

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia

LEYDIANNE LEITE DE SIQUEIRA PATRIOTA QUEIROZ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DE LECTINA DE FRONDE DE
*Microgramma vacciniifolia***

Recife
2017

LEYDIANNE LEITE DE SIQUEIRA PATRIOTA QUEIROZ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DE LECTINA DE FRONDE DE
*Microgramma vacciniifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque

Recife
2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Queiroz, Leydianne Leite de Siqueira Patriota

Isolamento, caracterização e avaliação de atividades citotóxicas e imunomoduladora de lectina de fronde de *Microgramma vacciniifolia* / Leydianne Leite de Siqueira Patriota Queiroz. – Recife, 2017.

103 f.: il.

Orientadoras: Thiago Henrique Napoleão, Lidiane Pereira de Albuquerque
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2017.

Inclui referências

1. I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II Albuquerque, Lidiane Pereira de (coorient.) II. Título.

616.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-457

LEYDIANNE LEITE DE SIQUEIRA PATRIOTA QUEIROZ

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
CITOTÓXICA E IMUNOMODULADORA DA LECTINA DE FRONDE DE
*Microgramma vacciniifolia***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 20/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão/
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva/
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual/
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena/
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho àquele que me dedicou tanto amor, meu avô João Patriota (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Existem situações na vida em que é fundamental poder contar com o apoio e ajuda de algumas pessoas. Para a realização dessa Dissertação, pude contar com várias. E a essas pessoas prestarei, através de poucas palavras, os mais sinceros agradecimentos:

Ao Deus de infinito amor, aquele que me deu a dádiva da vida e com ela todas as realizações que até aqui alcancei. Todas as graças sejam dadas a Ele. Agradeço também a Ele por todos que aqui citarei, pois assim permitiu que não caminhasse sozinha.

À minha família, quero agradecer por todo o carinho, dedicação, amor, cuidado e apoio. Em especial, aos meus pais Aldamery e Marijânio pela educação conferida e pelo incentivo para a realização dos meus objetivos, obrigada! À minha avó Tereza, agradeço por ser o maior alicerce familiar no qual eu me apoio e me espelho, uma grande mulher, mãe e amiga. Ao meu avô João Patriota, agradeço por nunca ter deixado faltar ternura.

Ao meu esposo Thiago, quem tem me acompanhado nessa jornada, dando força para enfrentar as barreiras mais difíceis e por sonhar meus sonhos comigo.

À minha amável amiga Thamara Procópio, obrigada por compartilhar as bancadas do laboratório e da vida comigo. Por ter sempre uma palavra de conforto e incentivo para mim, e por ser essa pessoa tão maravilhosa que és.

À Jéssica Santana, pelo envolvimento experimental e pessoal neste trabalho e pelo compartilhamento de conhecimento. Às dedicadas Virginie e Andressa pelo comprometimento em aprender e empenho em desenvolver comigo este trabalho.

Ao meu admirável orientador Thiago Napoleão, agradeço pela paciência que vem dedicando a mim durante essa jornada científica. Obrigada por toda confiança transmitida e pela fé depositada em mim. Pela disposição em orientar esse trabalho, por responder prontamente a todos os questionamentos e por ser tão presente, obrigada.

À minha adorável coorientadora Lidiane Albuquerque, que se dispôs a fazer todas as correções e contribuições a este trabalho mesmo de longe. Obrigada por ter me apresentado a este mundo científico e ser tão amável comigo.

À nossa querida colaboradora Cristiane Moutinho, por todo o apoio dado ao desenvolvimento deste trabalho, pelo empenho em ensinar os princípios dos experimentos e pelas contribuições feitas ao artigo.

À pesquisadora Virgínia Lorena, pelo apoio essencial na viabilidade e realização dos experimentos, bem como a todos os colaboradores do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Aos amigos e professores, Emmanuel Pontual, Nataly Santos e Patrícia Paiva obrigada por toda assistência e aprendizado concedido.

A todos os que fazem o Laboratório de Bioquímica de Proteínas, quero agradecer pela ajuda que nunca foi negada e por todo o amparo.

Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Pós-Graduação e apoio financeiro e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), também pelo apoio financeiro para realização do projeto.

“A maneira como você encara a vida é que faz a diferença. A vida muda quando você muda”.

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

Microgramma vacciniifolia (Polypodiaceae, Pteridophyta) é uma planta epífita que possui propriedades medicinais, por exemplo, no tratamento de infecções respiratórias. Lectinas de origem vegetal são capazes de exercer ação imunomoduladora sobre células do sistema imune de mamíferos, através da interação com receptores de superfície celular. Esta dissertação descreve a purificação e caracterização de uma lectina a partir das frondes de *M. vacciniifolia* (MvFL), assim como a avaliação da sua toxicidade e efeito imunomodulador sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano. Extrato proteico foi obtido por homogeneização do pó das frondes secas em NaCl 0,15 M (10%, p/v) por 16 h a 25°C. MvFL foi isolada a partir do extrato através de cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-75 seguida de cromatografia de troca iônica utilizando a matriz DEAE-Sephadex A25. A homogeneidade de MvFL foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas para proteínas básicas ou ácidas. MvFL foi caracterizada quanto a especificidade de ligação a carboidratos, massa molecular nativa, ponto isoelétrico (pI), composição em subunidades, presença de glicosilação e similaridades na sua estrutura primária com outras proteínas vegetais. A estabilidade da lectina em diferentes valores de pH (3,0–9,0) e após aquecimento a diferentes temperaturas (30–100°C) foi avaliada por ensaio de hemaglutinação e espectrometria de fluorescência. Adicionalmente, MvFL foi avaliada quanto à atividade inibitória de tripsina. Citotoxicidade foi investigada através da avaliação da indução de apoptose/necrose em PBMCs tratados com MvFL (6,25–50 µg/mL). A atividade imunomoduladora de MvFL (12,5 µg/mL) sobre PBMCs foi avaliada através da determinação dos níveis de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (NO). Diferenciação e ativação de células T também foram investigadas. MvFL foi isolada com elevada atividade hemaglutinante específica (10.240) e elevado fator de purificação (3.413). Ela foi revelada como uma glicoproteína de pI 4,51 e massa molecular nativa de 54 kDa, sendo composta por 3 subunidades distintas. Espectrometria de massas de peptídeos derivados da hidrólise de MvFL por tripsina revelou similaridades (cobertura de sequência de 32%) com a estrutura primária de uma proteína vegetal ligadora de RNA de *Theobroma cacao*. A atividade hemaglutinante da lectina foi inibida apenas por glicoproteínas (fetuína e ovoalbumina). O aquecimento de MvFL não afetou a atividade hemaglutinante nem promoveu desenovelamento da lectina. Tanto a atividade hemaglutinante quanto a conformação da lectina variaram dependendo do pH do meio, sendo MvFL menos ativa em pH alcalino. A lectina apresentou atividade inibidora de tripsina (3360,1 U/mg) e não apresentou toxicidade para PBMCs nas concentrações de 6,25 a 25 µg/mL. A lectina promoveu um aumento na produção de TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e NO, bem como estimulou a diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺. MvFL não alterou a produção das quimiocinas testadas. Em conclusão, as frondes de *M. vacciniifolia* contêm uma proteína termoestável e multifuncional, com atividades lectínicas e inibidora de tripsina, baixa toxicidade para linfócitos, ação imunomoduladora sobre PBMCs, induzindo predominantemente uma resposta Th1, e capaz de promover ativação e diferenciação de linfócitos humanos.

Palavras-chave: lectina. Pteridophyta. inibidor de tripsina.

ABSTRACT

Microgramma vacciniifolia (Polypodiaceae, Pteridophyta) is an epiphytic plant that has medicinal properties, for example, in the treatment of respiratory infections. Lectins of plant origin are able to exert immunomodulatory action on cells from mammalian immune system by interacting with cell surface receptors. This work describes the purification and characterization of a lectin from the *M. vacciniifolia* fronds (MvFL), as well as the evaluation of its toxicity and immunomodulatory effect on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Protein extract was obtained by homogenizing the powder of dried fronds in 0.15 M NaCl (10%, w/v) for 16 h at 25°C. MvFL was isolated from the extract by gel filtration chromatography on Sephadex G-75 column followed by ion exchange chromatography using the DEAE-Sephadex A25 matrix. The homogeneity of MvFL was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under native conditions for basic or acidic proteins. MvFL was characterized in terms of carbohydrate specificity, native molecular mass, isoelectric point (pI), subunit composition, presence of glycosylation and similarities in its primary structure with plant proteins. The stability of the lectin at different pH values (3.0-9.0) and after heating at different temperatures (30-100°C) was evaluated by hemagglutination assay and fluorescence spectrometry. Additionally, MvFL was evaluated for trypsin inhibitory activity. Cytotoxicity was investigated by evaluating the induction of apoptosis/necrosis in PBMCs treated with MvFL (6.25–50 µg/mL). Immunomodulatory activity of MvFL (12.5 µg/mL) on PBMCs was assessed by determining the levels of cytokines, chemokines and nitric oxide (NO). Differentiation and activation of T cells were also investigated. MvFL was isolated with high specific hemagglutinating activity (10,240) and purification factor (3,413). It was revealed as a glycoprotein with pI 4.51 and native molecular weight of 54 kDa, being composed of three distinct subunits. Mass spectrometry of peptides derived from the hydrolysis of MvFL by trypsin revealed similarities (32% sequence coverage) with the primary structure of a RNA-binding protein from *Theobroma cacao*. The hemagglutinating activity of MvFL was inhibited only by glycoproteins (fetuin and ovalbumin). Heating of MvFL did not affect hemagglutinating activity or promote lectin unfolding. Both the hemagglutinating activity and the conformation of the lectin varied depending on the pH of the medium, with MvFL being less active at alkaline pH. The lectin showed trypsin inhibitory activity (3,360.1 U/mg) and no toxicity to PBMCs at concentrations of 6.25 to 25 µg/mL. The lectin promoted an increase in the production of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 and NO, as well as stimulated the differentiation and activation of T CD8⁺ lymphocytes. MvFL did not alter the production of the chemokines tested. In conclusion, the fronds of *M. vacciniifolia* contain a thermostable and multifunctional protein with lectin and trypsin inhibitor activities, low toxicity to lymphocytes, immunomodulatory action on PBMCs, inducing predominantly a Th1 response, as well as able to promote differentiation and activation of human lymphocytes.

Keywords: lectin. Pteridophyta. trypsin inhibitor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

- FIGURA 1** - Ensaio para detecção da presença de lectinas. (A) Ensaio de hemaglutinação. (B) Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.15
- FIGURA 2** - Estrutura molecular tridimensional de um complexo enzima-inibidor, evidenciando a tríade catalítica da tripsina.20
- FIGURA 3** - Detecção de inibidor de tripsina por ensaio colorimétrico em microplaca. (A) Ensaio de determinação da atividade inibidora de tripsina. (B) Representação da interação entre tripsina e o substrato *N*-benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA), a qual resulta na clivagem do BAPNA em *N*-benzoil-DL-arginina e *p*-nitroanilina. A interação entre tripsina e inibidor forma um complexo inativo devido, por exemplo, à ocupação do sítio ativo.21
- FIGURA 4** - Métodos cromatográficos para purificação de proteínas. (A) Esquema geral das duas fases que constituem uma cromatografia em coluna. Representações das matrizes usadas em cromatografias de gel filtração (B), troca iônica (C) e afinidade (D).23
- FIGURA 6** - *Microgramma vacciniifolia*.41

ARTIGO

- FIGURE 1.** Purification of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL). (A) Chromatography of frond extract on Sephadex G-75 column performed using distilled water (flow rate: 0.5 mL/min) as mobile phase. Fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm (ABS 280 nm) and hemagglutinating activity (HA). (B) Ion exchange chromatography of P1 on DEAE-Sephadex column. Washing step used 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Elution was performed with this buffer containing 1.0 M NaCl. . Fractions of 3.0 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min and evaluated for ABS 280 nm and HA. The inset shows MvFL polypeptide band PAGE for native acidic proteins stained with Coomassie Brilliant Blue. 70

FIGURE 2. Characterization of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL). (A) Isoelectric focusing (IEF) of MvFL under native conditions. The isoelectric point of lectin is 4.51. (B) Gel filtration chromatography of MvFL (2.0 mg of protein) on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to AKTAprime plus system. (C) Electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) of MvFL (1), MvFL treated with β -mercaptoethanol (2) and molecular mass markers (3). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. (D) Chromatography of MvFL on ConA-Sepharose column. Washing step used 20 mM Tris-HCl pH 7.4 in 1.0 M NaCl. Adsorbed proteins were eluted with 1.0 M D-glucose. Fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm (ABS 280 nm) and hemagglutinating activity (HA). . 71

FIGURE 3. Effects of temperature (A and B) and pH (C and D) on conformation of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL). Intrinsic fluorescence of MvFL tryptophan residues (A and C) and fluorescence of extrinsic probe bis-ANS in presence of MvFL (B and D) were evaluated. 72

FIGURE 4. Evaluation of cytotoxic effects of MvFL on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by flow cytometry using the markers annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV–/PI+ cells were considered as necrotic and AnnV+/PI– cells were considered apoptotic. Cell death by necrosis was significant higher than in control only in treatment with 50 μ g/mL, as indicated by the p-value. Vertical bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. 73

FIGURE 5. Evaluation of immunomodulatory effects of MvFL on human lymphocytes in 24-h incubation. TNF- α (A), IFN- γ (B) and nitric oxide (C) production was stimulated by MvFL in comparison with control, as indicated by the p-values. The bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. 74

FIGURE 6. Evaluation of immunomodulatory effects of MvFL on human lymphocytes in 24-h incubation. IL-10 (A) and IL-6 (B) production was stimulated by MvFL in comparison with control, as indicated by the p-values. The bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. 74

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

TABELA 1 - Citocinas com atividade imunomoduladora e suas funções e aplicações terapêuticas..... 36

TABELA 2 - Lectinas de plantas que induzem produção de citocinas..... 38

ARTIGO

TABLE 1. Purification of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL) in basis of its hemagglutinating and trypsin inhibitor activities. 76

TABLE 2. Sequence similarities between peptides derived from trypsin digestion of MvFL and the sequence of a RNA-binding family protein isoform 2 from *Theobroma cacao* (EOY11515.1)..... 77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1	LECTINAS	14
2.1.1	Lectinas de plantas.....	16
2.2	PROTEÍNAS MULTIFUNCIONAIS.....	17
2.3	INIBIDORES DE TRIPSINA.....	18
2.4	PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS E INIBIDORES DE TRIPSINA.....	21
2.5	CITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS	25
2.5.2	Importância da avaliação da citotoxicidade de compostos naturais ...	27
2.6	IMUNOMODULAÇÃO	29
2.6.1	Mediadores da resposta imune	29
2.6.3	Imunomodulação no tratamento de doenças.....	34
2.6.4	Lectinas e inibidores de protease na imunomodulação	37
2.7	BIODISPONIBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	39
2.8	<i>Microgramma vacciniifolia</i>	40
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	ARTIGO.....	44
5	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS.....	79

1 INTRODUÇÃO

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos de forma reversível e específica, podendo promover a aglutinação de células e precipitar polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos. São amplamente encontradas na natureza, sendo isoladas de microrganismos, plantas, invertebrados e vertebrados. Nas plantas, lectinas têm sido obtidas de folhas, entrecascas, raízes, rizomas, bulbos, vagens, sementes, frutos e flores. A interação de lectinas com carboidratos de superfícies celulares pode desencadear diversas repostas intracelulares, o que resulta em uma gama de atividades biológicas que têm sido exploradas com diversos fins biotecnológicos (PAIVA et al., 2011, 2013; DAN; LIU; NG, 2016).

