UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

HELINE HELLEN TEIXEIRA MOREIRA

Endocitose e transporte intracelular de isoformas da pulchellina

São Carlos
2017

HELINE HELLEN TEIXEIRA MOREIRA

Endocitose e transporte intracelular de isoformas da pulchellina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dra .Ana Paula Ulian Araujo.

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2017

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

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Moreira, Heline Hellen Teixeira
Endocitose e transporte intracelular de isoformas
da pulchellina / Heline Hellen Teixeira Moreira;
orientador Ana Paula Ulian de Araujo - versão
corrigida -- São Carlos, 2017.
97 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2017.

1. Pulchellina. 2. RIP. 3. Endocitose. 4.
Transporte intracelular. I. Araujo, Ana Paula Ulian
de, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo todo o apoio durante essa jornada.

A todos meus amigos, colegas e companheiros: Flávio, Mariana Melo, Mariana Laureano, Cyntia, Nydy, Juliana, Thaty, Naty Mesquita, Naty, Tati, Luana, Ju Crusca, Crusca, Andressa, Helo, Sinara, Tom, Meneghello, Carla, Zé Luiz, Raissa, Aninha, Ana Eliza, Paty, Militar e Diego. Obrigada pela amizade, pelo apoio e ajuda no Trabalho.

Às técnicas da Biofísica Andressa e Bel, muito obrigada pela ajuda e apoio.

Ao grupo de Biofísica e ao IFSC pela estrutura e acolhimento.

A minha orientadora Ana Paula Ulian Araújo que muito me ensinou e ajudou no trabalho.

Ao professor Francisco Guimarães e seu aluno de doutorado Fernando Tsutae pela colaboração realizada.

A professora Kirsten Sandvig, a seus pos-doc Jonas e Anne Berit e a técnica Anne Grethe por me acolher e me ajudar em diversos aspectos desse trabalho. Foi maravilhosa a experiência e a colaboração.

A CAPES pelo suporte financeiro

“The tragedy of life is not death... but
what we let die inside of us while we live”

Norman Cousins

RESUMO

MOREIRA, H, H, T. **Endocitose e transporte intracelular de isoformas da pulchellina**. 2017. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A pulchellina é uma glicoproteína heterodimérica com duas cadeias, pertencente à família das proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2. A cadeia A é enzimaticamente ativa e é capaz de remover uma adenina da porção 28S do rRNA; a cadeia B é uma lectina que se liga a resíduos de D-Galactose terminais, presentes na membrana. Das 4 isoformas da pulchellina (PI, PII, PIII, PIV), PII é a mais tóxica *in vivo*, sendo a atividade catalítica da cadeia A similar para todas as isoformas. A interação da cadeia B com os glicoreceptores de membrana e seu consequente processo de endocitose é crucial para que cadeia A tóxica entre na célula e torne-se disponível para atuar no seu sítio ribossomal. Assim, visando explorar e encontrar potenciais diferenças no mecanismo de ligação à célula e de endocitose das isoformas, foram realizados experimentos usando microscopia confocal com as toxinas marcadas com Alexa flúor® em células HeLa e MV3. As imagens obtidas mostraram que PII localiza-se na região perinuclear das células enquanto PIV predomina na região cortical. Esses resultados sugeriram que as isoformas apresentam distintos mecanismos de entrada e transporte nas células. Para esclarecer tal questão, a ação da pulchellina em células HeLa tratadas com diversas drogas que atuam em diferentes rotas endocíticas e de translocação, foi monitorada. Os resultados de inibição de síntese proteica mostraram que as células sofrem proteção contra a pulchellina na presença de brefeldina A, indicando que a pulchellina necessita ser transportada via Golgi para executar sua função. Inibidores de glicosilação como tunicamicina, swainsonine e inibidores de síntese proteica, como a puromicina e cicloheximidina sensibilizaram as células à PII e PIV, mas em diferentes taxas. Por outro lado, a puromicina e a cicloheximidina não afetaram a taxa de endocitose das isoformas, o que indica que a pulchellina na ausência dos inibidores compete pelo transporte ou processamento de glicoproteínas recém-sintetizadas. Experimentos de ligação e captação da pulchellina mostraram que PII apresenta 30% menos afinidade pela superfície de células HeLa que PIV, além de apresentar menor taxa endocítica. Esses dados corroboram estudos de FCS (espectroscopia de correlação e fluorescência) que identificaram que a difusão de PIV em células HeLa é maior que de PII. Nos experimentos realizados com inibidores de dinamina, ambas isoformas tiveram as suas taxas de endocitose aumentadas, indicando um efeito compensatório para via endocítica independente de dinamina. Em células incubadas com PDMP e neuraminidase, PIV mostrou uma associação às células reduzida, enquanto PII não se alterou, indicando que PIV pode necessitar de esfingolipídeos e glicocomplexos contendo ácido siálico para ligar e se internalizar nas células testadas. Para investigar essa diferença na interação foram realizados ensaios *in vitro* de DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura) e SPR (ressonância plasmônica de superfície) com as isoformas isoladas. Esses ensaios mostraram que PIV e PII apresentam interações distintas com o gangliosídeo GM1, sendo que a PIV interage mais hidrofobicamente e com uma maior taxa de associação com GM1 que a PII.

Palavras-chave: Pulchellina. RIP. Endocitose. Transporte intracelular.

ABSTRACT

MOREIRA, H, H, T. **Endocytosis and cell transport of pulchellin isoforms.** 2017. 97 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Pulchellin is a heterodimeric toxin found in *Abrus pulchellus* seeds. It is a type 2 ribosome inactivating protein, which consists of a toxic A-chain linked to a sugar binding B-chain. The B-chain mediates its binding to the galactose residues on the cellular membrane in a process that is then followed by an endocytic uptake. Once the A-chain reaches the cytosol it inhibits protein synthesis leading to cell death. In order to explore pulchellin isoforms II and IV (PII and PIV) cell entry and transport mechanisms, experiments monitoring toxin labelled with Alexafluor® in MV3 and HeLa cells were performed using confocal microscopy. We have investigated the pulchellin action in pre-treated HeLa cells with several drugs, targeting different endocytic and translocation routes. Confocal images showed PII tends to be localized in cell's cortical region and PIV tend to be localized in cell's perinuclear region, suggesting that isoforms have different cell entry and transport mechanisms. The protein synthesis inhibition results showed that brefeldin A protects cells against the toxic effect of pulchellin, which indicates the pulchellin needs to be transported to Golgi to perform its toxic effect. When HeLa cells were incubated with protein synthesis inhibitors, such as puromycin and cycloheximidine and glycosilation inhibitors such as tunicamycin, swainsonine, they were sensitized to pulchellin, but to different extent for PII and PIV. Binding and uptake experiments showed that PII exhibits 30% less affinity than PIV on HeLa cells surface, PII also has lower endocytic rate than PIV in the cells. These data corroborate with FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) results, which identified that PIV diffuses faster than PII into the cells. Dynamine inhibitors increased endocytosis rates in both isoforms, indicating that pulchellin is upregulating the dynamine-independent endocytosis, possibly pulchellin is being internalized into the cells by alternative endocytic routes. When HeLa cells were incubated with PDMP and neuraminidase, PIV showed a reduced cell association compared with PII and control, indicating that PIV may require glycocomplexes and sphingolipids containing sialic acid to enter into the cells. DSC (Differential Scanning Calorimetry) and SPR (Surface Plasmon Ressonance) experiments using biomimetic membranes were performed using GM1 ganglioside to check this interaction. The results showed PIV and PII interact with GM1. This results also evidence PIV interact more hidrophobically and with a higher association rate on GM1 than PII.

Keywords: Pulchellin. RIP. Endocytosis. Cell transport.

SUMARIO

1	Introdução	13
1.1	Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs)	13
1.2	Internalização e transporte intracelular das RIPs	17
1.2.1	Captação endocítica das RIPs	22
1.2.2	Transporte da RIPs através do aparelho de Golgi para o RE	25
1.2.3	Transporte das RIPs do ER para o citosol.....	28
1.3	Aplicações das RIPs	29
1.4	A pulchellina.....	30
2	Objetivos.....	33
3	Metodologia.....	35
3.1	Obtenção das proteínas nativas (Isoformas).....	35
3.3	Medidas de Endocitose	37
3.4	Estudos por microscopia confocal	39
3.4.1	Interação das diferentes isoformas da pulchellina com a membrana plasmática (células fixadas)	39
3.4.2	Avaliação comparativa do processo de endocitose e tráfego intracelular das isoformas	39
3.4.3	Avaliação do tempo que as toxinas levam para alcançar o aparelho de Golgi	40
3.5	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	40
3.6	Ensaio de hemaglutinação - Inibição da hemaglutinação na presença de açúcares	43
3.7	Ressonância plasmônica de superfície (SPR).....	44
3.8	Espectroscopia de correlação e fluorescência (FCS)	46
4	Resultados.....	47
4.1	Estudos com confocal	47
4.2	Ensaio de citotoxicidade-Inibição da síntese proteica.....	53
4.3	Endocitose da pulchellina II e IV	60
4.4	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	66
4.5	Ensaio de hemaglutinação - Inibição da hemaglutinação na presença de açúcares	71
4.6	Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	71
4.7	Espectroscopia de correlação e fluorescência (FCS)	74
5	Discussão	77
6	Conclusões.....	81
	REFERÊNCIAS	83

1 Introdução

1.1 Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs)

As RIPs são um conjunto de enzimas que têm a propriedade de danificar ribossomos de maneira irreversível. As RIPs tipo 2, possuem duas cadeias, a cadeia A que é enzimaticamente ativa; e a cadeia B que é uma lectina que se liga à resíduos de D-Galactose terminais. A cadeia A catalisa especificamente a clivagem da ligação *N*-glicosídica entre uma ribose e uma adenina, causando uma depurinação numa sequência conservada no final da porção 3' do *loop* da subunidade 28S dos rRNAs eucarióticos (figura 1).¹ O trabalho de Endo e colaboradores em 1987¹ mostrou que todos os resíduos de adenina clivados (A_{4324} , em ribossomos de fígado de ratos), estavam situados em um *loop* exposto da sequência específica do RNA ribossomal. Essa sequência "GAGA" conservada foi nomeada de *loop* sarcina/ricina. Assim, o efeito das RIPs na célula promove um dano irreparável ao ribossomo, que impedirá a ligação dos fatores de alongação EF-1 e EF-2. Esses fatores estão envolvidos na ligação do aminoacil-RNAt na catálise e hidrólise do GTP e translocação, desse modo bloqueando a etapa de alongação na tradução e, conseqüentemente levando parada da síntese proteica.² Uma molécula de ricina ou abrina é capaz de inativar mais de 100 ribossomos por minuto, levando as células a se tornarem inaptas de rearranjar ribossomos em tempo adequado.³ A maioria das RIPs são produzidas por plantas e parecem estar envolvidas em mecanismos de defesa contra parasitas e vírus com alguns exemplos amplamente estudados, como a ricina, a abrina e as saporinas.⁴ Já RIPs de bactérias como a shiga-toxina e a cólera toxina são produzidas como fatores de virulência, que visam a patogenicidade e reprodução no organismo infectado.⁵⁻⁶ A administração dessas toxinas, por injeção, ingestão ou inalação pode ser letal em pequenas doses, causando uma inibição irreversível da síntese proteica das células acompanhada de necrose aguda nos órgãos e tecidos do indivíduo.⁷

Figura 1 - Esquema representativo da atividade N-glicosilase das RIPs no ribossomo eucarioto. A atuação das RIPs na porção GAGA do loop sarcina/ ricina da subunidade 28S do ribossomo é marcada pela depurinação da adenosina no RNAr.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante 20 anos acreditou-se que as células afetadas pelas RIPs sofriam apoptose por conta do estresse ribotóxico. Porém, com o passar dos anos novas pesquisas foram mostrando que as RIPs exibem outras propriedades que contribuem para citotoxicidade, como a atividade polinucleotídica adenosina glicosilase (APG).^{1,8-9} As RIPs também podem liberar mais de um resíduo de adenina dos ribossomos, podendo, além disso, atuar em espécies de RNA fora do RNA ribossomal e em regiões poli A.¹⁰ No entanto, a eficiência dessa atividade APG é significativamente menor comparada com a atividade RNA N-glicosilase nos ribossomos, fazendo com que a ação citotóxica não possa ser justificada atividade APG. Ainda foi observado que a ricina e shiga toxina inibem a recuperação de lesões no DNA causadas por H₂O₂,¹¹ mostrando que a cadeia A independente da inibição de síntese proteica apresenta outras atividades.¹² Mais tarde, alguns trabalhos reportaram a indução do dano do DNA realizada pela cadeia A, através da remoção da adenina do DNA e ativação da rota mitocondrial da morte celular.¹³ De

qualquer modo, o fato das RIPs depurinarem também DNA e outros ácidos nucleicos abriu novas perspectivas sobre o mecanismo de como essas toxinas atuam. Porém, ainda é incerto a maneira exata como essas toxinas podem causar morte celular, pois muitas atividades enzimáticas vêm lhes sendo atribuídas.¹⁴

Mais de 100 tipos de RIPs já foram isoladas de variados tipos de plantas e bactérias e são comumente classificadas em três grupos, de acordo com suas características estruturais.¹⁵

RIPs do tipo 1: a maioria das RIPs descobertas até agora são do tipo 1 e a maior parte é oriunda de espécies de vegetais, como das famílias Caryophyllaceae, Cucurbitaceae e Euphorbiaceae.¹⁵ Enquanto as RIPs tipo 2 podem ser muito tóxicas devido a presença da cadeia B lectínica, as RIPs tipo 1 são bem menos tóxicas. Essa baixa atividade tóxica não é devido a sua ineficiência em inativar ribossomos, mas sim pela sua ineficiência de entrar na célula dada a ausência da cadeia B: as RIP tipo 1 possuem apenas a cadeia catalítica. Por esse fato há RIPs tipo 1 no espinafre e tomate, mas pode-se consumi-los de forma crua, sem o receio de que possam causar algum dano ao organismo, embora isso não seja geral para todas as RIPs tipo 1.¹⁶

Vários tipos de RIPs tipo 1 têm sido estudadas incluindo a gelonina, tricosantina, mormodina e PAP, mas a melhor caracterizada é a saporina que é extraída da *Saponaria officinalis*. A estrutura da cadeia A da saporina é muito similar com a cadeia A das RIPs tipo 2,¹⁷ possuindo aproximadamente 30 kDa, sendo enzimas monoméricas que apresentam uma única cadeia e também um único domínio RNA *N*-glicosilase.¹⁸ Como já mencionado a ausência da cadeia B, em geral, significa baixa toxicidade na maioria das células, o que não é o caso da saporina. Existem evidências que a saporina estimula a endocitose ligando-se a superfície de receptores macroglobulina $\alpha 2$.¹⁹ Uma vez internalizada, a saporina é levada ao citosol através de uma rota, que a cadeia A da ricina usa, que utiliza um mecanismo independente de Golgi que não requer baixo pH para translocação na membrana.²⁰

As RIPs do tipo 2: são em geral isoladas de plantas e apresentam alta toxicidade, como a ricina, abrina, modicina, volquesina e pulchellina, entre outras. Consistem em proteínas heterodiméricas tóxicas com propriedades lectínicas e

enzimáticas em subunidades polipeptídicas separadas, com o polipeptídeo com atividade catalítica RIP, a cadeia A, que possui por volta de 30 kDa, ligada por uma ligação dissulfeto à uma cadeia lectina, a cadeia B, que apresenta por volta de 35kDa.^{19,21} Para a RIP poder exercer seu efeito tóxico e atingir seu alvo ribossomal é necessário que a proteína consiga ser transportada através da membrana celular. Para isso a cadeia A precisa de um segundo domínio, a cadeia B, que é inerente as RIPs tipo 2. Dessa forma, a cadeia lectínica pode se ligar à resíduos de carboidratos, como N-acetil-galactosamina, ou menos frequentemente, ao ácido N-acetil-neuramínico ^{14,22} na superfície de células eucarióticas e mediar a endocitose da cadeia A. Assim, a toxina é internalizada por diferentes mecanismos para o interior da célula, sendo então transportada via aparelho de Golgi e retículo endoplasmático para ser translocada para o citosol.²³ No citosol, esta proteína atingirá seu substrato ribossomal e impedirá a síntese proteica, levando a irreversível morte da célula.²⁴

As RIPs do tipo 3: são sintetizadas como precursores inativos que requerem um processamento proteolítico entre os aminoácidos envolvidos na formação do sítio ativo.²⁵ São encontradas no milho (b-32) e na cevada (JIP60). A b-32 é sintetizada como pro-enzima inativa e é ativada após a remoção de um peptídeo interno, gerando assim 2 segmentos de 16.5kDa e 8.5kDa, que aparentemente agem como N-glicosilase.²⁶ A JIP60 possui um domínio amino terminal com uma estrutura semelhante as RIPs tipo 1, que é ligado a um domínio carboxi terminal, que apresenta similaridade com o fator de iniciação de tradução eucariótico 4E ²⁷. Devido a essas diferenças estruturais, essas proteínas citadas não podem ser classificadas como RIPs tipo 1.^{13,16-28}

A ricina foi isolada pela primeira vez em 1888, pelo cientista alemão H Stillmark no seu trabalho de doutorado. O mesmo grupo de pesquisa também identificou a abrina como uma toxina.¹⁵⁻¹⁶ Experimentos iniciais mostraram que essas duas toxinas purificadas quando em contato com sangue, levavam ao processo de aglutinação e assim imaginou-se que a causa da toxicidade era em função da aglutinação dos eritrócitos. Mais tarde em 1891, um outro cientista, P. Ehrlich relatou em seu trabalho, que essas toxinas necessitam se fixar no tecido, sugerindo que a toxina apresentava um região ligante e outra região tóxica. Com a resolução de estruturas cristalográficas essa hipótese foi confirmada, mostrando a

toxina composta por duas regiões, cadeia A e B com distintas funções e ligadas por uma ponte dissulfeto.²⁹⁻³¹

Suposições sobre a ocorrência de transferência gênica horizontal entre bactérias e plantas foram levantadas para tentar explicar a origem das RIPs, com base em evidências estruturais e genéticas. Alguns elementos estruturais das RIPs tipo 1, não relacionados ao domínio N-glicosilase, são encontrados em proteínas ligantes de RNA, como na transcriptase retroviral e RNase H de *Escherichia coli*.³² Além disso, as toxinas de plantas e bactérias possuem até 14% de identidade sequencial, dando suporte para que alguma transferência gênica horizontal pudesse ter acontecido.³³⁻³⁴ Porém, um trabalho recente sugere que a origem dos genes de RIPs tenha um ancestral comum, pois a presença do domínio de RIPs foi detectada em bactérias, archae e eucariotos, levando à suposição que uma série de genes parálogos de RIPs existiam antes desses 3 domínios divergirem. Isso suporta a ideia de que não ocorreu transferência gênica horizontal do domínio das RIPs entre bactérias e plantas.³⁴⁻³⁵

