinases com domínios de lectinas (LecRLK - *Lectin Receptors-Like Kinases*) e podem ser classificados em quatro tipos: G, C, L e LysM (Singh & Zimmerli, 2013; Vaid *et al*., 2013; De Schutter & Van Damme, 2015). O primeiro (tipo G) possui um ou mais domínios extracelulares similares ao da aglutinina de *G. nivalis* (família de lectinas similiares à GNA). O segundo (tipo C) não é muito comum em plantas, uma vez que as lectinas do tipo C são raramente encontradas nesse reino. Atualmente, somente um tipo foi identificado, sendo o seu papel biológico ainda não estabelecido (Cambi

et al., 2005; Vaid *et al*., 2012). O terceiro (tipo L) possui domínio extracelulares semelhantes aos das lectinas de legumes, sendo identificado no genoma de *Arabidopsis thaliana* (Bouwmeester & Govers, 2009). O quarto (tipo LysM) é o mais estudado, visto que reconhece moléculas de GlcNAc presentes em superfície de bactérias e fungos (Buist *et al*., 2008), além de estar envolvido no reconhecimento de determinados micro-organismos simbióticos de plantas, como as bactérias do gênero *Rhizobium e* os fungos micorrízicos (Knogge & Scheel, 2006; Gust *et al*., 2012).

Diante do exposto, a capacidade das lectinas de plantas em ativar células do sistema imunológico em animais (Gupta, 2012) faz com que estas proteínas estejam envolvidas em muitos mecanismos imunomoduladores em alguns modelos de infecções patogênicas (Panunto-Castelo *et al*., 2001; Coltri *et al*., 2010; Ruas *et al*., 2012. Além disso, a participação dessas proteínas nos mecanismos de defesa no reconhecimento de patógenos em defesa do "próprio" (PRRs) (Lannoo & Van Damme, 2014) e em diversas vias apoptóticas, como agentes antitumorais (Fu *et al*., 2011; Hamid *et al*., 2013), permite que elas sejam utilizadas no tratamento, prevenção e diagnóstico de algumas doenças, incluindo o câncer. Estudos adicionais de identificação e caracterização bioquímica, dos mecanismos de ação em nível molecular e a relação estrutura e função dessas proteínas poderão ajudar a compreender os seus efeitos terapêuticos benéficos, assim como analisar as consequências tóxicas ocasionadas pelo tratamento com estas moléculas na exploração de novas drogas com finalidades medicinais e até mesmo biotecnológicas, no combate às pragas agrícolas (Chrispeels & Raikhelb, 1991; Peumans & Van Damme, 1995; Sharon & Lis, 2004).

1.2 Família *Apocynaceae*

1.2.1 Aspectos gerais

A família *Apocynaceae* está classificada na ordem *Gentianales* juntamente com mais quatro famílias: *Gentianaceae*, *Rubiaceae*, *Loganiaceae* e *Gelsemiaceae* (Judd *et al.*, 2009). Esta família é considerada uma das dez maiores e mais diversas do grupo de angiospermas (Rapini, 2000; Forzza *et al*., 2010) com aproximadamente 355 gêneros e 3.700 espécies distribuídas predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais; poucos gêneros ocorrem em regiões temperadas (Judd *et al*., 2009; Santos *et al*., 2013). No Brasil são encontrados cerca de 95 gêneros e 850 espécies que ocorrem em diversas formações, como as florestas pluviais amazônica, atlântica e de tabuleiro, floresta seca, restinga, cerrado e caatinga (Quinet

& Andreata, 2005). É composta de árvores, arbustos, lianas e ervas, às vezes suculentas e com aspectos de cactos. Apresenta floema interno e presença de laticíferos e látex geralmente leitoso. As folhas são geralmente opostas e inteiras, os estiletes são unidos no ápice, formando uma cabeça ampliada e as sementes são comosas (Endress & Bruyns, 2000; Rapini, 2000; Judd *et al*., 2009). Quase todas as espécies da família são venenosas e muitas são utilizadas com propósitos medicinais e/ou econômicos, devido à presença de metabólitos secundários no látex, como por exemplo hidrocarbonetos poli-isoprênicos (borracha), triterpenos, ácidos graxos, fitoesteróis e alcalóides (Yoder & Mahlberg, 1976). A parte mais utilizada das plantas dessa família é a casca (Santos *et al*., 2013). Os compostos derivados do gênero *Catharantus* (vinca-do-madagascar), *Rauvolfia* e *Strophantus* são utilizados em drogas contra lecucemia, hipertensão e no tratamento de doenças cardíacas (Judd *et al*., 2009). Compostos derivados da casca, látex e raízes do gênero *Tabernaemontana*, popularmente conhecida como jasmim-bravo, são utilizados no tratamento da sífilis, verrugas e como expectorantes (Agra *et. al*., 2007; 2008).

1.2.2 *Tabernaemontana. hystrix* Steud.

No Brasil, o gênero *Tabernaemontana* L. possui 28 espécies nativas sendo 6 endêmicas, dentre elas destacam-se *T. hystrix* Steud., a qual pode ser encontrada no Nordeste (PE, BA), Sudeste (MG, ES, SP, RJ); cerrado e mata atlântica (Forzza *et al*., 2010).

T. hystrix Steud. (sinonímia botânica – *Peschiera fuchsiaefolia* ou *Peschiera fuchsiifolia* A. DC. Miers), popularmente conhecida como leiteiro, é classificada na classe *Equisetopsida*, subclasse *Magnoliidae*, superordem *Asteranae*, ordem *Gentianales*, família *Apocynaceae* e gênero *Tabernaemontana* L. (disponível em <www.tropicos.org/Name/ 1802046>). Com altura entre 4 e 6 metros, tronco com diâmetro entre 8 e 12cm revestido de casca lisa, a planta perenifólia, heliófita e pioneira, floresce nos meses de outubro e novembro, com maturação dos frutos nos meses de maio e junho (Figura 2). Apesar de ser encontrada no Rio de Janeiro, São Paulo e norte do Paraná, é bastante comum da floresta semidecídua do planalto paulista, com intensa regeneração espontânea em formações abertas e capoeiras (Lorenzi, 2002). Essa planta é considerada uma importante daninha para as áreas de pastagem do país cuja ocorrência vem se tornando crítica nas regiões centro-oeste e sudeste do país (Lorenzi, 2002).

T. hystrix também pode ser nomeada como *Peschiera australis* (Müll. Arg.) Miers (disponível em <http://www.tropicos.org/Name/1802046?tab=acceptednames>), a qual é

conhecida por diversos nomes populares como: burra-leiteira, leiteira, leiteira-dois-irmãos, pau-de-leite, quina, esperta, jasmim, jasmim-pipoca, jasmim-catavento e sapirangui (Quinet & Andreata, 2005). Estudos indicam que *P. fuchsiaefolia* (A. DC.) Miers, sinonímia botânica de *T. hystrix*, pode ser utilizada em estudos farmacológicos, devido a sua atividade antineoplásica (Santos *et al*., 2013).

À vista disso, apesar dos estudos intensos e do conhecimento de diversas lectinas de plantas, grande parte da flora brasileira dos mais diferentes biomas continua inexplorada em relação a essa e muitas outras moléculas que poderiam ser utilizadas como possíveis mediadores de respostas celulares diversas. Tendo em vista a diversidade de atividades e processos celulares nos quais as lectinas de plantas estão envolvidas e em razão do enorme potencial farmacológico e medicinal das plantas da família *Apocynaceae*, particularmente de *T. hystrix*, torna-se de grande interesse o rastreamento de lectinas dessas plantas ainda inexploradas. Isso porque, além de auxiliar no entendimento dos mecanismos e moléculas envolvidas nos efeitos adversos que os compostos dos espécimes desse grupo possuem, a identificação de proteínas com atividade lectínica pode abrir perspectivas na identificação e análise de variantes de glicanas raras ou conhecidas ainda pouco exploradas neste grupo. Dessa forma, motivamo-nos a identificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar o possível potencial imunoestimulador de uma hemaglutinina de *T. hystrix* que demonstrou aglutinar eritrócitos dos três tipos sanguíneos humano (A, B e O), além de estimular a produção de mensagens para as citocinas TGF-β e IL-6 em células do sistema imunológico de camundongos.

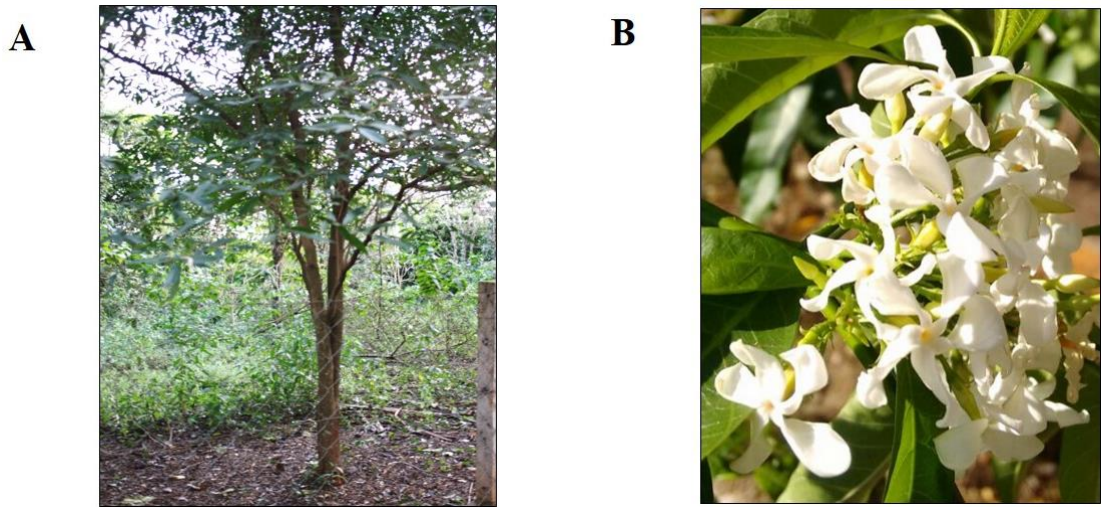

Figura 2: Ilustração de *Tabernaemontana hystrix* Steud**. (A)** Árvore e (**B**) Inflorescência de *T. hystrix*.

2 OBJETIVOS

Identificar, caracterizar bioquimicamente e avaliar o possível potencial imunoestimulador de uma hemaglutinina presente no extrato bruto de *T. hystrix.*

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo de extratos de *T. hystrix*

Raspas de súber e caule de *T. hystrix* foram lavados, trituradas até a obtenção da farinha, e ressupensas na proporção de 1:10 (m/v) em solução salina isotônica [NaCl a 0,85% (m/v)] em água ultrapura (Sistema Direct-Q 3 UV, Merck Millipore, Billerica, EUA) contendo ácido acético a 0,1% (v/v). Folhas de *T. hystrix* foram lavadas, trituradas e ressupensas em solução salina acidificada (descrita acima). Após 16 horas de incubação a 4ºC, o material foi filtrado em papel filtro qualitativo (J. Prolab, São José dos Pinhais, Brasil) e centrifugado a 2.500 × *g*, durante uma hora, a 4ºC, sendo posteriormente filtrado em membrana Durapore (HVLP04700 de 0,45µm, Merck Millipore).

3.2 Determinação de atividade hemaglutinante

3.2.1 Eritrócitos

Eritrócitos humanos dos tipos A, B e O foram obtidos de amostras sanguíneas de voluntários sadios do laboratório de Imunologia da FFCLRP-USP, cuja coleta foi feita com seringas contendo heparina sódica (Hemofol, Cristália, Itapira, SP) na concentração de 20U/mL de sangue. Os eritrócitos foram lavados três vezes, por centrifugação, com solução salina isotônica tamponada com fosfato de sódio a 10mM, pH 7,2 (PBS) e ressuspensos na concentração final de 2%.

3.2.2 Hemaglutinação

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo em "U" (BD, Franklin Lakes, EUA), incubando-se 50µL de amostra teste com 25µL de suspensão de eritrócitos humano a 2%, sendo a leitura realizada após 1 hora de incubação, à temperatura ambiente. Para a determinação da concentração hemaglutinante mínima, a amostra foi submetida às diluições duplo-seriadas em PBS e as reações inspecionadas visualmente para a avaliação da presença de atividade hemaglutinante. Controle negativo foi constituído de 50µL de PBS e 25µL de suspensão eritrócitos humanos. A diluição anterior à concentração hemaglutinante mínima foi usada nos ensaios de inibição

de hemaglutinação. Para tanto, 25µL de amostra obtida de *T. hystrix* foram incubados com 25µL de solução de possíveis inibidores de hemaglutinação, em diluições duplo-seriadas. Foram testados alguns epímeros de monossacarídeos comuns como D-galactose, D-manose e D-glicose, na concentração inicial de 0,4M, e as glicoproteínas fetuína e assialofetuína (1mg/mL). Às amostras foram adicionados 25µL de suspensão de eritrócitos humanos a 2% em PBS.

3.3 Purificação da hemaglutinina de *T. hystrix*

Para isolamento da hemaglutinina presente no extrato bruto de *T. histryx* foram usados os seguintes métodos: precipitação com solução saturada de sulfato de amônio e/ou cromatografia líquida.

3.3.1 Precipitação com sulfato de amônio

Ao extrato do súber de *T. hystrix* foi adicionado sulfato de amônio (Labsynth, Diadema, Brasil) lentamente para uma concentração final de 30%, sendo a massa determinada com o programa da *Encor Biotechnology* (disponível em <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>). O processo foi realizado à temperatura ambiente, sob agitação constante. Após agitação por 4 horas, o material foi centrifugado por 20 minutos, a 12.000 × *g*, a 4ºC, permitindo a separação do sobrenadante e do precipitado. O precipitado ressuspenso em água ultrapura (Merck Millipore), na razão de 1:5, com posterior dessalinização em cartuchos empacotados com octadecil silano (Sep-Pak C18, Waters Co., Milford, EUA) e estocagem a 4ºC. O sobrenadante foi submetido a precipitação sequencial com sulfato de amônio na concentração final de 60 e 90%, conforme descrito acima para precipitação a 30%.

3.3.2 Cromatografia líquida

Dentre os procedimentos de cromatografia líquida, foram usados métodos convencionais, realizados manualmente e com fluxo dependente da ação da gravidade ou do uso de seringa, e automatizados, em um equipamento *Äkta Purifier* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Todas as cromatografias foram realizadas à temperatura ambiente.

3.3.2.1 Cromatografia convencional

a) Dessalinização em cartuchos Sep-Pak C18

As dessalinizações de amostras obtidas ao longo dos processos de isolamento da aglutinina presente no extrato bruto do súber de *T. hystrix* foram feitas em cartuchos Sep-Pak C18 (Waters Co.). Após a reciclagem da coluna com acetonitrila absoluta, essa foi equilibrada com 3mL de ácido trifluoracético (TFA) a 0,1% (v/v) em água ultrapura (Merck Millipore). À amostra foi adicionado TFA para uma concentração final de 0,1%. Após aplicação da amostra, retirou-se o material não adsorvido à coluna com 3,5mL de TFA a 0,1%, com subsequente lavagem com 4mL de água ultrapura (Merck Millipore). O material adsorvido à coluna foi eluído com 2mL de metanol absoluto e seco em uma centrífuga à vacuo Hetovac VR-1 (Heto Lab Equipment, Birkerød, Dinamarca). Todos os procedimentos foram realizados manualmente com o auxílio de uma seringa.

b) Cromatografia em coluna de quitina

Quitina (Sigma Chemical Co.) foi empacotada em uma coluna PD-10 vazia (Empty Disposible PD10 column, GE Healthcare), lavada com 3 ciclos de passagem alternada do tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,5, e acetato de sódio 0,1M, pH 3,5. Em cada ciclo foram usados 10 volumes de coluna de cada tampão. Após o equilíbrio da resina com solução salina isotônica, esta foi ressuspensa na proporção de 2 volumes de coluna em tampão de equilíbrio e incubada com 100mL da amostra do extrato bruto do súber de *T. hystrix*, à temperatura ambiente, sob agitação. Após uma hora de incubação, resina e amostra foram vertidas na mesma coluna descrita acima. Para retirada do material não adsorvido, a coluna foi lavada com 25mL de solução salina isotônica, sendo o material adsorvido eluído com 10mL de tampão de equilíbrio acrescido de glicose a 0,4M. A coluna foi lavada novamente com tampão de equilíbrio, sendo o restante do material adsorvido eluído com 10mL de ácido acético a 0,1M em água. O material eluído foi coletado em tubos cônicos de polipropileno (17x120mm) estéreis (BD Bioscience) em frações com volumes finais de 2mL, sendo posteriormente agrupadas, dialisadas contra água em membranas com *cut-off* de 10kDa (Amicon Ultra-4, Merck Millipore) e submetidas à secagem em uma centrífuga à vacuo Hetovac VR-1 (Heto Lab Equipment).

3.3.2.2 Cromatografia automatizada

Nas cromatografias de baixa pressão, foram utilizadas as colunas de troca catiônica HiTrap SP FF, interação hidrofóbica HiTrap Octyl FF ou afinidade HiTrap Blue HP, todas da GE Healthcare, contendo 1mL de volume leito. As colunas foram lavadas com 10 volumes de coluna de água ultrapura (Merck Millipore) para retirada do tampão de armazenagem e, em seguida, lavadas com tampão de equilíbrio (solução A, Tabela 4) com o mesmo volume descrito acima. Após a aplicação das amostras, num volume que variou de 1 a 5mL, os materiais não adsorvidos foram retirados com 10 volumes de coluna da solução A (Tabela 4). Os materiais adsorvidos às colunas HiTrap SP FF e HiTrap Blue HP foram eluídos com um gradiente de força iônica crescente – de 0 (solução A) a 1M de NaCl (solução B). Já eluição na coluna HiTrap Octyl FF foi feita com gradiente decrescente, variando de 1,7 M de sulfato de amônio (solução A) até não haver mais sal (solução B).