Determinadas proteínas são consideradas multifuncionais por apresentarem duas ou mais funções catalíticas ou de ligação em uma única molécula (KIRSCHNER; BISSWANGER, 1976). Um exemplo é a proteína CrataBL, isolada da entrecasca de *Crataeva tapia*, que possui atividade lectínica e inibidora de tripsina (NUNES et al., 2015). Os inibidores de tripsina podem ser proteínas que bloqueiam ou reduzem a capacidade catalítica dessa protease (PONTUAL et al., 2012). São encontrados em plantas, animais e microrganismos e também apresentam diversas atividades biológicas (BIJINA et al., 2011; PAIVA et al., 2013; SRIKANTH; CHEN, 2016).

O sistema imune é a primeira barreira na prevenção de doenças e a modulação de seus componentes pode ser uma peça-chave na prevenção de determinadas doenças (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013). A expansão de doenças infecciosas crônicas, de tumores malignos e de doenças auto-imunes é geralmente o resultado de um colapso da resposta imune fundamental. Nesse contexto, a imunomodulação pode ser definida como qualquer tipo de intervenção destinada a restaurar a função normal do sistema imunológico. Os imunomoduladores podem apresentar atividades positiva (imunoestimulação) ou negativa (imunossupressão) sobre uma função imunológica específica (MAHIMA et al., 2012; DHAMA et al., 2015). Compostos de origem vegetal, dentre eles proteínas bioativas apresentam a capacidade de modular o sistema imunológico (FANG; NG, 2015; ZHANG et al., 2015; DITAMO et al., 2016).

Conhecida popularmente por “polipódio vacinifólio”, “erva-silvina” ou “erva-teresa”, *Microgramma vacciniifolia* é uma planta epífita com diversas propriedades medicinais tais como uso para tratamento de diferentes tipos de infecções (SANTOS; SYLVESTRE, 2006; AGRA et al., 2008; PERES et al., 2009). O rizoma de *M. vacciniifolia* contém uma lectina (denominada MvRL) que apresentou atividades antifúngica contra *Fusarium*, inseticida contra *Nasutitermes corniger*, antitumoral contra células NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (ALBUQUERQUE et al., 2012, 2014a, 2014b).

Estudos prévios realizados no Laboratório de Bioquímica de Proteínas da Universidade Federal de Pernambuco demonstraram que extrato das frondes de *M. vacciniifolia* apresentou atividade hemaglutinante, indicativo da presença de lectinas. Dessa forma, este trabalho descreve a purificação e caracterização de uma lectina multifuncional a partir das frondes de *M. vacciniifolia* (MvFL, do inglês *M. vacciniifolia frond lectin*), bem como a avaliação de suas atividades citotóxica e imunomoduladora sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

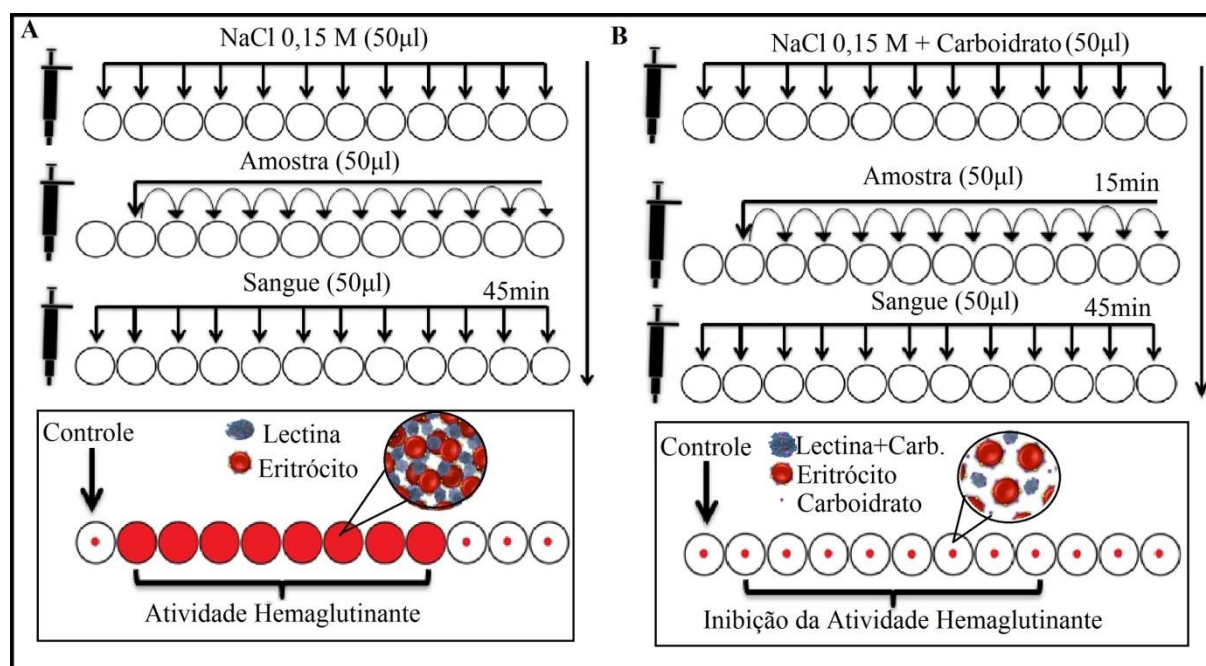
2.1 LECTINAS

As lectinas são proteínas que interagem com carboidratos de forma específica, sendo amplamente encontradas na natureza. Lectinas vêm sendo isoladas de bactérias (VAINAUSKAS et al., 2016), fungos (SINGH; KAUR; SINGH, 2015), plantas (GOMES et al., 2013) e animais (WANG; ZHAO; WANG, 2014). Em todos estes organismos, as lectinas podem estar envolvidas em processos biológicos normais, inclusive como parte de mecanismos de defesa (GABIUS et al., 2011).

Lectinas possuem, pelo menos, um domínio não catalítico que é capaz de se ligar reversivelmente a carboidratos simples (monossacarídeos, dissacarídeos), oligossacarídeos complexos (incluindo a porção glicídica de glicoconjugados) e/ou polissacarídeos (HAMID et al., 2013). A capacidade de se ligar a glicoproteínas e glicolipídeos presentes em superfícies celulares e a presença de pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos na estrutura de uma lectina confere a ela a propriedade aglutinante. O ensaio de hemaglutinação, no qual se avalia a capacidade de interação entre a lectina e carboidratos da superfície dos eritrócitos, é o método mais utilizado para detecção de lectinas. Quando a lectina se associa com esses açúcares, forma-se uma rede de hemaglutinação (Figura 1A). Caso não ocorra a hemaglutinação, tais eritrócitos depositam-se no fundo da placa (SANTOS et al., 2013).

Uma vez que o aspecto visual da hemaglutinação pode ser similar ao observado em casos de dispersão ou lise dos eritrócitos, é realizado o teste de inibição para confirmar a aglutinação promovida por lectinas. Nesse teste, são adicionados carboidratos livres em solução que interagem com as lectinas, impedindo que as mesmas se liguem à superfície dos eritrócitos e formem a rede de hemaglutinação (Figura 1B) (SANTOS et al., 2013).

FIGURA 1 - Ensaios para detecção da presença de lectinas. (A) Ensaio de hemaglutinação. (B) Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos.



Fonte: Elaborada pela autora.

As lectinas podem ser classificadas com base na sua especificidade de ligação a carboidratos em lectina ligadora de glicose/manose, N-acetilglicosamina, galactose/N-acetilgalactosamina, fucose, entre outros açúcares (RAMOS et al., 2000; HAMID et al., 2013).

A capacidade de ligação a carboidratos de superfícies celulares pode resultar no desencadeamento de repostas intracelulares, o que promove uma gama de propriedades biológicas as quais têm sido exploradas com diversos fins biotecnológicos e medicinais (PAIVA et al., 2011; SOUZA et al., 2013; SMIGIEL et al., 2014; IORDACHE et al., 2015; YAU et al., 2015; DAN; LIU; NG, 2016). Ainda, a significância funcional de carboidratos, particularmente aqueles associados a proteínas, tem sido elucidada por meio de investigações utilizando lectinas (GABIUS et al., 2011; NÓBREGA et al., 2012; GEETHANANDAN et al., 2013; LICHTENSTEIN; RABINOVICH, 2013).

Dentre as atividades biológicas descritas para lectinas podemos citar inseticida (NAPOLEÃO et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; LIMA et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2017), antiviral (FANG et al., 2010a; SATO et al., 2012), antifúngica (ALBUQUERQUE et al., 2014b; WU et al., 2016), antibacteriana

(MOURA et al., 2015; SINGH; KAUR; SINGH, 2015; AL-MAMUN et al., 2016; SILVA et al., 2016a), anti-angiogênica (AMBASTA et al., 2015), antinociceptiva (ARAÚJO et al., 2011; CAMPOS et al., 2016), antitumoral (SHI et al., 2014; YAU et al., 2015; SINGH et al., 2016), anti-inflamatória (CAMPOS et al., 2016), mitogênica (DHUNA, 2010; CHAN et al., 2012; SINGH; KAUR; SINGH, 2015), imunomoduladora (MELO et al., 2010; PRASANNA; VENKATESH, 2015; DITAMO et al., 2016; SINGH et al., 2017), antioxidante e gastroprotetora (RODRIGUES LACERDA et al., 2016).

Adicionalmente, as lectinas têm sido estudadas como ferramentas para cooperar com o diagnóstico e prognóstico de doenças, como o câncer, sendo usadas em sondas histoquímicas devido aos seus mecanismos de reconhecimento diferencial de tecidos ou ainda como ferramentas multifuncionais para marcar e identificar diferentes tipos de células (SANTOS et al., 2014; SILVA et al., 2016b).

2.1.1 Lectinas de plantas

As plantas são fontes ricas em compostos de estruturas variadas e potentes efeitos biológicos de relevância no tratamento de uma série de doenças, incluindo câncer e doenças infecciosas. Mais de 80% do total da população mundial recorre à medicina herbal para as suas necessidades primárias de cuidados com a saúde (GAO, 2011). Normalmente, compostos bioativos de vegetais possuem maior especificidade para as células-alvo (ARUL; SUBRAMANIAN, 2013; TANIGUCHI et al., 2015), o que aumenta a busca por fitoquímicos. A investigação de novos agentes medicinais de origem vegetal pode então contribuir para controlar o crescente problema de resistência a fármacos e toxicidade de antibióticos comercialmente disponíveis (AL-MAMUN et al., 2016).

Nesse contexto, entram em evidência as lectinas isoladas de plantas, a partir dos mais variados tecidos, tais como flores, folhas, sementes, vagens, bulbos, frutos e raízes (PAIVA et al., 2011; DIAS et al., 2015). As lectinas de plantas podem ser produzidas constitutivamente ou em resposta ao estresse ambiental e ataque de patógenos (lectinas induzidas). Normalmente, as lectinas produzidas constitutivamente são armazenadas em vacúolos ou no espaço extracelular e estão presentes, principalmente, em tecidos de armazenamento (LANNON; VAN DAMME, 2010), sendo descritas como relacionadas a defesa de plantas contra patógenos e

insetos herbívoros (GUO et al., 2013; AL ATALAH; SMAGGHE; VAN DAMME, 2014). As induzidas, situadas no núcleo e no citoplasma, também estão envolvidas no processo de defesa das plantas (LANNOO; VAN DAMME, 2010, 2014; MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). Muitos estudos mostraram que as lectinas de plantas exibem uma variedade de atividades biológicas, dentre elas todas as descritas na seção anterior.

Uma atual classificação de lectinas de plantas baseia-se na estrutura e sequência dos domínios que reconhecem carboidratos, sendo agrupadas nas seguintes famílias: (1) aglutininas homólogas a *Agaricus bisporus*, (2) amarantinas, (3) homólogas de quitinase classe V, (4) aglutinina de *Euonymus europaeus*, (5) aglutinina de *Galanthus nivalis*, (6) proteínas com domínio heveínico (motivo estrutural de reconhecimento da quitina), (7) jacalinas, (8) lectinas de leguminosas, (9) lectinas com domínio Lys M (motivo de lisina), (10) aglutinina de *Nicotiana tabacum* e (11) família ricina-B (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015). As lectinas de plantas também podem ser agrupadas em diferentes famílias de acordo com similaridades estruturais e na sequência de aminoácidos: lectinas de leguminosas, proteínas inativadoras de ribossomos de tipo II, lectinas de monocotiledôneas, lectinas ligadoras de manose, etc. Podem também ser categorizadas estruturalmente conforme o número e característica dos domínios que possuem: *merolectinas*, quando possuem apenas um domínio capaz de ligar a carboidratos e dessa forma não apresentam atividade aglutinante; *hololectinas*, que possuem dois ou mais domínios ligadores de carboidratos; *quimerolectinas*, que possuem um domínio que liga a carboidratos e outro que possui uma atividade biológica diversa; e *superlectinas*, que possuem dois ou mais domínios que reconhecem estruturas diferentes de carboidratos (HAMID et al., 2013).

2.2 PROTEÍNAS MULTIFUNCIONAIS

Proteínas multifuncionais são definidas por apresentarem duas ou mais funções bioquímicas na mesma molécula, tais como funções catalíticas ou de ligação (KIRSCHNER; BISSWANGER, 1976; DÍAZ-RAMOS et al., 2012; CHAPPLE et al., 2015; KIM et al., 2016). Tais proteínas multifuncionais podem interagir especificamente com conjuntos distintos de alvos, simultaneamente ou não,

dependendo da função realizada. Proteínas multifuncionais são importantes na regulação transcricional e sinalização sendo partes integrantes da maioria dos processos celulares (BECKER et al., 2012).

O termo “multifuncional” enquadra-se para algumas lectinas. Por exemplo, uma proteína isolada de oócitos de *Rana catesbeiana* possui atividades lectínica e enzimática (ribonuclease) (TATSUTA et al., 2013). A lectina da casca de *Crataeva tapia* (CrataBL), é uma proteína multifuncional com atividades lectínica e inibidora de tripsina (NUNES et al., 2015). Similarmente, foi também descrita a purificação de um inibidor de tripsina de sementes de *Abelmoschus moschatus* com atividade de lectina (DOKKA; KONALA; DAVULURI, 2014).

2.3 INIBIDORES DE TRIPSINA

Inibidores de protease são compostos que bloqueiam ou reduzem a capacidade catalítica de proteases. Estes inibidores possuem natureza química distinta podendo ser, no caso daqueles de origem vegetal, peptídicos ou metabólitos secundários (PAIVA et al., 2011; PONTUAL et al., 2012). Os inibidores proteicos podem ser classificados em competitivos ou não competitivos. Os primeiros atuam competindo com substratos pelo sítio ativo das proteases, com o qual estabelecem interações estáveis; os não-competitivos, por sua vez ligam-se em locais diferentes do sítio catalítico, resultando em modificações conformacionais na molécula da protease impossibilitando a realização da catálise (LIAO et al., 2007). Os inibidores de protease são encontrados em plantas, animais e microrganismos (BIJINA et al., 2011).

Os inibidores de protease classificam-se segundo o tipo de protease inibida em: (1) inibidores de serinoproteases, (2) aspártico-proteases, (3) cisteíno-proteases e (4) metaloproteases. Contudo, alguns inibidores de protease podem interferir em mais de um tipo de protease. Por exemplo, os da família das serpinas são geralmente ativos contra as serinoproteases e as cisteíno-proteases (FEAR; KOMARNYTSKY; RASKIN, 2007).