1.2 Internalização e transporte intracelular das RIPs

Não se sabe ao certo qual o mecanismo pelo qual as RIPs são internalizadas nas células. Porém, vários trabalhos apontam que cada tipo de RIPs apresentam preferências de vias específicas para ser internalizadas e transportadas.³⁶ Para RIPs do tipo I acredita-se que a entrada aconteça por meio da interação dos grupos glicosil das cadeias laterais dos açúcares com receptores presentes na membrana,³⁷⁻³⁸ sendo internalizadas pela endocitose de fase fluída.³⁹ Para RIPs do tipo 2, a cadeia B (lectina) liga-se aos receptores galactosil na superfície celular, permitindo que a entrada da toxina no citosol seja realizada por endocitose mediada por receptor.¹⁶ Algumas toxinas bacterianas como a toxina do antrax e da difteria acessam o citosol em função do baixo pH endossomal, já para as toxinas RIP tipo 2 como abrina, ricina, shiga e cólera toxina, os endossomas sofrem transporte retrógrado via aparelho de Golgi até o retículo endoplasmático (RE), antes que a cadeia A possa entrar no citosol.⁴⁰

A maioria das células apresentam em sua membrana milhões de potenciais receptores, como glicoproteínas ou glicolípídeos com resíduos terminais aos quais as RIPs podem se ligar. Uma vez ligadas aos receptores, as toxinas podem entrar na célula por diversos mecanismos de pinocitose (descritos na figura 2) que podem envolver ou não a presença de uma GTPase chamada dinamina. A dinamina é uma molécula que participa de alguns dos processos endocíticos, estando principalmente envolvida na cisão das vesículas recém formadas oriundas da membrana plasmática, e na fusão com outros compartimentos, como o aparelho de Golgi e vesículas cobertas por cavéola, provenientes da superfície da célula. A macropinocitose é independente de dinamina e as endocitoses clatrina e cavéola-dependentes são dependentes de dinamina. Já as endocitoses clatrina e cavéola-independentes podem ser ou não dependentes de dinamina, como esquematizado na figura 3.⁴¹ Após ser empacotada em vesículas, a toxina pode ser subsequentemente conduzida para vesículas endossomais precoces.⁴²⁻⁴³

Figura 2 -. Tipos de endocitose, fagocitose e pinocitose, que podem ocorrer nas células. A pinocitose é subdivida em macropinocitose e endocitose clatrina-dependente, cavéola independente e endocitose clatrina e cavéola-independentes. Em células especializadas, grandes partículas são endocitadas via fagocitose, enquanto que a captação de fluidos é realizada por macropinocitose e ambos os processos são dependentes de actina. A maioria das partículas endocitadas são transportadas para os endossomas precoces por via vesicular (vesículas cobertas por clatrina ou cavéola) ou por intermediários tubulares (conhecidos como carreadores independente de clatrina e dinamina (CLICs)) que são derivados da membrana plasmática. Algumas rotas podem se iniciar a partir de compartimentos intermediários, como caveolossoma ou compartimentos de endossomas precoces constituídos de proteínas ancoradas ao glicosil fosfatidilinositol (GEEC).

Fonte: Adaptada de MAYOR; PAGANO⁴⁴

Figura 3 - Esquema de rotas de pinocitose que podem ser traçadas no interior das células. Vale ressaltar que a endocitose cavéola e clatrina independente podem ser dependentes e independentes de dinamina.

Fonte: Adaptada de OZDENER; BAIS; TRACKMAN⁴¹

Ao ser endocitada a toxina tem 3 caminhos para percorrer (figura 4); um deles consiste em ser, reciclada para o meio extracelular, o segundo se dá na maioria das moléculas, ser transportada para os lisossomos para degradação proteolítica; e por último, por volta de 5% da toxina oriunda de endossomas precoces e/ou endossomas de reciclagem podem sofrer transporte retrogrado do *Trans-Golgi-Network* (TGN) e complexo de Golgi para o lúmen do RE.⁴⁵

Figura 4 - Esquema de captação endocítica e transporte retrógrado que a ricina, shiga e cólera toxina podem percorrer no interior da célula. Após as toxinas serem captadas pela célula podem seguir 3 rotas. 1- A toxina sofre degradação ao ser endereçada de endossomos tardios para corpos multivesiculares (MVB) em seguida lisossomos. 2- A toxina é reciclada e retorna ao meio extracelular. 3- A toxina é transportada retrogradamente a partir de endossomas precoces e/ou endossomas de reciclagem para o aparelho de Golgi. No RE sofre translocação da cadeia A para o citosol, onde inativará ribossomos e, consequentemente, a síntese proteica. Uma variedade de componentes celulares, que podem estar envolvidos no transporte dessas toxinas, são citados na figura e no decorrer do texto

Fonte: Adaptada de BERGAN et al⁴⁶

No RE a ligação dissulfeto que une a cadeia A à cadeia B é clivada por dissulfeto isomerases, fazendo com que a cadeia A se torne disponível para interagir com lipídeos da membrana no RE.⁴⁷ Ao interagir com a membrana do RE, a cadeia A sofre uma mudança conformacional, levando ao seu desenovelamento. Isso permite com que a cadeia A mal enovelada sofra o percurso que é geralmente traçado por proteínas com enovelamento defeituoso e seja reconhecida pelo ERAD (degradação proteica associada ao RE).⁴⁵⁻⁴⁸ Uma grande proporção de proteína segue essa rota conhecida como a rota ERAD. A primeira etapa dessa rota é a poliubiquitinação das lisinas da proteína alvo, mas como a cadeia A possui poucas

lisinas, uma pequena fração da cadeia A escapa dessa rota proteolítica, permitindo seu reconhecimento por chaperonas no lúmen do RE. As chaperonas direcionam a cadeia A para complexo proteico de translocase Sec61, que transloca a cadeia A para o citosol, onde atinge o seu sítio ribossomal. A variabilidade da toxicidade das RIPs tipo 2 pode ser, também, em parte explicada pela habilidade de escapar da degradação do ERAD.^{4,48-49} A figura 5 resume algumas rotas de entrada e ação de algumas RIPs.

Figura 5 - Mecanismo de entrada na célula pelas RIPs. Shiga toxina entra na célula depois da cadeia B se ligar a Globotrialetanolceramida (Gb3) e estimula a endocitose clatrina dependente e independente. Ao atingir o Golgi, a cadeia A é clivada pela protease furina. A ricina entra na célula após a cadeia B ligar-se à proteína e a glicolipídeos/glicoproteínas de membrana e é submetida à endocitose clatrina dependente e independente depois sofre transporte retrógrado do Golgi para o retículo endoplasmático (RE), nesse ponto a cadeia A e cadeia B são separadas tanto da ricina quanto da shiga toxina. A saporina entra no citoplasma via clatrina dependente, onde o mecanismo de entrada é ajudado pelas saponinas. Shiga-toxina, ricina e saporina inibem a síntese proteica pela sua atividade RNA-N-glicosilase, depurinando a adenina (A₄₃₂₄) da região 28S do rRNA. A α-sarcina entra na célula via pinocitose e cliva a ligação fosfodiéster entre a G₄₃₂₅ e A₄₃₂₆. Bactérias patogênicas intracelulares entram no citosol e secretam a toxina BLF1. A BLF1 inibe o fator translacional de iniciação, eIF4A, inibindo a síntese proteica.

Fonte: Adaptada de WALSH; DODD; HAUTBERGUE¹⁵

Experimentos utilizando ricina marcada com I¹²⁵ e com HRP (*peroxidase horseradish*) foram largamente realizados em estudos de endocitose. Além disso,

usando essas moléculas de ricina modificada em células foi possível revelar muitas rotas relacionadas ao transporte intracelular, bem como a maquinaria celular interage nesse processo. Moléculas de ricina com um sítio de sulfatação podem ser modificadas na rede trans-Golgi (TGN) e se mostraram também uma valiosa ferramenta para mensurar a quantidade de toxina que entra no aparelho de Golgi.⁵⁰⁻

51

Adicionalmente, as moléculas de ricina com sítios de glicosilação e ou de sulfatação podem ser utilizadas para controlar o transporte retrógrado através do aparelho de Golgi e retículo endoplasmático (ER), e assim a ricina (como outras toxinas) pode, portanto, ser usada não só para estudar a endocitose, mas também para investigar o transporte entre diferentes compartimentos celulares.

1.2.1 Captação endocítica das RIPs

Como já mencionado, a ricina, abrina, cólera e shiga toxina podem se ligar em glicoproteínas e/ou glicolipídeos presentes na membrana celular, podendo ser internalizadas por diversos mecanismos endocíticos.⁵²⁻⁵³ O mecanismo de endocitose mais estudado é a endocitose dependente de clatrina, entretanto existem uma variedade de mecanismos de endocitose clatrina independentes, como Cdc42, RhoA, Arf6 e associação lipídica a flotilina e a caveolina, o qual a caveolina adicionada as cavinas são essenciais para formação de cavéola.⁵⁴⁻⁵⁸ Outro mecanismo pinocítico que se pode incluir é a macropinocitose. A macropinocitose caracteriza-se pela a formação de uma vesícula de largo diâmetro.⁵⁹

Um grande número de moléculas fisiologicamente importantes são conhecidas por necessitar de endocitose dependente de clatrina,⁶⁰ mas existem também moléculas fisiologicamente importantes que entram na célula por endocitose independente de clatrina e cavéola, como a absorção de interleucina-2 em linfócitos,⁶¹ a internalização de angiotensina,⁶² receptores muscarínicos M2,⁶³ receptores de dopamina D2.⁶⁴ É importante salientar que também a endocitose clatrina dependente pode consistir de mais de um mecanismo de entrada⁶⁵ e estes serem diferencialmente regulados. Também no que diz respeito à regulação da

endocitose clatrino-dependente, parece haver diferenças na sua regulação no lado apical e basolateral em uma célula polarizada.⁶⁶

A ricina pode se ligar à uma variedade de lipídeos e proteínas, e espera-se que ela também sofra uma série de mecanismos endocíticos. Acredita-se que para determinados tipos de células a ricina trace prioritariamente a endocitose dependente de clatrina, podendo também ser internalizada por mecanismos independentes de clatrina. Assim, experimentos que permitiam a inibição da formação de vesículas revestidas de clatrina foram realizados, usando-se acidificação do citosol^{67, 68} e a depleção de potássio, que remove fossas de membrana recobertas de clatrina em alguns tipos de células.^{52,68} Esses experimentos bloquearam a captação de transferrina, ao passo de que a endocitose de ricina continuou, ainda que diminuída, na faixa de 50% para várias células. Evidências mais recentes para a endocitose independente de clatrina vêm de estudos com células que expressam dinamina mutante, inibindo a endocitose dependente de clatrina. Nestas células, a ricina foi endocitada após expressão de dinamina mutante.⁶⁹⁻⁷⁰ Além disso, estudos de células que expressam um fragmento negativo-dominante de cadeia pesada da clatrina,⁷¹ o qual interfere na captação dependente de clatrina, revelou que a ricina pode ser endocitada independentemente de clatrina.

A shiga-toxina liga-se a lipídios de membrana sendo maioritariamente internalizada por mecanismos independente de clatrina. Porém a shiga-toxina é a primeira toxina ligadora de lipídeos capaz de mediar a própria captação de vesículas revestidas por clatrina. Estudos recentes mostraram que a shiga toxina pode induzir a fosforilação e ativação de tirosino quinases (Src e Syk), que mediam a fosforilação de clatrina, aumentando o número de poços encobertos por clatrina, pelos quais a shiga-toxina pode ser captada.⁷²⁻⁷³ Trabalhos recentes vêm demonstrando que à associação da shiga-toxina com o Gb3 e da cólera-toxina com GM1, induzem a dissociação da fosfolipase A2 e anexina A1, causando um aumento do influxo do cálcio citosólico que ativa Syk. Esse efeito não é observado para ricina, mostrando que não exerce efeito nesses glicosfingolipídeos e consequentemente nessa rota.⁷⁴

Por muito tempo se acreditou que a cólera toxina, que se liga ao gangliosídeo GM1, era somente internalizada por via cavéola, mas os trabalhos que

vêm sendo recentemente publicados evidenciam que a cólera toxina pode ser internalizada em diferentes linhagens celulares por diferentes mecanismos, sendo a maioria o clatrina dependente e em menor fração, cavéola e clatrina independente.⁷⁵ Foi visto que no mecanismo de endocitose clatrina-independente traçado pela cólera toxina necessita da presença de flotilina-1 e 2 (proteína associada à membrana envolvida na endocitose clatrina-independente).⁷⁶ Baseando-se nesse dado, foi verificado se a shiga-toxina e a ricina também eram capazes de traçar a rota dependente de flotilina. Para isso foi feito nocaute de flotilina-1 e 2 em células HeLa e HEp-2, as quais não ocorreu nenhuma inibição da ligação ou da endocitose da shiga-toxina e ricina nessas células, indicando que essas toxinas não necessitam de flotilina, quando endocitadas pelo mecanismo clatrina-independente.⁷⁷

A endocitose cavéola-dependente possui vesículas cobertas por caveolina no lado citosólico da membrana, e não há evidências de que as duas isoformas, caveolina-1 e caveolina-2, sejam necessárias para formação do cavéola.⁷⁸ É sabido que a estrutura e função do cavéola são dependentes de colesterol da membrana⁷⁹ e muitas drogas como Filipina, que forma complexos com o colesterol, e a ciclodextrina, que remove o colesterol da membrana, afetam o transporte cavéola-dependente e clatrina-dependente.⁸⁰⁻⁸¹ É importante ressaltar que a endocitose da ricina prossegue em células, onde a função do transporte clatrina e cavéola-dependentes foram perturbadas pela extração de colesterol com ciclodextrina, proporcionando mais uma demonstração de que endocitose da ricina pode ocorrer independente de clatrina e cavéola.⁸²

Pode-se perceber que vários mecanismos estão envolvidos na endocitose da ricina além do mecanismo de endocitose independente de clatrina e cavéola. Alguns trabalhos mostraram que a ricina também pode sofrer macropinocitose (formação de estruturas vesiculares grandes), com formação de vesículas é dependente de PI-3 quinase.⁸³

O colesterol é uma molécula importante no processo endocítico. Alguns trabalhos usando drogas para extrair ou se associar ao colesterol da membrana, como β -metil-ciclodextrina, filipina ou nistatina, concluíram de que o colesterol é essencial para a endocitose, em especial da endocitose cavéola dependente. Porém, observou-se que o colesterol também é essencial para outras rotas

endocíticas, pois a extração de colesterol inibiu a invaginação de vesículas cobertas de clatrina, sugerindo que tenha um papel importante para curvatura da membrana.⁸⁴ O colesterol pode estar envolvido também na endocitose mediada por RhoA, (proteína da família de Rho GTPases, conhecida por controlar a formação de vesículas não cobertas por clatrina),⁸⁵ na atividade de Cdc42 (proteína da família Rho GTPases, responsável por captar componentes para endocitose independente de clatrina)⁸⁶ e na macropinocitose.⁸⁷⁻⁸⁸

Como já comentado, o transporte da ricina via aparelho de Golgi pode ser monitorado por microscopia eletrônica de transmissão, quando as células são incubadas com ricina marcada com I¹²⁵ ou HRP, ou por reação de sulfatação da ricina.⁴⁷ Alguns estudos revelaram que células que expressam dinamina mutante inibem o transporte de endossomas contendo ricina para o aparelho de Golgi, o que sugere que dinamina-2 ou uma molécula relacionada ao transporte clatrina e cavéola dependente está envolvida nesse passo de transporte.^{50,70} Os estudos mostraram também que o transporte de ricina para o aparelho de Golgi ocorre independentemente do baixo pH endossomal. Além disso, o transporte de ricina para o aparelho de Golgi pode ser regulado por cAMP⁷⁰⁻⁸⁹ e por inibidores de calmodulina.⁸⁹ A entrada da ricina no aparato de Golgi em células MDCK polarizadas mostrou-se diferencialmente regulada e depende, se a toxina é endocitada pelo lado apical ou pelo polo basolateral das células.^{42,70} Estes resultados estão de acordo com a ideia de que a ricina pode entrar no aparelho de Golgi por outro caminho, além da via endossomal.