Tabela 4. Colunas e tampões para cromatografia de baixa pressão em sistema *ÄKTA Purifier*.

Colunas	Tampão A	Tampão B
HiTrap SP FF	Acetato de sódio a 20mM, pH 4,0	Tampão A contendo 1M de NaCl
HiTrap Octyl FF	Sulfato de amônio a 1,7M, pH 5,2	Água
HiTrap Blue HP	Tris-HCl a 20mM, pH 7,2	Tampão A contendo 1M de NaCl

Nas cromatografias de alta eficiência, as amostras do extrato bruto do súber de *T. hystrix* foram aplicadas à coluna EC Nucleosil C18 (Macherey Nagel GmbH & Co, Dueren, Alemanha). A coluna foi regenerada previamente com 10mL de acetonitrila pura e equilibrada com 10mL de TFA a 0,1% em água ultrapura contendo 5% de acetonitrila. À amostra foi adicionado TFA para uma concentração final de 0,1%. O material não adsorvido à coluna foi retirado com 50mL de tampão de equilíbrio e o material adsorvido eluído com gradiente de 5 a 85% de acetonitrila.

Todas as cromatografias automatizadas foram realizadas com um fluxo de 1mL.min^{-1} e monitoradas por absorbância a 280nm. Foram coletados os picos com densidade óptica (DO) maior que 0,01 unidade de absorbância (AU).

Quando necessário, as amostras obtidas dos processos cromatográficos foram dessalinizadas em coluna Sep-Pak C18. Nesse caso e no das frações obtidas da fase reversa,

as amostras coletadas, foram secas em uma centrífuga à vacuo Hetovac VR-1 (Heto Lab Equipment) e ressuspensas em água ultrapura.

Para análise dos materiais obtidos nos procedimentos de isolamento da hemaglutina, foram feitas a dosagem da concentração proteica (método de Bradford), determinação de atividade hemaglutinante e em eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições dissociantes (SDS-PAGE).

3.4 Análise eletroforética

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida a 15% sob condições dissociantes (SDS-PAGE) em sistema *Mini Protean Tetra* (Bio-Rad, Hercules, EUA) (LAEMMLI, 1970). As amostras foram ressuspensas em tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl a 0,25M, pH 6,8, contendo azul de bromofenol a 0,05%%, glicerol a 50%, SDS a 10% e 2-β-mercaptoetanol a 5%), incubadas em água fervente (banho-maria) por 5 minutos, e aplicadas no gel. As corridas eletroforéticas tiveram duração de 1 hora, a 200V, sendo os géis corados pelo método da prata (BLUM *et al*., 1987) ou com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA). Como padrão de migração das proteínas foram usados proteínas e peptídeos com massas moleculares conhecidas (MM), sendo eles provenientes do *LMW-Marker kit* [fosforilase b (97kDa), albumina sérica bovina (66kDa), albumina de ovo de galinha (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa), α-lactoalbumina (14,4kDa), GE Healthcare] e *Natural Polypeptide* SDS-PAGE *Standards* [isomerase triosefosfato (26,6kDa), mioglobina (16,9kDa), α-lactoalbumina (14,4kDa), aprotinina (6,5kDa), cadeia beta oxidada da insulina (3,4kDa) e bacitracina (1,4kDa), Bio-Rad].

3.5 Quantificação proteica

As concentrações proteicas das amostras foram determinadas pelo método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent (Bio-Rad) e albumina sérica bovina (BSA) a 2mg/mL (Quick Start Bovine Serum Albumin Standard; Bio-Rad), conforme instruções do fabricante.

3.6 Análise de complexos multiproteicos

A presença de complexos multiproteicos em extratos de *T. hystrix* foi determinada por uma eletroforese bidimensional, sendo a primeira dimensão uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condição não desnaturante (nativa) usando a incorporação de azul de dextrana (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis* – BN-PAGE), conforme a descrição de SWAMY *et al*., 2006, com algumas modificações, e a segunda dimensão uma SDS-PAGE. Para a primeira dimensão, amostras contendo a aglutinina de *T. hystrix* foram ressupensas em tampão de amostra sem SDS e submetidas à BN-PAGE a 10%. A corrida foi realizada com tampão Tris-HCl a 25mM, pH 8,3, que continha glicina a 192mM. Ao tampão do cátodo da cuba foi adicionado 0,02% de Coomassie Blue G-250 (Sigma Chemical Co.). A eletroforese foi realizada em Sistema *Mini Protean Tetra* (Bio-Rad). Para a segunda dimensão, após a corrida da amostra em BN-PAGE, a raia contendo a amostra separada foi recortada, incubada em tampão de amostra (contendo SDS) por 10 minutos, incubadas em água fervente (banho maria) por 20 segundos e submetida à SDS-PAGE a 10%. Inicialmente, as corridas foram realizadas a 100V até a entrada das amostras nos géis, sendo posteriormente, aumentada a voltagem para 150V, durante 1 hora. Os géis foram descorados com solução de ácido acético a 10% em água ultrapura (Merck Millipore).

3.7 Ensaio de atividade antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado por meio da técnica de difusão no ágar (adaptado de Schlumbaum *et al*., 1986). Micélios do fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* foram espalhados, de maneira homogênea, em meio sólido *Saboraud*, sendo posteriormente adicionada, em poços de 2mm a 5mm de diâmetro, concentrações de 5 a 75µg da aglutinina do súber de *T. hystrix* purificada em coluna de quitina. A cultura foi incubada por 7 dias, a 28ºC, e a atividade antifúngica determinada pela presença de halo sem crescimento fúngico em volta dos poços contendo as amostras testadas.

3.8 Identificação da aglutinina de *T. hystrix*

As bandas de aproximadamente 3kDa, coradas com azul de Coomassie (figura 15 – raia 5 e figura 17 – raia 3) foram recortadas e submetidas à identificação por espectrometria

de massa (*Electrospray Ionization Ion Trap Mass Spectrometry*), em *Fingerprints Proteomics Facility*, Universidade de Dundee, Escócia.

3.9 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, de 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), Câmpus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, em microisoladores. A manutenção e todos os procedimentos realizados com os animais estavam de acordo com os preceitos éticos definidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Prefeitura do Câmpus Ribeirão Preto da USP, protocolo nº 13.1.996.53.4.

3.10 Coleta e obtenção de células do baço

Para a realização de experimentos *in vitro*, os animais foram mortos por deslocamento cervical. Os baços foram assepticamente coletados e colocados em placas de Petri estéreis de 22mm de diâmetro (Corining, Nova York, EUA) contendo 2mL de meio RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Com o auxílio de pinças estéreis, o baço foi divulsionado para obtenção de uma suspensão celular homogênea. Os eritrócitos foram lisados pela incubação com 3mL de tampão de lise Ack (NH_4Cl a 150mM, $KHCO_3$ a 10mM e EDTA a 1mM, pH 7,3), durante 5 minutos, a 4ºC e neutralizados com 10mL de PBS. As células foram ressuspensas em 1mL de RPMI 1640 suplementado contendo 10% de soro fetal bovino (SBF) (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 100U/mL de penicilina/estreptomicina e 10µg/mL de gentamicina (RPMI 1640 completo), sendo a concentração de células determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.11 Estimulação *in vitro* de células esplênicas com Tabhys

3.11.1 Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE

Células esplênicas de camundongos, na concentração de 10^6 células/mL, foram ressuspensas em 110µL de PBS estéril livre de endotoxinas, e marcadas com CFSE em

concentração final de 1,25µM. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e, então, às células foram adicionados 10mL de SBF, a aproximadamente 10% do volume total, para interrupção do processo de marcação. As células foram lavadas duas vezes, por centrifugação 300 × *g* com PBS estéril livre de endotoxinas, a 4ºC, durante 10 minutos e ressupensas em meio RPMI 1640 completo. Aproximadamente 10^6 células foram adicionadas a cada poço de placas de 48 poços, e incubadas a 37ºC, em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% de CO_2. As culturas foram feitas na ausência de estímulos, em presença de diferentes concentrações da aglutinina de *T. hystrix* e em presença dos mitógenos de células B (LPS a 25µg/mL) e T (ConA a 2µg/mL). Após por 72 horas de incubação, as células foram analisadas por citometria de fluxo, dentro da na população de linfócitos, determinada por parâmetros de tamanho e granularidade (FSC × SSC). A proliferação foi avaliada pela diminuição da fluorescência emitida pelo CFSE em células marcadas que sofreram proliferação.

3.11.2 Citometria de fluxo

As populações de células esplênicas de camundongos foram caracterizadas em relação à expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Cerca de 10^6 células/mL foram distribuídas em tubos para citometria em volume final de 100µL e incubadas durante 45 minutos, a 4ºC, com anticorpo contra CD16/CD32 (receptores de Fc) de camundongo (Fc Block; BD Bioscience, Franklin Lakes, EUA). Após o bloqueio dos receptores de Fc, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse (0,5 a 0,75µg de anticorpo/10^6 células), durante 30 minutos, a 4ºC, no escuro, sendo esses contra CD3, marcado com aloficocianina-cianina 7 (APC-Cy 7) e CD19, marcado com aloficocianina (APC). Posteriormente, as células foram lavadas com 2mL de tampão FACS (PBS contendo SBF a 2%) por centrifugação, a 300 × *g*, a 4ºC, durante 10 minutos, para interrupção do processo de marcação, e ressuspensas em 200µL de PBS.

As preparações celulares foram adquiridas no citômetro FACSCanto™ II (BD Bioscience). Foram adquiridos de 10.000 a 100.000 eventos por tubo. As células foram selecionadas pelo programa FACSDiva 6.1 (BD Bioscience) de acordo com parâmetros de tamanho (FSC- *Foward Scatter*), granularidade (SSC-*Side Scatter*) e intensidade de fluorescência de anticorpos. As análises dos parâmetros descritos acima foram realizadas pelo programa FlowJo versão 8.7.

3.11.3 Quantificação de mensagem de citocinas por reação em cadeia da polimerase em tempo real dos transcritos reversos (qRT-PCR).

3.11.3.1 Obtenção do RNA total de células do baço de camundongos

A extração do RNA total de células esplênicas de camundongos em cultura foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol (Life Technologies), segundo instruções do fabricante. Essas células foram cultivadas conforme descrito no item 3.11.1. A cada 10^6 células foi adicionado 1mL de TRIzol para lise e completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Os lisados foram transferidos para tubos de 1,5mL, sendo adicionados 200µL de clorofórmio para cada 1mL de suspensão. Os tubos foram centrifugados a 12.000 × *g*, por 15 minutos, a 4ºC, e a fase aquosa transferida para outros tubos. A estes foram adicionados 500µL de isopropanol, sendo a solução mantida a -70 ºC, por 16 horas. Após esse período, o RNA total foi precipitado por centrifugação a 12.000 × *g*, por 30 minutos, a 4ºC, lavado duas vezes com 1mL de etanol 75% gelado e ressuspenso em água DEPC (água estéril livre de nucleases pelo tratamento com dimetil pirocarbonato e autoclavagem). O RNA total extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, EUA) e sua integridade avaliada em gel de agarose a 1,5%. A leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 260nm, 280nm e 230nm para obtenção da concentração de RNA/µL e análise de possíveis contaminantes por fenol ou proteínas.

Posteriormente, 1µg do RNA foi submetido ao tratamento com 1 unidade da enzima *Amplification grade* DNase I (1U/µL) (Life Technologies) na presença de tampão contendo Tris-HCl a 20mM, pH 8,4, KCl a 50mM e $MgCl_2$ a 2mM para a remoção de DNA contaminante. A reação foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente, seguida da adição de 1µL de EDTA a 25mM e incubada por mais 10 minutos, a 65ºC para inativação da enzima.

3.11.3.2 Síntese de cDNA fita simples

Amostra de 1µg de RNA total, isolado como descrito acima, foi utilizada para a síntese de cDNA fita simples com a enzima *SuperScript II* (Life Technologies). Para cada 1µg de RNA total foram adicionados 1µL do iniciador Oligo(dT)12-18 [500µg/mL] (Life Technologies), 1µL de dNTP (desoxirribonucleotídeos trifosfatados – 0,1M de *dNTPSet, PCR Grade*) e 17µL de água DEPC, sendo a reação incubada a 70ºC, por 10 minutos. Em seguida, à reação foram adicionados os seguintes reagentes: 4µL de tampão da enzima contendo Tris-HCl a 250mM, pH 8,3, KCl a 375mM, $MgCl_2$ a 15mM (*FirstStrand Buffer*-Life Technologies) e 2µL de DTT a 0,1M. O

material foi equilibrado a 42ºC, por 2 minutos, e incubados com 1µL (200U) da transcriptase reversa *SuperScript II*, durante 60 minutos nesta mesma temperatura. A reação foi inativada pela incubação da amostra a 70ºC, por 15 minutos. A concentração de cDNA fita simples foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

3.11.3.3 qRT-PCR

Foram utilizados 200ng de cDNA de fita simples (sintetizado conforme descrito no item acima) como molde para amplificação dos alvos específicos. Cada reação foi realizada com 1µL de cada par de iniciadores a 10µM (Tabela 5), 1µL da amostra de cDNA, 12,5µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Invitrogen) e 9,5µL de água DEPC estéril. As reações foram incubadas no aparelho CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e as análises realizadas pelo CFX Manager™ Software (Bio-Rad). Os parâmetros utilizados foram: aquecimento a 95ºC, por 3 minutos, desnaturação a 95ºC, por 30 segundos, seguido de 40 ciclos de amplificação e ao final, 72ºC, por 30 segundos. Cada ciclo consistiu de 30 segundos a 95ºC para a desnaturação do DNA, 30 segundos em temperaturas que variaram de 56 a 58ºC (Tabela 5) para anelamento dos iniciadores e 30 segundos a 72ºC para síntese do DNA (extensão). Como controle de integridade das amostras e normalização dos dados, foi usada a amplificação da β-actina, segundo a metodologia desenvolvida por Livak e Schmittgen (2001).

Tabela 5. Moléculas, temperatura de anelamento e sequência dos iniciadores diretos e reversos utilizados nas reações de qRT-PCR.

Iniciadores[1]	Temperatura de anelamento	Sequência
β-actina	58ºC	F[2]: 5'-AGC TGC GTT TTA ACC CCT TT-3' R[3]: 5'-AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT-3'
TNF-α	56ºC	F: 5'-TGT GCT CAG AGC TTT CAA CAA-3' R: 5'-CTT GAT GGT GGT GCA TGA GA-3'
IL-6	56ºC	F: 5'-CGG CAA ACC TAG TGC GTT AT-3' R: 5'-TCT GAC CAC AGT GAG GAA TGT C-3'
IL-10	58ºC	F: 5'-TGG ACA ACA TAC TGC TAA CCG-3' R: 5'-GGA TCA TTT CCG ATA AGG CT-3'
TGF-β	58ºC	F: 5'-GCT GAA CCA AGG AGA CGG AAT-3' R: 5'-GCT GAT CCC GTT GAT TTC CA-3'
GATA-3	58ºC	F: 5'-AGG AGT CTC CAA GTG TGC GAA-3' R: 5'-TTG GAA TGC AGA CAC CAC CT-3'

[1]Iniciadores específicos para sequências dos genes das citocinas.
[2]Iniciadores diretos (*forward* ou *sense*).
[3]Iniciadores reversos (*reverse* ou *anti-sense*).

3.12 Análise estatística

A determinação estatística das diferenças entre médias dos grupos experimentais foi feita por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. Todos os experimentos foram realizados ao menos duas vezes.

4 RESULTADOS

4.1 Extrato do súber, mas não da folha e do caule de *T. hystrix*, apresenta atividade hemaglutinante

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que as preparações do extrato bruto do súber e do látex de *T. hystrix* apresentavam atividade hemaglutinante. No entanto, dado a formação de contaminantes particulados do látex e a sua baixa disponibilidade, tornando difícil o seu manuseio e obtenção, em um curto período de tempo, a opção pela preparação do súber do caule de *T. hystrix* tornou-se menos dispendiosa e mais acessível, sendo este o material escolhido para os estudos posteriores de caracterização e identificação da possível aglutinina de *T. hystrix*. Na tentativa de identificar a localização da aglutinina em outros tecidos da planta, foram realizados ensaios de hemaglutinação com os extratos brutos do súber, caule (desprovido de súber) e da folha de *T. hystrix*. Como demonstrado na figura 3, a atividade hemaglutinante foi observada apenas no extrato de súber do caule, reforçando ainda mais a opção pelo uso desse extrato nos estudos posteriores de identificação da aglutinina de *T. hystrix*.

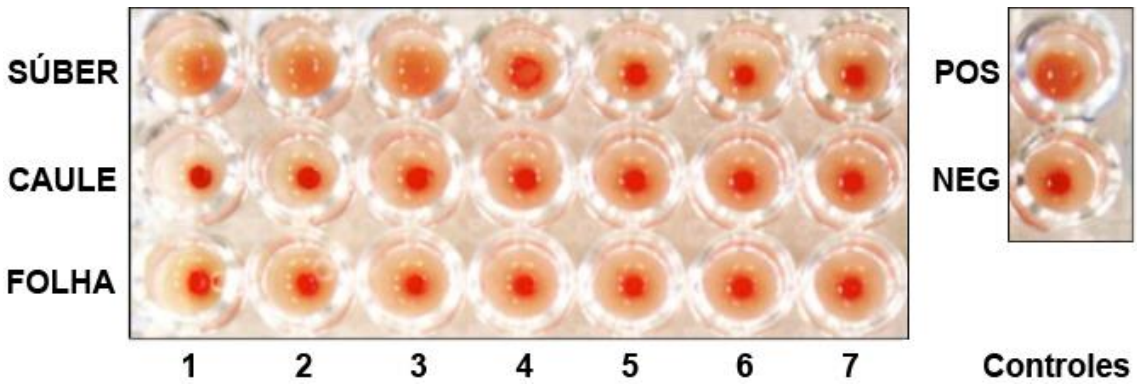

Figura 3: Ensaio de hemaglutinação dos extratos brutos do súber, do caule e da folha de *T. hystrix* realizado em microplacas de 96 poços. Poços **2** ao **7** - diluições seriadas (base 2) dos respectivos extratos em ordem crescente (1:2 até 1:64). Poço **1** - extratos brutos sem diluições. No controle positivo foi adicionado ConA a 2µg/mL e no controle negativo apenas solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada apenas no extrato bruto do súber de *T. hystrix* até a diluição 1:8.