Inibidores de protease provenientes de plantas vêm sendo purificados, caracterizados e investigados quanto ao potencial terapêutico usando métodos *in vitro*, tornando-se assim excelentes fontes de pesquisa para fins farmacológicos

(MAJUMDAR, 2013; ODEI-ADDO et al., 2013). SRIKANTH & CHEN (2016) chamam atenção para a importância da exploração de mais inibidores de protease de plantas (proteicos) e investigação de suas atividades para o tratamento e controle de doenças, devido ao seu enorme potencial na medicina.

Essas proteínas são produzidas constitutivamente ou por indução em tecidos vegetativos e reprodutivos de plantas, estando associadas à defesa contra herbívoros e regulação da morte celular programada (SOLOMON et al., 1999; HARTL et al., 2011; ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Ainda, esses inibidores podem funcionar como proteínas de armazenamento (MANDAL et al., 2002; KLOMKLAO et al., 2011; CHAN; ZHANG; NG, 2013).

A tripsina é uma endopeptidase do grupo das serinoproteases amplamente encontrada no sistema digestivo de vertebrados, sendo também expressa por microrganismos, e invertebrados (BHATTACHARYYA; LEIGHTON; BABU, 2007; ŠLECHTOVÁ et al., 2015). A importância desta enzima para esses organismos tem estimulado a busca por inibidores de tripsina para o uso no controle de pragas de interesse econômico, e como agentes terapêuticos para o tratamento de infecções causadas por microrganismos (MACEDO et al., 2007, 2010; PRASAD; DUTTA-GUPTA; PADMASREE, 2010; KLOMKLAO et al., 2011; PATRIOTA et al., 2016).

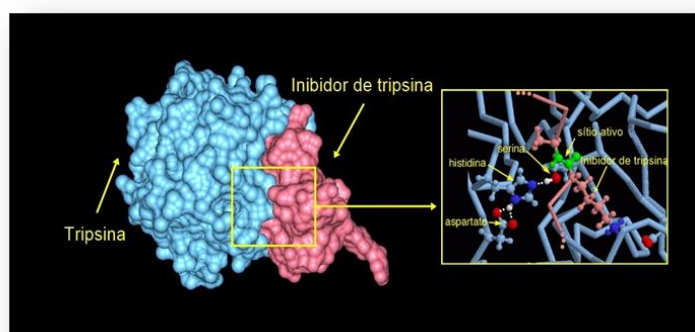
A tripsina apresenta, em seu sítio ativo, a tríade catalítica representada pelos resíduos de serina, histidina e aspartato (Figura 2). Esta tríade atribui ao resíduo de serina um caráter nucleofílico criando um espaço eletrostático favorável para a interação com resíduos de aminoácidos positivamente carregados. Esta enzima apresenta uma especificidade cerca de 10 vezes maior para arginina do que para lisina (HEDSTROM, 2002).

Proteínas com atividade inibidora de tripsina podem interagir com o sítio ativo ou com outras regiões da enzima, através de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. No caso dos inibidores competitivos, a inibição ocorre quando a sequência de aminoácidos presente no sítio reativo do inibidor é complementar àquela presente no sítio ativo da enzima, mas não passível de sofrer a catálise da quebra das ligações peptídicas (MAJOR; CONSTABEL, 2008).

A atividade inibidora de tripsina, *in vitro*, pode ser detectada pela incubação de uma preparação teste com a tripsina em presença do substrato sintético e cromogênico *N*-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BApNA) (Figura 3A). A tripsina é capaz de hidrolisar a ligação amida envolvendo o grupo arginil na molécula do

BApNA liberando p-nitroanilina no meio reacional (KAKADE; SIMONS; LIENER, 1969). Este composto químico absorve a luz, no comprimento de onda correspondente à região do amarelo, e pode ser detectado pela medida da absorbância a 405 nm. A interação entre tripsina e inibidor (complexo inativo), ocupa o sítio ativo e assim o BApNA não é clivado e não ocorre produção de cor (Figura 3B) (PONTUAL, 2012).

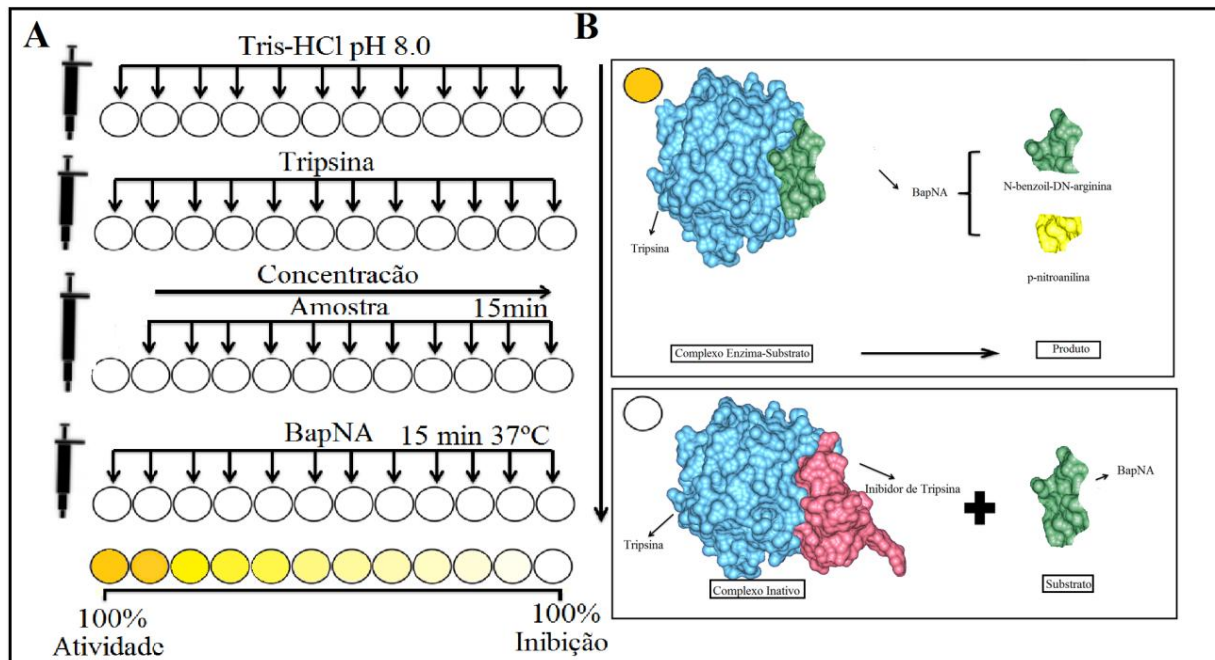
FIGURA 2 - Estrutura molecular tridimensional de um complexo enzima-inibidor, evidenciando a tríade catalítica da tripsina.



Fonte: Elaborada pela autora a partir de imagem disponível em:
<https://cdn.rcsb.org/pdb101/motm/images/2ptc-rasmol.gif>.

Inibidores de tripsina isolados de plantas apresentam atividades antiviral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e antitumoral, sendo candidatos a agentes terapêuticos (FEAR; KOMARNYTSKY; RASKIN, 2007; KIM et al., 2009; PAIVA et al., 2013; DOKKA; KONALA; DAVULURI, 2014; FANG; NG, 2015; PATRIOTA et al., 2016; SRIKANTH; CHEN, 2016).

FIGURA 3 - Detecção de inibidor de tripsina por ensaio colorimétrico em microplaca. (A) Ensaio de determinação da atividade inibidora de tripsina. (B) Representação da interação entre tripsina e o substrato *N*-benzoi-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BapNA), a qual resulta na clivagem do BapNA em *N*-benzoi-DL-arginina e *p*-nitroanilina. A interação entre tripsina e inibidor forma um complexo inativo devido, por exemplo, à ocupação do sítio ativo.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS E INIBIDORES DE TRIPSINA

As técnicas para isolar lectinas e inibidores de tripsina consistem em etapas gerais para purificação de proteínas. Ao serem extraídas de seu meio biológico, as proteínas ficam expostas a diversas condições ambientais que podem comprometer sua estrutura e função. Sendo assim, é necessário, ao longo de todo o processo de purificação, certificar-se de que a proteína que está sendo isolada permaneça bioativa. Para tanto, é necessário um método sensível e reprodutível para acompanhar a purificação, sendo o ensaio de hemaglutinação o mais utilizado no caso de lectinas, como mencionado anteriormente, e para os inibidores de tripsina o ensaio de atividade inibidora de tripsina descrito na página anterior. Ademais, o processo deve resultar em um aumento da atividade específica (relação entre a atividade da proteína de interesse e o total de proteínas presentes na amostra), o

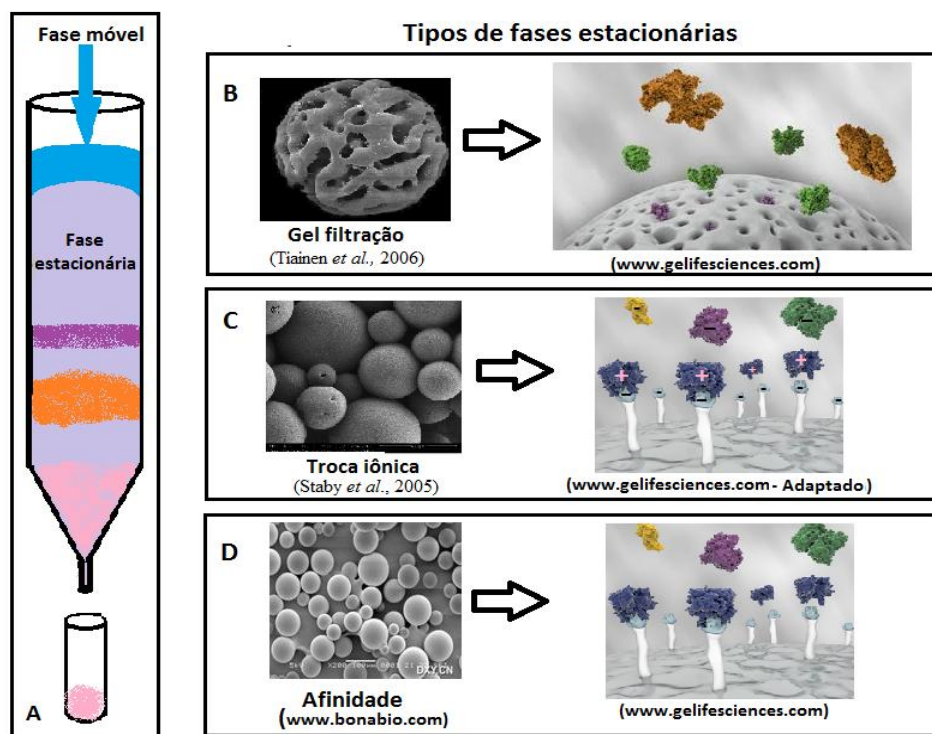
que indica que as moléculas da proteína em estudo estão sendo concentradas, enquanto proteínas que não são desejadas estão sendo eliminadas (SANTOS et al., 2013).

Para obtenção dos extratos, leva-se em consideração as condições em que a proteína é mais facilmente extraída do tecido, mas que também permaneça estável. Fatores importantes a serem considerados são pH, temperatura, necessidade de uso de detergentes não iônicos (proteínas de membrana), presença de íons metálicos, etc. (COELHO et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Após a extração, a proteína de interesse pode passar por etapas de pré-purificação com a finalidade de concentrar a proteína de interesse e eliminar as demais. As técnicas de pré-purificação exploram diferenças de solubilidade, pH ótimo e de estabilidade frente a temperatura. Um dos procedimentos mais utilizados é a precipitação salina com sulfato de amônio (sal altamente hidrofílico), pois além de promover a purificação, mantém a proteína sua conformação nativa (NELSON; COX, 2011; PAIVA et al., 2011). Após a purificação parcial, as proteínas são normalmente submetidas a processos cromatográficos.

Técnicas cromatográficas são constituídas por duas fases (estacionária e móvel) e consistem em um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura devido à migração/interação diferencial com a fase estacionária conforme a passagem da fase móvel (Figura 4A). A fase estacionária (também denominada matriz) determina o tipo de coluna e as mais usadas na purificação de proteínas são as matrizes de exclusão molecular, troca iônica e afinidade (NELSON; COX, 2011).

FIGURA 4 - Métodos cromatográficos para purificação de proteínas. (A) Esquema geral das duas fases que constituem uma cromatografia em coluna. Representações das matrizes usadas em cromatografias de gel filtração (B), troca iônica (C) e afinidade (D).



Fonte: PROCÓPIO (2016).

A cromatografia de exclusão molecular (ou gel filtração) separa as moléculas conforme o tamanho e a forma. A fase estacionária é formada por microesferas porosas (Figura 4B). Moléculas menores penetram nos poros das microesferas tendo o seu percurso retardado enquanto as maiores não são capazes de penetrar nos poros das esferas e são excluídas rapidamente da coluna (NELSON; COX, 2011; SANTOS et al., 2013).

A cromatografia de troca iônica separa as proteínas de acordo com a sua carga elétrica líquida, a qual varia conforme o pH do meio. A carga líquida de proteínas é positiva em valores de pH abaixo do seu ponto isoelétrico (pI) e negativa em valores de pH acima do pI. Isso deve ser levado em consideração tanto na escolha da matriz cromatográfica (por exemplo, a DEAE-Sephadex possui carga positiva e para que a proteína adsorva a matriz ela deve apresentar carga negativa), bem como da solução-tampão utilizada como fase móvel (na qual a proteína deve estar com a carga líquida desejada). A fase estacionária é constituída por uma matriz carregada (positiva ou negativamente) que retarda a passagem de proteínas

com carga oposta (Figura 4C). A eluição das proteínas adsorvidas pode ser realizada através de alterações do pH ou da força iônica da fase móvel. (NELSON; COX, 2011).

A cromatografia por afinidade separa as proteínas conforme a especificidade de ligação da proteína com a matriz (Figura 4D). Dessa forma, a proteína de interesse fica retida na coluna enquanto as outras são eliminadas. Após essa eliminação, a proteína ligada à matriz pode ser eluída por mudança no pH ou na molaridade da fase móvel, bem como por irrigação da coluna com solução do ligante específico na forma livre. No caso de lectinas, as matrizes de afinidade podem conter monossacarídeos ou glicoconjugados imobilizados, ou ainda podem consistir em suportes polissacarídicos. No caso de inibidores de tripsina, as matrizes de afinidade podem conter a própria enzima tripsina imobilizada (NELSON; COX, 2011; COELHO et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

A caracterização de proteínas consiste no uso de diferentes técnicas experimentais que visam identificar propriedades da proteína relacionadas ao grau de pureza, à composição de aminoácidos, à conformação, à constituição em subunidades, à especificidade de ligação, dentre outras características (PROCÓPIO, 2016).

A eletroforese em gel de poliacrilamida é um método analítico que consiste na migração de partículas carregadas sob influência de um campo elétrico. Esse gel pode ter malhas com tamanhos diferentes, que variam de acordo com a concentração de acrilamida e bis-acrilamida. Através dos métodos eletroforéticos, é possível verificar o grau de pureza e a massa molecular da proteína em análise (PAIVA et al., 2011). Na focalização isoeletrica, as proteínas migram em um meio com um gradiente de pH até o pH correspondente ao seu ponto isoeletrico. Na eletroforese em condições desnaturantes verifica-se o peso molecular e a composição em subunidades. Em condições redutoras, verifica-se a presença de subunidades unidas por pontes dissulfeto (SANTOS et al., 2013).