1.2.2 Transporte da RIPs através do aparelho de Golgi para o RE

O transporte retrógrado a partir de compartimentos endossomais (endossomos precoces, tardios e de reciclagem) para o aparelho de Golgi é implicado em uma série de eventos celulares e mecanismos patológicos. Uma série de proteínas funcionais requer esse transporte; como, hidrolases ácidas lisossomais, proteínas de membranas e receptores, como o manose 6-fosfato, a furina (protease transmembrana) e proteínas SNARE (família de proteínas envolvidas na fusão de

vesículas), como a syntaxina 6 e a v-SNARE VAMP4. Toxinas como a ricina, shiga e cólera-toxina são dependentes desse transporte para realização do seu efeito tóxico.⁹⁰

Depois de endocitada, a ricina pode ser transportada e degradada nos lisossomos, e pode também seguir a partir de endossomas precoces e ou/ endossomas de reciclagem para o aparato de Golgi via transporte retrógrado.⁴² Uma droga muito utilizada para estudar o transporte para o aparato de Golgi é a brefeldina A (BFA), que é capaz fragmentar o aparato de Golgi, causando assim proteção das células contra as RIPs. O efeito de proteção causado foi a prova de que o Golgi é essencial para mediar o transporte retrógrado da shiga-toxina e ricina.⁹¹

A primeira toxina descrita ser transportada desde a superfície da célula, através de endossomas até o aparelho de Golgi e o RE, foi a shiga-toxina ^{42,51}. Mais tarde, um transporte retrógrado semelhante foi mostrado sendo efetuado pela cólera toxina⁵¹ e ricina⁴². No caso da ricina, foi demonstrado que a toxina teve seus sítios de glicosilação modificados no RE e foi realmente transportada para o citoplasma. Para proteínas residentes do RE e fisiologicamente importantes serem mantidas ou transportadas retrogradamente para o RE, é necessário que essas proteínas possuam alguns “sinais de recuperação de retorno para o RE”. Entre os sinais existentes considera-se a sequência KDEL, que permite a essas proteínas serem reconhecidas pelo um receptor KDEL e transportadas retrogradamente do Golgi para o RE por um mecanismo dependente do complexo proteico I (COPI). A cólera-toxina e exotoxina A da *Pseudomonas* apresentam essa sequência KDEL e conseguem assim se “disfarçar” de proteína solúvel e fisiologicamente importante para sofrer transporte retrógrado.⁹² Em contraste com a cólera-toxina ⁹³, a ricina ⁹⁴ e shiga-toxina^{95,96-97} não apresentam uma sequência KDEL e seu tráfego parece ser independente de COPI. Não se sabe exatamente como toxinas que não apresentam sequencial KDEL de retenção no RE sofrem transporte retrógrado. Contudo, alguns estudos vêm mostrando que a shiga-toxina segue uma rota dependente de Rab6 que usa enzimas de glicosilação do Golgi.⁹⁸ Outros componentes como Cdc42, microtúbulos e actina também têm sido descritos como reguladores do transporte de shiga-toxina para o RE.⁹⁹⁻¹⁰¹ Já estudos mais recentes avaliando como a ricina pode ser transportada para o RE, identificou que a cadeia B da ricina se liga à um resíduo

galactose da calreticulina, uma proteína presente no aparelho de Golgi com um sinal KDEL, permitindo com que a ricina ligada a calreticulina sofra transporte retrógrado do aparelho de Golgi para o RE.¹⁰²

Uma série de proteínas estão envolvidas no transporte retrógrado de toxinas. Entre estas podemos citar as Rabs (GTPase tipo Ras que regula eventos do transporte vesicular ao nível de membrana), tubulina e actina.¹⁰³ Uma rota bastante caracterizada é a dependente de Rab9 a partir de endossomas tardios para o aparelho de Golgi, porém o transporte dependente de Rab9 por endossomas precoces (ignorando o transporte de endossomas tardios) e/ou pelo compartimento de reciclagem pode ser uma alternativa. Foi sugerido para shiga-toxina um transporte alternativo ao dos endossomas precoces, onde a toxina é transportada diretamente dos endossomas de reciclagem cobertos por clatrina para porção perinuclear da rede trans-Golgi (TGN), sem envolver também endossomas tardios. Esse processo parece ocorrer usando a via com clatrina e Rab11,¹⁰⁴ sendo dependente de uma proteína EHD1.^{55,105} Também existem evidências que o transporte da ricina a partir de endossomas precoces e não de endossomas tardios segue uma rota independente de Rab9. Durante o transporte do aparelho de Golgi para o RE, a cadeia A da shiga-toxina é clivada por uma protease, a furina, em dois fragmentos A1 e A2. A clivagem da shiga toxina pode ser realizada em uma etapa anterior do transporte, pois células com síntese de furina inibida, também tiveram as cadeias clivadas. Após a clivagem, a cadeia A da shiga-toxina segue para o citoplasma, realizando sua atividade inibidora de síntese proteica.¹⁰⁶

Em estudos para avaliar se a ricina necessitava de Rab9, Rab11 e clatrina para ser transportada para o aparelho de Golgi, a Rab9 e Rab 11 mutante e a cadeia pesada da clatrina foram expressas em células, de forma a bloquear o transporte Rab9, Rab11 e clatrina dependente. Os resultados mostraram que a ricina é transportada para o aparato de Golgi a partir de endossomas independentemente de Rab9, Rab11 e clatrina.^{94,107} Outras proteínas também estão envolvidas, como a Rab6A' e Rab6A. A Rab6A' parece estar envolvida no transporte da shiga-toxina a partir de endossomas precoces e/ ou reciclados para o aparato de Golgi, enquanto que a Rab6A é implicada no recobrimento COPI com uma rota de transporte independente a partir do aparelho de Golgi para o RE.¹⁰⁸ Outras proteínas também estão envolvidas no transporte endossomal da ricina, cadeia B da shiga-

toxina e da cólera-toxina para o aparelho de Golgi, como as proteínas SNARE, que incluem a syntaxina 5, e 16.¹⁰⁹

O efeito da Tapsigardina e A23187, drogas que elevam a concentração de cálcio no citosol e diminuem a concentração de cálcio no RE, foi investigado em células na presença da ricina. Nestas, observou-se a que elevação da concentração de cálcio no meio citosólico estimulou em 20x do transporte da ricina para o aparelho de Golgi. Adicionalmente foi investigado o efeito de inibidores da PI 3 quinase, wortmannin e LY294002. Os inibidores reduziram o transporte da ricina para o aparelho de Golgi induzido pela tapsigardina, o que leva a concluir que o transporte da ricina para o aparelho de Golgi é regulado por cálcio, possivelmente via PI3 quinase.¹¹⁰

No trabalho de Bassik e colaboradores células, nas quais foi realizado o nocaute do componente COPI, TRAPP (proteína transportadora de partícula) e dos complexos GARP (proteína associada ao transporte retrógrado) apresentaram uma forte proteção contra ricina.¹¹¹ Um trabalho anterior mostrou que componentes do GARP e COG (complexo oligomérico do Golgi, responsável por regular os endossomas para o TGN) são necessários para o transporte retrógrado da ricina e shiga-toxina.¹¹²⁻¹¹³

1.2.3 Transporte das RIPs do ER para o citosol

Após a chegada da toxina no RE a cadeia A da toxinas é liberada por redução da ligação de dissulfeto entre a cadeia B e A. As chaperonas presentes no RE e translocadores irão mediar à transferência da cadeia A para o citosol.

Para que a translocação aconteça a cadeia A pode seguir a rota de controle de qualidade para proteínas mal enoveladas, o ERAD. Entretanto as toxinas, como a ricina, escapam da degradação proteossomal por ter baixo conteúdo de lisinas. A ricina tem sido reportada como interagir com EDEM1 e derlinas (proteínas envolvidas no processo de translocação para o citosol), bem como ser translocada através do canal Sec61 na membrana do RE.¹¹⁴ Foi também reportado

que a cólera, shiga-toxina e exotoxina A podem se associar ao complexo Sec61. Foi relatado que a shiga-toxina pode interagir com uma chaperona presente no RE, conhecida como BiP. Uma vez transportada para o citosol a cadeia A pode finalmente ser transportada para o citosol, podendo assim atingir seu sítio ribossomal.¹¹⁵

1.3 Aplicações das RIPs

Os membros das RIPs apresentam uma série de aplicações variando de benefícios para a agricultura a terapias biomédicas.¹¹⁶ As RIPs não apenas constituem uma potente ferramenta para estudar o mecanismo de tradução, mas também apresentam grande potencial terapêutico quando usadas como toxinas quiméricas, obtidas por meio de manipulações genéticas¹¹⁷ ou bioquímicas, como as imunotoxinas¹¹⁸ ou toxinas conjugadas com ligantes como interleucinas¹¹⁹ tornando-as seletivamente tóxicas para um dado tipo de célula alvo. Nas imunotoxinas de RIPs, a cadeia A é conjugada a um anticorpo monoclonal específico à célula tumoral capaz de direcioná-la contra os alvos celulares específicos.¹²⁰⁻¹²¹ Nas toxinas conjugadas, as RIPs são ligadas à moléculas carreadoras. Uma vez internalizadas na célula elas são altamente tóxicas, sendo estimado que uma molécula de ricina seja suficiente para matar uma célula.¹²² Grande parte das pesquisas com imunotoxinas tem focado seu possível uso na terapia contra o câncer. Nos tumores sólidos, os resultados são pouco positivos possivelmente devido à baixa penetração, que é resultado da pouca vascularização. Estudos com imunotoxinas que contém a cadeia A da ricina ligada ao anticorpo que reconhece os epítopos específicos da célula cancerígena mostraram-se promissores no combate ao câncer em células *in vitro*. Porém em células a imunotoxina não foi tão eficaz, o que contrasta com as imunotoxinas baseadas em saporinas, que se mostraram potentes para células de câncer de próstata tanto *in vitro* quanto *in vivo*.¹²³ A substância P conjugada com a saporina foi desenvolvida para destruir neurônios envolvidos na transmissão da dor em pacientes com dores crônicas.¹²⁴ Outras RIPs tipo 2 e tipo 1 também vêm se mostrando eficazes contra células cancerígenas tanto *in vitro* quanto *in vivo*.¹²⁵

Pesquisas vêm sendo realizadas para encontrar métodos mais eficientes de direcionamento da droga nas células alvo, bem como diminuir a instabilidade das RIPs no plasma circulante. A conjugação das RIPs com polímeros de etilenoglicol solúveis em água as protege contra a clivagem proteolítica, melhorando assim sua meia vida e reduzindo sua imunogenicidade.¹²⁶ Um outro problema abordado é que as imunotoxinas de RIPs causam elevada resposta imune dos indivíduos tratados, o que diminui sua meia vida e compromete sua eficácia.¹¹⁶ Comparadas com os agentes quimioterápicos convencionais, algumas vantagens são atribuídas as imunotoxinas de RIP, como por exemplo, sua potente ação nas células em divisão.¹¹⁹

Outra área bastante explorada para as RIPs é seu uso como ferramenta para desvendar e compreender os intrincados processos de captação e transporte celular dessas toxinas nas células, ajudando a entender o processo fisiológico e patológico de como outras moléculas endógenas ou não são endocitadas e transportadas nas células.

1.4 A pulchellina

A pulchellina é uma RIP tipo 2 extraída de sementes de *Abrus pulchellus*¹²⁷⁻¹²⁸ e consiste em duas subunidades: uma enzima inativadora de ribossomos, de aproximadamente 29 kDa (cadeia A), ligada através de ligação dissulfeto a uma cadeia lectínica galactose/N-acetilgalactosamina ligante, de aproximadamente 31 kDa (cadeia B). Esta RIP tipo-2 apresenta uma alta toxicidade para ratos ($DL_{50}=30\mu\text{g/Kg}$ de peso corpóreo), comparável a ricina e abrina.¹²⁹

A pulchellina é produzida nas sementes como uma mistura de isoformas, sendo que 4 isoformas mais abundantes, denominadas P I, P II, P III e P IV foram separadas utilizando cromatografias diversas isoladas e caracterizadas bioquimicamente.¹²⁹ As isoformas exibem uma série de diferenças na identidade sequencial de aminoácidos (tabela 1) e nos níveis de toxicidade. Nas quais apresentam diferenças nos valores na metade da concentração inibitória mínima (IC_{50}) em células HeLa, sendo PI com $21.7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0.375nM), PII $22.7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (0.391nM), PIII $101.9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1.76 nM) e 98.4 PIV $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1.7 nM) e na dose letal

média (DL_{50}) em ratos em que, PI $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, PII $25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, PIII $60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e PIV $70 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.¹³⁰⁻¹³¹ Pode-se destacar que as isoformas também apresentam diferentes níveis de afinidades por diferentes carboidratos, em um ensaio de hemaglutinação realizado por Castilho e colaboradores, no qual identificou que PI e PII eram inibidas na presença de N-acetil-D-galactosamina, enquanto que PIII e PIV não.¹³¹ Diante das diferenças de toxicidade e afinidade por diferentes carboidratos subdividiu-se as isoformas em 2 subgrupos, um grupo contendo, PI, PII e outro contendo PIII e PIV. Desse subgrupos as isoformas que apresentaram maior rendimento na purificação foram PII e PIV. Portanto as isoformas PII e PIV foram escolhidas para realizar os experimentos propostos nesse trabalho.

Tabela 1 - Identidade das isoformas em alinhamento por pareamento. Os valores estão em porcentagem (%).

	Cadeia A		Cadeia B	
		Domínio 1	Domínio 2	
PI x PII	77,6	79,4	100	
PIII x PIV	79,2	83,8	99,2	
PI x PIII	79,2	77,2	78,7	
PI x PIV	100	93,4	79,5	
PII x PIII	98,4	89	78,7	
PII x PIV	77,6	72,8	79,5	

Fonte: Adaptada de CASTILHO et al¹³¹

Por apresentem atividades catalíticas equivalentes, a interação das isoformas da pulchellina com glicoreceptores de membrana e o seu mecanismo de transporte intracelular é o que parece reger o nível tóxico das isoformas na célula,¹³⁰ porém ainda sabe-se pouco a respeito disso. Acredita-se que a elucidação dos mecanismos de transporte intracelular e de interação das proteínas com a membrana celular seja a chave para entender as diferenças de toxicidade das isoformas.

Sabendo que as isoformas de uma RIP tipo 2 podem diferir no potencial de ligação aos açúcares e em nível citotóxico, como já observado para abrina e as isoformas da pulchellina. A investigação da interação de cada uma dessas isoformas com glicoreceptores presentes nas membranas das células proporcionará um

melhor entendimento de seu papel biológico, bem como uma melhor avaliação de suas potenciais aplicações. A ricina tem sido usada na produção de imunotoxinas para tratamento do câncer, o que potencialmente pode ser aplicado também para a pulchellina. Assim, entender e explorar as vias de entrada e tráfego intracelular dessas toxinas nas diferentes etapas do processo é muito importante, pois pode contribuir para melhor utilização/aplicação dessas moléculas para fins terapêuticos, bem como os resultados desses estudos podem contribuir para um melhor entendimento de como outras moléculas em processos patológicos e fisiológicos são transportadas e captadas pelas células.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Analisar de forma comparativa os processos de captação, endocitose e transporte intracelular das isoformas PII e PIV da pulchellina em células de mamíferos.

Objetivo específicos

- Avaliar as diferenças na toxicidade entre as isoformas frente as diferentes linhagens celulares;
- Analisar com o uso da microscopia confocal, FCS (Espectroscopia de Correlação e Fluorescência) e ensaios de endocitose as diferenças na ligação e transporte das isoformas nas células;
- Investigar quais possíveis rotas de captação e transporte as isoformas podem traçar na células HeLa, utilizando inibidores específicos para as rotas conhecidas;
- Avaliar a interação da PII e PIV com GM1 em modelos de membranas biomiméticos usando as técnicas de DSC de SPR.

3 Metodologia

3.1 Obtenção das proteínas nativas (Isoformas)

A purificação das isoformas da pulchellina foi realizada a partir do extrato de sementes maduras da planta *Abrus pulchellus*, utilizando cromatografias de afinidade, de exclusão molecular e de troca iônica, como já estabelecida em um trabalho prévio do grupo.¹²⁹ As plantas produtoras de sementes foram cultivadas em vasos em ambiente aberto, sob luz natural.

As proteínas eram mantidas congeladas em frações de 100µL à concentrações acima de 1mg/ml à -20°C em tampão PBS (tampão fosfato salino) pH 7.2.

3.2 Ensaios de citotoxicidade-inibição da síntese proteica

As células testadas foram pré-incubadas em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 células/poço, sendo mantidas em meio DMEM 10% de soro bovino fetal (SBF) numa atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Para os ensaios as células foram pré-incubadas 30min com as drogas de interesse usadas, exceto para o PDMP, que neste caso, teve um tempo de pré-incubação de 24h/48h e 72h (figura 6 e tabela 2). As células pré-tratadas foram então incubadas por 3h com as diferentes isoformas de pulchellina, independentemente, em meio de cultura livre de leucina. Logo em seguida o meio foi removido e então adicionado um meio contendo leucina marcada ($1\mu\text{Ci}[\text{H}^3]$ por mL). Incubou-se a mistura por 20min a seguir as células foram lavadas duas vezes com solução contendo 5% de TCA (ácido tricloroacético) para precipitação das proteínas sendo finalmente solubilizadas em solução de KOH 0.1 M. O precipitado ácido radioativo formado foi medido em um cintilador de contagem-β (MINAXI, TRI-CARB 4000 SERIES, United Technologies, Packard, Meriden, CT). Cada experimento foi realizado em duplicata e repetido 3 vezes.

Figura 6 - Drogas utilizadas nos experimentos de citotoxicidade e endocitose e os locais onde as mesmas atuam na célula.

Fonte: Adaptada de KAUWE; XIE; HAMM-ALVAREZ¹³²

Tabela 2 - Compostos usados nos ensaios de inibição de síntese proteica e endocitose.

Inibidores	Efeito
Brefeldina A	Inibe o transporte de vesículas, fragmenta o aparelho de Golgi
Bafilomicina	Inibe ATPase vacuolar-tipo H^+ , inibindo a acidificação dos endossomos
Citocalasina	Previne a polimerização da actina e fragmenta a actina
A23187	Aumenta a permeabilidade ao cálcio de todas as membranas da célula, Ca^{++} Citosol, RE.
Wortmannin	Inibidor da PI 3-quinase, inibe a fusão de endossomas
Tunicamicina	Inibe a glicosilação de proteínas, diminui o transporte de glicoproteínas
Swansonine	Inibidor da alfa manosidase II do Golgi, acelera o transporte intracelular de outras proteínas
Lactacistina	Inibidor do proteassomo
Puromicina*	Inibe a síntese proteica e mantém o canal de translocação aberto no RE, também aumenta a retrotranslocação da ricina ao citosol
Cicloheximidina	Inibe a síntese proteica, inibe também a autofagia, melhor eficiência da translocação da toxina pelo citosol
Ly294002	Inibidor da PI3K
TPA	Ativador da Proteína quinase C (PKC)-ativador e indutor da endocitose
PDMP*	Reduz a síntese de esfingolídeos e seus derivados. Reduz fortemente o transporte da shiga-toxina ligada a Gb3, oriundo de endossomas do aparelho de Golgi
Dynasore e sertralina*	Inibem dinamina, a qual é essencial para a endocitose clatrina dependente
Filipina	Liga-se ao colesterol, rompendo a membrana celular

*Drogas que foram usadas nos ensaios de endocitose

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Medidas de Endocitose

Para o ensaio controle com os inibidores de dinamina, a transferrina foi usada como a partícula modelo a ser endocitada. Inicialmente, pré-incubou-se as

células com sertralina e *dynasore*. A transferrina marcada com I^{125} foi incubada durante 5 min, a 37°C, usando células HeLa. Em seguida as células foram lavadas e então solubilizadas com solução de protease. A radioatividade das partículas de transferrina endocitadas foi medida no cintilador. As medidas são apresentadas como a percentagem da transferrina endocitada na célula.

Para saber a taxa ligação à superfície celular, PII ou PIV marcadas com I^{125} foram incubadas com células HeLa durante 1 h. A incubação foi realizada em gelo, com o intuito de evitar a internalização da toxina. Após uma hora as células foram lavadas com tampão contendo lactose e foi avaliado se a toxina poderia ou não ser removida pela solução. Em seguida as células foram lisadas com solução de 0.1 M de KOH e a radioatividade da solução resultante foi medida no cintilador contador de radiação γ (1261 Multigamma, Wallac, Gaithersburg, MD).

Para os experimentos de endocitose da pulchellina, células HeLa foram inicialmente incubadas por 30min a 37°C com os compostos (*dynasore*, sertralina, puromicina e cicloheximidine) e, em seguida, adicionou-se a PII e PIV marcada com I^{125} , seguindo-se por incubação por 30min a 37°C. As células foram lavadas com tampão contendo lactose para remoção da toxina ligada à superfície célula, a seguir as células foram lisadas e a radioatividade da pulchellina endocitada foi medida. Nos experimentos realizados utilizando neuraminidase e PDMP. As células não foram lavadas com solução de lactose, pois essas drogas atuam diretamente na membrana celular sendo interessante medir a pulchellina total ligada às células.

Foram também realizadas medidas de endocitose da pulchellina sob diferentes tempos de incubação, nesse caso a PII ou PIV marcadas com I^{125} foram incubadas 15, 30 e 60min a 37°C, as células foram lavadas com lactose, lisadas e o sobrenadante medido no cintilador.