4.2 A aglutinina do súber de *T. hystrix* é inibida pela glicoproteína fetuína.

Na tentativa de investigar se a atividade aglutinante presente no extrato bruto de súber de *T. hystrix* era proveniente de interação proteína-carboidrato, assim como analisar a especificidade dessa aglutinina, em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, foram feitos teste

de inibição da hemaglutinação. Os resultados obtidos demonstraram que a atividade hemaglutinante de *T. hystrix* foi inibida pelas glicoproteínas fetuína e peroxidase, mas não por diferentes tipos de carboidratos, como monossacarídeos, dissacarídeos e quelantes de cátions metálicos bivalentes. Para confirmação desses dados, foi feito um novo ensaio de inibição da hemaglutinação com os monossacarídeos D-glicose, D-galactose e D-manose nas concentrações iniciais de 400mM e com a glicoproteína fetuína em sua forma nativa e assialilada. Nenhuma inibição foi observada com os monossacarídeos descritos acima (Figura 4A), enquanto que a fetuína (dados não demonstrados) e a asialofetuína foram capazes de inibir a hemaglutinação na concentração de 1µg/mL (Figura 4B). Esses resultados, além de confirmaram os dados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, sugerem que a hemaglutinina de *T. hystrix* possui especificidade por oligossacarídeos, sendo essa especificidade, independente de ácido siálico.

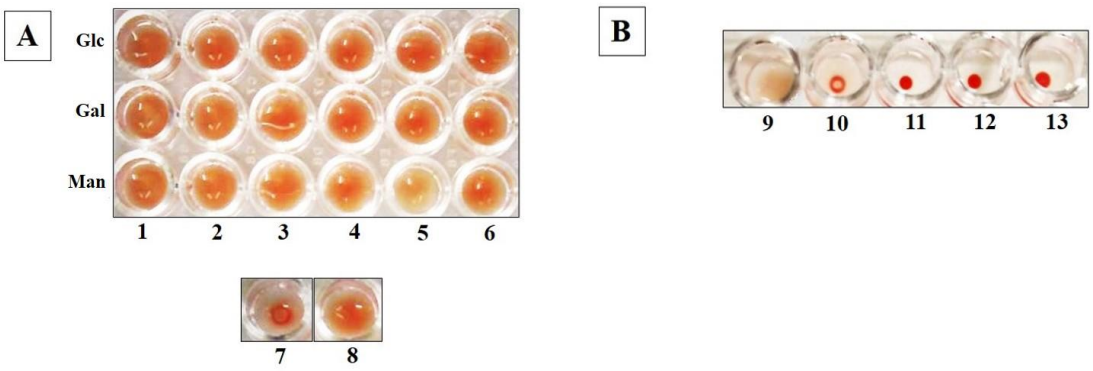

Figura 4: Ensaio de inibição da hemaglutinação do extrato bruto do súber de *T. hystrix* realizado em microplacas de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 25µL do extrato bruto de *T. hystrix* acrescido de 25µL de uma solução contendo um dos respectivos carboidratos, indicados nas fotos **(A)** nas concentrações iniciais de 400mM (poço **1**) e em diluições seriadas (base 2) de 1:2 a 1:32 (poços de **2** a **6**, respectivamente). Poço **7 e 8** – solução salina isotônica e 50µL do extrato bruto de *T. hystrix* sem a presença de carboidratos, respectivamente. (**B**) 50µL do extrato bruto de *T. hystrix* (**11**) em diluições seriadas (base 2) de 1:2 a 1:4 (poços **12** e **13,** respectivamente) na presença de asialofetuína a 1µg/mL. Poço **9** - extrato bruto de *T. hystrix* sem a presença de asialofetuína. Poço **10** – solução salina isotônica. A inibição da hemaglutinação foi observada apenas nos poços de **11** ao **13**.

4.3 O extrato bruto do súber de *T. hystrix* apresenta baixo conteúdo proteico.

A presença de atividade hemaglutinante no extrato bruto de *T. hystrix* nos levou a analisar o conteúdo proteico deste material, assim como submetê-lo à análise eletroforética (SDS-PAGE a 15%) para detecção da presença de possíveis bandas proteicas proeminentes que pudessem nos dar algum indício da massa molecular da aglutinina presente neste extrato. Pela análise do conteúdo proteico, por meio do método de Bradford, observamos que o extrato do súber de *T. hystrix* possuía baixo conteúdo proteico (aproximadamente 400µg de proteína/mL de amostra), sendo a

concentração mínima responsável pela atividade hemaglutinante correspondente a apenas 12,5% do total de proteínas presentes neste material, cerca de 50µg. No gel, observamos a presença de proteínas com massas moleculares (MM) de 20kDa e acima e/ou próximas de 30kDa e de dois peptídeos com MM aproximadamente de 3kDa e 7kDa (Figura 5).

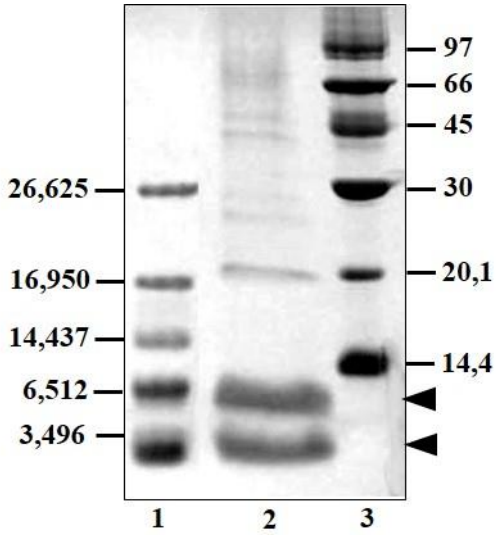

Figura 5: SDS-PAGE do extrato bruto de súber de *T. hystrix*. Raspas de súber do caule de *T. hystrix* foram lavados e triturados até a obtenção de farinha. Após a ressuspensão na proporção de 1:10 em água ultrapura (Merck Millipore) contendo cloreto de sódio 0,85% (m/v) e ácido acético a 0,1% (v/v), este material foi decantado, por uma noite, a 4ºC, centrifugado e filtrado. O material filtrado foi analisado por SDS-PAGE a 15% (raia **2**). O gel foi corado com azul de Coomassie. As migrações eletroforéticas de proteínas com massas moleculares conhecidas (raias **1 e 3**) estão indicadas na figura (expressa em kDa). As setas indicam dois peptídeos com massas moleculares de aproximadamente 3kDa e 7kDa.

4.4 O extrato bruto de *T. hystrix* apresenta proteínas de baixa e alta massas moleculares com possível atividade hemaglutinante.

Após a detecção de atividade hemaglutinante no extrato bruto do súber de *T. hystrix*, assim como a análise do seu conteúdo proteico, iniciamos o isolamento da aglutinina de *T. hystrix*. A fim de aumentarmos a concentração do total de proteínas presentes no extrato, iniciamos pelo fracionamento deste material por precipitação com sulfato de amônio a 30% e nas faixas de 30 a 60% e 60 a 90% de saturação. Quando os precipitados ressuspensos em água e dessalinizados foram submetidos à hemaglutinação, observou-se que a atividade hemaglutinante fora recuperada nos materiais precipitados com sulfato de amônio nas faixas de 30 a 60% e 60 a 90% de saturação – até 1:16 e 1:2, respectivamente (Figura 6). SDS-PAGE a 15% revelou a presença de um peptídeo de migração eletroforética de aproximadamente 3kDa e de uma proteína com alta massa molecular (acima de 97kDa) na

fração precipitada com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação (Figura 7). Visto que este material possuía maior atividade hemaglutinante (até 1:16), quando comparado com aquele precipitado com sulfato de amônio na faixa de 60 a 90% de saturação (até 1:2), resolvemos utilizá-lo nas próximas etapas de purificações da aglutinina de *T. hystrix*.

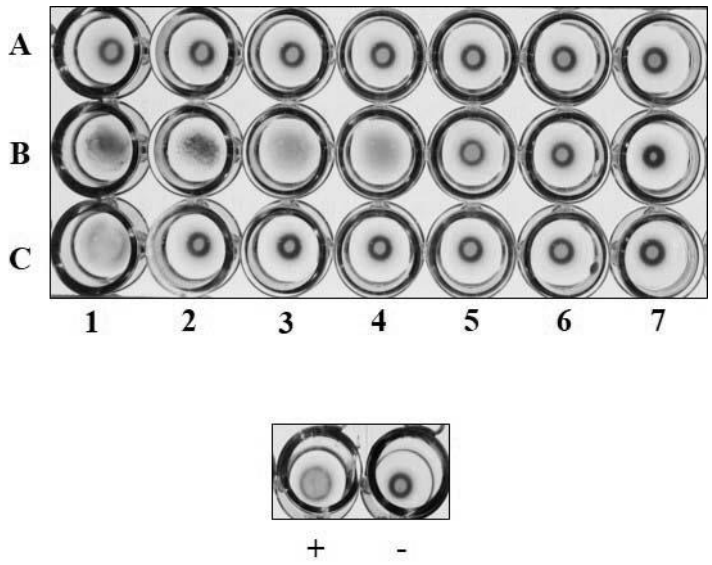

Figura 6: Hemaglutinina de *T. hystrix* é recuperada, principalmente, da amostra obtida por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60%. Amostras obtidas por precipitação do extrato bruto de súber de *T. hystrix* com sulfato de amônio a 30% (**A**) e nas faixas de 30 a 60% (**B**) e 60 a 90% (**C**) de saturação foram submetidas ao ensaio de hemaglutinação. Poços **1** ao **7** - Diluições seriadas de base 2 (1:2 a 1:128, respectivamente) de cada precipitado. (+) Controle positivo – 2µg/mL de ConA. (–) Controle negativo – solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada nas amostras precipitadas com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% (**B**) e 60 a 90% (**C**) de saturação, até 1:16 e 1:2, respectivamente.

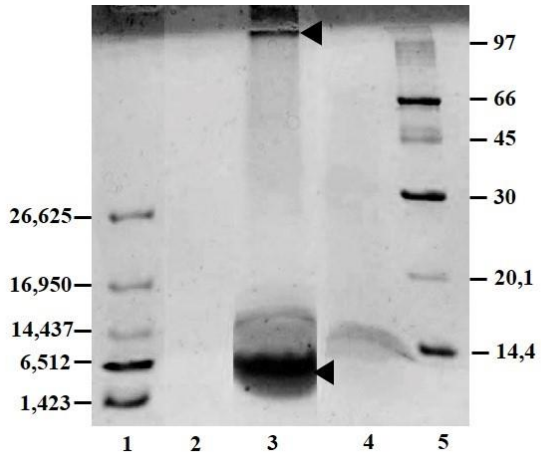

Figura 7: Amostra do extrato bruto de *T. hystrix* precipitado com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% apresenta proteínas de baixa e alta massas moleculares. O extrato bruto de súber de *T. hystrix* foi submetido ao fracionamento com sulfato de amônio a 30% (raia **2**) e nas faixas de 30 a 60% (raia **3**) e 60 a 90% (raia **4**) de saturação. A cada etapa de fracionamento, sobrenadante e precipitado foram separados por centrifugação. Os precipitados foram analisados em SDS-PAGE a 15%. Raia **1** e **5**: migrações eletroforéticas de proteínas com massas moleculares conhecidas expressas em kDa. O gel foi corado com azul de Coomassie. As setas indicam as migrações eletroforéticas de um peptídeo de aproximadamente 3kDa e uma proteína que praticamente não entrou no gel.

4.5 Extrato bruto de súber de *T. hystrix* apresenta peptídeos de aproximadamente 3kDa e 7kDa com possível atividade hemaglutinante.

Submeteu-se 1mL da fração precipitada do extrato bruto de *T. hystrix* com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna HiTrap Octyl FF (GE Healthcare). Durante a eluição do material com gradiente decrescente de 100% a 0% de sulfato de amônio, obtivemos 2 picos de absorbância a 280nm sem nenhuma atividade hemaglutinante (dados não mostrados). De fato, a atividade foi recuperada na amostra não adsorvida à coluna, até a diluição de 1:4 (Figura 8). Com o intuito de investigarmos as características eletroforéticas desse material, as frações não adsorvidas e adsorvidas à coluna HiTrap Octyl FF (pico 1 e pico 2) foram submetidas à SDS-PAGE a 15% (Figura 9). Observamos que a fração não adsorvida à resina Sepharose Octyl possuía uma banda de baixa massa molecular (aproximadamente 3kDa) e uma banda de alta massa molecular (acima de 97kDa) (Figura 9). É importante ressaltar que a banda de alta massa molecular também estava presente na fração adsorvida à coluna HiTrap Octyl FF (pico 1), a qual não apresentou atividade hemaglutinante. Os resultados da eletroferese sugerem que a aglutinina de *T. hystrix* poderia corresponder ao peptídeo de aproximadamente 3kDa.

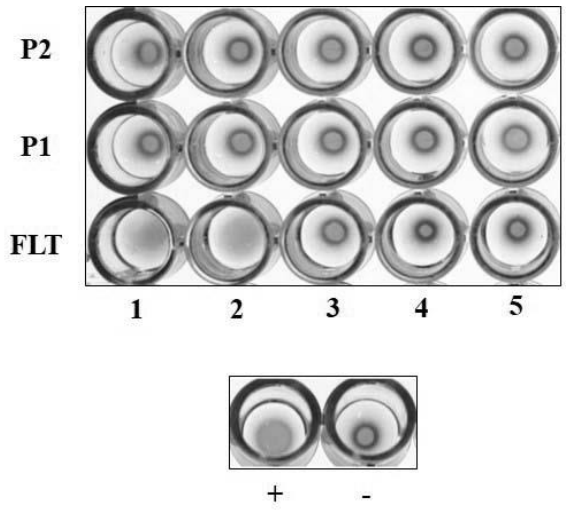

Figura 8: Ensaio de hemaglutinação das frações adsorvidas e não adsorvidas à coluna HiTrap Octyl FF. O precipitado do extrato bruto de súber de *T. hystrix*, após o fracionamento com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação, foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna HiTrap Octyl FF. As frações não adsorvidas e adsorvidas à coluna foram testadas em ensaio de hemaglutinação realizado em microplacas de 96 poços. **FLT (*flowthrough*)**: fração não adsorvida à coluna. **P1 e P2**: frações adsorvidas à coluna referentes ao pico 1 e pico2 obtidos no cromatograma a 280nm, respectivamente. Poços **1** a **5**: diluições seriadas (base 2) de cada amostra (1:2 a 1:32, respectivamente). (+) Controle positivo – 2µg/mL de ConA. (–) Controle negativo – solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada na fração não adsorvida à coluna (FLT) até 1:4.

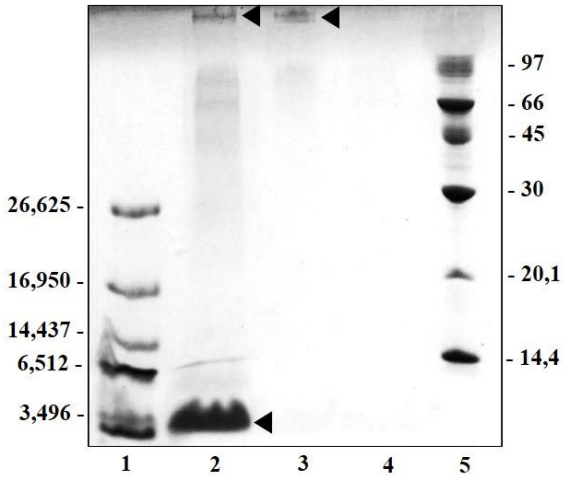

Figura 9: Análise eletroforética do material obtido do processo de isolamento de aglutina do extrato de súber de *T. hystrix* por cromatografia de interação hidrofóbica. O extrato bruto de *T. hystrix* foi precipitado com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação e submetido à cromatografia em coluna HiTrap Octyl FF. As frações adsorvidas e não adsorvidas à coluna foram analisadas em SDS-PAGE a 15%. Raia **2**: fração não adsorvida a coluna (FLT- *flowthrough*). Raias **3** e **4**: frações adsorvidas à coluna referentes ao pico 1 e pico 2, respectivamente, em cromatógrafo *ÄKTA Purifier*. Raias **1** e **5**: migrações eletroforéticas de peptídeos e proteínas de massas moleculares conhecidas expressas na figura em kDa. O gel foi corado com azul de Coomassie. As setas indicam uma proteína de massa molecular acima de 97kDa e um peptídeo de aproximadamente 3kDa.

Diante dos resultados expostos, na tentativa de isolarmos este peptídeo de outras proteínas presentes no extrato bruto de *T. hystrix* e identificarmos a aglutinina responsável pela atividade hemaglutinante, prosseguimos com a purificação da aglutinina de *T. hystrix*. No entanto antes do início das próximas etapas de purificações, foi feita a dessalinização da fração não adsorvida à resina Sepharose Octyl (*flowthrough*), aquela que apresentou atividade hemaglutinante, em cartuchos Sep-Pak C18, uma vez que este material possuía grande quantidade sulfato de amônio. Quando esse material (4,5mL) foi submetido à cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP FF (GE Healthcare), obtive-se a eluição de 2 picos de absorbância a 280nm (Figura 10). Ao avaliar a atividade hemaglutinante dos materiais adsorvidos e não adsorvidos à coluna, observamos que a aglutinina estava presente na fração adsorvida à resina, a qual foi eluída com 1M de NaCl (Figura 11).