O agente desnaturante mais utilizado em eletroforese é o dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS liga-se às porções hidrofóbicas da proteína fazendo com que esta permaneça em uma conformação estendida estável e também adiciona carga negativa a toda a molécula da proteína anulando a sua carga líquida original. Assim, a velocidade da migração depende apenas do tamanho do complexo proteína-SDS: quanto menor for esse complexo, mais rápida a migração. A presença do SDS

separa ainda subunidades que estavam unidas por ligações não-covalentes. No caso de subunidades unidas por pontes dissulfeto, para separá-las é necessário utilizar um agente redutor, como β -mercaptoetanol ou ditioneitol (PAIVA et al., 2011).

A fluorimetria tem sido muito utilizada para investigar alterações na estrutura terciária de proteínas (MESQUITA, 2010). Este estudo baseia-se na fluorescência intrínseca das proteínas, a partir da análise dos aminoácidos aromáticos presentes na cadeia polipeptídica, os quais podem ficar mais ou menos expostos ao meio aquoso, alterando o seu padrão de emissão de fluorescência, conforme as condições físico-químicas em que a proteína se encontra. As análises também podem ser efetuadas através da fluorescência extrínseca, utilizando um marcador ou sonda que se liga de forma não covalente à cadeia polipeptídica (COSTA, 2009). Um exemplo de sonda fluorescente para proteínas é o bis-ANS (4,4'-bis-1-anilinoftaleno-8-sulfonato), um composto que não fluoresce ou fluoresce fracamente em água, mas fluoresce fortemente quando em ambiente hidrofóbico; a fluorescência do bis-ANS pode aumentar em até 200 vezes quando ligado a estruturas hidrofóbicas (COSTA, 2009; BELOVOLOVA; GLUSHKOV; VINOGRADOV, 2011). Este fenômeno permite acompanhar alterações estruturais durante a desnaturação da proteína, pois a exposição de sítios hidrofóbicos à água resulta em diminuição da fluorescência dessa sonda (HAWE; POOLE; JISKOOT, 2010).

2.5 CITOTOXICIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS

2.5.1 Tipos de morte celular

Nos animais, a morte celular regulada desempenha papéis biológicos que vão desde a embriogênese até a imunidade. A desregulação, positiva ou negativa, do controle da morte celular sustenta patologias diversas, incluindo câncer, auto-imunidade, neurodegeneração e lesão. Geralmente, os meios pelos quais uma célula morre podem ser divididos em passivo, ocorrendo como resultado de danos

avassaladores, ou ativo, quando a própria célula contribui para sua própria morte (TAIT; ICHIM; GREEN, 2014).

A morte celular programada refere-se à apoptose e à autofagia, que são processos evolutivamente conservados para a manutenção da homeostase e eliminação de células nocivas (OUYANG et al., 2012); ambos os tipos de morte possuem características morfológicas e processos fisiológicos distintos, no entanto, existem inter-relações complexas entre elas (LI et al., 2009; CHOI, 2012).

A apoptose é a forma mais bem caracterizada da morte celular programada, tendo sido investigada extensivamente (GREEN, 2011; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013; PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013). A apoptose envolve o desmonte controlado de componentes intracelulares, evitando a inflamação e danos nas células circundantes. É caracterizada por condensação da cromatina, fragmentação nuclear (cariorrhexis), encolhimento (picnose), retração pseudópoda, formação de corpos apoptóticos e fagocitose por células vizinhas (HENGARTNER, 2000; KEPP et al., 2011; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). As caspases, um grupo de cisteino-proteases, são as principais impulsionadoras da morte celular apoptótica (PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013). As caspases iniciadoras ativam outras caspases que coordenam suas atividades para clivar proteínas estruturais e ativar outras enzimas-chave durante a apoptose. Existem várias vias apoptóticas, as quais podem ser distinguidas pelos adaptadores e caspases iniciadoras envolvidas, mas a maioria dos programas apoptóticos se enquadra nas categorias extrínseca (que se inicia na membrana plasmática através da ligação de um ligante externo) ou intrínseca (ocorre através da mitocôndria, com liberação de citocromo C) (HENGARTNER, 2000; KEPP et al., 2011; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013; PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013).

A autofagia é um mecanismo celular evolutivamente conservado para o apuramento dos componentes de células eucarióticas danificadas demasiadamente, o que leva a efeitos tanto pró-sobrevivência quanto pró-morte (SHI et al., 2013). A autofagia é um processo dependente de lisossomos que degrada desde moléculas a organelas inteiras (MIZUSHIMA, 2011). Durante a autofagia, uma membrana de isolamento se forma no citoplasma, engolfando a carga citosólica para criar um autofagossomo. Os autofagossomos maduros fundem-se com os lisossomos levando a uma quebra do material engolfado, permitindo que as macromoléculas sejam recicladas. A autofagia é um processo complexo realizado por proteínas

chamadas ATG. Ao nível organizacional, a autofagia é crucial para muitos processos, incluindo desenvolvimento, imunidade e envelhecimento celular (CHOI; RYTER; LEVINE, 2013; GALLUZZI et al., 2014; SHIBUTANI et al., 2015).

A necrose e a necroptose são formas de morte celular que se caracterizam pela distensão das organelas com a consequente perda da integridade da membrana celular e a liberação de constituintes intracelulares no espaço extracelular, o que pode levar a inflamação. Após lesão celular aguda, a necrose aparentemente ocorre de forma desordenada. No entanto, estudos recentes mostraram que a necrose também pode ser induzida por estímulos específicos e de forma programada por uma via de sinalização, sendo esse tipo de morte conhecida como necroptose (WALLACH; KANG; KOVALENKO, 2014). As células necróticas apresentam traços característicos, incluindo um citoplasma cada vez mais translúcido, inchaço de organelas citoplasmáticas, condensação da cromatina em remendos circunscritos e irregulares e um aumento no volume celular que culmina na ruptura mecânica da membrana plasmática. As células necróticas não se fragmentam em corpos discretos, nem seus núcleos, que se acumulam em tecidos necróticos (KEPP et al., 2011). A necrose tem sido considerada como um evento passivo resultante de um estímulo extrínseco celular, como a infecção por patógenos (BLÉRIOT; LECUIT, 2016).

Outras formas de morte não-apoptóticas podem ocorrer por pirocitose, morte celular independente de caspase e catástrofe mitótica. Essas formas de morte podem ser contribuintes da morte celular fisiológica tanto em casos de apoptose proficiente como deficiente. Entender como ocorre a morte celular caspase-independente pode permitir o desenvolvimento de novas alternativas de manipulações que possam ser usadas terapeuticamente em vários processos, incluindo câncer e doença auto-imune (TAIT; ICHIM; GREEN, 2014).

2.5.2 Importância da avaliação da citotoxicidade de compostos naturais

O primeiro passo para avaliar compostos candidatos a drogas em experimentos *in vitro* e *in vivo* é verificar em que doses o composto pode ser danoso para células normais. A necessidade de métodos *in vitro* eficazes para medir e

prever a citotoxicidade é crescente, pois a toxicidade é a principal razão para a alta taxa de falha (40-50%) de medicamentos farmacêuticos. Além disso, o interesse por produtos naturais tem produzido enormes bibliotecas de compostos químicos novos, complexos, e altamente diversos que devem ser rastreados quanto a citotoxicidade *in vitro* (SUMANTRAN, 2011).

Para lidar com uma diversidade de condições desfavoráveis, as plantas sofreram adaptações evolutivas tais como a elaboração de estratégias sofisticadas de defesa e a síntese de uma impressionante diversidade de compostos bioativos, alguns dos quais são tóxicos (MAAG et al., 2015). Dentre os diferentes compostos tóxicos relatados em plantas está um grande grupo de compostos de baixo peso molecular, dentre os quais alcaloides, terpenóides, taninos e glicosídeos (MITHÖFER; BOLAND, 2012; TAKANASHI; SHITAN; YAZAKI, 2014). Além disso, as plantas também sintetizam um arsenal de proteínas, tais como lectinas, proteínas inativadoras de ribossomo (RIPs), inibidores de protease que ajudam a planta em sua batalha pela sobrevivência, sendo essa toxicidade útil para a planta em sua defesa contra insetos herbívoros e patógenos (LANNOO; VAN DAMME, 2014; DANG; VAN DAMME, 2015). Porém, compostos secundários (VALLI et al., 2012) e extratos de plantas (MATIĆ et al., 2013) podem causar toxicidade para células humanas.

As lectinas foram inicialmente conhecidas por sua toxicidade devido à identificação da ricina, uma lectina tóxica presente no extrato de sementes de *Ricinus communis* (LORD et al., 2003). Lectinas tóxicas para células normais humanas têm sido descritas (FRANZ et al., 2006; ARAÚJO et al., 2013). Por outro lado, outras lectinas e inibidores de protease que têm apresentado citotoxicidade para células tumorais ou para células de patógenos também têm se mostrado não tóxicos para células normais humanas nas doses em que apresentam suas bioatividades (ALBUQUERQUE et al., 2014a; PATRIOTA et al., 2016; RODRIGUES LACERDA et al., 2016; BATISTA et al., 2017). Um dos tipos celulares atualmente empregados para avaliar a citotoxicidade, *in vitro*, de constituintes bioativos de plantas (proteínas, por exemplo) são células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs), pois as mesmas são de fácil obtenção e separação (FERREIRA et al., 2016; PATRIOTA et al., 2016).

Um método apropriado para a detecção precoce de apoptose é o monitoramento da externalização de resíduos de fosfatidilserina no exterior da

membrana plasmática de células apoptóticas individuais. Isto pode ser feito utilizando a proteína anexina V, que é capaz de ligar a esse fosfolípido. A conjugação da anexina V com marcadores fluorescentes ou estreptavidina, por exemplo, permite a quantificação por citofluorimetria, imunofluorescência e imunohistoquímica. Quando a membrana plasmática é permeabilizada, a anexina V liga-se à fosfatidilserina intracelular, o que implica em uma marcação que não corresponde a células em apoptose. Para distinguir as células apoptóticas (que são positivas para anexina V e possuem membranas plasmáticas intactas) de células não-apoptóticas, a marcação com anexina V é usualmente combinada com corantes impermeáveis às células, tais como iodeto de propídeo. O iodeto de propídeo só é capaz de marcar as células quando ocorre a perda da integridade de membrana (necrose), o que permite que este marcador penetre na célula e se associe com as moléculas de ácidos nucleicos. Esse método é de alta sensibilidade e pode ser realizado em citômetro de fluxo (GALLUZZI et al., 2009; KEPP et al., 2011; SUMANTRAN, 2011).

2.6 IMUNOMODULAÇÃO

2.6.1 Mediadores da resposta imune

O sistema imunológico é um mecanismo de defesa que reconhece e responde a uma grande variedade de patógenos ou lesões. É dividido em sistema imune inato (ou não específico) e sistema imune adaptativo ou específico. O sistema inato é uma resposta geral e não se altera com a exposição repetida. Por outro lado, o sistema adaptativo aumenta sua resposta apropriadamente em exposição repetida e exibe especificidade e memória. Cada um dos dois sistemas é constituído por componentes celulares e humorais (proteínas). A integração entre os dois sistemas é mediada por moléculas denominadas citocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; COTA; MIDWINTER, 2015).

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas produzidas por uma grande variedade de células (tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, células B e células T) que atuam através de receptores de superfície celular expressos pelas

células-alvo para regular o crescimento, maturação e responsividade de populações particulares de células (DINARELLO, 2007; RAMANI et al., 2015).

As citocinas incluem linfocinas, monocinas, quimiocinas, interleucinas (ILs), fatores estimuladores de colônias e fatores de crescimento e têm uma meia vida muito curta e agem localmente em concentrações picomolares. As citocinas formam redes interreativas complexas com potencial autócrino, parácrino e endócrino. É crescente o número de citocinas identificadas, mas em geral elas estão classificadas em quatro famílias: família de feixes alfa-hélice (inclui subfamília de IL-2, subfamília de IFN e subfamília de IL-10), família IL-1, família IL-17 e citocinas de nódulos de cisteína (superfamília fator de transformação do crescimento β [TGF- β]) (RAMANI et al., 2015; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

Funcionalmente, existem citocinas imunomoduladoras tipos 1 e 2. O tipo 1 (Th1) favorece a regulação das respostas imunes celulares (IFN- γ , fator de necrose tumoral α [TNF- α], IL-1, IL-2) enquanto o tipo 2 (Th2) comanda a produção de anticorpos (TGF- β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13) (CHAPLIN, 2010; RAMANI et al., 2015). Algumas citocinas são categorizadas funcionalmente como pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α) ou anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13). A interação entre elas pode ser aditiva, sinérgica ou antagônica, ou ainda pode envolver a indução de uma citocina por outra (COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010).

As citocinas podem ser pleiotrópicas no que se refere à sua capacidade de atuar em múltiplos objetivos e efeitos fisiológicos. A pleiotropia funcional e redundância (várias citocinas podem efetuar as mesmas ações) são características das citocinas que muitas vezes mostram atividades sobrepostas que regulam a proliferação ou diferenciação, dependendo do tipo e estado de desenvolvimento das células-alvo envolvidas (SCHELLER et al., 2011; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que promove a inflamação sistêmica através da indução de febre, da resposta de fase aguda e da ativação de macrófagos e neutrófilos. Embora o TNF- α seja crítico para a defesa do hospedeiro contra uma variedade de agentes patogênicos, está fortemente implicado na patogênese de várias desordens inflamatórias, sendo os inibidores de TNF- α altamente eficazes no tratamento destas desordens (CROFT; BENEDICT; WARE, 2013).

O IFN- γ é uma citocina pleiotrópica conhecida pelo seu papel durante a inflamação Th1, onde é necessária para a depuração de patógenos intracelulares. Além dos seus efeitos ativadores nas células T citotóxicas CD8⁺, células *natural-killer* (NK) e macrófagos, o IFN- γ também polariza as células T CD4⁺ nativas para a linhagem Th1 (NELSON; COX, 2011).

A IL-2, produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados, exerce papéis centrais na geração, ativação e homeostase dos linfócitos T. O receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) é expresso constitutivamente em células T reguladoras CD4⁺ (Treg) e em células CD4⁺ e CD8⁺ (CARMENATE et al., 2013). Estudos relatam que a intensidade e a duração do sinal de IL-2 controlam tanto a expansão primária como a secundária da população de células T CD8⁺ (BOYMAN; SPRENT, 2012). Além disso, a IL-2 regula respostas Th1, Th2 e a diferenciação de células Th17 através de seu efeito modulador na expressão de outras citocinas (LIAO et al., 2011).

A citocina IL-4, típica de resposta tipo 2, é conhecida pela sua capacidade de induzir a comutação do isotipo de IgE em células B e de iniciar e manter a diferenciação de células Th2 (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). A IL-6 é proliferativa e estimuladora de células imunitárias principalmente na resposta mediada por células (MIHARA et al., 2012). IL-6 pode ser considerada pleiotrópica, pois apesar de ser considerada principalmente como uma citocina pró-inflamatória, também apresenta atividades regenerativa ou anti-inflamatória (SCHELLER et al., 2011). A citocina anti-inflamatória IL-10 é conhecida por suas propriedades imunossupressoras, que têm efeitos sobre a regulação imune e inflamação (OUYANG et al., 2011). Neste sentido, o aumento da IL-10 pode atuar suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IZCUE; COOMBES; POWRIE, 2009).