Para as medidas de citotoxicidade e endocitose os experimentos foram medidos em duplicata e repetido 3 vezes. Foram realizadas análises estatísticas dos dados utilizando o programa GrafPad Prism 7. A normalidade dos dados foi realizada e considerada nos resultados. O método de análise da normalidade do dados usada foi o D'Agostino & Pearson, recomendado pelo programa, com o valor de p (nível de significância) $p < 0,05$.

3.4 Estudos por microscopia confocal

3.4.1 Interação das diferentes isoformas da pulchellina

Inicialmente, a isoforma PII foi conjugada com Alexa Fluor 488[®] (Molecular Probes) (denominada de PII*) e a PIV com Alexa Fluor 594[®] (Molecular Probes) (denominada de PIV*). As proteínas foram marcadas com Alexa Fluor e tiveram seu rendimento avaliado de acordo com o manual do kit do fabricante do Alexa Fluor (Molecular Probes). Células MV3 (melanoma humano) foram semeadas em lâminas de 8 poços da BD[®] à 5×10^4 células/mL por poço com DMEM suplementado com SBF e mantidas na temperatura de 37 °C e 5% CO₂ 1 dia antes da realização do experimento. Para realização do experimento as células MV3 foram incubadas durante 15min com DMEM não suplementado com SBF e contendo as proteínas marcadas (3000ng/ml). As células então foram lavadas com PBS e foi adicionado DMEM suplementado com SBF, incubando-se por 45 min. Em seguida lavou-se as células 3x com uma solução contendo 0,1 M de lactose, sendo então fixadas com 3,7% de formaldeído. As imagens foram analisadas em microscópio confocal, avaliando as possíveis diferenças no tráfego intracelular das isoformas da pulchellina marcadas.

3.4.2 Avaliação comparativa do processo de endocitose e tráfego intracelular das isoformas

Visando observar diferenças no padrão de ligação da proteína na superfície celular e no tráfego intracelular das toxinas, foram obtidas imagens digitais das células submetidas ao tratamento com as proteínas marcadas. Células HeLa foram semeadas em placas tipo petri da SPL[®] à 5×10^4 células/mL por poço com DMEM suplementado com SBF e mantidas na temperatura de 37 °C e 5% CO₂ 1 dia antes da realização do experimento. Posteriormente, a placa contendo células vivas previamente acoplada no microscópio foi adicionada uma solução com DMEM e as

toxinas a 2000ng/ml, logo em seguida o processo de endocitose e tráfego foi monitorado por um microscópio confocal ZEISS LSM 780[®].

3.4.3 Avaliação do tempo que as toxinas levam para alcançar o aparelho de Golgi

Células HeLa foram semeadas em lâminas de 8 poços da BD[®] à 5×10^4 células/mL por poço com DMEM suplementado com SBF e mantidas na temperatura de 37 °C e 5% CO₂ 1 dia antes da realização do experimento. Para realização do experimento células HeLa foram incubadas em diferentes tempos 30, 45, e 60 min com a PII* e PIV*, independentemente. As células foram fixadas com formaldeído 3,7% durante 20min, tratadas com solução de PBS contendo 0.1% de Triton X durante 5 min, seguida tratamento da solução de bloqueio com PBS com 5% de SBF. As células foram incubadas 1h com anticorpo anti-*giantin* (Novus) 1:1000 e em seguida lavadas 3x com PBS e incubada 30min com o anticorpo de coelho secundário fluorescente (Molecular Probes) 1:200. As lâminas contendo as células tratadas foram visualizadas com auxílio do microscópio confocal. A Giantina é uma proteína de membrana do aparelho de Golgi, presente em todas as células de mamíferos até então testadas para marcar Golgi.¹³³

3.5 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de DSC é usada para o estudo da transição da fase gel para líquido-cristalina em bicamadas lipídicas. As mudanças das cadeias acil de lipossomas durante as transições de fase podem ser analisados no DSC pela análise de variação de entalpia do sistema (ΔH), que por sua vez relaciona-se com a organização do arranjo molecular lipídico.¹³⁴

Desse modo, o DSC permite estudar o comportamento termotrópico, as transições das fases lipídicas (T_m), a variação de entalpia (ΔH_{cal}), a largura a meia altura do pico ($\Delta T_{1/2}$) de vesículas de bicamadas lipídicas na presença de agentes

interagentes como, fármacos, peptídeos, proteínas, entre outros; o que pode dar indicação acerca da cooperatividade da transição da fase gel para a líquida cristalina, e a variação da capacidade calorífica (ΔC_p) dessas transições de fase.¹³⁵

A nitidez da fase de transição é frequentemente expressa pela largura do meio pico $\Delta T_{1/2}$, ou como a diferença entre o início da fase de transição T_s e o final dela T_l ($\Delta T = T_l - T_s$), como demonstrado na figura 7.

Figura 7 - A variação de entalpia (ΔH_{cal}), o $\Delta T_{1/2}$ e T_m mostrado numa endoterma de DSC. Variação do calor específico em função da temperatura durante dois estados, no processo endotérmico.

Fonte: Adaptada de MCELHALNEY¹³⁶

As soluções estoque de lipídeos foram misturadas em clorofórmio e armazenadas a -20°C . Uma vez misturados, o solvente dos lipídeos foi evaporado usando fluxo de gás nitrogênio formando uma camada de filme fino na parede de vidro do tubo, para garantir a total eliminação de clorofórmio na amostra, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação sob vácuo (*Savant speedvac*) por

duas horas. A seguir, as amostras foram hidratadas com PBS seguido de agitação usando vortex durante 3 minutos e um processo de congelamento 5 vezes (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho maria à 40°C). A amostra então foi submetida à extrusão usando um mini extrusor de acordo com o manual do fabricante (Avanti Polar lipids, Inc), visando deixar as vesículas de tamanho homogêneo. Posteriormente as amostras tiveram sua polidispersividade medida em um equipamento de DLS (espalhamento dinâmico de luz).

A tabela 3 contém as misturas lipídicas com as devidas razões molares seguido das proporções de PII e PIV utilizadas para as misturas. Os efeitos das proteínas nas transições de fase foi observado em vesículas de DMPC (dimiristoil fosfatidil colina) contendo GalCer (galactosilceramida) ou gangliosídeo GM1, na presença de PII ou PIV. Como controle foram realizados também experimentos para checar o efeito dos lipídios DMPC, GM1 e GalCer na T_m das isoformas PII e PIV (tabela 4). Os experimentos foram realizados num microcalorímetro VP-DSC da empresa Microcal. A taxa de fornecimento de calor foi 30°C/h em um intervalo de temperatura de 10°C à 40°C.

Tabela 3 - Amostras utilizadas nos experimentos de DSC com as proporções de PII e PIV utilizadas

Amostras	Razão molar Proteína/ lipídeo
DMPC/GalCer 95:5	(Lipídeo puro)
DMPC/GalCer 95:5+ PII	1/125
DMPC/GalCer 95:5+ PIV	1/125
DMPC/GM1 95:5	(Lipídeo puro)
DMPC/GM1 95:5+ PII	1/125
DMPC/GM1 95:5+ PIV	1/125
DMPC	(Lipídeo puro)
DMPC+ PII	1/125
DMPC+ PIV	1/125

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 4 - Amostras utilizadas nos experimentos de DSC com as proporções de PII e PIV utilizadas

Amostras	Razão molar Proteína/ lipídeo
PII	6 μ M
PII + DMPC/GalCer 95:5	1/125
PII + DMPC/GM1 95:5	1/125
PII + DMPC	1/125
PIV	6 μ M
PIV + DMPC/GalCer 95:5	1/125
PIV + DMPC/GM1 95:5	1/125
PIV + DMPC	1/125

Fonte: Elaborada pela autora

A análise dos termogramas foi realizada utilizando a subtração da resposta calorimétrica do tampão, correção da linha de base e integração dos picos calorimétricos oriundos das transições de fases das vesículas, utilizando o *software* fornecido pela Microcal.

3.6 Ensaio de hemaglutinação - Inibição da hemaglutinação na presença de açúcares

Para realizar a atividade hemaglutinante para isoforma II e IV utilizou-se hemácias humanas do tipo O⁺ e hemácias de coelho, respectivamente. O sangue foi coletado e em seguida centrifugado por 5 minutos a 8000 x g. Os sobrenadantes, contendo o plasma e leucócitos, foram descartados e as hemácias foram lavadas 3x com PBS e diluídas a uma concentração final de 1%. O experimento foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços, onde todas as diluições foram feitas em PBS.

Para avaliar qual a concentração mínima para que cada isoforma causasse hemaglutinação das hemácias testadas, foi realizado, inicialmente um experimento controle, no qual todas as soluções e diluições foram feitas em PBS. Em cada poço, foram adicionados 25 μ L de PBS e em seguida, 50 μ L de solução com cada isoforma (112 μ g/mL) foi adicionado no primeiro poço que foi logo em seguida serialmente diluído pela metade da concentração do poço anterior. Um volume de 25 μ L da diluição de cada tipo de hemácia foi adicionado e após

incubação das placas a 37° C por 30 minutos, seguidos de mais 30 minutos a 24 ° C, o título de hemaglutinação foi analisado pela visualização a olho nu.

Para o ensaio de inibição da hemaglutinação na presença dos açúcares, foi adicionado ácido-N-acetil-Neuramínico ou lactose ao primeiro poço da placa 100 µL de cada açúcar a 0,1 M. Foram retirados 50 µL da solução e usados para diluições seriadas sucessivas nos poços seguintes que continham apenas 50 µL de PBS. Um volume de 50 µL da PII ou PIV (112 µg/mL) foi adicionado em cada poço para promover a interação da cadeia lectínica com o açúcar, seguindo-se a incubação a 37 °C durante 30 minutos. Após a incubação foram adicionados 50 µL de hemácias a 1 % (hemácias humanas tipo O⁺, hemácias de coelho). As placas foram incubadas por mais 30 minutos a 37 °C e os títulos foram analisados a olho nu.

3.7 Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

Essa técnica de superfície permite monitorar a interação de duas ou mais moléculas, molécula isca (analito) e a molécula a ser pescada (ligante). No equipamento são utilizados *chips* que apresentam uma superfície de vidro recoberta por uma fina camada de ouro, que por sua vez possui uma camada de dextrano carboximetilado, o qual propicia um ambiente hidrofílico para ligação com moléculas de diversas naturezas químicas, permitindo a imobilização não desnaturante no chip.

Durante as medidas, o equipamento incide constantemente um feixe de luz polarizada com um comprimento de onda próximo ao infravermelho no sensor chip, a energia do feixe de luz incidente é absorvida pela fina camada de ouro, fornecendo a energia necessária para a ressonância dos elétrons ali presentes, causando a ressonância plasmônica de superfície. Conforme a ressonância plasmônica vai ocorrendo a intensidade da luz refletida é detectada pelo equipamento. O ângulo no qual a ressonância ocorre é convertido em unidades de ressonância (figura 8).

Existe uma relação proporcional entre o ângulo de ressonância e a concentração da massa das moléculas adsorvidas na fina camada de ouro no chip,

desse modo o sinal de ressonância é uma medida indireta da massa adsorvida no chip. O sinal de SPR depende principalmente do índice de refração do lado não iluminado do chip (lado onde contém as moléculas iscas adsorvidas no chip), bem como do comprimento de onda incidida e as propriedades do metal, que no caso foi ouro.

Figura 8 - Esquema geral de como ocorre ressonância plasmônica de superfície, quando a energia do feixe de luz incidente é absorvida pela fina camada de metal, que fornece a energia necessária para a ressonância dos elétrons. A intensidade da luz refletida é detectada pelo equipamento de acordo com a ocorrência de SPR.

Fonte: Adaptada de WEISTRON...¹³⁷

Para avaliar a interação da PII e PIV com o ácido-N-acetilneuramínico, idealizou-se o uso de modelos de membrana contendo LUVs (vesículas unilamelares) nas seguintes formulações:

- DOPC (1,2 dioleil-sn-glicero-3-fosfofocolina)
- DOPC 95% com 5% de Galcer (galactosilceramida)
- DOPC 95% com 5% de GM1(gangliosídeo com uma cadeia contendo um ácido N-acetilneuramínico)

As vesículas foram preparadas usando a mesma metodologia usada no preparo das vesículas no DSC. O experimento foi realizado no equipamento Biacore X[®].

Inicialmente a superfície do *chip* foi limpa e regenerada de acordo com as recomendações do manual do *chip* L1. As vesículas estavam suspensas em PBS na concentração de 1 mM e foram imobilizadas no chip usando 80min de injeção no fluxo de 1µL/min. Para os ensaios de interação com as vesículas, foi injetado 25µL de proteínas na concentração 0,2 µM numa taxa de fluxo de 5µL/min com um intervalo de *delay* de 600s.

3.8 Espectroscopia de correlação e fluorescência (FCS)

Visando estudar e rastrear as diferenças na difusão das isoformas PII e PIV nas células foi aplicado à técnica de FCS. Para tanto foi feita a marcação das isoformas com alexa 488 para sua avaliação usando células vivas.

Células Hela foram cultivadas na concentração 5×10^4 células/mL em meio DMEM sem vermelho de fenol em poços de placas petri contendo uma lamínula de vidro no fundo. Para realização do experimento a placa contendo as células foi inserida numa câmara (aquecida a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂) acoplada ao microscópio confocal ZEISS LSM 780[®]. Com o uso de micropipeta adicionou-se 20 µL meio de cultivo contendo as isoformas marcadas com Alexa Fluor na concentração de 10nM para posterior análise no microscópio e coleta de dados do sinais de FCS. A objetiva utilizada foi de imersão em água, 63X juntamente com o laser de argônio 488 nm.

Para realização das medidas se estabeleceu uma colaboração com o Aluno de doutorado Fernando Massayuki Tsutae do Professor Francisco Gontijo Guimarães do Grupo de Biofotônica do IFSC.

4 Resultados

Embora estudos sobre o processo de captação e tráfego intracelular das proteínas RIP tipo 2 tenham sido largamente explorados, esse é o primeiro estudo comparativo relacionando proteínas sequencialmente e estruturalmente tão próximas usando células fixadas e vivas.

4.1 Estudos com confocal

A ligação da toxina aos receptores da superfície celular é a primeira etapa no processo de intoxicação. Esse processo foi estudado com o auxílio da microscopia confocal com escaneamento a laser (CLSM). O padrão de ligação e captação das isoformas de pulchellina PII e PIV, marcadas com fluoróforos (PII* e PIV*) foi comparada nas células fixadas e não fixadas. Observou-se que a PII* e PIV* se distribuíram pelo citoplasma em estruturas vesiculares. A PII* preferencialmente se distribuiu na região citosólica perinuclear da célula formando estruturas endossomais vesiculares, já PIV* se distribuiu em vesículas menores na região citosólica mais cortical das células. Este padrão de distribuição foi observado em células HeLa e MV3 não fixadas (figuras 9 e 10) e MV3 fixadas (figura 11). Desse modo, os experimentos indicam que a endocitose e o transporte intracelular de PII e PIV tem uma dinâmica diferente em ambas as linhagens celulares testadas, indicando que as toxinas podem utilizar diferentes rotas de tráfego intracelular, o que pode estar correlacionado com as diferentes citotoxicidades que PII e a PIV apresentam.

Figura 9 - Ligação de PII* e PIV* em células HeLa. Células HeLa *in vivo* tratadas com ambas as toxinas. Imagens obtidas numa escala de tempo de incubação com as toxinas de 2-14min. Na coluna da esquerda, imagens obtidas na presença do laser para excitar PII*. Na coluna do meio, imagens obtidas na presença do laser para excitar PIV*. Na coluna direita as imagens foram obtidas na presença simultânea dos lasers para excitar PII* e PIV*. (Barra de escala = 20µm).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 10 - Ligação de PII* e PIV* em células MV3 *in vivo* numa escala de tempo de incubação com as toxinas de 3-15min. (Barra de escala = 20µm)

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Ligação de PII* e PIV* em células MV3 fixadas com formaldeído. Na coluna da esquerda, imagens obtidas na presença do laser para excitar PII*. Na coluna do meio, imagens obtidas na presença do laser para excitar PIV*. À direita as imagens foram obtidas na presença simultânea dos lasers para excitar PII* e PIV*. (Barra de escala = 20µm)

Fonte: Elaborada pela autora

Para que a proteína alcance o seu sítio ribossomal é necessário a sua passagem pelo aparelho de Golgi e a seguir pelo retículo endoplasmático. Visando rastrear o tempo desse processo, a pulchellina marcada com Alexafluor, juntamente e anticorpos para marcar com complexo de Golgi (anti-giantina), foram usados. É possível visualizar na figura 12 que são necessários cerca de 30min para que a PII alcance o Golgi, sendo que após 60min, a colocalização com giantina fica menos intensa, sugerindo que, nesse tempo, PII pode já ter sido transportada para o retículo endoplasmático.

Figura 12 - Co-localização de PII* com anti-giantina. As células Hela foram pré-incubadas por diferentes períodos de tempo com PII* (30, 45 e 60min) e a seguir fixadas e tratadas com anticorpo anti-giantina (marcando o aparelho de Golgi) e anticorpo secundário marcado com alexa 594.

Fonte: Elaborada pela autora.

O mesmo processo foi repetido para PIV e os resultados na figura 13 mostram que essa isoforma necessita de quase o dobro de tempo da PII para alcançar o Golgi, uma vez que somente em 60 min de incubação foi possível co-localizá-la com giantina.

Figura 13 - Co-localização de PIV* com anti-giantina. Células HeLa foram pré-incubadas por diferentes períodos de tempo com PIV* (30, 45 e 60min) e a seguir fixadas e tratadas com anticorpo anti-giantina (marcando o aparelho de Golgi) e anticorpo secundário marcado com Alexafluor 488. Observação por microscopia confocal.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode-se observar, PII e PIV apresentam uma dinâmica diferente no seu transporte em células HeLa. Isso despertou o interesse em avaliar em nível molecular as diferenças traçadas nas rotas de transporte intracelular dessas isoformas de forma comparativa.

4.2 Ensaios de citotoxicidade-Inibição da síntese proteica

Uma vez que o uso de soro bovino fetal (SBF) é importante na participação de alguns processos metabólicos das células cultivadas *in vitro* é importante avaliar o quanto o SBF interfere na toxicidade da pulchellina. Assim, primeiramente foram feitos ensaios de citotoxicidade com a pulchellina na presença de diferentes concentrações de SBF, de forma a verificar se a toxicidade da pulchellina sofria interferência pelo soro.

A

(continua)

(continuação)

B

Figura 14 - Avaliação da inibição da síntese proteica causada por PII (A) e PIV (B) em células HeLa na ausência e na presença de diferentes concentrações de soro bovino fetal no meio de cultura.

Fonte: Elaborada pela autora.

É possível observar na figura 14 que o SBF protege as células HeLa contra ambas isoformas de pulchellina (100 vezes mais) nas variadas concentrações de SBF, mostrando que a presença do soro nos ensaios de citotoxicidade interfere na atuação das isoformas. Provavelmente essa diminuição da toxicidade da pulchellina é devido ao fato do soro conter glicoproteínas que se ligam à pulchellina, impedindo-a de interagir com os glicorreceptores na superfície celular. É possível notar também que a isoforma PIV em alta concentração (100ng/mL) é menos sensível em relação a presença do soro, voltando a ter uma toxicidade aumentada, o que não é evidente para PII. Desta forma, todos os demais experimentos realizados a seguir foram feitos na ausência de soro.