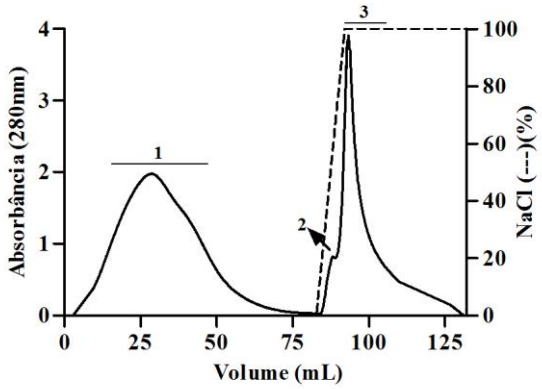

Figura 10: Cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP do material obtido pela precipitação com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% e que não foi adsorvido à coluna de HiTrap Octyl. A coluna HiTrap SP FF foi equilibrada com tampão acetato de sódio a 20mM, pH 4,0, e carregada com 4,5mL de amostra em tampão acetato de sódio a 20mM, pH 4,0. O material não adsorvido à coluna foi lavado com tampão de equilíbrio (**1**) enquanto que o material adsorvido à coluna foi eluído com um gradiente de 0 a 1M de NaCl (linha tracejada) (**2** e **3** – pico 2 e pico 3 eluídos com NaCl a 0,5M e 1M, respectivamente). A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente, sob fluxo de 1mL/min, com monitoramento pela absorbância a 280nm (linha contínua).

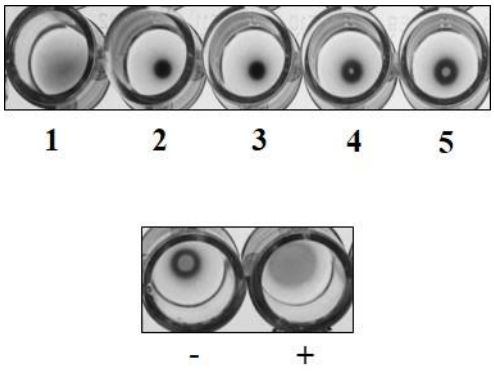

Figura 11: Ensaio de hemaglutinação da amostra purificada por cromatografia de troca catiônica. Hemaglutinina de *T. hystrix* foi purificado por cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP FF. As frações adsorvidas e não adsorvidas à coluna foram testadas em ensaio de hemaglutinação. Poços de **1** a **5**: diluições seriadas (base 2), de 1:2 a 1:32 respectivamente, da fração adsorvida à resina SP referente ao pico 3 obtido por absorbância a 280nm em cromatógrafo *ÄKTA Purifier*. (+) Controle positivo – 2µg/mL de ConA. (–) Controle negativo – solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada na diluição de 1:2 (poço **1**).

Com o propósito de identificarmos a aglutinina de *T. hystrix*, de mesmo modo avaliarmos a eficiência e o rendimento da purificação em coluna HiTrap SP FF, a amostra purificada foi analisada em SDS-PAGE a 15%. Surpreendentemente, no gel, notamos a presença de dois peptídeos de pesos moleculares de aproximadamente 3kDa e 7kDa na fração que apresentou atividade hemaglutinante (Figura 12). Importante ressaltar que esses peptídeos de massas moleculares parecidas foram observados no extrato bruto de súber de *T. hystrix* durante a análise em eletroforese (SDS-PAGE a 15%). Desta maneira, diante dos resultados expostos, sugerimos que um desses peptídeos seria a aglutinina de *T. hystrix*.

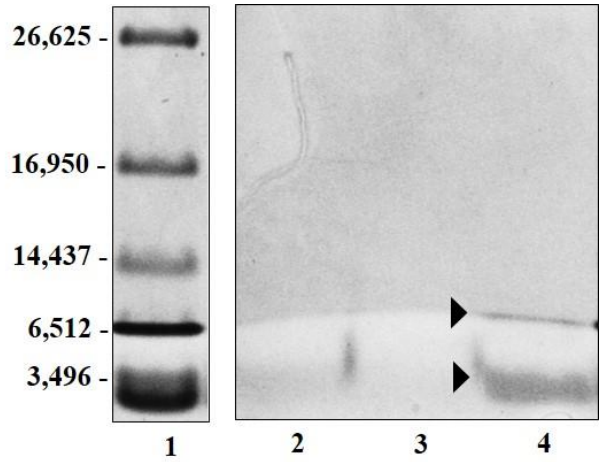

Figura 12: Peptídeos de aproximadamente 3 e 7kDa isolados por cromatografia de troca catiônica como possível hemaglutinina. O extrato bruto de súber de *T. hystrix*, após ser precipitado com sulfato de amônio e submetido à cromatografia de interação hidrofóbica, foi purificado por cromatografia de troca catiônica em coluna HiTrap SP FF. As frações adsorvidas e não adsorvidas à coluna foram analisadas em SDS-PAGE a 15%. Raia **2**: Fração não adsorvida à coluna. Raia **3** e **4**: Frações adsorvidas à coluna referentes ao pico 2 e pico 3, respectivamente. Raia **1**: migrações eletroforéticas de proteínas de massas moleculares conhecidas expressas em kDa. As setas indicam dois peptídeos de aproximadamente 3kDa e 7kDa com possíveis atividade hemaglutinante.

4.6 Peptídeo de aproximadamente 3kDa presente no extrato bruto de súber de *T. hystrix* como uma provável hemaglutinina.

Para confirmarmos a hipótese de que um dos peptídeos de aproximadamente 3 e 7kDa seria o responsável pela aglutinação de eritrócitos do extrato de *T. hystrix*, submetemos 0,5mL da fração com atividade hemaglutinante, adsorvida à coluna HiTrap SP FF e eluída com gradiente de NaCl (pico 3 da figura 10), à cromatografia de fase reversa em coluna EC Nucleosil C18. Os picos obtidos por absorbância a 280nm foram eluídos com gradiente de 5% a 85% de acetonitrila (Figura 13) e agrupados em 5 *pools*. Cada um desses *pools* foi testado em ensaio de hemaglutinação (Figura 14) e analisado em eletroforese SDS-PAGE (Figura 15). De maneira interessante, a fração que possuía atividade hemaglutinante foi eluída a 83% de acetonitrila (pico no *pool* 5), que curiosamente apresentou um peptídeo de aproximadamente 3kDa (indicado pela seta na figura 13). Dessa forma, como não foi observado a presença de outras proteínas juntamente com este peptídeo de 3kDa, concluímos que ele seria o responsável pela aglutinação de eritrócitos no extrato bruto de súber de *T. hystrix*.

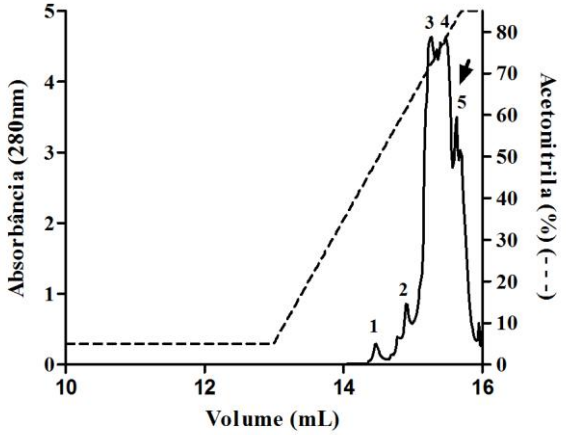

Figura 13: Cromatografia de fase reversa em coluna EC Nucleosil da amostra com atividade hemaglutinante obtida de processos de precipitação e cromatografias do extrato bruto de súber de *T. hystrix*. A coluna EC Nucleosil C18 foi regenerada com acetonitrila absoluta e equilibrada com TFA a 0,1% contendo acetonitrila a 5%. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e o material eluído em um gradiente de 5 a 85% de acetonitrila. Pico **1**: eluição com acetonitrila a 47,8%; Pico **2**: eluição com acetonitrila a 61,40%. Pico **3**: eluição com acetonitrila a 71,43%. Pico **4**: eluição com acetonitrila a 77,8% e Pico **5**: eluição com acetonitrila a 83%. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente, sob fluxo de 1mL/min, com monitoramento pela absorbância a 280nm (linha contínua). A seta indica o pico em que o peptídeo de aproximadamente 3kDa foi eluído.

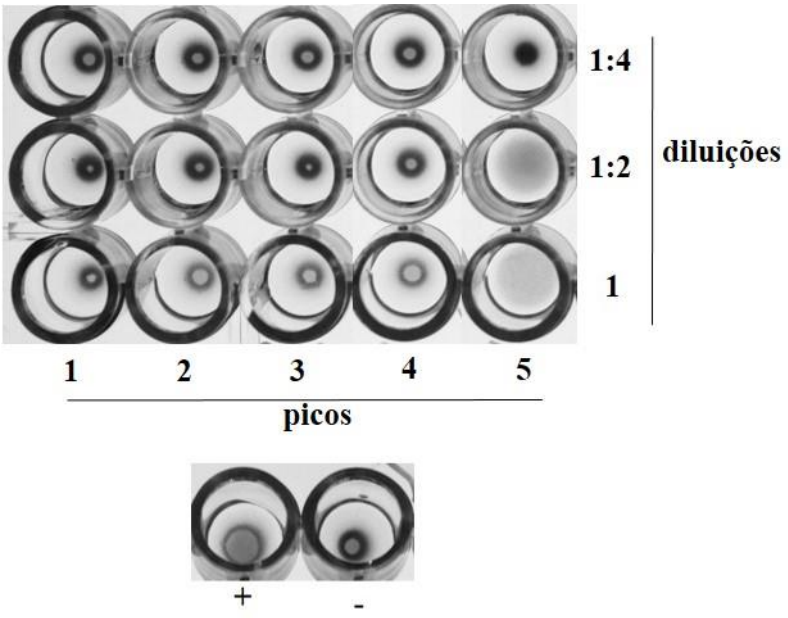

Figura 14: Ensaio de hemaglutinação da amostra purificada por cromatografia de fase reversa. Amostra com atividade hemaglutinante obtida do extrato bruto do súber de *T. hystrix* foi purificado por cromatografia em fase reversa em coluna EC Nucleosil C18. As frações adsorvidas à coluna, após serem dessalinizadas em cartuchos Sep Pak C18, foram testadas em ensaio de hemaglutinação. Os poços de (**1**) a (**5**) representam os *pools* dos picos de 1 a 5, respectivamente, obtidos a 280nm em cromatógrafo *ÄKTA Purifier*. Foram feitas diluições seriadas (base 2) de cada *pool* até 1:4. (+) Controle positivo – 2µg/mL de ConA. (**–**) Controle negativo – solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada no poço (**5**) (*pool* 5) até a diluição de 1:2.

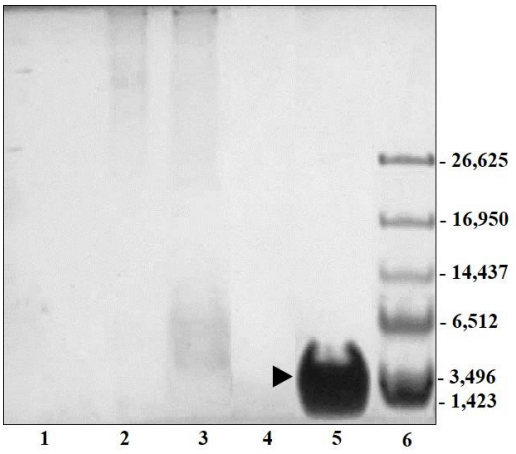

Figura 15: Amostra com atividade hemaglutinante obtida do extrato bruto de súber de *T. hystrix* apresenta peptídeo de aproximadamente 3kDa. Amostra contendo hemaglutinina, obtida do extrato bruto de súber de *T. hystrix* por precipitação com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação, cromatografia de interação hidrofóbica e troca catiônica, foi submetida à cromatografia em fase reversa, conforme mostrado na figura 13. Os cinco *pools* das frações adsorvidas à coluna e eluídas com um gradiente de 5 a 85% de acetonitrila foram submetidas à troca de tampão em cartuchos Sep-Pak C18 e analisado em SDS-PAGE a 15%. Raias **1** ao **5** refere-se aos *pools* 1 ao 5, respectivamente. A cabeça de seta indica um peptídeo, de aproximadamente 3kDa, eluído com 83% de acetonitrila e com atividade hemaglutinante. O gel foi corado com azul de Coomassie. Raia **6**: migrações eletroforéticas de proteínas de massas moleculares conhecidas expressas em kDa.

Com o propósito de excluirmos qualquer dúvida quanto à propriedade de aglutinação do peptídeo, optamos por realizar um método adicional de purificação. Das colunas testadas, obtivemos bons resultados com a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Blue HP (GE Healthcare) (Figura 16). As análises em ensaio de hemaglutinação e em eletroforese das frações obtidas permitiu-nos observar que o material eluído com aproximadamente 0,5M de NaCl apresentava a banda do peptídeo de aproximadamente 3kDa (Figura 17) e possuía atividade hemaglutinante (Figura 18).

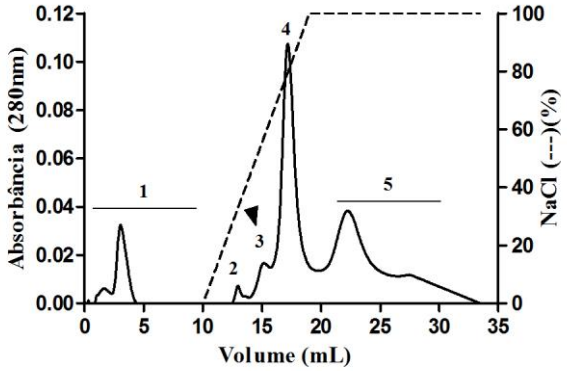

Figura 16: Peptídeo é eluído com aproximadamente 0,5M de NaCl em cromatografia de afinidade com resina de Blue-Sepharose (em sistema *ÄKTA Purifier*). Amostra da hemaglutinina, obtida do extrato bruto do súber de *T. hystrix* por precipitação com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação, cromatografia de interação hidrofóbica seguida de cromatografia de troca catiônica e em fase reversa, foi submetida à cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Blue HP**.** A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl a 20mM, pH=7,2, e lavada com o mesmo tampão para retirada do material não adsorvido (**1**). O material adsorvido à coluna foi eluído com gradiente de 0 a 1M NaCl em tampão de equilíbrio (linha tracejada) (**2** – NaCl a 0,3M, **3** – NaCl a 0,5M, **4** – NaCl a 0,8M e **5** – NaCl a 1M). A cromatografia foi realizada à temperatura ambiente, sob fluxo de 1mL/min, com monitoramento pela absorbância a 280nm (linha contínua). Os picos com absorbância a 280nm foram coletados e dessalinizados em cartuchos Sep-Pak C18. A seta indica o pico em que o peptídeo de aproximadamente 3kDa foi eluído.

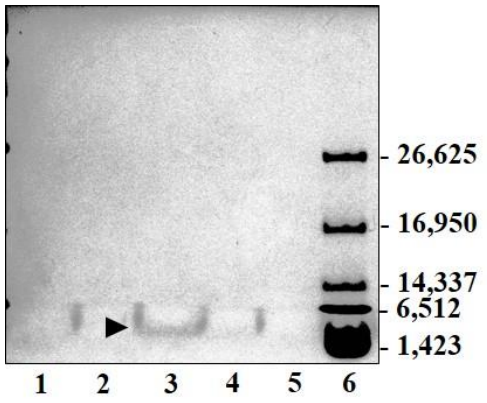

Figura 17: SDS-PAGE das frações eluídas da coluna HiTrap Blue HP. As amostras com atividade hemaglutinante obtidas das purificações do extrato bruto do súber de *T. hystrix* por precipitação com sulfato de amônio na faixa de 30 a 60% de saturação, cromatografia de interação hidrofóbica seguida de cromatografia de troca catiônica e em fase reversa foram submetidas a mais uma etapa de purificação em coluna HiTrap HP. Os materiais não adsorvidos (raia **1**) e adsorvidos à coluna (raia **2** a **5**) foram analisados em SDS-PAGE a 15%. Raia **2**: amostra eluída com NaCl a 0,3M, raia **3**: 0,5µg de proteína da amostra eluída com NaCl a 0,5M, raia **4**: amostra eluída com NaCl a 0,7M e raia **5**: amostra eluída com NaCl a 1M. Raia **6**: migrações eletroforéticas de proteínas com massas moleculares conhecidas expressas em kDa. O gel foi corado com azul de Coomassie. A seta indica peptídeo de aproximadamente 3kDa na fração eluída com 0,5M de NaCl, cuja atividade hemaglutinante foi positiva (ver figura a seguir).

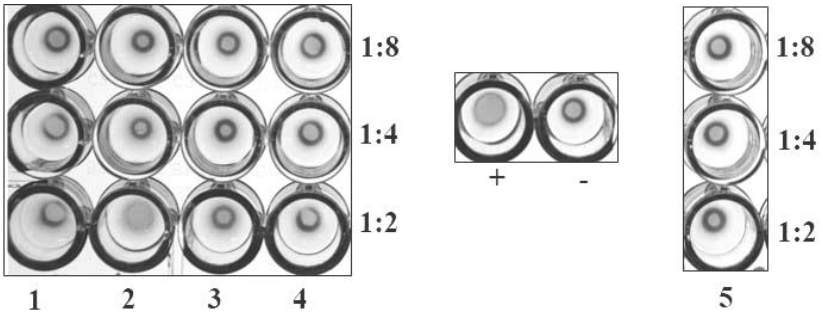

Figura 18: Ensaio de hemaglutinação com as amostras obtidas da cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Blue HP (Figura 16). Frações eluídas da coluna HiTrap Blue HP foram submetidas a ensaio de hemaglutinação em diluições seriadas (base 2) até 1:8. Foram testas as frações eluídas com NaCl a 0,3M (poço **1**), 0,5M (poço **2**)**,** 0,7M (poço **3)** e 1M (poço **4**). Poço **5:** Material não adsorvido à coluna. (+) Controle positivo – 2µg/mL de ConA. (–) Controle negativo – solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada no poço 2, na diluição de 1:2, amostra essa que continha o peptídeo de aproximadamente 3kDa (figura anterior).