As células produtoras de IL-17 (citocina pró-inflamatória) são predominantemente linfócitos Th17, no entanto há outras células dos sistemas inato e adaptativo (células T, células NK, neutrófilos e eosinófilos) que também produzem IL-17. Na imunidade inata, IL-17 estimula as células epiteliais das mucosas a secretar citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (DOMINGUEZ-VILLAR; HAFLER, 2011). Embora o papel fisiológico primário da IL-17 seja atuar contra agentes patogênicos extracelulares, estudos sugerem que a IL-17 pode influenciar significativamente a patogênese de várias doenças auto-imunes

(lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, esclerose múltipla) (SHAH et al., 2010; DHAMA et al., 2015).

As quimiocinas são citocinas de baixa massa molecular e elevada homologia entre si que, de acordo com a posição dos resíduos de cisteína na extremidade N-terminal, subdividem-se em: C, CC, CXC e CX3C (SALANGA; HANDEL, 2011; BACHELERIE et al., 2014). Além disso, uma quinta subclasse de quimiocinas foi proposta para complementar esta superfamília, consistindo em citocinas nas quais estão faltando o resíduo de cisteína específico no N-terminal (ASARE; SCHMITT; BERNHAGEN, 2013; ZERNECKE; WEBER, 2014). As quimiocinas são quimioatratentes, atuando no recrutamento de leucócitos para locais de inflamação. Após imobilização em glicosaminoglicanos de superfície celular, as quimiocinas interagem com proteínas específicas de receptores transmembrana, levando à sinalização intracelular e à migração dos leucócitos aos locais inflamatórios, um processo que é crítico à resposta imunológica (SALANGA; HANDEL, 2011).

Os macrófagos desempenham um papel importante tanto nas respostas inata quanto na adaptativa. Durante o curso da resposta pró-inflamatória, os macrófagos podem exercer duas funções, dependendo dos seus fenótipos. Em particular, macrófagos M1 servem como mediadores para a iniciação e progressão da resposta inflamatória com a produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (GAURNIER-HAUSSER et al., 2008; HAGEMANN et al., 2008). TNF- α é uma citocina típica derivada de macrófagos M1 com potente propriedade inflamatória (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). Em contraste, macrófagos M2 secretam grande quantidade de citocinas Th2 (tais como IL-10) para limitar a intensidade da resposta imune, prevenindo assim o dano ao tecido ou ao órgão hiperativo (FRIDMAN et al., 2012).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre de curta meia-vida sintetizado por uma via que é catalisada por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Na maioria das células animais, são descritos três tipos de NOS: NOS1 (neuronal), NOS2 (induzível) e NOS3 (endotelial) (LEE et al., 2006). A NOS2 (ou iNOS), que produz níveis mais elevados de NO, é expressa em células somente após os estímulos imunológico e inflamatório (KAPRAL et al., 2015; MOHSENZADEGAN et al., 2015).

O NO é uma importante molécula sinalizadora celular envolvida em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos em mamíferos, incluindo seres

humanos. Por ser uma molécula pluripotente em muitas células diferentes, o NO pode agir sobre um grande número de células-alvo. As consequências fisiológicas da produção de NO e seus alvos celulares estão sendo descobertas rapidamente (FAN et al., 2016). O NO demonstrou possuir propriedades pró e anti-inflamatórias. O equilíbrio entre os dois depende de "onde" e "quanto" NO é produzido. As quantidades baixas de NO parecem ser benéficas pois, por exemplo, inibem a adesão e migração de células inflamatórias (LAROUX et al., 2001; LO FARO et al., 2014). Uma outra função principal do NO durante a inflamação é a morte microbiana, através da geração de ONOO^- (LO FARO et al., 2014).

2.6.2 Células T

As células T são classificadas em auxiliares (CD4) e citotóxicas (CD8) de acordo com suas funções efetoras características, desempenhando um papel proeminente na imunidade (MILLER, 2004). Uma resposta de células T a uma infecção aguda pode ser caracterizada por três fases distinguíveis: expansão clonal, contração da população de células T e formação de memória. À medida que as células T específicas do antígeno expandem clonalmente, diferenciam-se em células efetoras, muitas das quais entram no sangue e migram para locais de infecção (KAECH; CUI, 2012). Após a depuração do patógeno, a fase de contração se instala e mais de 90% das células T sofrem apoptose (GARROD et al., 2012). Tipicamente, apenas uma pequena fração de células T sobrevive além deste estágio e é gerado um conjunto de diferentes subconjuntos de células T de memória (HIRAHARA et al., 2013). Linfócitos T citotóxicos são importantes na resposta Th1. Nas infecções virais ou bacterianas intracelulares, a resposta de tipo 1 é induzida, promovendo a diferenciação das células T em linfócitos T CD8^+ que matam células infectadas (através de granzimas e perforinas) e secretam citocinas como o $\text{IFN}\gamma$ e o $\text{TNF-}\alpha$ (KAECH; CUI, 2012).

A diferenciação de células T CD8^+ nativas em células efetoras e de memória é conduzida pela exposição ao antígeno e/ou inflamação e harmonizada pela indução de fatores de transcrição específicos (KAECH; CUI, 2012). As funções efetoras de células T CD8 diferenciadas incluem a sua capacidade para matar

células alvo através da secreção de grânulos citolíticos na sinapse imune (VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015).

Por outro lado, linfócitos T CD4⁺ estão envolvidos na resposta adaptativa. As células T CD4⁺ nativas diferenciam-se em pelo menos quatro tipos de células T auxiliares (Th) – Th1, Th2, Th17 e Treg – em resposta a diferentes agentes infecciosos, microrganismos comensais ou auto-antígenos (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). As células T CD4 auxiliam as células B a produzir anticorpos, melhoram e mantêm as respostas das células T CD8, regulam a função dos macrófagos, orquestram as respostas imunes contra uma grande variedade de microrganismos patogênicos e regulam/suprimem as células imunes tanto para controlar a auto-imunidade quanto para ajustar a magnitude e a persistência das respostas (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). As células Th1 são caracterizadas pela produção de sua citocina cardinal o IFN- γ , juntamente com TNF- α e IL-2 (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). As células Th2, por outro lado, produzem IL-4, IL-5 e IL-10 e atuam preferencialmente na resposta humoral do sistema imune adaptativo (PAUL; ZHU, 2010).

2.6.3 Imunomodulação no tratamento de doenças

A imunomodulação pode ser definida como qualquer tipo de intervenção destinada a restaurar a função normal do sistema imunológico. Os imunomoduladores podem apresentar atividades positiva (imunoestimulação) ou negativa (imunossupressão) sobre uma função imunológica específica (MAHIMA et al., 2012; DHAMA et al., 2015). A imunoestimulação previne infecções através de vacinas (que ativam a imunidade humoral), e também age contra infecções estabilizadas por deslocamento da resposta imunológica mediada por células. Além disso, pode atuar contra o câncer pelo uso de citocinas, de anticorpos tumor-específicos e de infiltração tumoral por linfócitos. Por outro lado, a imunossupressão é geralmente usada em alergias, auto-imunidade e transplante de órgãos (DHAMA et al., 2015).

A imunomodulação pode ser específica ou não-específica. A específica é limitada a um único antígeno, como a vacinação; a não-específica implica em mudanças generalizadas na resposta imunológica, tanto a inata quanto a adaptativa,

levando a uma modificação na reatividade do hospedeiro para muitos antígenos diferentes (DHAMA et al., 2015).

Imunomoduladores são componentes-chave na prevenção de doenças, pois fortalecem o sistema imunológico fraco ou modera seu funcionamento quando os mecanismos de defesa se encontram excessivamente ativos. Nos últimos anos, a sua quota de mercado vem aumentando devido à sua ampla gama de aplicações médicas para a estimulação e a supressão do sistema imunológico (EL ENSHASY; HATTI-KAUL, 2013).

A infecção e a resposta imune parecem ser importantes em condições patológicas, tais como esclerose múltipla, artrite, psoríase, doença inflamatória intestinal, úlceras e fibromialgia (RAO et al., 2007). Por outro lado, a expansão de doença infecciosa crônica, de tumores malignos e de doenças auto-imunes específicas de órgãos é geralmente o resultado de um colapso da resposta imune fundamental. Assim, a comunidade científica tem sido orientada para identificar novos produtos com o intuito de desenvolver novas alternativas terapêuticas contra inflamações (KRIFA et al., 2013; MUSTAPHA et al., 2016). Os tecidos vegetais representam excelentes fontes de imunomoduladores, sendo uma nova abordagem para combater as infecções causadas por microrganismos (HANCOCK; NIJNIK; PHILPOTT, 2012; JANTAN; AHMAD; BUKHARI, 2015).

Alguns componentes do sistema imunológico podem ser modulados, por exemplo o NO, que manifesta uma grande variedade de atividades, estando envolvido no controle de pressão arterial, transdução de sinal neural, função plaquetária e também apresenta ações antimicrobiana e antitumoral (FANG et al., 2010a). Citocinas e quimiocinas também podem ser moduladas, pois regulam o sistema imune e, assim, vêm sendo utilizadas como alvos de vias terapêuticas em produtos comercializados (Tabela 1). As indicações incluem doenças inflamatórias imunomediadas do intestino, doenças reumatóides, artrite, asma e psoríase, por exemplo (RAMANI et al., 2015; GORGOGLIONE et al., 2016). A citocina TNF- α é conhecida por suas propriedades antitumorais (para linfoma e mieloma, por exemplo) e vem sendo aplicada como terapêutico antitumoral para o tratamento de pacientes com sarcomas avançados e melanomas metastáticos (GALLUZZI et al., 2009; BERTAZZA; MOCELLIN, 2010).

TABELA 1 - Citocinas com atividade imunomoduladora e suas funções e aplicações terapêuticas.

Citocinas	Fonte	Função	Aplicação terapêutica
IL-1	Monócito, linfócito e endotélio	Hematopoiese, co-estimulação de células T, proliferação de fibroblastos, resposta de fase aguda	Bloqueio da atividade de IL-1
IL-2	Células T ativadas e células dendríticas	Proliferação e diferenciação de células T, secreção de Ig, atividade proliferativa e citolítica	Tratamento de câncer e doenças infecciosas, transplante de medula óssea
IL-3	Células T ativadas, mastócitos e células NK	Proliferação e diferenciação de progenitores de células tronco mielóides, prevenção da indução de apoptose em macrófagos	Transplante de medula óssea
IL-4	Células T, mastócitos, eosinófilos e basófilos	Proliferação e diferenciação de células B, comutação de Ig	Agente antitumoral e imunostimulador
IL-6	Células T, mastócitos, monócitos, células endoteliais	Estimulação de produção de anticorpos por células B, crescimento e diferenciação de células T em linfócitos citotóxicos	Antitumoral
IL-8	Monócitos, linfócitos e endotélio	Quimiotaxia e ativação de neutrófilos, função de quimiocina	Nenhuma
IL-10	Monócitos, linfócitos e endotélio	Inibição de produção de citocinas pro-inflamatórias por monócitos, granulócitos, inibição da produção de IL-2 por células B, inibição da ativação antígeno específica de células T	Anti-inflamatória e imunossupressora, usado em doenças auto-imunes
IL-12	Monócitos, células B	Proliferação de células T e NK, resposta do CTL a células tumorais, aumento da produção de IFN- γ por células T e NK, inibe produção de IgE	Anti-metastática, antitumoral e adjuvante em vacinas
IL-13	Células T ativadas e células B	Fator de crescimento e diferenciação de células B, estimula quimiotaxia	Agente antitumoral e anti-inflamatório
IL-15	Células mononucleares e células NK	Estimulação de células B, T e NK ativadas, quimioatraente	Antitumoral e artrite reumatóide
IL-16	Células T e eosinófilos	Quimiotaxia para células CD4	Anti-HIV
IL-17	Células T Th17	Regulação da inflamação	Lupus eritematoso sistêmico, psoríase, esclerose sistêmica, esclerose múltipla, diabetes tipo 1
IFN- α	Leucócitos	Ação antiproliferativa e imunoregulatória	Câncer, hepatite B, hepatite C, AIDS, sarcoma de Kaposi, esclerose múltipla
IFN- β	Fibroblasto, epitélio e endotélio	Antiviral, regulação antígeno-MHC, citotoxicidade de células NK, antimicrobiano	Câncer, esclerose múltipla
IFN- γ	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B e T	Expressão de MHC de classe II, ativação de macrófagos e células NK, seleção do isótipo de Ig	Usada como adjuvante
G-CSF	Células estromais, endotélio	Proliferação e diferenciação de células progenitoras de macrófagos	Após transplante de medula óssea
M-CSF	Fibroblasto, endotélio, células T, monócitos e neutrófilos	Proliferação, diferenciação e ativação de monócitos	Antitumoral, anti-infecção, mielo-supressão
GM-CSF	Células T e B, macrófagos e endotélio	Inibe apoptose, proliferação, diferenciação e ativação da linhagem de granulócitos e macrófagos	Recrutamento de células tronco de sangue periférico, estimulação de APC para imunoterapia
Quimiocina A	Monócitos, neutrófilo, endotélio e epitélio	Quimiotaxia e aderência de neutrófilos, secreção de IL-6	Nenhuma
Quimiocina B	Monócito, fibroblasto, epitélio e melanócito	Ativação de monócitos e basófilos, quimiotaxia de células T, citólise de células NK	Nenhuma
RANTES	Células T, monócitos, células NK, fibroblastos, epitélio e endotélio	Quimiotaxia e proliferação de células T, quimiotaxia e ativação de monócitos, quimiotaxia de células NK, modulação de monócitos, eosinófilos e células T	Supressão de replicação de HIV
TNF- α	Macrófago, células T	Citotóxico para células tumorais, atividade antiviral, antibacteriana e antiparasítica	Câncer e doenças auto-imunes
TNF- β	Mastócitos, plaquetas e fibroblastos	Reparo tecidual, regulação do crescimento celular, remodelamento tecidual e imunossupressão	Inibição de células inflamatórias, tratamento de câncer de mama

Fonte: Adaptado de DHAMA et al. (2015)

A modulação do sistema imunológico por uma citocina bioterapêutica pode resultar em efeitos desejáveis ou indesejáveis, dependendo da doença tratada. Assim, é importante caracterizar os potenciais efeitos adversos da citocina e da droga que a induz em estudos toxicológicos *in vitro* e/ou *in vivo* (RAMANI et al., 2015).

Adicionalmente, células T também podem ser moduladas (GHOSH et al., 2016). A depleção de células T CD8⁺ pode revelar um aumento de uma infecção viral, e manifesta-se pelo aumento da replicação viral, morbidade e letalidade,

realçando a importância das células T CD8⁺ no controle imunológico do hospedeiro com infecções virais; nesse caso o aumento de células T CD8⁺ é benéfico (GAINEY et al., 2012; REILLY et al., 2012). Além disso, expansão clonal e ativação dos linfócitos T CD8⁺ podem ser modulados positivamente em caso de outras doenças como câncer, por exemplo (JACKSON; YUAN; TEAGUE, 2014; BERINSTEIN et al., 2015) ou negativamente, para reduzir a rejeição em transplantes (FARIA et al., 2008; GOWDY et al., 2015).

2.6.4 Lectinas e inibidores de protease na imunomodulação

Preparações de origem vegetal, tais como extratos e proteínas são capazes de modular o sistema imune (ASSAF et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Lectinas têm a capacidade de ativar células do sistema imunológico, tais como macrófagos (DIAS-NETIPANYJ et al., 2016), mastócitos (BARBOSA-LORENZI et al., 2016) e linfócitos (MELO et al., 2011). As lectinas exercem ação imunomoduladora por meio da interação com porções glicídicas da superfície de células imunológicas (KATRLÍK et al., 2010; GAO et al., 2013; SUNG et al., 2013). Estas interações desencadeiam a transdução de sinais para a produção de certas citocinas (KATRLÍK et al., 2010). Lectinas estimulam respostas pró-inflamatórias (PRASANNA; VENKATESH, 2015; MARINKOVIĆ et al., 2016) ou anti-inflamatórias (CAMPOS et al., 2016), e dessa forma, podem exibir induzir perfis Th1 e Th2 ao mesmo tempo (SINGH et al., 2017). Um estudo sobre os efeitos imunomoduladores de lectinas vegetais relatou um levantamento do perfil de citocinas liberadas em resposta a lectinas (Tabela 2) (SOUZA et al., 2013).