Também, foi avaliada a citotoxicidade das isoformas da pulchellina frente a diferentes linhagens celulares, visando identificar diferenças marcantes de níveis

citotóxicos entre as duas isoformas para uma mesma linhagem. Trabalhos anteriores demonstraram que as RIPs variam sua rota de entrada dependendo da linhagem celular. Por exemplo, a endocitose de ricina em células CACO2 ocorre majoritariamente (~95%) pela via clatrina-dependente.¹³⁸⁻¹³⁹ Já as células A431 são ricas em GM1 caveolina e cavéola, podendo permitir assim uma internalização mais prioritária pela via cavéola.¹⁴⁰

Na tabela 5 estão mostrados os resultados dos experimentos com as isoformas da pulchellina, sendo possível observar maiores diferenças nos níveis de toxicidade para a linhagem U20S, para a qual a PII mostrou-se 15 vezes mais tóxica que a PIV; bem como para a linhagem A431, cujas células são 100 vezes mais sensíveis aos efeitos tóxicos da PIV que da PII. De modo geral, as várias linhagens testadas mostraram diferenças de citotoxicidade entre as isoformas, sugerindo que a via de entrada ou de tráfego e/ou endereçamento para degradação das toxinas podem ser distintas para as isoformas. Sendo a linhagem A431 aquela que apresentou a maior diferença de citotoxicidades entre PII e PIV, essas células tornam-se candidatas para a realização de novos estudos relacionados à ligação, entrada e tráfego intracelular das isoformas.

Baseando-se na informação que a linhagem A431 apresenta grandes quantidades de GM1, caveolina e cavéola, pode-se hipotetizar que a PIV, por apresentar maior citotoxicidade que PII para estas células, apresenta preferência pelo transporte cavéola-dependente. Para linhagem CACO2, PII foi mais tóxica que PIV, sugerindo que PII tenha preferência por um transporte clatrina-dependente, preferencialmente usado para ricina.

Tabela 5 - Relação de citotoxicidade entre PII e PIV nas linhagens celulares testadas.

Linhagens celulares	Relação toxicidade PII/PIV
HeLa (câncer de cérvix)	PII mesma razão de toxicidade que PIV
PC3 (câncer de próstata humano)	PII 3X mais tóxica que PIV
CACO2 (carcinoma de cólon humano)	PII 3X mais tóxica que PIV
U20S (células epiteliais de osteosarcoma de osso humano)	PII 15X mais tóxica que PIV
A431 (carcinoma epitelial humano)	PII 100X menos tóxica que PIV
MCF 7 (adenocarcinoma de mama humano)	PII 10X menos tóxica que PIV

Fonte: Elaborada pela autora

Objetivando compreender quais possíveis rotas que a pulchellina pode traçar dentro da célula, foram utilizadas drogas que interferem na homeostasia e no metabolismo de vias de entrada e transporte das toxinas nas células.¹⁴¹ Os resultados desses experimentos podem ser visualizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito do pré-tratamento de células HeLa com os compostos na toxicidade da pulchellina.

Inibidores	PII	PIV
Brefeldina A	Protege	Protege
Bafilomicina	1.8($\pm$ 0.22) x sensibilização	4.6($\pm$ 0.2) x sensibilização
Citocalasina	Sem efeito	Sem efeito
Wortmannin	1.9($\pm$ 0.38) x sensibilização	1,6 ($\pm$ 0.17)x sensibilização
Tunicamicina	5,2($\pm$ 2.66) x sensibilização	21,9($\pm$ 11.38) x sensibilização
Swansonine	6,2 ($\pm$ 2.38)x sensibilização	52,4 ($\pm$ 21.75)x sensibilização
A23187*	2,3($\pm$ 1.2) x sensibilização	4,6($\pm$ 1.57) x proteção
Lactacistina	2,5($\pm$ 0.45) x sensibilização	2 ($\pm$ 0.61) x sensibilização
Puomicina	7,8($\pm$ 3.45) x sensibilização	6,7($\pm$ 3.37) x sensibilização
Cycloheximidine	48 ($\pm$ 10.31) x sensibilização	60 ($\pm$ 22.7) x sensibilização
TPA	4,6 ($\pm$ 0.56) x sensibilização	7,5 ($\pm$ 0.95) x sensibilização
PDMP	Sem efeito	1.7 ($\pm$ 0.05) x sensibilização
Ly294002	Sem efeito	Sem efeito
Fillipin	Sem efeito	Sem efeito

*Composto tóxico as células testadas

Fonte: Elaborada pela autora

Assim como para ricina, o pré-tratamento com a brefeldina A protege as células contra o efeito tóxico da pulchellina,¹⁴² mostrando que a pulchellina também utiliza o transporte retrógrado via Golgi para alcançar o ribossomo.

O uso da bafilomicina sensibilizou as células às toxinas, especialmente à PIV e isto pode estar relacionado com o processo de degradação da toxina. A bafilomicina é um inibidor da bomba de H^+ (ATPase H^+). A ATPase é uma bomba de prótons responsável por promover um ambiente ácido para dissociação de ligantes e atuação de hidrolases ácidas em algumas organelas como lisossomos e endossomos. Ela está envolvida na diminuição do pH dos lisossomos, que é importante para o processo de exocitose e endocitose. O número de etapas entre os sistemas do compartimento vacuolar é fortemente afetado quando se faz o uso de

agentes, como a bafilomicina, que neutralizam a acidez dessas organelas.¹⁴³ Fazendo com que a fusão de endossomos maduros para lisossomos seja inibida, o que faz no caso de ricina que o processo de degradação seja fortemente reduzido na presença de bafilomicina, tornando as células mais sensíveis à toxina.¹⁴⁴ O mesmo pode estar ocorrendo também para pulchellina, principalmente para PIV, mostrando que a PIV pode sofrer um maior endereçamento para rotas de degradação que a PII.

Para os compostos como citocalasina, PDMP (d,1-treo-1-fenil- 2-decanoilimino-3-morfolino-1-propanol HCl), e filipina não foram observados efeitos significativos na proteção ou sensibilização das células a toxina. A citocalasina é uma antagonista da actina ligando-se nas terminações farpadas dos filamentos de actina impedindo a associação dos monômeros de actina. Existem evidências que a citocalasina D inibe a endocitose apical clatrina dependente e independente.¹³⁸ A inibição da polimerização dos filamentos de actina atrapalha na endocitose caveolar e clatrina-dependente, induzindo uma menor captação de ricina pelas células.¹⁴⁵ Porém, alguns trabalhos mostram que nos ensaios de citotoxicidade, a citocalasina protegeu fracamente as células do efeito tóxico da ricina. O trabalho de Shurety e colaboradores^{139, 146} mostrou que a citocalasina não exerce efeito no transporte em algumas linhagens celulares e nos ensaios de inibição de síntese proteica não foi visto efeito. Isto também foi observado com a pulchellina, mostrando que toxina pode traçar outras rotas alternativas de endocitose, quando algumas rotas estão inibidas.¹⁴⁶

A filipina é um agente ligante de esteróis de membrana, interage com 3 β -hidroxiesteróis, como o colesterol, sendo capaz de romper as estruturas cavéola formadas. O trabalho de Fishman e Orlandi¹⁴⁷ mostrou que a filipina diminui a quantidade de cólera toxina associada à superfície das linhagens de célula CACO2 e A431. No experimento realizado para pulchellina, a filipina não exerceu nenhum efeito nas células, o que não necessariamente indica que a pulchellina não sofra alterações no seu transporte na presença de filipina. Deve-se considerar que a pulchellina pode traçar rotas alternativas à cavéola dependente e chegar com sucesso ao seu sítio ribossomal, mostrando que essa rota pode não ser primordial para a sua entrada. No caso, deveria ser realizado um experimento que permitisse avaliar a endocitose e/ou a quantidade de toxina total associada à célula na

presença de filipina. Desse modo, seria possível saber se realmente se a inibição do colesterol causada pela filipina interfere na captação ou endocitose da toxina.

No processo de síntese proteica, à medida que o ribossomo vai realizando a síntese, a cadeia nascente de polipeptídeo vai sendo enovelada. Comumente as proteínas destinadas para serem secretadas ou encaminhadas para outras organelas carregam um sinal N-terminal que interage com a partícula de reconhecimento de sinal (PRS). O PRS conduz o complexo formado ribossomo-RNA-polipeptídeo para a membrana do ER. A cadeia polipeptídica nascente é ancorada e direcionada ao translocador proteico diretamente dentro do RE. O enovelamento proteico inicia-se à medida que a cadeia polipeptídica entra no lúmen do RE. Esse processo de enovelamento envolve uma gama de enzimas e chaperonas que coordenam e regulam as reações. Uma das reações mais importantes são a N-glicosilação e a formação de ponte dissulfeto. Proteínas enoveladas incorretamente carecem de glicosilações, e muitas vezes se acumulam e agregam. Essas proteínas são direcionadas para o ERAD para serem degradadas.¹⁴⁸

Algumas drogas levam ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, que são então direcionadas para o ERAD. A tunicamicina e o swainsonine bloqueiam a N-glicosilação de proteínas. Mais especificamente, a tunicamicina inibe a adição de carboidrato ao aminoácido asparagina pela prevenção da síntese do intermediário lipídico envolvendo esse processo. O swainsonine inibe uma enzima no Golgi, a manosidase II, impedindo a remoção de um pedaço de um intermediário com alto teor de manose, formado no processo de glicosilação.¹⁴⁹

Cicloheximidina e puromicina são inibidores de síntese proteica, interferindo no processo de translocação do RNAm e RNAt no ribossomo, causando um término prematuro da elongação da cadeia de proteínas. A puromicina induz a despolimerização dos polissomos enquanto a cicloheximidina tem o efeito oposto, na qual deixa o RNAm ligado aos ribossomos.¹⁵⁰ É improvável que a sensibilização das toxinas seja devido ao aumento da exposição das toxinas ao seu sítio nos ribossomos. Foi visto no trabalho de Sandvig e colaboradores,¹⁴⁹ que quando se retira a droga do meio, a sensibilidade das células à ricina volta aos níveis normais. Isso indica que o efeito sensibilizador é devido ao aumento do transporte do

fragmento enzimaticamente ativo da ricina dentro do citosol e corrobora com os resultados de que a ricina compete com as glicoproteínas recém-sintetizadas.

Pode-se observar na tabela 6 que os inibidores de N-glicosilação de proteínas, como tunicamicina, swainsonine e os inibidores de síntese proteica, como a cicloheximidina e puromicina, sensibilizaram as células ao efeito tóxico de ambas as isoformas da pulchellina. Essa sensibilização das células as isoformas causadas pelos compostos, demonstra que a pulchellina na ausência dos inibidores compete pelo transporte ou processamento de glicoproteínas recém-sintetizadas. O mesmo foi observado no trabalho de Sandvig e colaboradores com ricina, abrina, shiga-toxina e enterotoxina A da *Pseudomonas*.¹⁴⁹

A lactacistina é um inibidor de proteassoma. O pré-tratamento com lactacistina aumenta a sensibilidade da célula tratada à pulchellina. O mesmo efeito foi observado também para ricina¹⁵¹ e indica que, durante o tráfego intracelular, parte da toxina é inviabilizada pela degradação no proteassoma.

O TPA apresenta a capacidade de estimular a via de endocitose apical clatrina-dependente para a ricina em células MDCK, via ativação da proteína quinase C (PKC),¹⁵² o que provavelmente está ocorrendo também para pulchellina em células HeLa, pois as células se tornaram 4,6 vezes e 7,5 vezes mais sensíveis para PII e PIV, respectivamente, quando tratadas com TPA. Uma vez que as células tratadas com TPA se tornaram mais sensibilizadas para PIV que para PII, existe a possibilidade da PIV ter maior preferência pelo transporte clatrina independente.

A fosforilação lipídica é um passo importante na regulação do transporte endossomal.¹⁵³ O Ly294002 e wortmannin são inibidores da PI 3 quinase e inibem o transporte endossomal da ricina para o aparelho de Golgi.¹⁵⁴ O trabalho de Houle e Marceau¹⁵⁵ mostrou que as células HEK 293 tratadas com wortmannin tinham o transporte a partir dos endossomos para o aparelho de Golgi inibido. Nos ensaios de toxicidade para pulchellina não foi notado considerável efeito de ambas as drogas, apenas uma leve sensibilização no caso de wortmannin. Isso não necessariamente indica que o transporte da pulchellina é afetado por essas drogas, sendo necessário ainda realizar ensaios, como os de endocitose, que permitam verificar o aumento ou a diminuição do transporte das vesículas endossomais da pulchellina para o Golgi.

4.3 Endocitose da pulchellina II e IV

Primeiramente para confirmar se a lactose era capaz de remover a pulchellina ligada a superfície das células, as isoformas complexadas com I^{125} foram incubadas com células banho de gelo durante 1h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS contendo ou não lactose. Como pode ser visto na figura 15, os níveis das contagens por minuto (CPM) da PII e PIV (não sofreu lavagem com lactose) comparados com PII* e PIV*, são visivelmente maiores, mostrando que PII apresenta 30% menos afinidade pela superfície de células HeLa que PIV.

Figura 15 - Quantificação das isoformas ligadas à superfície de células HeLa. As células e a pulchellina foram incubadas em gelo durante 1h. PII* e PIV* referem-se às células que foram incubadas com PII e PIV e posteriormente lavadas com lactose. Os resultados são expressos em contagens por minuto (CPM-*counts per minute*).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os experimentos de ligação e captação da pulchellina (figura 15), mostraram que PII apresenta ~30% menos afinidade pela superfície de células HeLa que a PIV. Além disso, no experimento de cinética de entrada (figura 16), a PII apresenta menor taxa endocítica comparada com PIV. Como pode ser visualizado no gráfico da figura 15, após uma hora de incubação havia 15% mais PIV

internalizada que PII. Visto que PIV apresenta maior ligação pela superfície de células HeLa que PII, a maior taxa de internalização pode ser um reflexo disto. Porém, embora haja maior entrada de PIV em HeLa, a atividade tóxica de PII é superior a de PIV. No trabalho de Castilho e colaboradores¹³¹ identificou a DL50 da PII e PIV de $15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ e $60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente, mostrando que *in vivo* a PII é mais tóxica que a PIV.

Figura 16 - Avaliação da endocitose das isoformas da pulchellina em células HeLa em função do tempo. As células e a pulchellina foram incubadas a 37°C durante 15, 30 e 60min e posteriormente lavadas com lactose.

Fonte: Elaborada pela autora.

O PDMP é uma droga que inibe a enzima glucosil sintetase que é responsável por converter a ceramida em glucosil ceramida, inibindo a síntese de uma série de glicosíngolípídeos, como GM1 e reduzindo fortemente o transporte de Gb3-shiga-toxina dos endossomos para o aparato de Golgi¹⁵⁶ embora não reduza o transporte da ricina.¹⁵⁷ No trabalho de Keusch e colaboradores a concentração de glicolípídeos caiu 10x com tratamento de células Hela com PDMP.¹⁵⁸ Visando avaliar se o PDMP afeta na captação da pulchellina, células HeLa foram incubadas com PDMP durante 48h e posteriormente foi medida a quantidade de isoformas da pulchellina que se associada às células. O resultado desse experimento pode ser visualizado na figura 17, sendo que a associação de PII permanece inalterada, enquanto a de PIV foi diminuída, o que sugere que a PIV requer glicosíngolípídeos para sua internalização.

A neuraminidase é uma enzima viral e/ou bacteriana responsável por clivar as ligações glicosídicas do ácido neuramínico, facilitando a ligação desses agentes.¹⁵⁹ No trabalho de Spilpsberg e colaboradores para mostrar que ricina necessita de glicoesfingolípídeos para internalização nas células, a neuraminidase foi usada para transformar o gangliosídeo GM3 (que não apresenta uma região terminal contendo galactose) em uma lactosilceramida, na qual a ricina pode se ligar. O pré-tratamento das células com neuraminidase fez com que a ricina interagisse 3 vezes mais com as células tratadas.¹⁶⁰ Nos experimentos com a pulchellina, após o tratamento com neuraminidase, a isoforma PIV mostrou uma redução de associação às células quando comparada ao controle, enquanto para PII o processo não se alterou (figura 17). Pela semelhança estrutural e sequencial que a ricina e pulchellina apresentam, era esperado que a neuraminidase aumentasse a associação para ambas as isoformas. Porém, como mostrado na figura 17, a associação da PIV foi diminuída em relação ao controle, o que sugere que a PIV, diferentemente da PII, necessita de ácido siálico e glicoesfingolípídeos para ligação e/ou entrada na célula.

Figura 17 - Avaliação da associação das isoformas da pulchellina em células HeLa pré-tratadas com neuraminidase e PDMP, no qual o controle mostra o efeito das células não tratadas. As células e a pulchellina foram incubadas com PDMP a 37°C e durante 48h e com neuraminidase, 37°C e durante 30min.

Fonte: Elaborada pela autora.

A dinamina é uma GTPase essencial para a formação de vesículas clatrina-dependentes. É recrutada para o brotamento de vesículas a partir da membrana celular no estado tardio onde se forma um colar que constrixe a vesícula formada. A dinamina, também, exerce diversos papéis em estágios não tardios da formação das vesículas.¹⁶¹ Visando saber se a dinamina é requerida para brotamento da vesícula endocítica contendo pulchellina foram realizados experimentos com drogas inibidoras de dinamina.

Nos experimentos realizados com inibidores de dinamina (figura 18) ambas isoformas tiveram as suas taxas de endocitose aumentadas, principalmente quando as células foram tratadas com *Dynasore*. Isso mostra que pode estar ocorrendo um efeito compensatório para via endocítica independente de dinamina, sendo assim a pulchellina é possivelmente internalizada nas células por duas vias, clatrina-dependente e clatrina-independente. O mesmo comportamento foi visto no trabalho de Llorente e colaboradores expondo células com a dinamina nocauteada à ricina.⁵⁰

Para mostrar que as drogas estavam realmente agindo na inibição da dinamina no processo da endocitose, foi realizado um ensaio controle com transferrina em células previamente incubadas com sertralina e *dynasore*. Nos ensaios controle (figura 18), ambas as drogas inibiram com sucesso a endocitose da transferrina em diferentes proporções, sendo por volta de 25% e 50% para sertralina e *Dynasore*, respectivamente.