Uma vez que conseguimos isolar a aglutinina de *T. hystrix* e que esta correspondia ao peptídeo de apenas 3kDa, antes de testarmos a sua capacidade mínima de aglutinar eritrócitos, avaliamos por eletroforese em condições nativa (BN-PAGE) se este era o responsável pela hemaglutinação e que não estávamos diante de uma subunidade ou domínio de alguma proteína com massa molecular maior. Além disso, procuramos determinar se o peptídeo poderia formar agregados (Figura 19). Pela análise do peptídeo em gel nativo, este ainda permaneceu com a mesma massa molecular analisada em gel sob condições dissociantes (SDS-PAGE), ou seja, de aproximadamente 3kDa. Esses resultados sugerem que este peptídeo não é uma subunidade ou domínio de alguma outra proteína de massa molecular maior.

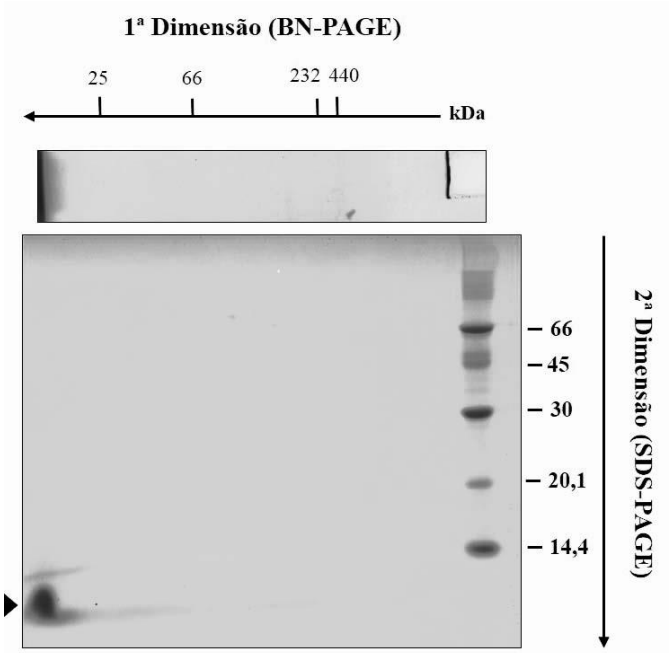

Figura 19: Peptídeo não forma complexos. O peptídeo de aproximadamente 3kDa purificado do extrato bruto de súber de *T. hystrix* foi submetido a eletroforese bidimensional, sendo corrida a 1ª dimensão em condição nativa e na 2ª dimensão um SDS-PAGE. As migrações eletroforéticas de proteínas com massas moleculares conhecidas estão indicadas na figura em kDa. Ferritina (440kDa), Catalase (232 kDa), BSA (66kDa) e Quimotripsinogênio (CMT) (25kDa). As proteínas foram coradas com azul de Coomassie. A seta indica a migração eletroforética do peptídeo (aproximadamente 3kDa) submetido à eletroforese bidimensional.

A amostra contendo o peptídeo foi testada quanto a sua capacidade mínima de aglutinar eritrócitos. Foi observada atividade hemaglutinante em solução contendo o peptídeo purificado na diluição de 1:2. Esse material ao ser quantificado pelo método de Bradford demonstrou uma concentração proteica baixa de 75µg/mL. Com base nesses resultados foi possível calcular a concentração hemaglutinante mínima deste peptídeo que foi de 35,5µg/mL, assim como o rendimento ao longo dos processos de purificações que foi baixo (Tabela 6). De mesmo modo, com base no cálculo do rendimento ao longo das purificações da aglutinina de *T. hystrix*, observamos diminuição no conteúdo proteico durante essas etapas e consequente perda de atividade hemaglutinante (de 1:16 para 1:2). Vale ressaltar que esta perda de atividade pode estar relacionada tanto a este baixo conteúdo proteico, quanto à desnaturação do peptídeo ao longo dos processos de purificações devido a variações no pH e temperatura, a presença de solventes orgânicos e aos processos de dessalinizações e secagem à vácuo do mesmo.

Tabela 6: Etapas de purificações da aglutinina do extrato bruto do súber de *T. hystrix*.

Amostras		**Proteína total (µg/ml)**	**Atividade hemaglutinante[1]**
Precipitação com $(NH4)_2SO_4$ (concentração de 30 a 90%)		1.500	93,75
Cromatografia	Interação hidrofóbica HiTrap Octyl FF)	900	225
	Troca catiônica (HiTrap SP)	340	170
	Fase reversa (EC Nucleosil C18)	220	110
	Afinidade HiTrap Blue HP)	75	35

[1] Concentração mínima de proteína (µg/mL) necessária para induzir hemaglutinação.

4.7 Purificação em coluna de quitina

Diante dos resultados expostos, na tentativa de aumentar o rendimento na purificação do peptídeo de *T. hystrix*, e tendo em vista a existência de uma variedade de peptídeos de plantas similares à heveína, ligante de quitina, e com atividade antimicrobicida (Van den Bergh *et al*., 2002; Odintsova *et al*., 2009; Porto *et al*., 2012), 100mL do extrato bruto do súber de *T. hystrix* foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de quitina. A fim de investigarmos as características eletroforéticas do material obtido, submetemos a fração adsorvida à SDS-PAGE (Figura 20). De maneira interessante, no material eluído com ácido acético a 0,1M foi observado o peptídeo de aproximadamente 3kDa. No entanto, a presença de outras proteínas inviabilizava a conclusão de que este peptídeo possuía afinidade pela quitina. Por esse motivo, a fração eluída foi passada por membrana com limite de exclusão (*cut-off*) de 10kDa para separar o peptídeo das outras proteínas. Quando as amostras foram analisadas, observou-se que a atividade hemaglutinante foi recuperada na fração filtrada (Figura 21), até a diluição de até 1:8, mas não no retentato (dados não mostrados). Desde que o filtrado foi destituído das moléculas de maior massa molecular (Figura 22), ficou clara a correlação entre a presença do peptídeo e da atividade hemaglutinante. Diante dessas observações e da capacidade deste peptídeo em interagir com a quitina, com o propósito de investigarmos as suas características biológicas, foi feito um ensaio antifúngico com o fungo dermatófito *Trichophyton rubrum*, entretanto, não houve atividade antifúngica.

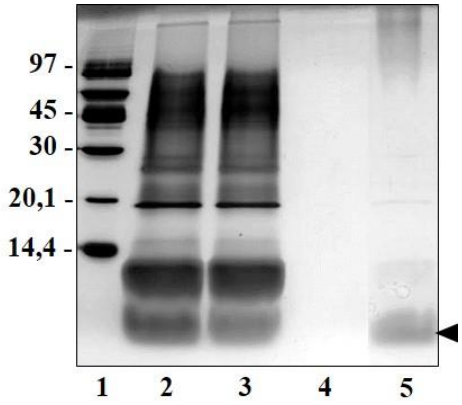

Figura 20: Análise em SDS-PAGE a 15% do extrato bruto do súber de *T. hystrix* purificado em coluna de quitina. O extrato bruto do súber de *T. hystrix* (Raia **2**) foi submetido à purificação em coluna de quitina. As amostras não adsorvidas à coluna (Raia **3**) foram lavadas com solução salina de NaCl a 0,85%. As amostras adsorvidas à coluna foram eluídas com solução salina isotônica acrescida de glicose a 0,4M (Raia **4**) e com solução de ácido acético a 0,1M (Raia **5**). Raia **1**: migrações eletroforéticas de proteínas com massas moleculares conhecidas expressas em kDa. O gel foi corado com nitrato de prata. A seta indica o peptídeo de massa molecular de aproximadamente 3kDa.

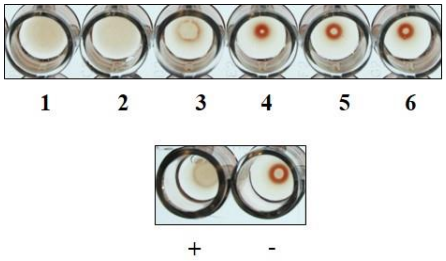

Figura 21: Ensaio de hemaglutinação do peptídeo de *T. hystrix* purificado em coluna de quitina. O extrato bruto do súber de *T. hystrix* foi purificado em coluna de quitina e filtrado em membrana com *cut-off* de 10kDa. O peptídeo de aproximadamente 3kDa eluído com ácido acético a 0,1M foi dessalinizado em cartucho Sep-Pak C18 e testado em ensaio de hemaglutinação. Poços de 1 a 6: diluições seriadas (base 2) de 1:2 a 1:64, respectivamente, do peptídeo purificado. (+) Controle positivo – 2µg/mL de ConA. (–) Controle negativo – solução salina isotônica. A atividade hemaglutinante foi observada na diluição de até 1:8.

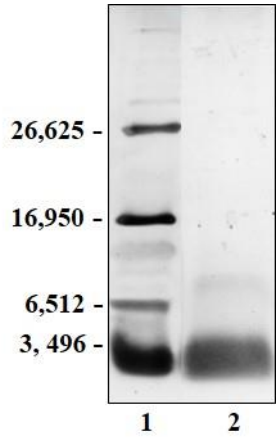

Figura 22: Peptídeo de aproximadamente 3kDa do extrato bruto do súber de *T. hystrix* é purificado em coluna de quitina. O extrato bruto do súber de *T. hystrix* foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de quitina e filtrado em membrana com *cut-off* de 10kDa. A fração eluída com 0,1M de ácido acético foi analisada em SDS-PAGE a 15% (Raia **2 -** peptídeo de aproximadamente 3kDa). Raia **1**: migrações eletroforéticas de proteínas com massas moleculares conhecidas expressas em kDa. O gel foi corado com nitrato de prata.

4.8 Sequenciamento do peptídeo

A fim de se identificar o peptídeo hemaglutinante isolado do extrato de *T. hystrix*, foram submetidas amostras do peptídeo em SDS-PAGE, sendo as bandas de massas moleculares de aproximadamente 3kDa (figura 15 – raia **5** e figura 17- raia **3**), coradas com azul de Coomassie, recortadas e submetidas à identificação por meio de MS (*electrospray ion trap mass spectrometry*). Os peptídeos trípticos obtidos da banda da figura 15 apresentaram identidade com sequências preditas do fator 1-α de elongação de massa molecular de 39,2kDa (acesso Cc04_g09020) de *Coffea canephora*, a qual é classificada na mesma ordem que *Tabernaemontana hystrix*, denominada *Gentianales*. Com relação aos peptídeos trípticos obtidos da Figura 17, estes tiveram identidade com as seguintes sequências preditas de *Coffea canephora*: proteína 2 carreadora de ATP, ADP, mitocondrial de 32,1 kDa (acesso Cc00_g21450); ácido abscísico - 8´- hidroxilase 4 (ABA8´- OH) de 54,3kDa (acesso Cc02_g18810) e novamente fator 1-α de elongação de 39,2kDa (acesso Cc04_g09020). O pareamento com sequências de plantas filogeneticamente próximas à *T. hystrix* depositadas em bancos de dados resultou em identidade com sequências preditas de proteínas de massas moleculares maiores do que a do peptídeo, isso devido à ausência de bancos de dados de sequências gênicas ou proteicas de *T. hystrix* que pudessem determinar a sequência do peptídeo. À procura de sequências preditas de outras plantas não filogeneticamente próximas a *T. hystrix* depositadas em diversos bancos de dados que pudessem nos auxiliar na identificação da sequência do peptídeo, foi encontrado no servidor UniProt, uma sequência predita depositada no banco de dados EMBL *Nucleotide Sequence Database*, de uma proteína putativa não caracterizada de massa molecular compatível com a do peptídeo (3,269kDa) (acesso B6U1L3) de *Zea mays*. Estes resultados, devido à distância filogenética entre *T. hystrix* e *Zea mays*, não podem proporcionar com acurácia a identidade da sequência do peptídeo de *T. hystrix*. À vista disso, não foi possível determinar a sequência da aglutinina presente no extrato bruto de *T. hystrix*.

4.9 A aglutinina de *T. hystrix* não é capaz de induzir a proliferação de células do sistema imunológico

Tendo em vista a ampla variedade de aglutininas presentes em plantas que apresentam diversos efeitos sobre as células do sistema imunológicos, na tentativa de avaliar se aglutinina de *T. hystrix* apresentava atividade mitogênica, utilizou-se amostras contendo peptídeo de 3kDa em ensaios de proliferação com células do baço de camundongos C57BL/6 marcadas

com CFSE. O peptídeo purificado, nas concentrações de 740, 370, 148, 74, 37, 14,8 e 7,4ng/mL, não foi capaz de induzir a proliferação de células T e B (Figuras 23 e 24), dado que as células estimuladas não apresentaram proliferação estatisticamente significativas em relação às células não estimuladas (controle negativo).

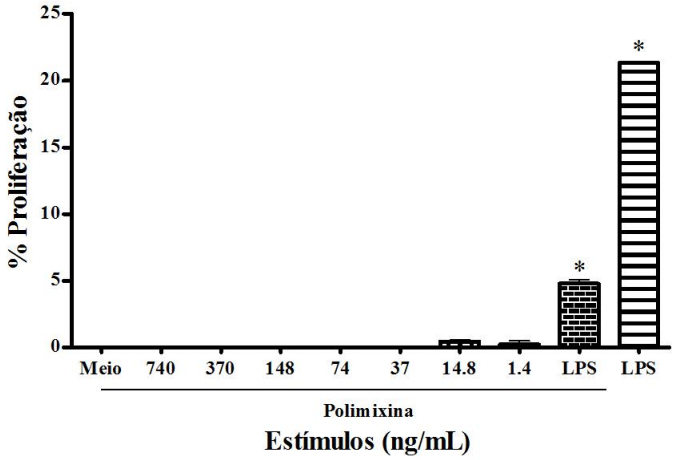

Figura 23: O peptídeo de *T. hystrix* não induz proliferação de células B totais do baço de camundongos. Cerca de 1×10^6 células esplênicas de camundongos C57BL/6 foram marcadas com CFSE e cultivadas na ausência (meio) ou presença do peptídeo purificado nas concentrações de 740, 370, 148, 74, 37, 14,8 e 7,4ng/mL e de LPS a 25µg/mL. Após 72 horas, as células esplênicas foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD19-APC e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros de tamanho e granularidade (FSC × SSC). Os resultados foram expressos com a porcentagem mais o desvio padrão da média da frequência de células que proliferam. *****$p < 0,0001$ em relação às células não estimuladas (meio).

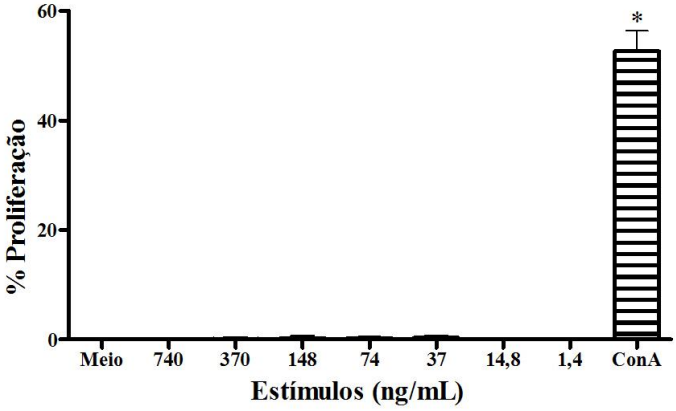

Figura 24: O peptídeo de *T. hystrix* não induz proliferação de células T totais do baço de camundongos. Cerca de 1×10^6 células esplênicas de camundongos C57BL/6 foram marcadas com CFSE e cultivadas na ausência (meio) ou presença do peptídeo purificado nas concentrações de 740, 370, 148, 74, 37, 14,8 e 7,4ng/mL e de ConA a 2µg/mL. Após 72 horas, as células esplênicas foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD3-APC-Cy 7 e analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros de tamanho e granularidade (FSC × SSC). Os resultados foram expressos com a porcentagem mais o desvio padrão da média da frequência de células que proliferam. *****$p < 0,0001$ em relação às células não estimuladas (meio).

4.10 A aglutinina de *T. hystrix* estimula a expressão de TGF-β por células esplênicas

Embora não estimulasse a proliferação de linfócitos, havia a possiblidade, como acontece com algumas lectinas (Hostanska *et al*., 1995; Muraille *et al*., 1999) de que essa hemaglutinina induzisse a produção de citocinas por células do sistema imunológico. A figura 25 mostra que as células esplênicas de camundongos C57BL/6 estimuladas com 37ng do peptídeo de *T. hystrix* apresentaram um aumento relativo na expressão de mensagens para a citocina TGF-β, obtidas por qRT-PCR, quando comparada às células controle não estimuladas; enquanto não houve diferença estatisticamente significativa em relação a TNF-α, IL-10, IL-6 e GATA-3 (dados não mostrados).