TABELA 2 - Lectinas de plantas que induzem produção de citocinas.

Lectina	Fonte	Citocina
ArtinM	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	IL-12 e IL-10 (Células dendríticas e macrófagos de ratos) TNF- α (Mastócitos de ratos) IL-10/IFN- γ (Esplenócitos de ratos)
Banlec	<i>Musa paradisiaca</i>	IFN- γ , IL-10, e IL-4 (Esplenócitos de ratos)
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	IFN- γ (Esplenócitos de ratos) IFN- γ e IL-2 (Esplenócitos de ratos) IL-5, IL-10, TNF- α , e IFN- γ (PBMCs humano)
Conbr	<i>Canavalia brasiliensis</i>	IL-5, IL-10, TNF- α , e IFN- γ (PBMCs humano) IFN- γ (Esplenócitos de ratos)
Cramoll	<i>Cratylia mollis</i>	IFN- γ (Esplenócitos de ratos)
DrosL	<i>Dioclea rostrata</i>	IL-5, IL-10, TNF- α , e IFN- γ (PBMCs humano) TNF- α e IL-1 β (Cavidade peritoneal de rato)
Dviol	<i>Dioclea violacea</i>	IL-5 (PBMCs humano)
Dvirl	<i>Dioclea virgata</i>	IL-5, IL-10, TNF- α , e IFN- γ (PBMCs humano)
ASA-I	<i>Alium sativum</i>	IFN- γ e IL-12 (Esplenócitos de ratos)
KML	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>	IL-12 (Células dendríticas humanas)
ML-I	<i>Viscum album</i>	IL-12 (PBMCs humano) IL-15 (Neutrófilos humanos) IL-6, TNF- α , e IL-10 (PBMCs humano)
PAA	<i>Pisum arvense</i>	IFN- γ (Esplenócitos de ratos)
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	IFN- γ e IL-2 (Esplenócitos de ratos)
PSA	<i>Pisum sativum</i>	IFN- γ e IL-2 (Esplenócitos de ratos)
PWM	<i>Phytolacca americana</i>	TNF- α , IL-12, e IL-6 (PBMCs humano)
ScLL	<i>Synadenium carinatum</i>	IFN- γ e IL-10 (Fluido de lavagem broncoalveolar de ratos)
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	IL-2 e IFN- γ (Esplenócitos de ratos)
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	IL-12 e IFN- γ (Esplenócitos de ratos)

Fonte: Adaptado de SOUZA et al (2013).

SANSONE et al. (2016) sugeriram que as citocinas induzidas por lectinas podem variar de acordo com o modelo (*in vivo/in vitro*), o tipo de célula imunológica e a via de administração utilizada. Em estudos com lectina de banana (BanLec) foi observada indução de resposta pró-inflamatória em esplenócitos murinos com aumento de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (CHEUNG; WONG; NG, 2009), bem como estímulo da secreção de IL-4 e IL-10 em linfócitos (STOJANOVIĆ et al., 2010). No entanto, um outro estudo revelou uma diminuição do nível de IFN- γ após exposição *in vivo* a BanLec, sem diferenças significativas para IL-2 ou IL-4 no sangue periférico de ratos. BanLec recombinante administrada por via retal também induziu a produção de IFN- γ , IL-2 e IL-4 (PEUMANS et al., 2002).

As lectinas podem estimular de forma específica um tipo de célula imunológica. Por exemplo, a lectina de *Viscum album coloratum* (VCA-B) é um potente estimulador na maturação e na ativação de células dendríticas (CDs), iniciando resposta Th1. O papel crítico da VCA-B na ativação das CDs e o aumento das respostas imunitárias específicas sugerem que a lectina apresenta ação imunoadjuvante como terapêutico tumoral (KIM et al., 2014). Por outro lado, a lectina do cogumelo *Agrocybe aegerita* (AAL) exerceu função imunomoduladora controlando a produção de citocinas inflamatórias e exacerbando a resposta pró-inflamatória na sepse induzida por ruptura cecal, tendo como prováveis células-alvo os macrófagos (ZHANG et al., 2015). Estudos revelaram que algumas lectinas podem induzir a secreção de NO, o que pode contribuir parcialmente para suas habilidades antitumorais por exemplo (WONG; NG, 2006; KITAGAKI et al., 2009; NÓBREGA et al., 2012; SINGH et al., 2017)

Efeitos imunomoduladores de inibidores de protease também têm sido descritos. O inibidor de quimotripsina de sementes de *Momordica cochinchinensis* (MCoCI) mostrou ação imunoestimulatória sobre a proliferação de esplenócitos, linfócitos e células de medula óssea; também esteve envolvido na diferenciação de esplenócitos e linfócitos e exibiu atividade anti-inflamatória (TSOI; NG; FONG, 2006). O inibidor de tripsina de sementes de *Bauhinia variegata* modulou o sistema imunológico, favorecendo a produção de IL-1 β , IL-2 e TNF- α (FANG et al., 2010b). Ainda, inibidores de protease podem induzir produção de óxido nítrico (CHUANG; LIN; HOU, 2007; FANG; NG, 2015).

2.7 BIODISPONIBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

A revolução da Biotecnologia levou à descoberta de vários tipos de proteínas com potencial terapêutico para doenças crônicas e malignas tais como câncer, doenças auto-imunes e outras patologias (IBRAHEEM; ELAISSARI; FESSI, 2014). A estrutura química de proteínas permite que elas apresentem reações específicas no organismo, aumentando a eficácia na ação e diminuindo efeitos colaterais indesejáveis (MORISHITA; PEPPAS, 2006; MOELLER; JORGENSEN, 2009). No entanto, o emprego de proteínas terapêuticas é confrontado por muitos obstáculos, tais como a sua curta meia-vida na corrente sanguínea, tornando necessário repetir

as administrações, potencial antigenicidade, instabilidades química e física (rápida desnaturação no trato gastrointestinal e retenção em mucosas intestinais impermeáveis) que dificultam a administração oral destas proteínas (IBRAHEEM; ELAISSARI; FESSI, 2014). Por isso, estratégias para biodisponibilização de proteínas têm sido estudadas (ANDRADE et al., 2004; SINGH; DILNAWAZ; SAHOO, 2011; BONIFÁCIO et al., 2013).

O encapsulamento de peptídeos terapêuticos, com nanopartículas biocompatíveis e biodegradáveis vem se tornando uma alternativa promissora para superar a dificuldade da administração oral de proteínas. Um estudo com a lectina de *V. album coloratum* desenvolveu um sistema de estabilização composto por núcleos (grânulos) que continham a lectina revestidas com uma parede de polímero biodegradável. Este sistema produziu resultados excelentes com perfis de liberação ideais e perdas mínimas de citotoxicidade para células de hepatocarcinoma humano após a etapa de fabricação (LYU et al., 2004). Estudos mais recentes com essa lectina encapsulada apresentaram bons resultados para melanoma de ratos (HAN et al., 2015).

Além disso, proteínas recombinantes são desenvolvidas e preparadas em grande escala, e desempenham um papel dominante na melhoria da terapia com base em proteínas (OVERTON, 2014). Lectinas e inibidores de protease têm sido produzidos de forma recombinante (LOURENÇO et al., 2014; AUDFRAY et al., 2015; TATENO et al., 2015).

2.8 *Microgramma vacciniifolia*

A família Polypodiaceae apresenta aproximadamente 56 gêneros e 1.200 espécies (SMITH et al., 2006), sendo considerada uma das maiores famílias de plantas pteridófitas, constituindo-se principalmente de espécies epífitas (PERES et al., 2009). O gênero *Microgramma* abrange cerca de 30 espécies. Dentre as espécies deste grupo de plantas, destaca-se a *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel., a qual é encontrada como corticícola e/ou rupícola e facilmente reconhecida por seu caule longo intensamente revestido por escamas e frondes (folhas) dimorfas (as estéreis são ovais e as férteis, lanceoladas (Figura 6) (PERES et al., 2009). É observada sua incidência nas Antilhas, Venezuela, Colômbia,

Paraguai, Argentina e Brasil (PRADO; HIRAI; SCHWARTSBURD, 2010) e, eventualmente, na América do Norte (GURJAÚ et al., 2011).

Em estudos florísticos realizados no Brasil, *M. vacciniifolia* ocorre em distintas formações vegetacionais (Cerrado, Floresta Atlântica Nordeste e Floresta Atlântica do Sul-Sudeste) (GURJAÚ et al., 2011) e nos estados de Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (PRADO; HIRAI; SCHWARTSBURD, 2010). A planta possui uma ampla valência ecológica (capacidade de uma espécie de povoar meios) para diferentes fatores microclimáticos e é capaz de suportar ambientes com distintos estados de conservação (GONÇALVES et al., 2012).

FIGURA 5 - *Microgramma vacciniifolia*.



Fonte: Adaptado pela autora a partir da Fototeca Paulo Schwirkowski (<http://www.splink.org.br>)

M. vacciniifolia encontra-se no interior de florestas úmidas, nas margens de trilhas, nas encostas de matas e também em paredões rochosos. Conhecida popularmente por “polipódio vacinifólio”, “erva-silvina” ou “erva-teresa”, apresenta propriedades medicinais tais como: adstringente, sudorífera, expectorante, tratamento de cólicas intestinais, diarreias e disenterias, infecções respiratórias, tosse, bronquites, coqueluche e laringite. Também empregada no tratamento de

hemoptises e em casos de hematúria (SANTOS; SYLVESTRE, 2006; AGRA et al., 2008; PERES et al., 2009).

Estudo fitoquímico com as frondes de *M. vacciniifolia* identificou os esteroides β -sitosterol e hopan-22-ol, a flavona glicosilada 6-metoxiapinenina-7-O- β -D-alopiranosídeo e uma mistura de ésteres graxos. Extratos das frondes apresentaram potencial antioxidante, antimicrobiano e alelopático (PERES et al., 2009).

Entre as divisões do reino vegetal, há poucos relatos na literatura sobre lectinas da família Polypodiaceae. ALBUQUERQUE et al. (2012) isolaram a lectina do rizoma de *M. vacciniifolia* (MvRL). Essa lectina é termoestável com capacidade de ligação à quitina, aproximadamente 17 kDa em SDS-PAGE, dependente de cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e têm apresentado atividades biológicas: atividade inseticida contra *Nasutitermes corniger*, atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, atividade citotóxica contra células NCI-H292 (carcinoma de pulmão) e atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (ALBUQUERQUE et al., 2012, 2014a, 2014b; SANTANA et al., 2012). Da mesma família foi relatada a purificação de uma lectina do rizoma de *Phlebodium aureum* (PAL), específica para manose/glicose, que possui aproximadamente 31 kDa e se dissocia em dímeros de 15 kDa em SDS-PAGE (TATENO et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar uma lectina a partir das frondes de *M. vacciniifolia* (MvFL) e avaliar as atividades citotóxica e imunomoduladora sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer um protocolo de purificação para MvFL.
- b) Avaliar a especificidade de ligação de MvFL a carboidratos e glicoproteínas.
- c) Determinar a massa molecular nativa, ponto isoelétrico e composição em subunidades de MvFL.
- d) Caracterizar MvFL quanto à estabilidade da atividade hemaglutinante e de sua conformação frente a variações de temperatura e pH.
- e) Investigar similaridades da estrutura primária de MvFL com sequências de proteínas de plantas depositadas em bancos de dados.
- f) Investigar MvFL quanto à atividade inibidora de tripsina.
- g) Avaliar a citotoxicidade de MvFL para linfócitos humanos através da quantificação da indução de apoptose e necrose.
- h) Determinar o potencial imunomodulador de MvFL sobre células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano, através da análise da produção de citocinas de respostas Th1 e Th2, quimiocinas e óxido nítrico.
- i) Investigar o efeito diferenciador e ativador de MvFL sobre linfócitos T.

4 ARTIGO

Evaluation of cytotoxic and immunomodulatory properties of a multifunctional lectin isolated from the fronds of *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae)

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO

“International Journal of Biological Macromolecules”



Fator de impacto: 3.138

Instruções para autores: <https://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-biological-macromolecules/0141-8130/guide-for-authors>

Evaluation of cytotoxic and immunomodulatory properties of a multifunctional lectin isolated from the fronds of *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae)

Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Thamara Figueiredo Procópio^a, Jéssica de Santana Brito^a, Virginie Sebag^b, Ana Patrícia Silva de Oliveira^a, Ana Karine de Araújo Soares^c, Leyllane Rafael Moreira^c, Thâmarah de Albuquerque Lima^a, Tatiana Soares^d, Túlio Diego da Silva^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Virgínia Maria Barros de Lorena^c, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^e, Lidiane Pereira de Albuquerque^f, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}

^a*Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^b*Département de Chimie, Institut Universitaire de Technologie de Créteil-Vitry, Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne, Vitry-sur-Seine, France.*

^c*Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^d*Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^e*Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.*

^f*Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.*

*Corresponding author. Tel: +558121268540; fax: +558121268576.

E-mail address: thiagohn86@yahoo.com.br

Abstract

This work describes the purification and characterization of a lectin from *Microgramma vacciniifolia* fronds (MvFL) and the assessment of its immunomodulatory properties on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Frond proteins were extracted with 0.15 M NaCl and MvFL was isolated through gel filtration (Sephadex G-75) and ion exchange (DEAE-Sephadex A-25) chromatographies. MvFL is an acidic protein (pI 4.51) with 54 kDa composed by three distinct subunits. It is a glycoprotein and showed sequence similarities (32% coverage) with a plant RNA-binding protein. MvFL also demonstrated the ability of inhibiting trypsin activity. Hemagglutinating activity of MvFL was not altered by heating but was reduced in alkaline pH. Fluorimetric analyses showed that the lectin did not undergo marked conformational changes when heated. On the other hand, the MvFL conformation changed depending of the pH although it was not observed total unfolding. MvFL at 6.25–25 µg/mL was not cytotoxic to lymphocytes present among PBMCs and induction of cell death was only observed in 50 µg/mL treatment but did not affect more than 10% of cells. PBMCs incubated for 24 h with the lectin in 12.5 µg/mL showed increased of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 and nitric oxide production. MvFL also stimulated the activation and differentiation of T CD8⁺ cells. In conclusion, MvFL is a heat-stable and multifunctional protein, with lectin and trypsin inhibitor activities, and is able to induce predominantly a Th1 response in human PBMCs as well as activation and differentiation of T CD8⁺ lymphocytes.

Keywords: lectin; pteridophyte; heat-stable protein; cytokines; lymphocytes; CD8 cells.

1. Introduction

Lectins are proteins broadly distributed in nature that bind carbohydrates in a specific and reversible manner. Plant lectins exhibit a variety of properties with biotechnological relevance like insecticidal, antimicrobial, antitumor, and immunomodulatory effects [1–4]. In order to take advantage of these activities in the best possible way, lectins have been studied for their structural and physicochemical characteristics, such as stability to variations in pH and temperature.