Figura 18 - Avaliação da endocitose das isoformas da pulchellina em células HeLa pré-tratadas com Sertralina e Dynasore, no qual o controle mostra o efeito das células não tratadas. As células e a pulchellina foram incubadas a 37°C durante 30 min e posteriormente lavadas com lactose.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 19 - Avaliação da endocitose da transferrina, que foi usada como controle, em células HeLa pré-tratadas com Sertralina e Dynasore. As células e a pulchellina foram incubadas a 37°C durante 30min.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos ensaios de citotoxicidade usou-se puromicina e a cicloheximidina que levaram a um aumento da taxa de sensibilização das células às isoformas. Isso ocorre devido às essas drogas inibirem a síntese proteica, fazendo com que a maquinaria celular responsável por transportar proteínas fique mais disponível para carrear as toxinas, permitindo com que as mesmas cheguem mais facilmente ao seu sítio ribossomal.¹⁴⁹ Na figura 20 é possível observar que a taxa de endocitose da pulchellina não é afetada por essas drogas, o que era esperado, uma vez que o processo de inibição causado pelas drogas se dá numa etapa de pós endocitose das toxinas.

Figura 20 - Avaliação da endocitose da pulchellina em células HeLa pré-tratadas com cicloheximidina e puromicina, no qual o controle mostra o efeito das células não tratadas. As células e a pulchellina foram incubadas a 37°C durante 30 min e posteriormente lavadas com lactose.

Fonte: Elaborada pela autora.

Analisando os dados de endocitose em células tratadas com as drogas PDMP e a enzima neuraminidase foi levantada a hipótese de a PIV necessitar de esfingolípídeos, glicolípídeos e ácido siálico ou compostos que contém ácido siálico para se ligar na membrana. Assim, visando avaliar se de fato PIV interage com ácido siálico para se ligar na membrana, foram propostos experimentos utilizando DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura), SPR (ressonância plasmônica de superfície), além de ensaio de hemaglutinação, cujos resultados estão descritos a seguir.

4.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de DSC permite monitorar as transições de fase gel para líquido cristalino em modelos de membrana com o aumento da temperatura e acompanhar as modificações na estrutura das bicamadas lipídicas ocasionadas pela incorporação de determinados compostos nestes sistemas. Essas modificações podem ser vistas como deslocamentos da temperatura de transição de fase do fosfolípido puro e o alargamento da sua respectiva curva de DSC. Isso ocorre em função das mudanças de entropia e da diminuição da cooperatividade da transição.¹⁶² Quando o ordenamento molecular é perturbado, a variação de entropia do sistema aumenta, deslocando a temperatura de transição (T_m) para menores valores.

De acordo com o resultado obtido no experimento de endocitose usando neuraminidase, PIV parece necessitar de ácido siálico para se ligar à membrana. Para avaliar a potencial interação de PIV com ácido siálico, foram preparadas vesículas fosfolipídicas mistas de DMPC/GM1 (95:5. mol/mol). O GM1 é um gangliosídeo que contém em sua estrutura um ácido siálico na molécula. Desse modo, objetivando examinar a interação das isoformas de pulchellina com o GM1 incorporado nas vesículas mistas de DMPC/GM1, foram realizadas medidas de DSC, tanto com PIV como com PII, na presença dessas vesículas.

Como controles, vesículas de DMPC puro e também de DMPC/GalCer (95:5, mol/mol) foram também analisadas por DSC. O GalCer foi usado como um controle positivo de interação, uma vez que é sabido que PII e PIV interagem fortemente com a subunidade galactosil presente no GalCer.

A modificação estrutural das bicamadas lipídicas ocasionadas por determinados compostos pode acarretar deslocamentos de temperatura de transição de fase dos lipídeos e alargamento da curva de DSC. Isso ocorre em função das mudanças de entropia de transição e diminuição da cooperatividade da transição.¹⁶²

A adição das isoformas de pulchellina nas vesículas causou sutis modificações no perfil termotrópico destes lipídios, que podem ser observados nos termogramas da figura 21 e nos dados termodinâmicos da tabela 7.

Figura 21 - Influência da PII e PIV nas vesículas de DMPC (A), DMPC/GalCer (B) e DMPC/GM1 (C).
Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 7 - Dados termodinâmicos obtidos das análises dos termogramas de DSC da PII e PIV com as vesículas de DMPC contendo GM1 ou GalCer a razão lipídica de 95/5 mol/mol.

Amostra	Razão proteína/lipídeo	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH (kcal/mol)
DMPC/GalCer	(lipídeo puro)	23.5	1.13	3.90
DMPC/GalCer+PII	1/125	23.4	1.23	4.02
DMPC/GalCer+PIV	1/125	23.5	1.14	3.94
DMPC/GM1	(lipídeo puro)	25.3	6,91	4.71
DMPC/GM1+PII	1/125	25.5	5.90	4.57
DMPC/GM1+PIV	1/125	24.9	6.18	4.94
DMPC	(lipídeo puro)	22.9	1.13	1.30
DMPC+PII	1/125	22.9	1.10	1.51
DMPC+PIV	1/125	22.6	1.42	1.34

Fonte: Elaborada pela autora.

A interação de PII com as vesículas de DMPC e DMPC/Galcer mostrou-se diferente da interação de PIV com estas vesículas. PIV diminuiu a temperatura de transição do DMPC puro de 22,9 °C para 22,6 °C, porém quando GalCer foi incorporado na vesícula (DMPC/GalCer) não se observou mais mudanças na temperatura de transição. Assim, PIV diminuiu o T_m das vesículas contendo DMPC, mas não foi mais capaz de diminuir o T_m das vesículas de DMPC/GalCer, sugerindo que PIV na presença de vesículas de DMPC parece diminuir a cooperatividade do sistema. Isso pode ser resultado de uma interação direta de PIV com DMPC, mas que se torna inviabilizada na presença do ligante (GalCer). Em contrapartida, PII não altera a temperatura de transição do DMPC e, nas vesículas contendo Galcer, a temperatura de transição foi levemente diminuída de 23,5°C para 23,4°C com a largura de transição aumentada no gráfico (maior ΔH), indicando nesse caso uma diminuição da cooperatividade.

A diminuição na cooperatividade da transição principal é ocasionada por uma desestabilização da fase P_β . Para ajudar no entendimento, um diagrama das transições das fases L_β , P_β e L_α das bicamadas lipídicas é mostrado na figura 22.

Figura 22 - Curva típica de DSC mostrando bicamadas lipídicas variando seu arranjo de fase transição de gel para líquido cristalino de acordo com o aumento de temperatura. 1: fase de pré-transição, na qual existe a conversão da fase gel *tilted* (L_β) para a fase gel *ripple* (P_β). 2: Fase de transição principal, na qual existe a conversão da fase P_β para a fase líquida cristalina (L_α).

Na presença de PII as vesículas de DMPC/GM1 tiveram a temperatura de transição levemente aumentada, de 25,3°C para 25,5°C. Porém na presença de PIV ocorreu o oposto, sendo que essas vesículas tiveram diminuição da temperatura de transição de 25,3°C para 24,9°C. A diminuição da temperatura de transição e o alargamento dos picos sugerem que PIV perturba mais intensamente que PII a organização das cadeias lipídicas do DMPC/GM1, sendo que a presença do GM1 pode favorecer a penetração parcial da PIV na bicamada lipídica ou uma inserção na região hidrofóbica das vesículas.

O aumento na temperatura de transição nos sistemas PII+DMPC/GM1 e PIV+DMPC/GalCer, mostra que a adição de PII nas vesículas contendo GM1 e de PIV nas vesículas contendo GalCer, melhoram a cooperatividade e ajudam na estabilização das fases de gel. Isso pode ser explicado pela possibilidade de PII e PIV poderem estabelecer uma interação polar na região glicana do GM1 e GalCer, respectivamente. Isso gera uma redução da repulsão eletrostática dessas regiões polares, melhorando o empacotamento global das cadeias, levando a um aumento da cooperatividade na transição e na estabilização da fase gel da bicamada acarretando assim no aumento do T_m .

Observou-se também um aumento na cooperatividade com a diminuição do parâmetro $\Delta T_{1/2}$ de alguns tipos de vesículas com a adição de PII: em DMPC/GM1, o $\Delta T_{1/2}$ cai de 6,91 para 5,90. A PIV também é capaz de diminuir o $\Delta T_{1/2}$ do DMPC/GM1, onde o $\Delta T_{1/2}$ cai de 6,91 para 6,18. O $\Delta T_{1/2}$ do DMPC+PIV é aumentado de 1,13 para 1,42, quando se adiciona GalCer em DMPC o valor que era de 1,42 diminui para 1,14, indicando que o GalCer interage com a PIV estabilizando melhor a fase gel dos lipídios. De acordo com esse parâmetro o acréscimo de GalCer e GM1 no DMPC faz com que a PIV reduza $\Delta T_{1/2}$ das vesículas de DMPC/GalCer e DMPC:GM1. Para PII apenas o DMPC e GM1 são capazes de diminuir o $\Delta T_{1/2}$, o que não foi observado com as vesículas de DMPC/GalCer, indicando que interação da PII com o GalCer não é cooperativa.

Os resultados indicam que ambas as isoformas interagem com a vesícula contendo GM1 e GalCer. Para as vesículas contendo GalCer e GM1, PIV aparenta interagir mais hidrofílicamente com os grupos galactosil do GalCer e a PII com os grupos glicanos do GM1. Foi notado que a PIV também interage mais com as vesículas de DMPC e DMPC/GM1, sendo as interações com DMPC são mais hidrofóbicas, por ter os parâmetros T_m diminuído e $\Delta T_{1/2}$ aumentado. Já para as

interações com DMPC/GM1, o T_m e $\Delta T_{1/2}$ é diminuído, demonstrando que a interação da PIV com GM1 pode ser mais anfipática.

Assim, os dados mostram que a PIV tem maior penetrabilidade que PII no interior hidrofóbico das bicamadas em especial nas vesículas formadas somente por DMPC.

Um experimento adicional foi realizado, no qual se avaliou a desnaturação térmica das isoformas na presença das diferentes vesículas lipídicas. De acordo com a tabela 8, a presença de qualquer uma das vesículas promoveu o deslocamento do T_m das isoformas, indicando que ambas isoformas têm a capacidade de interagir com a membrana. A interação hidrofóbica foi mais evidente para PIV em vesículas de DMPC, onde o T_m da PIV aumentou em 1,5°C, enquanto a PII aumentou 0,2°C.

Para PII foi notado que a adição de GalCer e GM1 nas vesículas aumenta o T_m de 66,8°C em DMPC, para 67,6°C e 68,4°C, respectivamente. Já para PIV observou-se o efeito inverso, onde o acréscimo GalCer ou GM1 nas vesículas diminuiu o T_m , de 66,9°C em DMPC somente, para 66,1°C em ambas vesículas mistas. Esses dados corroboram com os dados da tabela 7, que indicam que a interação com as vesículas contendo DMPC/GM1 é mais cooperativa para PII que para PIV. Isso fortalece a hipótese de que a interação de PIV tem caráter mais hidrofóbico que a de PII com o gangliosídeo GM1.

Tabela 8 - Dados termodinâmicos obtidos das análises dos termogramas de DSC da PII e PIV com e sem as vesículas de DMPC contendo GM1 ou GalCer a razão lipídica de 95/5 mol/mol.

Amostra	Razão proteína/lípido	T_m (°C)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)	ΔH (kcal/mol)
PII	6 μ M	66.6	7.66	664
PII+DMPC/GalCer	1:125	67.6	5.92	1.76
PII+DMPC/GM1	1:125	68.4	5.85	1.65
PII+DMPC	1:125	66.8	6.19	1.07
PIV	6 μ M	65.4	6.25	663
PIV+DMPC/GalCer	1:125	66.1	5.90	2.70
PIV+DMPC/GM1	1:125	66.1	5.90	2.70
PIV+DMPC	1:125	66.9	6.98	4.57

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Ensaio de hemaglutinação- Inibição da hemaglutinação na presença de açúcares

O experimento de endocitose no qual PIV teve sua ligação diminuída na superfície de células pré-tratadas com neuraminidase (remoção do ácido-siálico da superfície das células) indicou uma possível interação de PIV com ácido siálico. Assim, com o objetivo de confirmar essa interação, foi realizado um experimento de hemaglutinação, visando avaliar se as isoformas, em especial PIV, apresentava interação de sua cadeia lectínica com o ácido siálico.

Inicialmente foi realizado o experimento controle das isoformas, para avaliar seu potencial hemaglutinante frente às hemácias testadas. Foi verificado que para isoforma PII o título obtido com hemácias humanas tipo O⁺ era 28 µg/mL e para isoforma PIV o título obtido com hemácias de coelho era 1,75 µg/mL. No trabalho de Castilho e colaboradores¹³¹ o título obtido da PII para hemácias humanas tipo O⁺ foi 27,5 µg/mL e para PIV o título obtido com hemácias de coelho foi de 12,3 µg/mL, o que mostra que existe distinção entre as hemácias de coelho testadas.

Para avaliar a afinidade das isoformas por ácido siálico, foi realizado um ensaio de hemaglutinação na presença ácido-N-acetilneuramínico, usando como controle a lactose. Nenhuma das isoformas teve sua atividade hemaglutinante inibida pela presença do ácido-N-acetilneuramínico. A lactose, por sua vez, inibiu a atividade de PII na concentração de até 12,5µg/mL e a atividade da PIV não foi inibida na presença das concentrações de lactose testadas. Portanto, de acordo com o ensaio de hemaglutinação, PIV e PII não apresentaram afinidades pelo ácido-N-acetilneuramínico nas concentrações testadas.

4.6 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

De forma semelhante ao realizado nos experimentos de DSC, também foram preparadas vesículas mistas de DMPC contendo GM1, visando avaliar se PII e PIV apresentavam diferenças de afinidade frente ao gangliosídeo. Para isso,

através da técnica de SPR foi realizado o monitoramento da ligação de PII e PIV em diferentes vesículas fosfolipídicas contendo DOPC, mantendo a concentração de proteína fixa em 10 μ M. As vesículas de DOPC/Galcer 95:5 e DOPC/GM1 95:5 foram imobilizadas e reconstituídas na superfície de um *sensorchip* (sensorchip L1), com funcionalização para captura de vesículas. As figuras 23 e 24 mostram os sensorgramas obtidos para a interação de PII e PIV nas diferentes vesículas lipídicas imobilizadas no sensorchip L1.

Uma vez que a pulchellina é uma lectina galactose ligante, utilizou-se como controle vesículas mistas de DOPC/Galcer (95/5 mol/mol), pois o GalCer é uma ceramida que possui uma porção galactose. A partir dos sensorgramas das figuras 23 e 24 pode-se observar que a PII e PIV interagem eficientemente com as diferentes composições lipídicas das vesículas. A composição lipídica para a qual as proteínas mostraram maior RU foi a das LUVs de DOPC/GalCer, confirmando que PII e PIV apresentam afinidade para a vesícula mista que contém o seu ligante conhecido e, portanto, funcionando como o controle positivo experimental. PII, comparada a PIV, apresentou interação para todas as composições lipídicas. Já a PIV apresenta uma taxa de associação mais elevada para as composições contendo GalCer e GM1.

Observa-se na figura 24 que PII apresenta maior afinidade que PIV pelas vesículas de DOPC, já a PIV apresenta maior afinidade para as vesículas DOPC/GalCer. Para a mistura DMPC/GM1 observa-se que PII tem maior interação que PIV, porém PIV apresenta maior inclinação da curva que PII, o que reflete em uma maior taxa de associação da PIV pelo GM1.

Figura 23 - Sensorgramas da interação da PII e PIV nas vesículas constituídas de DOPC (A), DOPC/Galcer (B), DOPC/GM1 (C).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 24 - Sensorgramas representando a interação da PII (A) e PIV(B), isoladamente, nas formulações contendo DOPC, DOPC/GalCer e DOPC/GM1.

Fonte: Elaborada pela autora.

É notável na figura 24 que a PII interage com as vesículas de DOPC de forma bastante semelhante com as vesículas mistas de DOPC/GM1, e isto não foi observado para PIV. A isoforma PIV aparenta melhores níveis de associação com as vesículas contendo o GM1, o que pode ser notado pela maior inclinação da curva de associação das vesículas de DOPC/GM1 comparada com as demais. Isso mostra que PIV aparenta ter uma interação diferenciada com GM1 em relação ao controle e em relação à PII, gerando mais um indício de que PIV possui diferenças no padrão de interação com GM1.

4.7 Espectroscopia de correlação e fluorescência (FCS)

A técnica de FCS foi utilizada para investigar as diferenças no processo de difusão nas isoformas dentro de células HeLa. Os experimentos descritos a seguir foram realizados em colaboração com o doutorando Fernando Tsutae e o professor Francisco Guimarães, do IFSC. Inicialmente foi escolhida uma região na célula (no caso, o citosol) para realizar as medidas (figura 25 A). Em seguida, a proteína foi adicionada nas células e iniciou-se a captação do sinal num intervalo de tempo. Na figura 25 B pode-se observar um aumento do sinal de FCS até 17min e seu subsequente decaimento, mostrando que a PII tem um aumento de concentração no citoplasma numa grandeza de nM até 17 min., seguindo contínuo aumento de concentração até os 50min. Foi observado que o sinal de FCS cai a partir dos 17 min, pois é nesse ponto que a concentração ótima para obtenção de um bom sinal é ultrapassada.

Num outro experimento, uma região equivalente noutra célula foi escolhida para realização de medidas no intervalo de ~5min com a isoforma PIV. Foi visto que a difusão de PIV ocorre mais rapidamente que a PII (figura 26). Nos primeiros segundos de medidas, o sinal FCS atinge o seu máximo e após 10min o sinal satura e ocorre uma queda brusca. Isso ocorre devido à elevação da concentração da PIV no meio intracelular acima da concentração de nanomolar, ultrapassando as concentrações ótimas para obtenção no sinal. Esses dados corroboram as medidas de endocitose, nas quais os experimentos de ligação e

captação da pulchellina (figura 15), mostraram que PII apresenta em torno de 30% menos acúmulo na superfície de células HeLa que a PIV.

Figura 25 - A região da célula compreendida pelo citoplasma que foi escolhida para realização da obtenção dos sinais até 50min. B: Gráfico de autocorrelação de fluorescência $G(t)$ em função do tempo t (s) contendo o sinal de FCS normalizado da difusão PII no interior celular.

Fonte: TSUTAE¹⁶⁴

No experimento de cinética de entrada (figura 16), PII apresenta menor internalização comparada com PIV. Como pode ser visualizado no gráfico da figura 16, após uma hora de incubação, havia 15% mais PIV internalizada que PII. Visto que PIV apresenta maior taxa de ligação à superfície de células HeLa que PII, a maior taxa de internalização pode ser uma representação disto.

Figura 26 - Gráfico de autocorrelação de fluorescência $G(\tau)$ em função do tempo t (s) contendo o sinal de FCS normalizado da difusão PIV no interior celular.