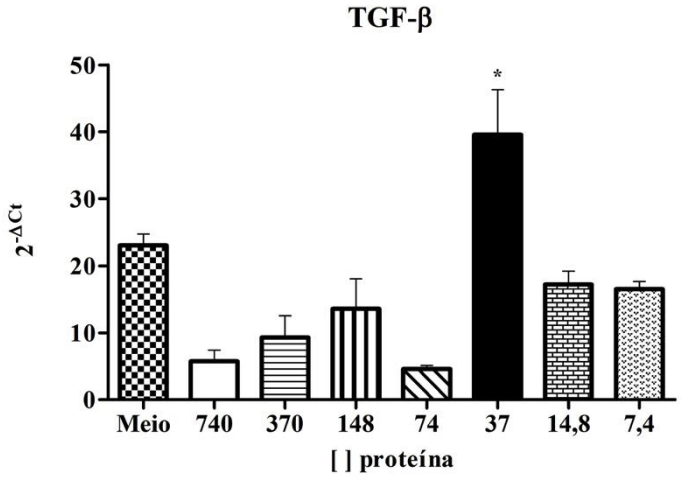

Figura 25: Peptídeo de *T. hystrix* induz a expressão de TGF-β por células esplênicas murinas. Cerca de 1 × 10^6 células esplênicas de camundongos C57BL/6 foram cultivadas na ausência ou presença do peptídeo purificado nas concentrações de 740, 370, 148, 74, 37, 14,8 e 7,4ng/mL. Após 72 horas de estímulo, o RNA total foi extraído e o cDNA confeccionado para uso na quantificação da expressão da citocina. Como controle negativo foi utilizado o RNA total de células não estimuladas (meio). *p <0,05 em relação às células não estimuladas (Meio).

5 DISCUSSÃO

Devido às diferenças em estrutura molecular, propriedades bioquímicas e especificidade a carboidratos, as lectinas de plantas formam um grupo heterogêneo (Peumans & Van Damme, 1998; Van Damme, 2008). Apesar dos intensos esforços na identificação e caracterização desse grupo heterogêneo de proteínas, muitas delas ainda não foram descobertas. Os grandes avanços nas técnicas de biofísica e biologia molecular, assim como a ampla disponibilidade de oligossacarídeos sintéticos tem contribuído muito para a identificação de muitas dessas lectinas (Hamid *et al*., 2013).

No presente projeto, utilizamos diferentes técnicas de purificações cromatográficas e convencionais para o isolamento de um peptídeo com uma estrutura terciária de aproximadamente 3kDa correspondente à hemaglutinina de *T. hystrix*, uma espécie da família *Apocynaceae* presente no domínio fitogeográfico do cerrado (Lorenzi, 2002). Passamos a denominar esse peptídeo de Tabhys. A atividade hemaglutinante do peptídeo não foi inibida por monossacarídeos, em contrapartida, observamos inibição pela fetuína nativa e assialilada. Além da caracterização bioquímica, observamos o aumento de mensagem para a citocina TGF-β por células esplênicas estimuladas com este peptídeo, porém, este não foi capaz de induzir proliferação.

Embora as lectinas de plantas estejam presentes em diversos tecidos vegetativos (Peumans & Van Damme, 1995; Van Damme *et al*., 1998; Van Damme, 2008, Dias *et al*., 2015), os motivos pelos quais utilizamos o extrato bruto de súber do caule para o isolamento da aglutinina de *T. hystrix* foram: (1) ambos os extratos do caule e da folha desta planta não apresentaram atividade hemaglutinante.; (2) apesar da presença de atividade hemaglutinante no látex de frutos de *T. hystrix*, a sua baixa disponibilidade juntamente com a presença de contaminantes insolúveis, dificultou o uso deste material *a priori*, e (3) facilidade de obtenção e manuseio deste extrato com disponibilidade perene.

Atualmente, tem sido relatada a presença de muitas lectinas de plantas encontradas em extratos obtidos do súber de vários espécimes. Algumas dessas lectinas são denominadas proteínas de armazenamento vegetativo (VSP- *Vegetative Storage Proteins*). Como exemplo podemos citar as lectinas do súber de *Cladrastis lutea* (Van Damme *et al*., 1995a), *Maackia amurensis* (Van Damme *et al*., 1997b), *Robinia pseudoacacia* (Van Damme *et al*., 1995b), *Sophora japonica* (Hankins *et al*., 1988; Van Damme *et al*., 1997a). Todas são agrupadas na família de lectinas de leguminosas. Enquanto que outras são identificadas em extratos do súber de espécimes pertencentes à família *Moraceae*, as quais são classificadas como lectinas

similares à jacalina (JRLs) (Van Damme *et al*., 2002). O conteúdo lectínico identificado nos espécimes citados acima é alto, podendo até corresponder a 80% do total de proteínas (Van Damme *et al*., 2002), enquanto que neste trabalho, a concentração do peptídeo purificado correspondente a aglutinina de *T. hystrix* foi de apenas 75µg, sendo esta quantidade referente a somente 18,75% do total de proteínas presentes no extrato bruto. Estes dados podem ter sido resultado de perda ou degradação proteica ao longo dos processos de purificações da aglutinina de *T. hystrix*, demonstrados pelo baixo rendimento obtido ao final destes processos.

No início do desenvolvimento deste projeto nos deparamos com algumas dificuldades: (1) O baixo conteúdo proteico do extrato bruto de súber do caule de *T. hystrix*; e (2) a presença de altas quantidade dos mais diversos compostos químicos, incluindo pigmentos, e principalmente alcaloides, muito frequente no gênero *Tabernaemontana* (Yoder & Mahlberg, 1976; Rapini, 2000, Souza *et al*., 2010). Tendo em vista que muitas lectinas de plantas têm sido isoladas por técnicas de purificações convencionais com o uso de umas ou mais técnicas cromatográficas, além do fracionamento e o pré-tratamento com solventes orgânicos e/ou sulfato de amônio (Sumner & Howell, 1936; Van Damme *et al*., 2002; Naeem *et al*., 2007; Zhao *et al*., 2010, Lam & Ng, 2011), as etapas dos processos de purificações foram aumentadas, utilizando um conjunto de técnicas cromatográficas líquidas convencionais e automatizadas. Embora o aumento no número de etapas de purificações possa ter resultado em um baixo rendimento (Lam & Ng, 2011; Hamid *et al*., 2013), ao final destas etapas obtivemos um material com alto grau de homogeneidade. Além disso, o fracionamento do extrato bruto de súber de *T. hystrix* em solução de sulfato de amônio nas faixas de 30, 60 e 90% de saturação fez com que aumentássemos o conteúdo proteico do material inicial de purificação.

Em muitos trabalhos de isolamento e caracterização de lectinas de plantas têm sido recorrente o uso de técnicas de fracionamento por sais antes do início das etapas de purificações. No trabalho de Zhao *et al*. (2011), estes identificam uma proteína similar a heveína e uma quitinase de classe I, utilizando-se a precipitação com sulfato de amônio seguida de várias técnicas de purificações cromatográficas. No trabalho de Naeem *et al*. (2007) também foi utilizado o fracionamento em sulfato de amônio na faixa de 30 e 50% de saturação seguida de cromatografia de afinidade para o isolamento e caracterização de uma aglutinina presente na semente de uma leguminosa.

Em contrapartida, o aumento dos processos de purificações cromatográficas, devido ao uso de alguns solventes orgânicos, mudanças no pH, temperatura e o próprio manuseio das amostras pode ocasionar a degradação proteica ou perda de proteínas (Cleland *et al*., 1993;

Chang & Hershenson, 2002). Em nosso estudo, durante os processos de purificações, observávamos a formação de um precipitado branco, o qual poderia estar associado à formação de agregados proteicos insolúveis (Garcia-Rubio, 1989) e, portanto, pode ter contribuído para o baixo rendimento que observamos ao final das etapas purificações da aglutinina de *T. hystrix*.

A dessalinização das amostras em cartuchos Sep-Pak C18, embora necessária, também pode ter contribuído para a perda ou degradação proteica dos materiais purificados, devido ao tratamento destes com ácido (TFA) para retirada dos sais e a secagem dos mesmos para a evaporação completa deste ácido e do metanol. Na tentativa de amenização desta perda, buscamos outros métodos de dessalinização, como por exemplo, o uso de colunas cromatográficas para troca de tampão (*desalting column*) e membranas com *cut-off* de 3kDa, porém, devido à baixa massa molecular do peptídeo correspondente à aglutinina de *T. hystrix*, tais métodos tornaram-se inviáveis. Apesar disso, de maneira surpreendente, o tratamento das amostras com ácidos durante os processos de dessalinizações e purificações não ocasionou a perda de atividade hemaglutinante do peptídeo Tabhys, sendo que este mostrou-se bastante resistente à desnaturação, mesmo após os processos de secagem para retirada total de ácido e metanol, os quais eram repetidos de duas até três vezes.

De modo geral, o pré-tratamento do extrato bruto de *T. hystrix* com solução de ácido acético a 0,1% em água, o uso de solventes orgânicos, o aumento das etapas de purificações e a determinação da especificidade da aglutinina de *T. hystrix* em ensaios de inibição da hemaglutinação foram essenciais para a exclusão da hipótese de que a atividade hemaglutinante de *T. hystrix* era proveniente de um fenômeno não específico causado por lipídeos ou por outros compostos químicos que poderiam resultar em resultados falso-positivos de hemaglutinação (Tsivion & Sharon, 1981; Etzler, 1985). Em nossos estudos, além de identificarmos o peptídeo correspondente a hemaglutinina de *T. hystrix*, a atividade hemaglutinante deste, apesar de não ter sido inibida por monossacarídeos, foi inibida pela fetuína e assialofetuína. Estes dados comprovam com resultados prévios obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, nos quais demonstram que a especificidade desta aglutinina, além de ser independente da ácido siálico e cátions divalentes, pode estar preferencialmente associada a oligossacarídeos N-ligados, isso porque a atividade hemaglutinante de *T. hystrix* também foi inibida pela peroxidase. Nesse sentido, no presente trabalho observamos as mesmas atividades com uma amostra com grau de homogeneidade muito maior (Milanezi, 2012). Fetuína e assialofetuína são moléculas idênticas em sua estrutura proteica, porém, com uma sutil diferença nos carboidratos que formam o grupo prostético dessa molécula. Nos

oligossacarídeos O-ligados da assialofetuína estão ausentes as ligações de ácido siálico do tipo α2,3 com galactose e/ou α2,6 com N-acetilgalactosamina (GalNAc) (Spiro & Bhoyroo, 1974; Nilsson *et al*., 1979). O fato de termos inibido previamente a reação com peroxidase (que possui somente oligossacarídeos N-ligados predominantemente do tipo *high manose*), mas não com BSA (molécula não glicosilada), aponta para a possibilidade do núcleo comum a todas as N-glicosilações, ou parte deste, ser o glicotopo específico de Tabhys. Embora ocorram como substituições frequentes em glicoproteínas de plantas a xiloseβ(1-2) e fucoseα(1,3) (Kurosaka *et al*., 1991; Takahashi *et al*., 1998; Wuhrer *et al*., 2005), esses resíduos parecem não ser essenciais. Dessa forma, como fetuína e peroxidase apresentam em comum oligossacarídeos N-ligados, foi sugerido que estes são provavelmente as estruturas que Tabhys possui especificidade. Com base nas estruturas N-ligadas compartilhadas entre essas duas glicoproteínas, foi sugerido que o núcleo comum entre elas pelo qual a aglutinina de *T. hystrix* interage é, resumidamente composto de $Man_3GlcNAc_2$ (Milanezi, 2012).

Apesar da especificidade das lectinas ser determinada por ensaios de inibição da hemaglutinação com mono ou dissacarídeos, a concentração requerida desses compostos para a inibição da atividade hemaglutinante é relativamente alta, especialmente quando comparada àquela de oligossacarídeos complexos (Peumans & Van Damme, 1998). Além disso, muitas lectinas não possuem especificidade por mono ou dissacarídeos (Lis & Sharon, 1998; Wititsuwannakul *et al*., 2008). No presente projeto, a atividade hemaglutinante do peptídeo Tabhys não foi inibida por monossacarídeos mesmo à altas concentrações (400mM), porém a adição de poucas quantidades de fetuína, cerca de 7mM, foram suficientes para a inibição da atividade hemaglutinante desta molécula.

A inibição da atividade hemaglutinante da aglutinina de gérmen de trigo (WGA) por oligossacarídeos de N-acetilglicosamina $(GlcNAc)_4$ é potencialmente muito maior do que apenas pelos monômeros que compõem este açúcar (Goldstein & Poretz, 1986), assim como ocorre com a lectina extraída do bulbo de *Galanthus nivalis* (GNA) com oligossacarídeos constituídos de Manα1,3Man (Shibuya *et al*., 1988). A explicação desse alto potencial de inibição da aglutinação por oligossacarídeos é devido ao fato da multivalência proporcionada por estas estruturas multiantenárias que aumentam a complementaridade entre as lectinas e os seus açúcares ligantes, resultando em um aumento de afinidade, principalmente por glicanas complexas (Rini, 1995; Elgavish & Shaanan, 1997; Peumans & Van Damme, 1998, Wittmann & Pieters, 2013).

O fato de algumas lectinas de plantas possuírem especificidade à oligossacarídeos complexos presentes nas cadeias laterais de glicoproteínas de animais e ausentes em plantas

(Mandal, 1990) pode evidenciar o papel biológico de defesa dessas moléculas. As lectinas ligantes de quitina são um exemplo. Estas possuem especificidade à polissacarídeos que não estão presentes nas plantas, porém são abundantes na parede celular de fungos e no exoesqueleto de insetos (Peumans & Van Damme, 1998).

A quitina é um polímero composto de N-acetiglicosamina com ligações do tipo β1- 4. Dentre uma variedade de lectinas ligantes de quitina, destaca-se a heveína, uma lectina de baixo peso molecular, extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), (Van Parijs *et al*., 1991; Agrawal & Konno, 2009). Tendo em vista que uma variedade de peptídeos heveína-símiles e/ou lectina-símiles com domínio heveína têm sido isolados de diversas fontes, incluindo plantas, artrópodes, anfíbios, dentre outros animais (Liang & Pan, 1995;Van den Bergh *et al*., 2002; Marquardt *et al*., 2007; Li *et a*l., 2008; Jiang *et al*., 2009; Porto *et al*., 2012) e da suposta especificidade da aglutinina de *T. hystrix* a N-glicanas, a hipótese de que o peptídeo correspondente à aglutinina de *T. hystrix* possuía alguma homologia com a heveína foi testada através da purificação do extrato bruto de *T hytsrix* em coluna de quitina. A purificação nesta coluna também foi uma alternativa em melhorar o rendimento proteico com a simplificação das etapas deste processo (Lam & Ng, 2011).

De maneira interessante, as análises eletroforéticas demonstraram na fração purificada uma banda proteica de massa molecular similar à do peptídeo, no entanto, alguns acontecimentos nos deixaram duvidosos quanto a especificidade deste peptídeo à quitina: (1) a presença de alguns contaminantes proteicos na amostra purificada do peptídeo; e (2) a ausência de atividade antifúngica desta amostra. Nas análises eletroforéticas da purificação em coluna de quitina da fração eluída com glicose a 0,4M não foram observadas a presença de outras proteínas, em contrapartida quando utilizamos ácido acético a diferentes concentrações (0,02M e 0,1M) para eluição das amostras, nos atentamos para a presença de uma banda de massa molecular baixa, com aproximadamente 3kDa, semelhante àquela do peptídeo, além de contaminantes proteicos com massas moleculares altas (maior do que 97kDa), podendo indicar degradação ou desnaturação de proteínas, e uma banda proteica próxima à do peptídeo, porém com massa molecular aproximado de 14kDa e outra próxima à 20kDa. À pesquisa de trabalhos na literatura que pudessem explicar a presença dessas outras proteínas na amostra, encontramos no trabalho de Lee *et al*. (1991) a identificação de duas proteínas, uma com 14kDa e outra com 5kDa, sendo está última a heveína, como resultado de produtos de clivagem de um polipetídeo precursor de 20kDa. Tais observações podem indicar que as duas bandas proteicas contaminantes observadas na purificação em coluna de quitina seriam referentes aos precursores e os produtos de clivagem da heveína observados no trabalho de

Lee *et al*. (1991), porém não podemos afirmar esta hipótese sem antes realizarmos análises mais aprofundadas sobre o assunto. Para tanto seria necessário a identificação da sequência primária do peptídeo correspondente à aglutinina de *T. hystrix*. Em contrapartida, este peptídeo apresentou atividade hemaglutinante, mesmo após a eluição com diferentes concentrações de ácidos e a secagem das amostras para retirada completa desses ácidos, enquanto que a heveína não possui capacidade de aglutinar células devido à presença de apenas um CRD.

Em alguns trabalhos de identificação e purificação de lectinas ou peptídeos ligantes de quitina, a eluição do material adsorvido à quitina somente com sal não é eficiente, sendo necessário a adição de alguns ácidos, incluindo ácido fortes, como ácido clorídrico. Trindade (2005) utiliza uma combinação de NaCl a 0,15M com ácido clorídrico a 0,01M para purificação de duas lectinas ligantes de quitina do gênero *Artocarpus*. Por outro lado, Broekaert *et al*. (1992) e Van der Bergh *et al*. (2002) utilizam apenas ácido acético a 0,1M e 20mM, respectivamente, para eluição de peptídeos antimicrobianos de plantas similares à heveína. Dessa forma, o fato do peptídeo de *T. hystrix* adsorvido à coluna de quitina não ter sido eluído com glicose, um monossacarídeo que apresenta similaridade com N-acetilglicosamina (GlcNAc), não demonstra à inespecificidade deste à quitina. No entanto, experimentos de inibição da hemaglutinação com GlcNac e seus oligômeros deverão ser realizados para a comprovação da especificidade do peptídeo a esse açúcar.