Studies have demonstrated that some lectins may have other biochemical properties, in addition to the carbohydrate-recognizing ability, acting as multifunctional proteins. For example, Dokka et al. [5] and Nunes et al. [6] describe the isolation of proteins with both lectin and trypsin inhibitory activities. Similarly to lectins, proteinaceous trypsin inhibitors are able to exert several biological activities, being candidates for use as insecticidal and chemotherapeutical agents, for instance [7,8]. Antifungal, anticancer and anti-inflammatory activities have been reported for protease inhibitors [9–11].

The investigation of immunological effects promoted by natural compounds has been conducted aiming to find potential agents for modulation of the immune response involved in pathological conditions, such as autoimmunity, cancer, allergy, and infections [12–14]. The interaction between lectins and glycan moieties present on the surface of immune cells may trigger different immunomodulatory effects, including proliferation, activation and cytokines production [15–18]. The mitogenic effect of lectins on lymphocytes has been well documented and may be relevant in the defensive role of these cells against infections [19,20].

Lectins can modulate cytokine production by immune cells in different ways. The *Viscum album coloratum* lectin (KML-B) and the lectin from *Cratylia mollis* seeds (Cramoll 1,4) promoted specific-Th1 immune responses *in vitro* [21,22]. The *Allium cepa* agglutinin (ACA) and the lectin isolated from the fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe aegerita* (AAL) stimulated the release of pro-inflammatory cytokines in macrophages *in vitro* and in a sepsis model, respectively [23]. Marinković et al. [24] showed that a recombinant lectin isoform from *Musa paradisiaca* promoted a balance in the pro-inflammatory response in the colon of mice when administered through the rectum. The *Moringa oleifera* seed lectins

(cMoL and WSMoL) induced anti-inflammatory response on lipopolysaccharide-stimulated macrophages [25]. In addition to cytokines, the release of nitric oxide (NO) may also be modulated by lectins and protease inhibitors [8,18,26].

Microgramma vacciniifolia (Langsd. & Fisch) Copel., popularly known as snakefern or “cipó-cabeludo”, is an epiphyte pteridophyte (Family Polypodiaceae) which has ornamental usage and also medicinal properties against intestinal infections [27–29]. A *M. vacciniifolia* frond extract was reported to have allelopathic, antimicrobial and antioxidant activities [29]. The rhizome of this plant contains a lectin called MvRL, which presented cytotoxic activity against lung carcinoma NCI-H292 cells, antifungal activity against *Fusarium*, insecticide activity against the termite *Nasutitermes corniger*, and molluscicide activity against *Biomphalaria glabrata* [30–32].

Since the use of *M. vacciniifolia* for treatment of infections has been reported, we performed the purification and characterization of a *M. vacciniifolia* frond lectin (MvFL) and investigated its cytotoxicity and immunomodulatory effects on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

2. Materials and methods

2.1. Plant material and protein extraction

Fronds of *M. vacciniifolia* were collected in the campus of the *Universidade Federal de Pernambuco* at Recife, Brazil, with authorization (number 36301) of the *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* (ICMBio). Taxonomic identification was confirmed at the herbarium Dárdano de Andrade Lima (*Instituto Agrônomo de Pernambuco*, Recife), where a voucher specimen (number 63,291) is deposited.

The fronds were washed with tap and distilled water, dried at 28°C for 7 days and then powdered using a blender. Frond proteins were extracted by homogenization of the powder in 0.15 M NaCl (in proportion of 10%, w/v) for 16 h at 25°C, using a magnetic stirrer. After filtration and centrifugation (9000 × *g*, 15 min, 4°C), the supernatant collected corresponded to the frond extract.

2.2. Hemagglutinating activity assay

Carbohydrate-binding property of lectin along the purification procedure was detected by the ability of samples in agglutinate rabbit erythrocytes (hemagglutinating activity, HA). The erythrocytes collection method was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the *Universidade Federal de Pernambuco* (process 23076.033782/2015-70). The HA assays were conducted in 96-well microtiter plates (Kartell S.P.A., Italy) using a 2.5% (v/v) suspension of erythrocytes treated with glutaraldehyde [33]. The sample (50 μ L) was two-fold serially diluted in 0.15 M NaCl. Next, the erythrocyte suspension (50 μ L) was added to each well and the assay was incubated at 25°C for 45 min. Negative control contained only erythrocytes and 0.15 M NaCl. The number of HA units (HAU) was calculated as the reciprocal value of the highest dilution of sample that promoted full agglutination of erythrocytes. Specific HA was defined as the ratio between HAU and protein concentration (mg/mL).

HA inhibition assays were performed by adding carbohydrates to the 0.15 M NaCl solution used; in addition, an incubation step of 15 min was included prior to the addition of the erythrocytes. The monosaccharides (200 mM) fucose, glucose, galactose, mannose, *N*-acetyl-galactosamine, *N*-acetyl-glucosamine, *N*-acetyl-mannosamine rhamnose, and ribose, the disaccharide maltose (200 mM), and the glycoproteins (0.5 mg/mL) ovalbumin and fetuin, were evaluated for inhibitory effect on HA of frond extract and MvFL.

2.3. Estimation of protein concentration

Protein concentration was measured according to the method described by Lowry et al. [34] using a standard curve of bovine serum albumin (31.25–500 mg/mL).

2.4. Isolation of MvFL

Frond extract (2.0 mL; 2.7 mg of protein) was loaded onto a Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) column (30.0 $\times$ 1.5 cm) previously

equilibrated with distilled water. A flow rate of 0.5 mL/min of distilled water was maintained and fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm and lectin presence. The protein peak that showed HA (P1) was dried by lyophilization, resuspended in 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and loaded (1.0 mL; 2.2 mg of protein) onto a DEAE-Sephadex A25 (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) column (3.0 × 2.0 cm) previously equilibrated with this buffer. Washing step used Tris buffer and adsorbed proteins (MvFL) were eluted with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 1.0 M NaCl. Fractions of 3.0 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min and evaluated for absorbance at 280 nm and HA. The homogeneity of MvFL was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for native basic (12%, w/v, gel) or acidic (10%, w/v, gel) proteins [35,36].

2.5. Determination of native molecular mass, isoelectric point and subunit composition

Native molecular mass of MvFL was determined by loading the lectin (2 mL; 2 mg of protein) onto a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR column coupled to the ÄKTA prime plus system (GE Healthcare Life Sciences, Sweden). The chromatography was performed using 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. The fractions (3 mL) collected were monitored for absorbance at 280 nm. A mixture of the proteins bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa) and lysozyme (14 kDa), all purchased from Sigma-Aldrich (USA), was also chromatographed at the same conditions. The relative molecular mass of MvFL was calculated by comparison with the migration of these marker proteins.

For the determination of the isoelectric point, MvFL (100 µg) was resuspended in a solution constituted by 8.0 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) IPG buffer pH 3–10 and 0.002% (w/v) bromophenol blue. This solution containing the lectin was used to rehydrate the strip (7 cm; linear pH gradient 3–10) during 16 h at 25°C. The hydrated strip was then submitted to isoelectric focusing on the Ettan IPGPhor III system (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The strip was then washed three times with an equilibrating solution [50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6.0 M urea, 30% (v/v) glycerol and 0.002% (w/v) bromophenol blue] and transferred to the top of a 10% (w/v) polyacrylamide gel for acidic proteins.

The polypeptide spot was stained with 0.02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid. The gel was analyzed using the ImageMaster software (GE Healthcare Life Sciences, Sweden).

Subunit composition of MvFL was determined through PAGE (12%, w/v, gel) in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS) according to Laemmli (1970). Polypeptide bands from MvFL and molecular mass markers (12–225 kDa; GE Healthcare Life Sciences, Sweden) were stained with Coomassie Brilliant Blue. SDS-PAGE was also performed using MvFL treated with the reducing agent β -mercaptoethanol.

The effect of temperature on MvFL HA was evaluated as described in section 2.2 using lectin samples previously heated for 30 min at 30–100°C. To determinate the effects of pH variation on HA, the assay was performed as described but replacing the 0.15 M NaCl solution by the following buffer solutions: 0.1 M citrate phosphate buffer pH 3.0 to 6.0, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 or 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 9.0.

2.6. Affinity chromatography on Concanavalin A (ConA)-Sephrose

MvFL (2.0 mL; 1.0 mg of protein) was evaluated for the presence of carbohydrate moiety using a affinity chromatography on a ConA-Sephrose column (5.0 × 1.0 cm) pre-washed with 1.0 M NaCl containing 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂ and 5 mM CaCl₂ and equilibrated with 20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 1.0 M NaCl. A flow rate of 0.5 mL/min was maintained and the column was washed with the equilibrating solution until the absorbance at 280 nm was lower than 0.05. Next, the adsorbed proteins were eluted with 1.0 M D-glucose. Fractions of 3 mL were collected and evaluated for HA.

2.7. Fluorimetric analysis

The effects of pH and temperature on MvFL conformation were evaluated by fluorimetric analysis of intrinsic tryptophan fluorescence as well as using the extrinsic probe bis(8-anilinonaphthalene-1-sulfonate) [bis-ANS], which emits fluorescence

when binds to hydrophobic regions surrounded by positively charged residues. Fluorescence measurements used MvFL samples (2 μ M) at the following conditions: MvFL in water; MvFL incubated for 30 min at 25°C in 0.1 M citrate phosphate buffer pH 3.0 to 6.0, 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0 or 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 and 9.0; and MvFL incubated for 30 min at different temperatures (30–100°C). Tryptophan and bis-ANS fluorescence spectra were measured at 23°C on a spectrofluorometer (Jasco FP-6300, Tokyo, Japan) in a rectangular quartz cuvette with a 1 cm path length. Tryptophan emission spectra were obtained by setting the excitation wavelength at 280 nm and emission in the 300–400 nm range. In the assays using bis-ANS, the lectin was incubated with 50-fold molar excess of this probe in the dark and the excitation wavelength was set at 360 nm and emission was evaluated in the range 400–600 nm. The spectra displayed in the figures are the averages of three scans and the signals were corrected by subtracting the solution spectrum.

2.8. Peptide mass fingerprint analysis

Native MvFL polypeptide band from PAGE for acidic proteins was cut from the gel and washed three times with 25 mM ammonium bicarbonate/acetonitrile 1:1 (v/v). Then, the material was covered with 100% acetonitrile for 10 s and then replaced by 25 mM ammonium bicarbonate and incubated for 45 min at 56°C. A digestion buffer (10 mg/mL trypsin in 25 mM ammonium bicarbonate) was added to the gel, incubated for 45 min, and replaced by 50 mM ammonium bicarbonate without the enzyme. The sample was incubated at 37°C overnight and then the peptides were extracted by incubation in 5% trifluoroacetic acid/acetonitrile 1:1 (v/v) for 30 min followed by removal and storage of the supernatant. The extraction step was repeated twice and all supernatant fractions were pooled and dried in a vacuum concentrator (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Germany). The peptides were analysed in a MALDI-TOF/TOF Autoflex III smartbeam spectrometer (Bruker Daltonics, USA). The spectra of peptides were compared with sequences of plant proteins present in NCBI database using MASCOT database search (<http://www.matrixscience.com>). The analysis was performed three times.

2.9. Trypsin inhibitor assay

Trypsin inhibitor activity was assayed in 96-well microtiter plates using 0.1 mg/mL bovine trypsin prepared in 0.1 M Tris–HCl pH 8.0 containing 0.02 M CaCl₂. The enzyme (5 µL) was incubated (5 min, 37 °C) with MvFL (10 µL; 2.0 µg) and the volume was adjusted for 195 µL with Tris buffer. Next, the synthetic substrate N- α -benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (5 µL; 8 mM) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was added and the assay was incubated for 30 min at 37°C. In the 100% activity control, the reaction between trypsin and the substrate was carried out in the absence of lectin. The substrate hydrolysis was followed by measurement of absorbance at 405 nm using a universal microplate spectrophotometer (μ Quant, MQX200; BioTek Instruments, Inc., VT, USA). Blank reactions were performed under the same conditions, without the substrate or without enzyme. One unit of trypsin inhibitor activity was defined as the amount of inhibitor that decreases the absorbance in 0.01 after 30 min at 37°C, in comparison with 100% activity control [38]. The *M. vacciniifolia* crude extract (10 µL; 13.3 µg of protein) and P1 from Sephadex G-75 chromatography (10 µL; 22.0 µg of protein) were also evaluated for trypsin inhibitor activity.

2.10. Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and culture of lymphocytes

Forty milliliters of blood were collected from healthy and non-smoking donors and placed in heparin tubes (Vacuette). PBMCs were collected using a density-gradient centrifugation over Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) and cell viability was evaluated using Trypan blue (Sigma-Aldrich, USA). Cells were only used for lymphocytes culture when viability was >98%. All voluntary donors signed a term of free and informed consent and experimental protocols were approved by the Ethics Committee of the *Universidade Federal de Pernambuco* (process number 1.870.360/2016).

For use in the assays, lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) with 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)

in 24-well plates (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 10^6 cells/well.

2.11. Analysis of cell viability

Lymphocytes cultured in absence (control) or presence of MvFL (concentration in the wells ranging from 6.25 to 50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h were centrifuged (450 g , 4°C, 10 min) and, after discarding the supernatant, 1 mL of PBS 1X was added to the precipitate. The cells were resuspended and centrifuged again at the same conditions. The pellet was resuspended in 300 μL of a binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 and 1.8 mM CaCl_2), transferred to a labeled cytometer tube, and annexin V (AnnV) conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 $\mu\text{g/mL}$) were added. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur platform (BD Biosciences, San Jose, USA) and the results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). AnnV–/PI+ cells were considered as necrotic and AnnV+/PI– cells were considered in the early stage of apoptosis. Double negatives were considered as viable cells.

2.12. Measurement of cytokine and chemokine levels

Supernatants of cultures treated or not with MvFL (12.5 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h were collected for quantification of cytokines using the CBA (Cytometric Bead Array) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of interleukins (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interferon-gamma (IFN- γ). The assays were performed according manufacturer's instructions and data were acquired on FACSCalibur platform. Six individual cytokine standard curves (0–5000 pg/mL) were run in each assay. The range of detection was between 3000 pg/mL and 5000 pg/mL.

Chemokines assessment was carried out using the CBA Human Chemokine Kit (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of CCL5, CCL2, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 in culture supernatants. The cells were analyzed using

the FACSCalibur platform according to manufacturer's instructions. Five individual chemokine standard curves (0–5000 pg/mL) were run in each assay and the range of detection was between 1500 pg/mL and 3000 pg/mL. The results were analyzed using FCAP 3.1 software.

2.13. Nitrite analysis

The supernatants from cultures of cells incubated or not with MvFL (12.5 µg/mL) for 24 h were used for nitrite analysis by the colorimetric Griess method [39]. NO concentration was estimated using a standard curve (3.12–100 µmol/mL). The reading was carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GoW/Cuvette, Waltham) at 595 nm.

2.14. Lymphocytes immunophenotyping assay

PBMCs cultured for 24 h in presence and absence of MvFL (12.5 µg/mL) were removed from plates using ice cold 1% PBS-Wash (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄; BD Biosciences) and transferred in 15-mL polypropylene tubes containing 6 mL of PBS-Wash for centrifugation (400 *g* for 10 min). After discarding the supernatant, cells were washed with 2 mL of PBS-Wash and centrifuged again (400 *g* for 5 min). Supernatant was discarded and surface monoclonal antibodies conjugated with peridinin chlorophyll (PerCP), FITC, phycoerythrin (PE) or allophycocyanin (APC) [anti-CD4-PerCP, anti-CD8-FITC, anti-CD28-PE and anti-CTLA-4-APC; BD Biosciences] were added to tubes and incubated for 30 min. After this time, it was performed two washing steps with 1 mL of PBS-Wash followed by centrifugation (400 *g* for 5 min). The cells were fixed for 15 min with 150 µL of Cytofix solution (BD Biosciences) and then washed with 2 mL of PBS-Wash followed by centrifugation (400 *g* for 5 min). After removal of the supernatant, 300 µL of PBS-Wash was added to each tube, which was loaded onto the FACSCalibur platform.