Fonte: TSUTAE ¹⁶⁴

5 Discussão

Após a internalização, o tráfego intracelular das RIPs é de fundamental importância para sua toxicidade. As diferenças na citotoxicidade de PII em relação à PIV dificilmente poderiam ser atribuídas somente às diferenças presentes na cadeia A das isoformas, pois essas cadeias são extremamente conservadas em sequência e estrutura. Baseando-se em trabalhos realizados com outras toxinas, as características da cadeia B regem a distribuição da toxina na localização celular após a internalização. Quando se compara nigrina com ricina, verifica-se que a baixa toxicidade da nigrina b se ao fato da mesma apresentar alto nível de degradação nas células, mostrando-se em baixas concentrações intracelulares.¹⁶⁵ Outros estudos com toxinas, como a shiga e cólera-toxinas, ricina e saporina verificaram que diferenças na cadeia B são essenciais para o endereçamento subcelular e consequentemente para sua citotoxicidade.^{15,40} Desse modo pode-se inferir que as diferenças na cadeia B dessas toxinas contribuem para que elas apresentem diferenças nas toxicidades, concordando com os resultados de PII e PIV se comportando diferente nas células testadas, bem como apresentando taxas de endocitose diferenciadas.

Os resultados de experimentos celulares *in vivo* mostraram que quando as células foram incubadas simultaneamente com PII e PIV, diferentes padrões de citolocalização foram obtidos, onde PII se situou numa região mais perinuclear e PIV na região mais cortical na célula. Isso demonstra que a captação e o transporte das isoformas apresentam dinâmica diferente nas células testadas, indicando que as toxinas podem utilizar diferentes rotas de tráfego intracelular. Essas diferenças na dinâmica intracelular foram evidenciadas no experimento que avaliou o tempo médio necessário para as toxinas alcançarem o Golgi, mostrando que PII atinge o Golgi mais rapidamente, por volta de 30min, enquanto PIV teve tempo médio de 60 min. Correlacionando esses os resultados, pode-se concluir que o padrão mais perinuclear da PII é devido ao fato dela atingir mais rapidamente o Golgi, uma vez que o Golgi é localizado na região perinuclear da célula. Assim, dentro do tempo de realização do experimento de citolocalização *in vivo*, somente PII atingiu o aparelho de Golgi.

De acordo com os resultados dos ensaios de citotoxicidade para diferentes linhagens celulares foi constatado que PII é 3x mais tóxica que PIV para células CACO2. Já foi relatado que a ricina utiliza rota endocítica clatrina-independente nessas células,¹³⁸⁻¹³⁹ o que pode ser um indicativo que PII possui uma maior preferência por utilizar rotas clatrina-independentes que PIV nessas células. Para células A4321, PIV se mostrou 100x mais tóxica que PII. De acordo com o trabalho de Parton e colaboradores, as células A431 são ricas em GM1, caveolina e cavéola, mostrando que essa célula prioriza traçar rotas endocíticas cavéola-dependente.¹⁴⁰ Baseando-se nessa informação, pode-se propor que PIV tenha preferência por rotas dependentes de cavéola. Além disso, foi notado que o tratamento com TPA, as células HeLa se tornaram mais sensibilizadas para PIV mais que para PII. O TPA é uma droga capaz de estimular a endocitose de vesículas não cobertas de clatrina, sugerindo mais uma vez que PIV pode priorizar rotas de endocitose clatrina-independente.

Os experimentos de endocitose mostraram que a PIV, quando comparada com a PII, possui diferenças nas taxas de endocitose e na ligação à superfície das células. Foi visto que a PIV apresenta uma maior ligação à superfície das células, bem como uma maior taxa de endocitose que a PII. Esses dados corroboram os resultados obtidos no FCS, nos quais foi detectado que PIV apresenta uma maior difusão que PII, indicando que internaliza-se mais rapidamente que PII.

Em contrapartida, os dados de difusão e endocitose são conflitantes, numa primeira análise, com os resultados que mostram que PII leva menos tempo que PIV para atingir o Golgi. Uma vez que PIV difunde-se mais rapidamente que PII, seria esperado que PIV atingisse primeiro o Golgi. Porém, pode-se justificar esse viés com o indício de que uma maior proporção de PIV percorre o endereçamento para rotas de reciclagem e degradação, já que no experimento de citotoxicidade usando de bafilomicina, que é um inibidor das rotas de degradação traçadas pelas RIPs, as células se sensibilizaram mais para PIV que para PII.

Como previsto para pulchellina, células pré-incubadas com brefeldina A sofrem proteção contra o efeito tóxico da pulchellina, indicando que, de fato a pulchellina necessita ser transportada via Golgi.

Inibidores de glicosilação como tunicamicina e swainsonine, e de síntese proteica como cicloheximidina e puromicina, sensibilizaram as células à pulchellina. Nos ensaios de endocitose testados com puromicina e cicloheximidina não afetaram a taxa de endocitose de ambas as isoformas, o que indica que a pulchellina na ausência dos inibidores compete no transporte ou processamento de glicoproteínas recém-sintetizadas.

Outro fato interessante visto nos experimentos de endocitose no qual se inibiu dinamina, foi a observação de que a pulchellina, semelhantemente a shiga-toxina e a ricina pode traçar diferenciadas e alternativas rotas de endocitose nas células, como clatrina e caveola-independentes.

Ainda pelos ensaios de endocitose com células pré-tratadas com neuraminidase, PIV, diferentemente de PII, pareceu requerer glicosíngolípídeos para sua internalização e também a presença de glicoestruturas contendo ácido siálico presentes na membrana. Para avaliar essa hipótese, foram realizados ensaios adicionais, inicialmente utilizando ITC (calorimetria de titulação endotérmica) para avaliar se PIV apresentava alguma afinidade pelo ácido siálico, titulando as isoformas com ácido-N-acetil-neuramínico (análogo do ácido siálico). Verificou-se uma interação muito fraca com ambas as isoformas, não gerando resultados conclusivos e evidentes de interação (dados não mostrados).

Partiu-se então para um ensaio de inibição da hemaglutinação, no qual se propôs que a toxina uma vez ligada ao seu ligante hipotético, o ácido-N-acetil-neuramínico, seria incapaz de hemaglutinar as hemácias em solução. Porém, o ácido-N-acetil-neuramínico, que foi incubado em diferentes concentrações com ambas as isoformas, não foi capaz de inibir a hemaglutinação, mostrando que o carboidrato em si não é capaz de interagir com PII ou PIV.

Procurando mimetizar um ambiente mais próximo de um ambiente celular, foram sintetizadas vesículas fosfolipídicas misturadas a um gangliosídeo presente na membrana contendo ácido siálico, o GM1. Desse modo, realizaram-se experimentos de DSC e SPR visando investigar se as isoformas PII e PIV teriam algum tipo de interação com o GM1 presente nas vesículas. De acordo com os resultados de DSC, PIV parece interagir de forma mais hidrofóbica que PII com GM1, bem como a PIV aparenta ter maior penetrabilidade no core hidrofóbico das

vesículas. Em contrapartida a PII aparenta interagir hidrofílicamente com porção glicana do GM1. Os resultados de SPR mostraram que a PII apresenta uma maior interação que PIV com as vesículas contendo GM1, porém PIV aparenta ter uma taxa de associação maior que PII para as vesículas testadas. Para ambos os experimentos de DSC e SPR foi verificado que as isoformas interagem diferentemente com o GM1. Porém não foi possível ainda determinar de forma quantitativa e precisa qual isoforma apresenta maior afinidade com o GM1.

De qualquer forma, os resultados obtidos foram satisfatórios no que se refere à interação da PIV com GM1. Porém foi verificado que a PII, mesmo de forma distinta da PIV, interage com o GM1, o que não era esperado. Visto que, a avaliação e/ou reprodução de uma interação desconhecida de uma proteína num sistema isolado de biomembranas miméticas, apresenta algumas limitações como: a ausência de componentes lipídicos reais da membrana biológica em lipossomas; elevadas concentrações de ácidos graxos monoinsaturados, o que inexiste em membranas biológicas e diferenças na distribuição de simetria dos lipídeos nos lipossomas, quando comparada com as membranas biológicas. Desse modo, torna-se difícil extrair resultados conclusivos, bem como reproduzir resultados biológicos, quando se trabalha com sistema reducionista e de menor complexidade como membranas miméticas.⁵³ Em função das limitações das técnicas de uso de biomembranas miméticas no DSC e SPR, se faz necessária a realização de experimentos biológicos que permitam a obtenção de resultados mais quantitativos e mais evidentes dessa interação com o GM1 e/ou outros componentes na membrana contendo ácido siálico.

Outros gangliosídeos presentes na membrana contendo ácido sálico como, GT1B, GD2 e GD1A podem servir como alvo para investigações futuras da interação da pulchellina. A ligação da cólera-toxina com o GM1 foi verificada realizando-se ensaios de endocitose, no qual incubou-se GM1 com a cólera-toxina previamente marcada com I¹²⁵ em células de fígado.¹⁶⁶ Vale ressaltar, que também podem ser investigadas, outras estruturas como alguns oligossacarídeos contendo ácido siálico presentes na membrana, onde o vírus influenza e várias lectinas de plantas, como a *Sambucus nigra*, *Maackia amurensis* se ligam.¹⁶⁷

6 Conclusões

A partir dos resultados de microscopia confocal foram observados diferentes padrões de citolocalização para as isoformas PII e PIV em células HeLa e MV3. PII foi localizada preferencialmente na região perinuclear, enquanto a PIV na região cortical das células.

Em células CACO2, PII mostrou ter preferência por rotas clatrina-independes, similar ao observado para ricina. Já em células A4321, PIV mostrou-se ser mais tóxica que PII e parece ter preferência por rotas cavéola-dependentes.

Com relação ao tempo de tráfego intracelular em células HeLa, PII atingiu o aparelho de Golgi duas vezes mais rápido que PIV, a qual prioriza traçar rotas clatrina-independentes nessas células. De qualquer forma, ambas as isoformas necessitam do Golgi para serem transportadas.

Baseando-se nos ensaios com inibidores de síntese proteica e glicosilação, PII e PIV competem pelo transporte e/ou processamento de glicoproteínas recém-sintetizadas. Pelos resultados dos ensaios com Sertralina e *Dynasore* pode-se concluir que PII e PIV utilizam também rotas endocíticas independentes de dinamina em células HeLa.

Diferentemente de PII, PIV parece requerer em células HeLa a presença de estruturas na membrana contendo ácido siálico e glicoesfingolipídeos. Experimentos de DSC com vesículas fosfolipídicas contendo GM1, notou-se que PIV interage de forma mais hidrofóbica com GM1 que PII. Porém, PII apresentou maior interação que PIV com as vesículas contendo GM1 nas análises por SPR, embora a taxa de associação de PIV tenha sido maior.

Em conjunto, pode-se concluir que a isoforma PIV interage com caráter mais hidrofóbico com as membranas celulares e sistemas biomiméticos testados, priorizando traçar rotas cavéola-dependentes em relação à isoforma PII. Além disso, o fato de PIV apresentar maior ligação à superfície das células, maior taxa de endocitose e sofrer maior reciclagem e degradação em células HeLa em comparação à PII, podem ser as causas da diferença de toxicidade observada entre as isoformas.

REFERÊNCIAS

- 1 ENDO, Y. et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. the site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. **Journal Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5908-5912, 1987.
- 2 TUMER, N. E.; LI, X. P. Interaction of ricin and Shiga toxins with ribosomes. **Current Topics Microbiology Immunology**, v. 357, p. 1-18, 2012.
- 3 OLSNES, S.; PIHL, A. Isolation and properties of Abrin : a toxic protein inhibiting protein synthesis evidence for different biological functions of its two constituent-peptide chains. **European Journal of Biochemistry**, v. 35, p. 179-185, 1973.
- 4 PURI, M. et al. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 13-14, p. 774-783, 2012.
- 5 JOHANNES, L.; RÖMER, W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 105-116, 2010.
- 6 JUILLLOT, S.; RÖMER, W. Shiga toxins. In: MORABITO, S. (Ed.) **Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology**. [s.l.] Caister Academic Press. 2014. cap 5. p.79-101. ISBN 978-1-908230-99-7.
- 7 ROTZ, L. D. et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, n.2, p. 225-230, 2002.
- 8 ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8128-8130, 1987.
- 9 GRIFFITHS, G. D.; LEEK, M. D.; GEE, D. J. The toxic plant proteins ricin and abrin induce apoptotic changes in mammalian lymphoid tissues and intestine. **Journal of Pathology**, v. 151, n. 3, p. 221-229, 1987.
- 10 BARBIERI, L. et al. Polynucleotide:adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 3, p. 518-22, 1997.
- 11 SESTILI, P. et al. Shiga toxin 1 and ricin inhibit the repair of H₂O₂-induced DNA single strand breaks in cultured mammalian cells. **DND Repair**, v.4, p.271-277, 2005. doi:10.1016/j.dnarep.2004.09.007

12 HASEGAWA, N. et al. Isolated ricin B-chain-mediated apoptosis in U937 cells. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1422-1429, 2000.

13 BRIGOTTI, M. et al. Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. **FASEB Journal**, v. 16, n. 3, p. 365-72, 2002.

14 PEUMANS, W. J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E. J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? **FASEB Journal**, v. 15, n. 9, p. 1493-506, 2001.

15 WALSH, M. J.; DODD, J. E.; HAUTBERGUE, G. M. Ribosome-inactivating proteins: potent poisons and molecular tools. **Virulence**, v. 4, n. 8, p. 774-84, 2013.

16 SCHROT, J.; WENG, A.; MELZIG, M. F. Ribosome-inactivating and related proteins. **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1556-1615, 2015.

17 SAVINO, C. et al. Crystallization and preliminary X-ray study of saporin, a ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis*. **Acta Crystallographica Section D: biological crystallography**, v. 54, n. 4, p. 636-638, 1998.

18 BOLOGNESI, A. et al. Ribosome-inactivating proteins (RNA N-glycosidases) from the seeds of *Saponaria ocymoides* and *Vaccaria pyramidata*. **European Journal of Biochemistry**, v. 228, n. 3, p. 935-940, 1995.

19 SIKRIWAL, D.; GHOSH, P.; BATRA, J. K. Ribosome inactivating protein saporin induces apoptosis through mitochondrial cascade, independent of translation inhibition. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 12, p. 2880-2888, 2008.

20 VAGO, R. et al. Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells. **FEBS Journal**, v. 272, n. 19, p. 4983-4995, 2005.

21 STIRPE, F. et al. Inhibition of protein synthesis by modeccin, the toxin of *Modecca digitata*. **FEBS Letters**, v. 85, n. 1, p. 65-7, 1977.

22 SHANG, C. et al. The cytotoxicity of elderberry ribosome-inactivating proteins is not solely determined by their protein translation inhibition activity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132389, 2015.

23 STEEVES, R. M. et al. Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. **Biochemistry**, v. 38, n. 36, p. 11677-11685, 1999.

24 LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **FASEB Journal**, v. 8, n. 2, p. 201-8, 1994.

25 MUNDY, J. et al. Genes encoding ribosome-inactivating proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 2, p. S60-S62, 1994.

26 HEY, T. D.; HARTLEY, M.; WALSH, T. A. Maize ribosome-inactivating protein (b-32). homologs in related species, effects on maize ribosomes, and modulation of activity by pro-peptide deletions. **Plant Physiology**, v. 107, n. 1995, p. 1323-1332, 1995.

27 RUSTGI, S. et al. JIP60-mediated, jasmonate- and senescence-induced molecular switch in translation toward stress and defense protein synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 39, p. 14181-14186, 2014.

28 GIRBES, T. et al. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 461-476, 2004.

29 STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins. In: LAPPI, D. G; WILEY, R. G. (Ed.) **Molecular neurosurgery with targeted toxins**. New Jersey: Humana Press, 2005. cap 1. p. 9-29.

30 TAHIROV, T. H. et al. A new crystal form of abrin-a from the seeds of *Abrus precatorius*. **Journal Molecular Biology**, v. 235, n. 3, p. 1152-1153, 1994.

31 WESTON, S. A. et al. X-ray structure of recombinant ricin A-chain at 1.8 Å resolution. **Journal Molecular Biology**, v. 244, n. 4, p. 410-422, 1994.

32 READY, M. P.; KATZIN, B. J.; ROBERTUS, J. D. Ribosome-inhibiting proteins, retroviral reverse transcriptases, and RNase H share common structural elements. **Proteins: structure, function, and genetics**, v. 3, n. 1, p. 53-59, 1988.

33 DOOLITTLE, R. F. et al. A naturally occurring horizontal gene transfer from a eukaryote to a prokaryote. **Journal of Molecular Evolution**, v. 31, n. 5, p. 383-388, 1990.

34 LAPADULA, W. J.; SÁNCHEZ PUERTA, M. V.; JURI AYUB, M. Revising the taxonomic distribution, origin and evolution of ribosome inactivating protein genes. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e72825, 2013.

35 BOLOGNESI, A. et al. Ribosome-inactivating proteins from plants: A historical overview. **Molecules**, v. 21, n. 12, p E2627, 2016.

36 SANDVIG, K. et al. Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 3, p 267-276. 2008.

37 BATTELLI, M. G. Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 513-521, 2004.

38 FRIGERIO, L. et al. Sorting of phaseolin to the vacuole is saturable and requires a short C-terminal peptide. **Plant Cell**, v. 10, n. 6, p. 1031-1042, 1998.

39 HARTLEY, M. R.; CHADDOCK, J. A.; BONNESS, M. S. The structure and function of ribosome-inactivating proteins. **Trends in Plant Science**, v. 1, n. 8, p. 252, 1996.

40 SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 49-53, 2002.

41 OZDENER, G. B.; BAIS, M. V.; TRACKMAN, P. C. Determination of cell uptake pathways for tumor inhibitor lysyl oxidase propeptide. **Molecular Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1-23, 2016.

42 SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. **Physiology Review**, v. 76, n. 4, p. 949-66, 1996.

43 SANDVIG, K. et al. Ricin transport into cells: studies of endocytosis and intracellular transport. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 4-5, p. 415-420, 2000.

44MAYOR, S.; PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 603-612, 2007.

45 SPOONER, R. A.; MICHAEL LORD, J. Ricin trafficking in cells. **Toxins**, v. 7, n. 1, p. 49-65, 2015.

46 BERGAN, J. et al. Shiga toxins. **Toxicon**, v. 60, n. 6, p. 1085-1107, 2012.

47 VAN DEURS, B. et al. Routing of internalized ricin and ricin conjugates to the Golgi complex. **Journal of Cell Biology**, v. 102, n. 1, p. 37-47, 1986.

48 MICHAEL LORD, J.; SPOONER, R. A. Ricin trafficking in plant and mammalian cells. **Toxins**, v. 3, n. 7, p. 787-801, 2011.

49 SPOONER, R. A.; LORD, J. M. How ricin and Shiga toxin reach the cytosol of target cells: Retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 357, p. 19-40, 2012.

50 LLORENTE, A. et al. Expression of mutant dynamin inhibits toxicity and transport of endocytosed ricin to the Golgi apparatus. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 3, p. 553-563, 1998.

51 RAPAK, A.; FALNES, P. O.; OLSNES, S. Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of American**, v. 94, n. 8, p. 3783-3788, 1997.