A ineficiência do peptídeo quanto à inibição do crescimento do fungo filamentoso *Trichophyton rubrum* pode ter sido causada pelo tratamento deste com solventes orgânicos como metanol, durante os processos de dessalinizações, bem como acetonitrila e alguns ácidos durante os processos de purificações. Interessante notar que estes solventes não inibiram a atividade hemaglutinante deste peptídeo. Em contrapartida, a maioria dos protocolos de identificação e purificação de peptídeos lectina-símiles que apresentam atividade antimicrobicida utilizam-se de cromatografia de fase reversa com o uso de solventes orgânicos para esta finalidade (Li *et al*., 2008; Odintsova *et al*., 2009). Por outro lado, existem na literatura a identificação de alguns peptídeos lectina-símiles e/ ou lectinas ligantes de quitina com baixa massa molecular que não apresentam atividade antimicrobicida. Liang & Pan (1995) identificaram um peptídeo que apesar de ser encontrado em altas quantidades no veneno da aranha *Selenoscoma huwena* e possuir homologia com fragmentos da aglutinina de *Urtica dioica* não demonstrou toxicidade alguma à insetos e mamíferos. Peumans *et al*. (1996) isolaram e caracterizaram parcialmente uma lectina ligante de quitina com baixa massa

molecular que não apresenta atividade antifúngica, no entanto demonstrou atividade citotóxica em ensaios realizados com células-T de linhagem humana.

As análises em SDS-PAGE e PAGE (em condição nativa) da estrutura molecular do peptídeo Tabhys monstraram que este é composto de apenas uma subunidade com massa molecular relativa de aproximadamente 3kDa mesmo com a presença de agentes redutores. Do mesmo modo, as análises em gel bidimensional (BN-PAGE) não revelaram a presença de nenhuma proteína ou complexos proteicos associados ao peptídeo. Como a maioria das lectinas possui massa molecular acima de 20kDa, raramente a existência de peptídeos lectina-símiles com capacidade de aglutinar eritrócitos tem sido raramente relatada, uma vez que para a aglutinação de células é necessário pelo menos, a presença de dois CRDs. Lectinas que possuem estruturas moleculares composta de apenas uma subunidade com baixa massa molecular, como a heveína, são consideradas merolectinas, porque exibem somente um CRD e, portanto, não aglutinam células ou glicoconjugados (Van Parijs *et al.*, 1991). Isso porque a aglutinação é resultado da interação dos CRDs das lectinas oligoméricas, que possuem monômeros mono ou polivalentes, com carboidratos de superfície celular. Essa interação estabelece uma ponte entre as células, formando uma rede que se aglutina. De maneira interessante, o peptídeo de Tabhys foi capaz de aglutinar igualmente todos os eritrócitos humanos do grupo A, B e O.

É importante ressaltar a existência de peptídeos lectina-símiles na literatura que são capazes de aglutinar eritrócitos. Liang & Pan (1995) isolaram um peptídeo do veneno de aranha composto de 32 resíduos de aminoácidos que demonstrou a capacidade de aglutinar tanto eritrócitos de camundongo quanto eritrócitos humanos dos 3 tipos (A, B e O). Li *et al*. (2008) identificaram um peptídeo de anfíbio com apenas 17 resíduos de aminoácidos que demonstrou aglutinar tanto células de fungos e bactérias quanto eritrócitos de coelho. Jiang *et al*. (2009) fizeram a expressão, purificação e caracterização de dois peptídeos lectina-símiles de veneno de aranha que demonstraram aglutinar eritrócitos humanos. Tal como, não muito frequentemente são encontradas lectinas com baixas massas moleculares que possuem dois CRDs e, portanto, são capazes de aglutinar eritrócitos. Como exemplo podemos citar a aglutinina de *U. dioica* composta de apenas uma subunidade de massa molecular entre 8 e 9kDa (Peumans *et al*., 1984; Van Damme *et al*., 1988; Beintema & Peumans, 1992). Os mecanismos que explicam a capacidade de peptídeos lectina-símiles em aglutinar eritrócitos não são compreendidos. Estudos indicam que a maioria desses peptídeos demonstram atividade antimicrobicida por interagirem com glicanas presentes na superfície de bactérias e

fungos, exibindo potente atividade lítica contra essas células (Koo *et al*., 1998) e mínima atividade lítica contra eritrócitos (Cheng *et al*., 2001).

De modo geral, das análises cromatográficas que realizamos obtivemos bons resultados com as cromatografias de troca catiônica em coluna HiTrap SP FF e cromatografia de fase reversa em coluna C18, com exceção da cromatografia realizada em coluna HiTrap Octyl FF, uma vez que a atividade hemaglutinante foi detectada na fração não adsorvida à coluna (Figura 8). Esse resultado, apesar de inesperado, pode ter sido causado pela menor hidrofobicidade da resina quando comparado a outras colunas de interação hidrofóbica, como por exemplo Phenyl Sepharose e Capto-Butyl Sepharose (Manual de instruções HiTrap HIC *Columns* – GE Healthcare/ disponível em <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/en/GELifeSciences-br/28411007>). Com relação à cromatografia de afinidade em resina Blue-Sepharose, embora as análises eletroforéticas tenham demonstrado baixa concentração do peptídeo purificado, a amostra purificada apresentou alta homogeneidade. Experimentos adicionais com apenas uma etapa de purificação do peptídeo deverão ser realizados e testados para a obtenção de uma concentração maior desta aglutinina.

Dentre as lectinas conhecidas de plantas laticíferas não há relatos de nenhum peptídeo com massa molecular menor do que a heveína (4,7kDa), ao contrário do que é visto em alguns espécimes agrupadas na mesma família de plantas. Como por exemplo, na família de plantas *Amaranthaceae* (*Amaranthus caudatus*) foram identificados dois peptídeos lectina-símiles (*Ac*-AMP1 e *Ac*-AMP2) com massas moleculares de aproximadamentede 3kDa (Broekaert *et al*., 1992). Do mesmo modo, na família de plantas Conculvaceae foram identificados dois peptídeos com atividade antifúngica homólogos à heveína de massa molecular de aproximadamente 4kDa (Koo *et al*., 1998). Na tentativa de determinarmos a identidade do peptídeo que havíamos isolado, recortamos as bandas de massas moleculares de aproximadamente 3kDa purificadas tanto por cromatografia de fase reversa em resina C18 quanto em cromatografia de afinidade em resina Blue-Sepharose e submetemo-as à identificação por MS (*electrospray ionization ion trap mass spectrometry*). Os resultados foram inconclusivos, uma vez que no pareamento com outras sequências de genes ou proteínas disponíveis nos bancos de dados, encontramos a identidade, de ambas as bandas, com o fator 1-α de elongação de 39,2kDa de *Coffea canephora*, uma planta agrupada na mesma ordem que *T. hystrix* (Gentianales).

O fator 1-α de elongação é uma proteína que dentre outras funções exerce um papel central na fase de elongação da síntese proteica em procariotos e eucariotos. De modo geral, este facilita o transporte do complexo aminoacil-tRNA, fazendo com que ele se ligue ao sítio

A do RNA ribossômico. O fator 1-α de elongação pode também evitar que outras proteínas se agreguem (atividade de chaperona), além de possuir atividade de isomerase, participar da proteólise de proteínas, de eventos de exportação nuclear, da modulação do citesqueleto da célula, de eventos apoptóticos, auxiliar na propagação de alguns vírus, além de elicitar células de imunidade inata (Mateyak & Kinzy, 2010; Fu *et al*., 2012). Em plantas pode ser regulado por fatores abióticos de estresse e pode estar relacionado com glicoproteínas de adesão celular (Zhu *et al*., 1994; Fu *et al*., 2012). Não há conhecimento e nem relatos de atividade lectínica nesta proteína. Diante do exposto, não foi possível determinar a sequência de aminoácidos do peptídeo correspondente a aglutinina de *T. hystrix*, devido à falta de sequências de genes ou proteínas de *T. hystrix* disponíveis em bancos de dados, como no GenBank. Estudos posteriores com novas técnicas de identificação proteica deverão ser realizados, como por exemplo a determinação da sequência aminoterminal do peptídeo realizado por meio do método de degradação de Edmann, o qual é muito utilizado para o sequenciamento de proteínas de baixas massas moleculares como o peptídeo de *T. hystrix*.

A capacidade das lectinas de plantas, assim como de peptídeos lectina-símiles em interagirem com glicoproteínas de superfície das células, permitindo que estas sejam ativadas, além de desencadearem diversas cascatas de sinalizações intracelulares que vão resultar em ativação de diversos genes já é bastante conhecida. No caso dos linfócitos, normalmente essas lectinas levam a proliferação (Bekeredjian-Ding *et al*., 2012) e/ou a produção de citocinas (De Oliveira Silva *et al*., 2011; Da Silva *et al*., 2012). Do mesmo modo, alguns peptídeos lectina-símiles podem mimetizar superantígenos (Galelli & Truffa-Bachi, 1993), além de induzirem a apoptose de algumas células (Voelter *et al*., 2000; Fu *et al*., 2011). Em nossos experimentos, observamos que a hemaglutinina de *T. hystrix* não foi mitogênica para linfócitos. Outras lectinas de plantas também apresentam essa característica, como a lectina de gérmen de trigo (WGA) (Kawakami *et al*., 1988). Em contrapartida, o peptídeo, na concentração de 37ng/mL, foi capaz de induzir um considerável aumento da expressão de mensagem para a citocina TGF-β por células esplênicas de camundongos. Na imunidade adaptativa, a citocina TGF-β na presença de IL-6, dependendo das condições do meio, pode induzir um perfil inflamatório na diferenciação de células TCD4 em Th17, em contrapartida, a ausência de IL-6, na presença da primeira citocina e dentre outros fatores, pode induzir um perfil imunossupressor de células T reguladoras (Treg). Neste estudo, não foram observados o aumento de mensagens para a citocina IL-6. Em contrapartida, foi observado um aumento substancial de mensagens para a citocina IL-10, principalmente por células esplênicas estimuladas com as concentrações mais altas do peptídeo de 740 a 370ng/mL. Devido ao fato de que esse aumento de mensagem

observado em análises de qPCR foi insuficiente para a detecção da citocina IL-10 em ensaios de dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA), chegamos à conclusão de que o peptídeo não induz um padrão de células Treg. Por outro lado, tendo em vista que células T apoptóticas e macrófagos podem produzir e secretar TGF-β (Fadok *et al*., 1998; Chen *et al*., 2001), a ausência de aumentos significativos de mensagens para outras citocinas nos fez investigarmos a hipótese de que este peptídeo estivesse induzindo a morte de células do sistema imunológico. Em experimento piloto realizado com iodeto de propídio (IP), observamos a diminuição significativa da viabilidade de macrófagos peritoneais (J774) estimulados com esta molécula a 2µg/mL após 24 horas de incubação (dados não mostrado). No entanto, estudos posteriores com o uso de um controle positivo para morte, assim como a marcação das células com anexina V para detecção de apoptose deverão ser realizados para confirmação dessa hipótese.

No presente projeto, identificamos um peptídeo com uma subunidade de aproximadamente 3kDa presente no extrato bruto do súber de *T. hystrix* que foi capaz de aglutinar eritrócitos dos 3 tipos sanguíneos humanos. Raramente, existem na literatura peptídeos com tal capacidade, isso porque geralmente aqueles que são homólogos às lectinas possuem somente um CRD. Apesar de pouco conhecidos, os estudos destes peptídeos e dos mecanismos pelos quais eles interagem com receptores de superfície celular, incluindo aqueles presentes em eritrócitos, podem abrir novas perspectivas para o entendimento à nível estrutural da interação de lectinas com os seus açucares ligantes, assim como para o desenvolvimento de nova drogas.

6 CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do presente trabalho, foi possível a obtenção de preparações solúveis, homogêneas e ativas do peptídeo presente no extrato bruto do súber de *T. hystrix*, denominado de Tabhys. Este peptídeo demonstrou: (1) aglutinar os três grupos sanguíneos de eritrócitos humanos, (2) interagir com polímeros de GlcNAcβ(1,4) (quitina), (3) ter especificidade por glicanas presentes na fetuína, independente de àcido siálico, (4) não ter especificidade pelos monossacarídeos D-glicose, D-manose e D-galactose, (5) ser constituído por estrutura molecular composta de apenas uma subunidade de massa molecular aproximada de 3kDa, com e sem a presença de agentes redutores, (6) não se associar com outras proteínas ou complexos proteicos, (7) ter homologia com fator 1-α de elongação em análises de pareamento dos peptídeos trípticos obtidos por espectrometria de massa com sequências gênicas ou proteicas disponíveis em bancos de dados, (8) não apresentar atividade antifúngica ou (9) mitogênica, e (10) induzir o aumento de mensagens para TGF-β em células esplênicas de camundongo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev bras farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

AGRA, M. F. *et al*. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Rev bras farmacogn**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, A. A.; KONNO, K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. **Annu Rev Ecol Evol Syst**, v. 40, p. 311-31, 2009.

AMINOFF, D.; MORGAN, W. T.; WATKINS, W. M. The isolation and properties of the human blood-group a substance. **Biochem J**, v. 46, n. 4, p. 426-38, 1950.

ASHWELL, G.; MORELL, A. G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 41, p. 99-128, 1974.

AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 54, n. 2, p. 396-9, 1965.

AUB, J. C.; TIESLAU, C.; LANKESTER, A. Reactions of Normal and Tumor Cell Surfaces to Enzymes. I. Wheat-Germ Lipase and Associated Mucopolysaccharides. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 50, p. 613-9, 1963.

BARKAI-GOLAN, R.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of Penicillia and Aspergilli. **Arch Microbiol**, v. 116, n. 2, p. 119-21, 1978.

BEINTEMA, J. J.; PEUMANS, W. J. The primary structure of stinging nettle (Urtica dioica) agglutinin. A two-domain member of the hevein family. **FEBS Lett**, v. 299, n. 2, p. 131-4, 1992.

BEKEREDJIAN-DING, I. *et al*. Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29806, 2012.

BOHLOOL, B. B.; SCHMIDT, E. L. Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium- legume root nodule symbiosis. **Science**, v. 185, n. 4147, p. 269-71, 1974.

BOUWMEESTER, K.; GOVERS, F. Arabidopsis L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles. **J Exp Bot**, v. 60, n. 15, p. 4383-96, 2009.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRAMBL, R.; GADE, W. Plant seed lectins disrupt growth of germinatiiig fungal spores. **Physiol. Plant**, v. 64, p. 402-408, 1985.

BROEKAERT, W. F. *et al*. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, v. 31, n. 17, p. 4308-14, 1992.

BUIST, G. *et al*. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. **Mol Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 838-47, 2008.

BUNDLE, D. R.; YOUNG, N. M. Carbohydrate-protein interactions in antibodies and lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 2, n. 5, p. 666-673, 1992.

CAMBI, A.; KOOPMAN, M.; FIGDOR, C. G. How C-type lectins detect pathogens. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 481-8, 2005.

CHANG, B. S.; HERSHENSON, S. Practical approaches to protein formulation development. **Pharm Biotechnol**, v. 13, p. 1-25, 2002.

CHEN, W. *et al*. TGF-beta released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 715-25, 2001.

CHEN, Y. *et al*. Jasmonic acid methyl ester induces the synthesis of a cytoplasmic/nuclear chito-oligosaccharide binding lectin in tobacco leaves. **FASEB J**, v. 16, n. 8, p. 905-7, 2002.

CHENG, R. P.; GELLMAN, S. H.; DEGRADO, W. F. beta-Peptides: from structure to function. **Chem Rev**, v. 101, n. 10, p. 3219-32, 2001.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 1991.

CLELAND, J. L.; POWELL, M. F.; SHIRE, S. J. The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. **Crit Rev Ther Drug Carrier Syst**, v. 10, n. 4, p. 307-77, 1993.

COLTRI, K. C. *et al*. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against Paracoccidioides brasiliensis infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, v. 173, n. 2, p. 423-32, 2008.

COLTRI, K. C. *et al*. Protection against *Paracoccidioides brasiliensis* infection conferred by the prophylactic administration of native and recombinant ArtinM. **Med Mycol**, v. 48, n. 6, p. 792-9, 2010.

DA SILVA, C. D. *et al*. Purification and characterization of a mannose recognition lectin from *Oreochromis niloticus* (tilapia fish): cytokine production in mice splenocytes. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, n. 2, p. 424-35, 2012.

DE OLIVEIRA SILVA, F. *et al*. Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell Tissue Res**, v. 346, n. 2, p. 237-44, 2011.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. J. M. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029-9053, 2015.

DIAS, R. O. *et al*. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519-41, 2015.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology**, v. 11, n. 5, p. 71R-9R, 2001.

DONG, Q. *et al*. Stimulation of IFN-gamma production by garlic lectin in mouse spleen cells: involvement of IL-12 via activation of p38 MAPK and ERK in macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 4, p. 309-16, 2011.

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

_____. Multiplicity of lectin-carbohydrate interactions. **Nat Struct Biol**, v. 2, n. 6, p. 437-9, 1995.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 237-64, 1993.

EDELMAN, G. M. *et al*. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 9, p. 2580-4, 1972.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends Biochem Sci**, v. 22, n. 12, p. 462-7, 1997.

ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A Revised Classification of the Apocynaceae s.l. **The Botanical Review**, v. 66, n. 1, p. 1-56, 200.

ETZLER, M. E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant Physiol**, v. 36, p. 209-234, 1985.

FADOK, V. A. *et al*. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J Clin Invest**, v. 101, n. 4, p. 890-8, 1998.

FIGUEIREDO, J. G. *et al*. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by D. rostrata lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 736-44, 2009.

FORZZA, R. C.; JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio, 2010. Disponível em: < http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/ >.

FOUQUAERT, E. *et al*. The "old" *Euonymus europaeus* agglutinin represents a novel family of ubiquitous plant proteins. **Plant Physiol**, v. 147, n. 3, p. 1316-24, 2008.

FOUQUAERT, E. *et al*. Proteins with an Euonymus lectin-like domain are ubiquitous in Embryophyta. **BMC Plant Biol**, v. 9, p. 136, 2009.

FOUQUAERT, E.; VAN DAMME, E. J. M. Promiscuity of the euonymus carbohydrate-binding domain. **Biomolecules**, v. 2, n. 4, p. 415-34, 2012.

FU, L. L. *et al*. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 10, p. 1442-9, 2011.

FU, J.; MOMČILOVIĆ, I.; VARA PRASAD, P. V. Roles of Protein Synthesis Elongation Factor EF-Tu in Heat Tolerance in Plants. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

GABIUS, H. J. *et al*. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 6, p. 298-313, 2011.