52 MOYA, M. et al. Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicity of diphtheria toxin but not that of ricin toxin. **Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 2, p. 548-559, 1985.

53 SANDVIG, K. et al. Lipid requirements for entry of protein toxins into cells. **Progress in Lipid Research**, v 54, p. 1-13. 2014. doi: 10.1016/j.plipres.2014.01.001.

54 BASQUIN, C. et al. The signalling factor PI3K is a specific regulator of the clathrin-independent dynamin-dependent endocytosis of IL-2 receptors. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 5, p. 1099-1108, 2013.

55 CHAUDHARY, N. et al. Endocytic crosstalk: cavins, caveolins, and caveolae regulate clathrin-independent endocytosis. **PLoS Biology**, v. 12, n. 4, p.e.10011832, 2014.

56 MALDONADO-BÁEZ, L.; WILLIAMSON, C.; DONALDSON, J. G. Clathrin-independent endocytosis: a cargo-centric view. **Experimental Cell Research**, v. 319, n 18. p. 2759-2769. 2013.

57 PARTON, R. G.; DEL POZO, M. A. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 2, p. 98-112, 2013.

- 58 SANDVIG, K. et al. Clathrin-independent endocytosis: from nonexistent to an extreme degree of complexity. **Histochemistry Cell Biology**, v. 129, n. 3, p. 267-276, 2008.
- 59 LIM, J. P.; GLEESON, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 8, p. 836-843, 2011.
- 60 MAYOR, S.; PARTON, R. G.; DONALDSON, J. G. Clathrin-independent pathways of endocytosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 6, p. a016758, 2014.
- 61 SUBTIL, A.; HÉMAR, A.; DAUTRY-VARSAT, A. Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 12, p. 3461-3468, 1994.
- 62 ZHANG, J. et al. Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. **Journal Biology Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18302-18305, 1996.
- 63 ROSEBERRY, A. G.; HOSEY, M. M. Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae. **Journal of Cell Science**, v. 114, Pt 4, p. 739-746, 2001.
- 64 VICKERY, R. G.; VON ZASTROW, M. Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. **Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 1, 1999. .doi:10.1083/jcb.144.1.31.
- 65 CAO, T. T.; MAYS, R. W.; VON ZASTROW, M. Regulated endocytosis of G-protein-coupled receptors by a biochemically and functionally distinct subpopulation of clathrin-coated pits. **Journal of Biology Chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24592-24602, 1998.
- 66 NAIM, H. Y. et al. Apical and basolateral coated pits of MDCK cells differ in their rates of maturation into coated vesicles, but not in the ability to distinguish between mutant hemagglutinin proteins with different internalization signals. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 5, p. 1241-1250, 1995.
- 67 LARKIN, J. M. et al. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. **Cell**, v. 33, n. 1, p. 273-285, 1983.

68 SANDVIG, K. et al. Inhibition of endocytosis from coated pits by acidification of the cytosol. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 73-81, 1988.

69 DAMKE, H. et al. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. **Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 915-934, 1994.

70 LLORENTE, A.; VAN DEURS, B.; SANDVIG, K. Transport of apically but not basolaterally internalized ricin to the Golgi apparatus is stimulated by 8-Br-cAMP in MDCK cells. **FEBS Letters**, v. 431, n. 2, p. 200-204, 1998.

71 LIU, S. H.; MARKS, M. S.; BRODSKY, F. M. A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 5, p. 1023-1037, 1998.

72 LAUVRAK, S. U. et al. Shiga toxin regulates its entry in a Syk-dependent manner. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 1096-1109, 2006.

73 UTSKARPEN, A. et al. Shiga toxin increases formation of clathrin-coated pits through syk kinase. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, 2010, doi.org/10.1371/journal.pone.0010944.

74 KLOKK, T. I.; KAVALIAUSKIENE, S.; SANDVIG, K. Cross-linking of glycosphingolipids at the plasma membrane: consequences for intracellular signaling and traffic. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 6, p. 1301-1316, 2016.

75 TORGERSEN, M. L. et al. Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. **Journal of Cell Science**, v. 114, Pt 20, p. 3737-3747, 2001.

76 GLEBOV, O. O.; BRIGHT, N. A.; NICHOLS, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 46-54, 2006.

77 PUST, S. et al. Interplay between toxin transport and flotillin localization. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010. doi.org/10.1371/journal.pone.0008844

78 SCHEIFFELE, P. et al. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. **Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 4, p. 795-806, 1998.

79 ROTHBERG, K. G. et al. Cholesterol controls the clustering of the glycosphingolipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 6, Pt 2, p. 2931-2938, 1990.

80 HAILSTONES, D. et al. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. **Journal of Lipid Research**, v. 39, n. 2, p. 369-379, 1998.

81 SCHNITZER, J. E. et al. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. **Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 5, p. 1217-1232, 1994.

82 GRIMMER, S. et al. Endosome to Golgi transport of ricin is regulated by cholesterol. **Molecular Biology of Cell**, v. 11, n. 12, p. 4205-4216, 2000.

83 ARAKI, N.; JOHNSON, M. T.; SWANSON, J. A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **Journal of Cell Biology**, v. 135, n. 5, p. 1249-1260, 1996.

84 RODAL, S. K. et al. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, n. 4, p. 961-974, 1999.

85 LAMAZE, C. et al. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. **Molecular Cell**, v. 7, n. 3, p. 661-671, 2001.

86 CHADDA, R. et al. Cholesterol-sensitive Cdc42 activation regulates actin polymerization for endocytosis via the GEEC pathway. **Traffic**, v. 8, n. 6, p. 702-717, 2007.

87 GRIMMER, S.; VAN DEURS, B.; SANDVIG, K. Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. **Journal of Cell Science**, v. 115, Pt 14, p. 2953-2962, 2002.

88 IVERSEN, T.; FRERKER, N.; SANDVIG, K. Uptake of ricinB-quantum dot nanoparticles by a macropinocytosis-like mechanism. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 33-33, 2012.

89 LLORENTE, A. et al. Effect of calmodulin antagonists on endocytosis and intracellular transport of ricin in polarized MDCK cells. **Experimental Cell Research**, v. 227, n. 2, p. 298-308, 1996.

90 LAUFMAN, O.; HONG, W.; LEV, S. The COG complex interacts directly with Syntaxin 6 and positively regulates endosome-to-TGN retrograde transport. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 3, p. 459-472, 2011.

91 PRYDZ, K. et al. Effects of brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 2, p. 259-272, 1992.

92 MAJOUL, I. et al. KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 3, p. 601-612, 1998.

93 SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Microbiology Reviews**, v. 56, n. 4, p. 622-647, 1992.

94 LAMB, F. I.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. **European Journal of Biochemistry**, v. 148, n. 2, p. 265-270, 1985.

95 KOZLOV YU, V. et al. The primary structure of the operons coding for Shigella dysenteriae toxin and temperature phage H30 shiga-like toxin. **Gene**, v. 67, n. 2, p. 213-221, 1988.

96 SEIDAH, N. G. et al. Complete amino acid sequence of Shigella toxin B-chain. A novel polypeptide containing 69 amino acids and one disulfide bridge. **Journal of Biology Chemistry**, v. 261, n. 30, p. 13928-13931, 1986.

97 STROCKBINE, N. A. et al. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from Shigella dysenteriae type 1. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 3, p. 1116-1122, 1988.

98 WHITE, J. et al. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. **Journal Cell Biology**, v. 147, n. 4, p. 743-760, 1999.

99 SUZUKI, T.; YAN, Q.; LENNARZ, W. J. Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum. **Journal Biology Chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10083-10086, 1998.

100 LUNA, A. et al. Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 3, p. 866-879, 2002.

101 MANDON, E. C.; TRUEMAN, S. F.; GILMORE, R. Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v. 5, n. 2, p. a013342, 2013.

102 WESCHE, J. Retrograde transport of ricin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, n. 6-7, p. 517-521, 2002.

103 JOHANNES, L.; POPOFF, V. Tracing the retrograde route in protein trafficking. **Cell**, v 135, n.7. p. 1175-1187. 2008.

104 WILCKE, M. et al. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi network. **Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 6, 2000.

105 RIEDERER, M. A. et al. Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network. **Journal of Cell Biology**, v. 125, n. 3, p. 573-582, 1994.

106 KAVALIAUSKIENE, S. et al. Protection against Shiga toxins. **Toxins**, v. 9, n. 2, p. 44-44, 2017.

107 IVERSEN, T. G. et al. Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 7, p. 2099-2107, 2001.

108 UTSKARPEN, A. et al. Transport of ricin from endosomes to the Golgi apparatus is regulated by Rab6A and Rab6A'. **Traffic**, v. 7, n. 6, p. 663-672, 2006.

109 AMESSOU, M. et al. Syntaxin 16 and syntaxin 5 are required for efficient retrograde transport of several exogenous and endogenous cargo proteins. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. Pt. 8, p. 1457-1468, 2007.

110 LAUVRAK, S. U. et al. Selective regulation of the Rab9-independent transport of ricin to the Golgi apparatus by calcium. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. Pt. 17, p. 3449-3456, 2002.

111 BASSIK, M. C. et al. A systematic mammalian genetic interaction map reveals pathways underlying ricin susceptibility. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 909-922, 2013.

112 PEREZ-VICTORIA, F. J.; MARDONES, G. A.; BONIFACINO, J. S. Requirement of the human GARP complex for mannose 6-phosphate-receptor-dependent sorting of Cathepsin D to lysosomes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 6, p. 2350-2362, 2008.

- 113 LAUFMAN, O.; HONG, W.; LEV, S. The COG complex interacts directly with Syntaxin 6 and positively regulates endosome-to-TGN retrograde transport. **Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 3, p. 459-472, 2011.
- 114 CHO, J. A. et al. Insights on the trafficking and retro-translocation of glycosphingolipid-binding bacterial toxins. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 51-51, 2012. doi: 10.3389/fcimb.2012.00051.
- 115 FALGUIÈRES, T.; JOHANNES, L. Shiga toxin B-subunit binds to the chaperone BiP and the nucleolar protein B23. **Biology of the Cell**, v. 98, n. 2, p. 125-134, 2006.
- 116 STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. **Toxicon**, v.67, p.12-16. 2013. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.02.005
- 117 LAPPI, D. A. et al. Expression and activities of a recombinant basic fibroblast growth factor-saporin fusion protein. **Journal of Biology Chemistry**, v. 269, n. 17, p. 12552-12558, 1994.
- 118 FALINI, B. et al. Response of refractory Hodgkin's disease to monoclonal anti-CD30 immunotoxin. **Lancet**, v. 339, n. 8803, p. 1195-1196, 1992.
- 119 SANDVIG, K. et al. Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine. **FEBS Letters**, v. 584, p. 2626-2634. 2010. doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.008.
- 120 FRANKEL, A. E. et al. Advances in immunotoxin biology and therapy: a summary of the Fourth International Symposium on Immunotoxins. **Cancer Research**, v. 56, n. 4, p. 926-932, 1996.
- 121 DE VIRGILIO, M. et al. Ribosome-inactivating proteins: from plant defense to tumor attack. **Toxins**. v. 2, p. 2699-2737. 2010. doi: 10.3390/toxins2112699.
- 122 EIKLID, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. **Experimental Cell Research**, v. 126, n. 2, p. 321-326, 1980.
- 123 PASTAN, I. et al. Immunotoxin treatment of cancer. **Annual Review of Medicine**, v. 58, p. 221-237, 2007. doi:10.1146/annurev.med.58.070605.115320

124 KURODA, K. et al. Saporin toxin-conjugated monoclonal antibody targeting prostate-specific membrane antigen has potent anticancer activity. **Prostate**, v. 70, n. 12, p. 1286-1294, 2010

125 PURI, M. et al. Ribosome-inactivating proteins: Current status and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 774-783. 2012. doi: 10.1016/j.drudis.2012.03.007

126 LI, M. et al. Anti-tumor activity and immunological modification of ribosome-inactivating protein (RIP) from *Momordica charantia* by covalent attachment of polyethylene glycol. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 792-799, 2009.

127 RAMOS, M. R. V. et al. Isolation and partial characterisation of highly toxic lectins from *Abrus pulchellus* seeds. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 477-484, 1998.

128 SILVA, A. L. C. et al. Production of *Abrus pulchellus* ribosome-inactivating protein from seeds callus culture. **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 841-849, 2003.

129 CASTILHO, P. V. et al. Isolation and characterization of four type 2 ribosome inactivating pulchellin isoforms from *Abrus pulchellus* seeds. **FEBS Journal**, v. 275, n. 5, p. 948-959, 2008.

130 GOTO, L. S. et al. Endocytosis of pulchellin and its recombinant B-chain into K-562 cells: binding and uptake studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - general subjects**, v. 1770, n. 12, p. 1660-1666, 2007.

131 CASTILHO, P., V. **Isolamento, Caracterização estrutural, atividade biológica e investigações do tráfego celular de isoformas da pulchellina**. 2008. 120p, Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

132 MEDINA-KAUWE, L. K.; XIE, J.; HAMM-ALVAREZ, S. Intracellular trafficking of nonviral vectors. **Gene Therapy**, v. 12, n. 24, p. 1734-1751, 2005.

133 LINSTEDT, A. D.; HAURI, H. P. Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. **Molecular Biology of Cell**, v. 4, n. 7, p. 679-93, 1993.

134 GABBOTT, P. A practical introduction to differential scanning calorimetry. In: _____ **Principles and applications of thermal analysis**. New York: Wiley, 2007. cap.1. p. 49-49.

135 MENCZEL, J. D. et al. Differential scanning calorimetry (Dsc). In: MENCZEL, J. D.; PRIME, R.B. **Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications**. California,USA: John Wiley & Son., 2008. p. 688.

136 MCELHANEY, R. N. The use of differential scanning calorimetry and differential thermal analysis in studies of model and biological membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 30, n. 2-3, p. 229-259, 1982.

137 WEISTRON CO. **Surface plasmon resonance system (SPR)**. Disponível em: <<http://www.weistron.com/products/>>. Acesso em: 13 mar 2017.

138 JACKMAN, M. R. et al. Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 9, p. 2547-2556, 1994.

139 SHURETY, W.; BRIGHT, N. A.; LUZIO, J. P. The effects of cytochalasin D and phorbol myristate acetate on the apical endocytosis of ricin in polarised Caco-2 cells. **Journal of Cell Science**, v. 109, n. 12, p. 2927-2935, 1996.

140 PARTON, R. G. Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**: official journal of the histochemistry society, v. 42, n. 2, p. 155-166, 1994.

141 LAMAZE, C.; SCHMID, S. L. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, n. 4, p. 573-580, 1995.

142 SANDVIG, K. et al. Ricin transport in brefeldin A-treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. **Journal of Cell Biology**, v. 115, n. 4, p. 971-981, 1991.

143 MOUSAVI, S. A. et al. Effects of inhibitors of the vacuolar proton pump on hepatic heterophagy and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta: biomembranes**, v. 1510, n. 1-2, p. 243-257, 2001.

144 VAN DEURS, B.; HOLM, P. K.; SANDVIG, K. Inhibition of the vacuolar H(+)-ATPase with bafilomycin reduces delivery of internalized molecules from mature multivesicular endosomes to lysosomes in HEp-2 cells. **European Journal of Cell Biology**, v. 69, n. 4, p. 343-350, 1996.

145 YARAR, D.; WATERMAN-STORER, C. M.; SCHMID, S. L. A Dynamic actin cytoskeleton functions at multiple stages of clathrin-mediated endocytosis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 2, p. 964-975, 2004.

146 SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Selective modulation of the endocytic uptake of ricin and fluid phase markers without alteration in transferrin endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 11, p. 6382-6388, 1990.

147 ORLANDI, P. A.; FISHMAN, P. H. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. **Journal of Cell Biology**, v. 141, n. 4, p. 905-915, 1998.

148 XU, C.; NG, D. T. W. Glycosylation-directed quality control of protein folding. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 12, p. 742-752, 2015.

149 SANDVIG, K.; TØNNESSEN, T. I.; OLSNES, S. Ability of inhibitors of glycosylation and protein synthesis to sensitize cells to abrin, ricin, Shigella toxin, and Pseudomonas toxin. **Cancer Research**, v. 46, n. 12, Pt .1, p. 6418-6422, 1986.

150 SCHNEIDER-POETSCH, T. et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 3, p. 209-217, 2010.

151 WESCHE, J.; RAPAK, A.; OLSNES, S. Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. **Journal of Biology Chemistry**, v. 274, n. 48, p. 34443-34449, 1999.

152 LLORENTE, A. et al. Apical endocytosis of ricin in MDCK cells is regulated by the cyclooxygenase pathway. **Journal of Cell Science**, v. 113, n. 7, p. 1213-1221, 2000.

153 TAKÁČ, T. et al. Vesicular trafficking and stress response coupled to PI3K inhibition by LY294002 as revealed by proteomic and cell biological analysis. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 10, p. 4435-4448, 2013.

154 SKÅNLAND, S. S. et al. Phosphoinositide-regulated retrograde transport of ricin: Crosstalk between hVps34 and sorting nexins. **Traffic**, v. 8, n. 3, p. 297-309, 2007.

155 HOULE, S.; MARCEAU, F. Wortmannin alters the intracellular trafficking of the bradykinin B2 receptor: role of phosphoinositide 3-kinase and Rab5. **Biochemical Journal**, v. 375, Pt 1, p. 151-158, 2003.

156 SANDVIG, K. et al. Importance of glycolipid synthesis for butyric acid- induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 7, n.9, p. 1391-1404, 1996.

157 RAA, H. et al. Glycosphingolipid requirements for endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin. **Traffic**, v. 10, n. 7, p. 868-882, 2009.

158 KEUSCH, G. T. et al. Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for Shiga-like toxin 2e. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1138-1141, 1995.

159 GALEN, J. E. et al. Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 406-415, 1991.

160 SPILSBERG, B.; VAN MEER, G.; SANDVIG, K. Role of lipids in the retrograde pathway of ricin intoxication. **Traffic**, v. 4, n. 8, p. 544-552, 2003.

161 MACIA, E. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. **Developmental Cell**, v. 10, n. 6, p. 839-850, 2006.

162 LŐRINCZY, D.; KISS, M.; BELAGYI, J. DSC and EPR study on AMP.PNP, BeFx and AIF4 containing myosin nucleotide complexes. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, n. 2, p. 565-572, 2003.

163 PIGNATELLO, R. **Drug-biomembrane interaction studies: the application of calorimetric techniques**, Woodhead: Elsevier, 2013. 389 p.

164 TSUTAE, F. M. **Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos de sistemas moleculares, biológicos e celulares**. 2016. 96p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

165 BATTELLI, M. G. et al. Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. **Archives of Toxicology**, v. 71, n. 6, p. 360-364, 1997.

166 CUATRECASAS, P. Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. **Biochemistry**, v. 12, n. 18, p. 3547-3558, 1973.

167 TREBBIEN, R.; LARSEN, L. E.; VIUFF, B. M. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. **Virology Journal**, v. 8, p. 434-434, 2011. doi: 10.1186/1743-422X-8-434.