GABIUS, H. J. Animal and Human Lectins. In: FANG, E. F.; NG, T. B. (Ed.). **Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds**. Springer Netherlands, 2013. ISBN 978-94-007-6214-5.

GALELLI, A.; TRUFFA-BACHI, P. *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome. **J Immunol**, v. 151, n. 4, p. 1821-31, 1993.

GARCIA-RUBIO, L. H. Characterization of proteins during aggregation using turbidimetry. **Chemical Engineering Communications**, v. 80, p. 193-210, 1989.

GOLDSTEIN, I. J. *et al*. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, 1980.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation, Physicochemical, Characterization, and Carbohydrate – Binding Specificity of Lectins. In: LIENER, I. E.; SHARON, N. GOLDSTEIN, I. J. (Ed). **The Lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine.** Academic Press (MI), 1986.

GUPTA, G. S. Lectin: An overview. In:_____. **Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications**. Springer Vienna, 2012. ISBN 978-3-7091-1065-2.

GUST, A. A. *et al*. Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. **Trends Plant Sci**, v. 17, n. 8, p. 495-502, 2012.

HAJTO, T. *et al*. Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes in vitro and in vivo. **Natural Immunity**, v. 16, n. 1, p. 34-46, 1998.

HAMBLIN, J.; KENT, S. P. Possible role of phytohaemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. **Nat New Biol**, v. 245, n. 140, p. 28-30, 1973.

HAMID, R. *et al*. Lectins: Proteins with Diverse Applications. **J Appl Pharm Sci**, v. 3, p. S93-S103, 2013.

HANKINS, C. N.; KINDINGER, J. I.; SHANNON, L. M. The Lectins of *Sophora japonica*: II. Purification, Properties, and N-Terminal Amino Acid Sequences of Five Lectins from Bark. **Plant Physiol**, v. 86, n. 1, p. 67-70, 1988.

HOSTANSKA, K. *et al*. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **Nat Immun**, v. 14, n. 5-6, p. 295-304, 1995.

INBAR, M.; BEN-BASSAT, H.; SACHS, L. Membrane changes associated with malignancy. **Nat New Biol**, v. 236, n. 61, p. 3-4 passim, 1972.

INBAR, M.; SACHS, L. Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells. **Nature**, v. 223, n. 5207, p. 710-2, 1969.

JANZEN, D. H.; JUSTER, H. B.; LIENER, I. E. Insecticidal action of the phytohemagglutinin in black beans on a bruchid beetle. **Science**, v. 192, n. 4241, p. 795-6, 1976.

JIANG, L. *et al*. Expression, purification and characterization of a group of lectin-like peptides from the spider *Ornithoctonus huwena*. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 669-74, 2009.

JUDD, W. S. *et al*. Apocynaceae. In:_____. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. ISBN 9788536317557.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J Immunol Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.

KAWAKAMI, K.; YAMAMOTO, Y.; ONOUE, K. Effect of wheat germ agglutinin on T lymphocyte activation. **Microbiol Immunol**, v. 32, n. 4, p. 413-22, 1988.

KNOGGE, W.; SCHEEL, D. LysM receptors recognize friend and foe. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 29, p. 10829-30, 2006.

KOHARUDIN, L. M.; FUREY, W.; GRONENBORN, A. M. A designed chimeric cyanovirin-N homolog lectin: structure and molecular basis of sucrose binding. **Proteins**, v. 77, n. 4, p. 904-15, 2009.

KOHARUDIN, L. M. *et al*. The evolutionarily conserved family of cyanovirin-N homologs: structures and carbohydrate specificity. **Structure**, v. 16, n. 4, p. 570-84, 2008.

KOO, J. C. *et al*. Two hevein homologs isolated from the seed of *Pharbitis nil L*. exhibit potent antifungal activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1382, n. 1, p. 80-90, 1998.

KUROSAKA, A. *et al*. The structure of a neural specific carbohydrate epitope of horseradish peroxidase recognized by anti-horseradish peroxidase antiserum. **J Biol Chem**, v. 266, n. 7, p. 4168-72, 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LANNOO, N.; PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. The presence of jasmonate-inducible lectin genes in some but not all Nicotiana species explains a marked intragenus difference in plant responses to hormone treatment. **J Exp Bot**, v. 57, n. 12, p. 3145-55, 2006.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 2, p. 190-201, 2010.

_____. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front Plant Sci**, v. 5, p. 397, 2014.

LANNOO, N. *et al*. The jasmonate-induced expression of the *Nicotiana tabacum* leaf lectin. **Plant Cell Physiol**, v. 48, n. 8, p. 1207-18, 2007.

LEE, H. I.; BROEKAERT, W. F.; RAIKHEL, N. V. Co- and post-translational processing of the hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **J Biol Chem**, v. 266, n. 24, p. 15944-8, 1991.

LI, J. *et al*. Odorranalectin is a small peptide lectin with potential for drug delivery and targeting. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2381, 2008.

LIANG, S. P.; PAN, X. A lectin-like peptide isolated from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena*. **Toxicon**, v. 33, n. 7, p. 875-82, 1995.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. **Chem Rev**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** Nova Odessa, SP: Instituto Platarum, v. 2, 2002.

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

LORIS, R. *et al*. Legume lectin structure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36, 1998.

MANDAL, C.; MANDAL, C. Sialic acid binding lectins. **Experientia**, v. 46, n. 5, p. 433-41, 1990.

MARQUARDT, A.; BERNEVIC, B.; PRZYBYLSKI, M. Identification, affinity characterisation and biological interactions of lectin-like peptide-carbohydrate complexes derived from human TNF-alpha using high-resolution mass spectrometry. **J Pept Sci,** v. 13, n. 12, p. 803-10, 2007.

MATEYAK, M. K.; KINZY, T. G. eEF1A: thinking outside the ribosome. **J Biol Chem**, v. 285, n. 28, p. 21209-13, 2010.

MILANEZI, M. **Caracterização bioquímica da lectina de *Tabernaemontana hystrix* e de sua atividade estimuladora de células do sistema imunológico.** Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

MIYA, A. *et al*. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 49, p. 19613-8, 2007.

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

MORGAN, W. T.; WATKINS, W. M. Unravelling the biochemical basis of blood group ABO and Lewis antigenic specificity. **Glycoconj J**, v. 17, n. 7-9, p. 501-30, 2000.

MOVAFAGH, A. *et al*. The structure Biology and Application of Phytohemagglutinin (PHA) in Phytomedicine: With special up-to-date references to lectins. **JPS**, v. 4, 2013.

MURAILLE, E. *et al*. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cell Immunol**, v. 191, n. 1, p. 1-9, 1999.

NAEEM, A.; SALEEMUDDIN, M.; KHAN, R. H. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology. **Curr Protein Pept Sci**, v. 8, n. 3, p. 261-71, 2007.

NILSSON, B.; NORDEN, N. E.; SVENSSON, S. Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin. **J Biol Chem**, v. 254, n. 11, p. 4545-53, 1979.

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

ODINTSOVA, T. I. *et al*. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif. **FEBS J**, v. 276, n. 15, p. 4266-75, 2009.

PANUNTO-CASTELO, A. *et al*. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, n. 12, p. 1035-42, 2001.

PARK, C.; NOVAK, J. T. Characterization of lectins and bacterial adhesins in activated sludge flocs. **Water Environ Res**, v. 81, n. 8, p. 755-64, 2009.

PELLETIER, M. *et al*. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. **Clin Immunol**, v. 101, n. 2, p. 229-36, 2001.

PERCUDANI, R.; MONTANINI, B.; OTTONELLO, S. The anti-HIV cyanovirin-N domain is evolutionarily conserved and occurs as a protein module in eukaryotes. **Proteins**, v. 60, n. 4, p. 670-8, 2005.

PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; VAN DAMME, E. J. M. Artin M: a rational substitution for the names artocarpin and KM+. **Immunol Lett**, v. 119, n. 1-2, p. 114-5, 2008.

PEUMANS, W. J.; DE LEY, M.; BROEKAERT, W. F. An unusual lectin from stinging nettle (Urtica dioica) rhizomes. **FEBS Lett**, v. 177, n. 5, p. 99-103, 1984.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.

_____. Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.15, n. 1, p. 199-228, 1998.

PEUMANS, W. J. *et al*. Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). **FEBS Lett**, v. 396, n. 2-3, p. 261-5, 1996.

PEUMANS, W. J. *et al*. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Adv Exp Med Biol**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PEUMANS, W. J. *et al*. The liverwort *Marchantia polymorpha* expresses orthologs of the fungal *Agaricus bisporus* agglutinin family. **Plant Physiol**, v. 144, n. 2, p. 637-47, 2007.

PILOBELLO, K. T.; MAHAL, L. K. Lectin microarrays for glycoprotein analysis. **Methods Mol Biol**, v. 385, p. 193-203, 2007.

PONTING, C. P. *et al*. Eukaryotic signalling domain homologues in archaea and bacteria. Ancient ancestry and horizontal gene transfer. **J Mol Biol,** v. 289, n. 4, p. 729-45, 1999.

PORTO, W. F. *et al*. In silico identification of novel hevein-like peptide precursors. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 127-36, 2012.

QUINET, C. G. P.; ANDREATA, R. H. P. Estudo taxonômico e morfológico das espécies de Apocynaceae Adans. na reserva Rio das Pedras, município de Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. São Leopoldo: Instituto Anchietano de Pesquisas, **Pesquisas**, **Botânica**, n.56, p.13-74, 2005.

RAPINI, A. **Sistemática: estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais**. 2000. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RINI, J. M. Lectin structure. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v. 24, p. 551-77, 1995.

RIPOLL, C. *et al*. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, p. 517-523, 2003.

RUAS, L. P.; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. ArtinM offers new perspectives in the development of antifungal therapy. **Front Microbiol**, v. 3, p. 218, 2012.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J**, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001.

SANTOS, A. C. B. *et al*. Levantamento etnobotânico, químico e farmacológico de espécies de Apocynaceae Juss. ocorrentes no Brasil. **Rev Bras Pl Med**, v. 15, n. 3, p. 442-458, 2013.

SELA, B. A. *et al*. Quantitation of N-acetyl-D-galactosamine-like sites on the surface membrane of normal and transformed mammalian cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 249, n. 2, p. 564-8, 1971.

SELL, A. M.; DA COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SCHLUMBAUM, A. Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, v. 324, p. 365-367, 1986.

SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J Biol Chem**, v. 282, n. 5, p. 2753-64, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science,** v. 177, n. 4053, p. 949-59, 1972.

_____. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-34, 1989.

_____. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **FASEB J**, v. 4, n. 14, p. 3198-208, 1990.

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

SHARON, N.; LIS, H. History. In:_____. **Lectins**. Springer Netherlands, 2007. ISBN 978-1-4020-6605-4.

SHIBUYA, N. *et al*. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. **J Biol Chem**, v. 263, n. 2, p. 728-34, 1988.

SINGH, P.; ZIMMERLI, L. Lectin receptor kinases in plant innate immunity. **Front Plant Sci**, v. 4, p. 124, 2013.

SINHA, S. *et al*. Subunit assembly of plant lectins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 17, n. 5, p. 498-505, 2007.

SOFUNI, T.; YOSHIDA, M. C. Combined use of several mitogens for mitotic stimulation to human lymphocytes. **J Radiat Res**, v. 33 Suppl, p. 222-30, 1992.

SOUZA, J. J. *et al*. Two New Indole Alkaloids from *Tabernaemontana hystrix* Steud. (Apocynaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 422-429, 2010.

SOUZA, M. A. *et al*. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**, v. 30, n. 7, p. 641-57, 2013.

SPIRO, R. G.; BHOYROO, V. D. Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. **J Biol Chem**, v. 249, n. 18, p. 5704-17, 1974.

STIRPE, F.; BATTELLI, M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 16, p. 1850-66, 2006.

STOJANOVIC, M. M. *et al*. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. **Int Immunopharmacol**, v. 10, n. 1, p. 120-9, 2010.

SUMNER, J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **J Bacteriol**, v. 32, n. 2, p. 227-37, 1936.

SWAMY, M. *et al*. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. **Sci STKE**, v. 2006, n. 345, p. pl4, 2006.

TAKAHASHI, N. *et al*. New N-glycans in horseradish peroxidase. **Anal Biochem**, v. 255, n. 2, p. 183-7, 1998.

TEICHBERG, V. I. *et al*. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 4, p. 1383-7, 1975.

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

TRINDADE, M. B. **Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *Artocarpus*.** Programa de Pós-graduação em Física Aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

TSIVION, Y.; SHARON, N. Lipid-mediated hemagglutination and its relevance to lectin-mediated agglutination. **Biochim Biophys Acta**, v. 642, n. 2, p. 336-44, 1981.

VAID, N.; MACOVEI, A.; TUTEJA, N. Knights in action: lectin receptor-like kinases in plant development and stress responses. **Mol Plant**, v. 6, n. 5, p. 1405-18, 2013.

VAID, N.; PANDEY, P. K.; TUTEJA, N. Genome-wide analysis of lectin receptor-like kinase family from Arabidopsis and rice. **Plant Mol Biol**, v. 80, n. 4-5, p. 365-88, 2012.

VAN DAMME, E. J. M.; BROEKAERT, W. F.; PEUMANS, W. J. The *Urtica dioica* Agglutinin Is a Complex Mixture of Isolectins. **Plant Physiol**, v. 86, n. 2, p. 598-601, 1988.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. A lectin and a lectin-related protein are the two most prominent proteins in the bark of yellow wood (*Cladrastis lutea*). **Plant Mol Biol**, v. 29, n. 3, p. 579-98, 1995a.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. The bark of *Robinia pseudoacacia* contains a complex mixture of lectins. Characterization of the proteins and the cDNA clones. **Plant Physiol**, v. 107, n. 3, p. 833-43, 1995b.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur J Biochem**, v. 236, n. 2, p. 419-27, 1996.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Mol Biol**, v. 33, n. 3, p. 523-36, 1997a.

_____. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends Plant Sci**, v. 9, n. 10, p. 484-9, 2004.

VAN DAMME, E. J. M.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconj J**, v. 14, n. 4, p. 449-56, 1997b.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit Rev Plant Sci**, v.17, n. 6, p. 575–692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. Ribosome-Inactivating Proteins: A Family of Plant Proteins that do more than inactivate ribosomes. **Crit Rev Plant Sci**, v. 20, n. 5, p. 395-465, 2001.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. Two distinct jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of the black mulberry tree. **Plant Physiol**, v. 130, n. 2, p. 757-69, 2002.

VAN DAMME, E. J. M. *et al*. A novel family of lectins evolutionarily related to class V chitinases: an example of neofunctionalization in legumes. **Plant Physiol**, v. 144, n. 2, p. 662-72, 2007.

VAN DAMME, E. J. M. Plant Lectins as Part of the Plant Defense System Against Insects In: SCHALLER, A. (Ed.). **Induced Plant Resistance to Herbivory**. Springer Netherlands, 2008. ISBN 978-1-4020-8182-8.

VAN DEN BERGH, K. P. B *et al*. Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). **FEBS Lett**, v. 530, p. 181-185, 2002.

VAN PARIJS, J. *et al*. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-64, 1991.

VARKI, A.; FREEZE, H. H.; GAGNEUX, P. Evolution of Glycan Diversity. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D., *et al* (Ed.). **Essentials of Glycobiology**. 2nd. Cold Spring Harbor (NY), 2009. ISBN 9780879697709.

VOELTER, W. *et al*. Complete Structural Characterization of a Chitin-Binding Lectin from Mistletoe Extracts. **Journal für praktische Chemie**, v. 342, n. 8, p. 812-818, 2000.

WAN, J. *et al*. A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 20, n. 2, p. 471-81, 2008.

WANG, W. *et al*. Leaves of the Lamiaceae species *Glechoma hederacea* (ground ivy) contain a lectin that is structurally and evolutionary related to the legume lectins. **Plant J**, v. 33, n. 2, p. 293-304, 2003.

WANG, X. W. *et al*. Collaboration between a soluble C-type lectin and calreticulin facilitates white spot syndrome virus infection in shrimp. **J Immunol**, v. 193, n. 5, p. 2106-17, 2014.

WHISLER, R. L.; YATES, A. J. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I. Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. **J Immunol**, v. 125, n. 5, p. 2106-11, 1980.

WITITSUWANNAKUL, R. *et al*. A role for a Hevea latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 339-47, 2008.

WITTMANN, V.; PIETERS, R. J. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates. **Chem Soc Rev**, v. 42, n. 10, p. 4492-503, 2013.

WRIGHT, C. S. The crystal structure of wheat germ agglutinin at 2-2 A resolution. **J Mol Biol**, v. 111, n. 4, p. 439-57, 1977.

_____. New folds of plant lectins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 7, n. 5, p. 631-6, 1997.

WUHRER, M. *et al*. New features of site-specific horseradish peroxidase (HRP) glycosylation uncovered by nano-LC-MS with repeated ion-isolation/fragmentation cycles. **Biochim Biophys Acta**, v. 1723, n. 1-3, p. 229-39, 2005.

YODER, L. R.; MAHLBERG, P. G. Reactions of Alkaloid and Histochemical Indicators in Laticifers and Specialized Parenchyma Cells of *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). **American Journal of Botany**, v. 63, n. 9, p. 1167-1173, 1976.

ZHANG, W. *et al*. Isolation and characterization of a jacalin-related mannose-binding lectin from salt-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. **Planta**, v. 210, n. 6, p. 970-8, 2000.

ZHAO, M. *et al*. A hevein-like protein and a class I chitinase with antifungal activity from leaves of the paper mulberry. **Biomed Chromatogr**, v. 25, n. 8, p. 908-12, 2011.

ZHU, J. K. *et al*. A higher plant extracellular vitronectin-like adhesion protein is related to the translational elongation factor-1 alpha. **Plant Cell**, v. 6, n. 3, p. 393-404, 1994.