2.15. Statistical analysis

Data were analyzed using non-parametric tests. Standard deviations (SD) were calculated using the software GraphPad Prism 5.0 and data were expressed as a mean of replicates $\pm$ SD. Student's *t*-test was used to analyze the results from cell viability assay while differences between treatment groups were analyzed by Wilcoxon test. Significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

The extract from *M. vacciniifolia* fronds showed protein concentration of 1.33 mg/mL and a specific HA of 3.0. The HA of the extract was neutralized by fetuin and ovalbumin, confirming that the agglutination was due to the presence of lectins. The extract was treated with ammonium sulphate (60% saturation) but both the precipitate and supernatant fractions obtained did not show HA; thus, the extract was directly submitted to chromatography on a gel filtration column. As can be seen in Figure 1A, two proteins peaks (P1 and P2) were detected. The P1 showed specific HA a little higher than the extract (Table 1) while P2 did not present HA and was strongly colored. P1 was then submitted to the second chromatography step.

The ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex column separated P1 in two peaks (Figure 1B). The first, containing proteins that did not adsorb to the matrix, was not able to agglutinate erythrocytes. On the other hand, the pool of adsorbed proteins eluted with 1.0 M NaCl showed a high specific HA corresponding to a purification fold of 3,813 (Table 1). This peak showed a single polypeptide band in PAGE for acidic proteins (Figure 1B, inset) while no band was detected in PAGE for basic proteins. These results confirm the homogeneity of this preparation, which was deemed *M. vacciniifolia* frond lectin (MvFL).

Isoelectric focusing of MvFL revealed a single polypeptide spot with pI 4.51 (Figure 2A). This result implies the anionic nature of MvFL, which is in accordance with the adsorption on DEAE matrix and the results of PAGE for native proteins. A native molecular mass of 54 kDa for native MvFL was estimated through gel filtration chromatography (Figure 2B). SDS-PAGE of MvFL revealed three polypeptide bands (Figure 2C, lane 1) with approximate molecular masses of 20.8, 17.1, and 14.4 kDa.

Based on these results and on the native molecular mass, we can assume that MvFL is an oligomeric protein composed by three distinct subunits. When SDS-PAGE was performed in the presence of the reducing agent β -mercaptoethanol, the polypeptide of 17.1 kDa was not observed (Figure 2C, lane 2) indicating that it contains disulfide bridges.

MvFL HA was neutralized in presence of fetuin and the specific HA was reduced from 10,240 to 10 in presence of ovalbumin. The HA was not altered in the presence of tested monosaccharides and disaccharide. Other lectins had their ability to agglutinate cells inhibited only by complex sugars like the oligosaccharide moieties of glycoproteins [40,41] and this may be linked to an extended size of the carbohydrate-binding sites [42].

Affinity chromatography on Con A-Sepharose column was performed to assess whether MvFL would be a glycoprotein. The lectin adsorbed to the matrix and was eluted using glucose as mobile phase (Figure 2D), a competitor for ConA carbohydrate-binding sites. This results shows that MvFL is a glycoprotein and that its carbohydrate moiety may contain glucose and/or mannose residues since ConA is a mannose/glucose-binding lectin [43].

There was no alteration in the HA when MvFL was heated at temperatures ranging from 30 to 100°C. MvFL was more active when incubated at pH 4.0 and 5.0 (specific HA: 40,960), showed specific HA of 10,240 at pH 6.0 and 7.0, and was less active at basic pH values of 8.0 and 9.0 (specific HA of 1,280). The lectin from *Spatholobus parviflorus* seeds also showed HA in a wide range of pH (2.0–11.0) and resistant to heating[44]. Other examples of lectins able to agglutinate erythrocytes even after heating at 100°C is the water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin and the lectins from *Myracrodruon urundeuva* heartwood, bark and leaf [40,45].

The conformation stability of MvFL towards changes in temperature and pH was evaluated by fluorimetric analyses. The assays were performed investigating intrinsic tryptophan fluorescence as well as using the bis-ANS extrinsic probe, which is useful to detect stages of protein unfolding since its fluorescence is reduced when the protein hydrophobic patches are exposed to aqueous environment [46]. Figure 3A shows that tryptophan fluorescence spectra of MvFL heated at different temperatures did not show significant shift in the maximum emission wavelength (around 336 nm). The fluorescence intensity was lower in the samples heated at the highest temperatures. In regard to bis-ANS fluorescence, it was not detected

exposure of hydrophobic sites to the solvent since the fluorescence intensity did not decrease; on the contrary, the heating resulted in increase of intensity (Figure 3B). Together, these results show that heating of MvFL leads to conformational changes (such as closure of the hydrophobic pockets) but not to unfolding of this protein. These results are in agreement with the stability of MvFL HA towards heating.

Intrinsic fluorescence spectra of MvFL incubated at different pH values showed no remarkable shifts of the maximum emission wavelength of tryptophan (Figure 3C). Fluorescence of bis-ANS was observed when MvFL was incubated at all tested pH values (Figure 3D), indicating that the protein was not totally unfolded in any condition. However, the maximum emission wavelengths and fluorescence intensity varied, reflecting distinct conformations according to the pH of the medium. Indeed, the HA of MvFL varied according to the pH of the medium, which is a reflection of these conformational alterations.

The determination of the conditions under which a protein remains stable is important to prevent denaturation during storage and biotechnological application. In addition, the tendency of proteins to aggregate usually decrease under stabilizing conditions. Effects of pH on the stability of lectin from *Phaseolus vulgaris* were studied by fluorescence spectroscopy and the intrinsic fluorescence spectra suggested that, similarly to MvFL, this protein did not denature in a wide pH range from 2.0 to 10.0 [47]. The HA of *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin was stable towards heating up to 70°C but was lost at 80°C, which was accompanied by drastic changes in fluorescence indicating protein unfolding [48]. Unlike MvFL, the lectin from seeds of *Bauhinia ungulata* was weakly thermostable because its HA was lost at 50°C being observed thermal unfolding of sample heated at this temperature [49].

MvFL was digested with trypsin and the derived peptides were analyzed by mass spectrometry. The lectin showed homology with a RNA-binding family protein isoform 2 from *Theobroma cacao* (EOY11515.1) with a sequence coverage of 32% and score 84. The matched peptides are presented in Table 2. Cucurbitaceae phloem lectins have been reported to possess both carbohydrate and RNA-binding activities; these RNA-binding proteins are able to bind pathogenic and non-pathogenic RNAs being involved in plant defense and long-distance RNA transport system [50,51].

According to Kirschner and Bisswanger [52] multifunctional proteins consist of a single protein with multiple catalytic or binding functions. This term is currently used

to describe some lectins that fit this description [53]. MvFL was evaluated for ability to reduce the activity of trypsin and showed high specific inhibitor activity (3360.1 U/mg). Trypsin inhibitor activity was also evaluated for frond extract and P1, revealing a purification factor of 19.2 regarding this property of MvFL (Table 1). Based on these results, MvFL can be considered a multifunctional protein, similarly to the *Crataeva tapia* bark lectin, which display both lectin and trypsin inhibitory activities [6]. A sialic acid-binding lectin from *Ranacates beiana* oocytes is also a multifunctional protein with lectin and enzyme (ribonuclease) activities [54]. It has been also described the purification of proteins with both trypsin inhibitor and hemagglutinating activities from *Albelmoschus moschatus* seeds [5].

As previously mentioned, several plant lectins are known as potent immunomodulatory agents. Before evaluating whether MvFL would have immunomodulatory action, we determined its toxicity degree to human PBMCs since some lectins can be toxic to these cells [25,55]. The cells were treated with MvFL at 6.25 to 50 µg/mL and evaluated for occurrence of apoptosis and/or necrosis. Results showed that, in 24 h of incubation, MvFL did not promote damage in more than 6% of cells at all tested concentrations (Figure 4). Apoptosis signals were not significantly different ($p > 0.05$) between control and all lectin treatments. Cell death by necrosis was significant ($p < 0.05$) higher than in control only in treatment at 50 µg/mL.

The concentration of 12.5 µg/mL was chosen to perform the immunological tests with MvFL since no cytotoxic effect was detected and concentrations between 10 and 15 µg/mL have been reported to be enough to detect immunomodulatory properties of lectins [21]. The results showed that MvFL was able to stimulate a Th1 response by increasing TNF- α and IFN- γ production (Figure 5A and 5B). The pleiotropic IL-6 was also produced in higher values by MvFL-treated cells in comparison with control (Figure 5C). IL-6 is a proliferative cytokine that stimulates mainly T cells-mediated immune response [58]. The *Cratylia mollis* seed lectin and the *Musa paradisiaca* lectin were also able to induce IL-6 production [21,59,60]. TNF- α and IL-6 promote systemic inflammation through induction of fever, acute phase response and activation of macrophages and neutrophils [61]. IL-6 has also been reported to induce proliferation and cytotoxic activity of CD8⁺ T cells [62].

The production of nitric oxide (NO) by cells incubated with MvFL was also higher than that determined in control (Figure 6). Together, these results may indicate that MvFL induced a Th1 response. Studies have shown that some lectins

can induce the release of NO [18,26] and the increase of this chemical mediator seems lead the upregulation of IFN- γ production [56]. A major function of NO during inflammation is microbial killing via the generation of ONOO⁻ [57].

Regarding the cytokines linked to a Th2 response, the release of IL-4 was not stimulated but IL-10 was produced in high level by lectin-stimulated PBMCs (Figure 5D). The anti-inflammatory cytokine IL-10 is known for its immunosuppressive properties, which have effects on immune regulation and inflammation. The results found in our work are interesting because it was observed an induction of pro-inflammatory status associated with Th1 response but concomitant with a IL-10 stimulus that may modulate the process avoiding uncontrolled responses.

No differences between control and MvFL-treated cells were detected with respect to IL-17 production. It is known that IFN- γ might suppress IL-17 production and favor IL-10 release by T cells [63]. Both situations may have happened in our study since increased of IFN- γ and IL-10 levels and no alteration in IL-17 production were detected for MvFL-treated cells. MvFL did not stimulate the production of the chemokines evaluated, which suggest that MvFL promotes higher stimulation in lymphocytes and lower stimulation in leucocytes or IL-10 production observed in our results promoted a down-regulation of pro-inflammatory status.

The pharmacological potential of cytokines in biotherapeutics may involve the modulation (activation or inhibition) of the immune system. In addition, modulation of the pathways of the immune system by cytokines may result in multiple effects, which may be desirable or undesirable, depending on the disease phase [64]. As mentioned, our results revealed that MvFL could modulate immune cells inducing mainly a pro-inflammatory status, but modulated by IL-10. The *Viscum album* lectins induced the release of pro-inflammatory cytokines in monocytes isolated from peripheral blood [65,66]. This ability of these lectins was considered interesting by these authors because inflammatory responsiveness is usually decreased in cancer patients and thus the activation of immunological mechanisms may inhibit tumor growth. According to Dhama et al. [67], immunomodulation of TNF- α and IL-6 may exert antitumor action, INF- γ may be helpful as an adjuvant, and IL-10 may be relevant for the therapy of autoimmune diseases.

We evaluated the effects of MvFL on proliferation of CD4⁺ and/or CD8⁺ lymphocytes as well as the activation of these cells, which was determined through

investigation of CD28. The results showed that MvFL induced proliferation (Figure 7A) and activation (Figure 7B) of T CD8⁺ lymphocytes subset. These results are interesting since the effector functions of differentiated T CD8⁺ cells include their capacity to kill infected cells through the release of cytolytic granules [68]. CTLA-4, a protein that acts as a negative signal for T cell responses, was also investigated but its expression was not detected in relevant levels in both control and treated cells (Figure 7C).

Monocytes serve as mediators for the initiation and progression of the inflammatory response with the production of large amounts of proinflammatory cytokines as well as secretion of a large amount of Th2 cytokines (such as IL-10) to limit the intensity of the immune response, preventing damage to tissue or to the hyperactive organ [69, 70]. These cells may also be involved in the immunomodulation promoted by MvFL.

Plant lectins have been reported to be effective in activating the proliferation of lymphocytes. The *Cratylia mollis* seed lectin induced mitogenic response in murine splenocytes [21] and the *Musa paradisiaca* lectin and the *Allium cepa* agglutinin showed lymphoproliferative activity toward thymocytes [23,60]. Depletion of CD8⁺ T cells often may result of viral infections and thus the induction of CD8⁺ proliferation may be relevant in the control of these kind of infections [71,72]. Moreover, clonal expansion and activation of CD8⁺ T lymphocytes can be positive in the therapy of diseases such as cancer [73,74].

4. Conclusion

Microgramma vacciniifolia fronds contain a multifunctional protein (MvFL) with lectin and trypsin inhibitor activities and sequence similarities with a plant RNA-binding protein. MvFL is an anionic protein whose conformation and HA is stable toward heating. The lectin showed low toxicity to lymphocytes and was able to induce predominantly a Th1 response by PBMCs. In addition, it promoted the activation and differentiation of T CD8⁺ cells. These results support future studies on the immunomodulatory action of MvFL on *in vivo* antitumor assays, for example.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowship (PMGP), the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0137-2.08/12; APQ-0318-2.08/13; APQ-0330-2.08/13; APQ-0661-2.08/15) for financial support. LLSP would like to thank CNPq for graduate scholarship. TFP and TAL would like to thank FACEPE for graduate (IBPG-0088-2.08/14) and researcher fixation (BFP-0089-2.08/16) scholarships, respectively. We are also thankful to the technical assistance of Mr. Mineo Nakazawa from the Immunoparasitology Laboratory of the *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz*.

References

- [1] P.M.G. Paiva, E.V. Pontual, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, *Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae*, first ed, Nova Science Publishers Inc, New York, 2013. <https://www.researchgate.net/publication/287248479>
- [2] T. Yau, X. Dan, C.C.W. Ng, T.B. Ng, Lectins with potential for anti-cancer therapy., *Molecules*. 20 (2015) 3791–3810. doi:10.3390/molecules20033791.
- [3] Z. Zhang, L. He, S. Hu, Y. Wang, Q. Lai, P. Yang, Q. Yu, S. Zhang, F. Xiong, S. Simsekylmaz, Q. Ning, J. Li, D. Zhang, H. Zhang, X. Xiang, Z. Zhou, H. Sun, C.Y. Wang, AAL exacerbates pro-inflammatory response in macrophages by regulating mincle/Syk/Card9 signaling along with the Nlrp3 inflammasome assembly, *Am. J. Transl. Res.* 7 (2015) 1812–1825. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656759/>
- [4] T.F. Procópio, M.C. Moura, L.P. Albuquerque, F.S. Gomes, N.D.L. Santos, L.C.B.B. Coelho, E. V Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential, in: *Antibacterials Synth. Prop. Biol. Act.*, Nova Scien, New York, 2016: pp.18.
- [5] M.K. Dokka, G. Konala, S.P. Davuluri, Hemagglutinating activity of trypsin inhibitors from seeds of *Albelmoschus moschatus* L., *Int. J. Curr. Microbiol. AppliedSciences*. 3 (2014) 184–199.

- [6] N.N.S. Nunes, R.S. Ferreira, R. a. Silva-Lucca, L.F.R. de Sá, A.E. a. de Oliveira, M.T.D.S. Correia, P.M.G. Paiva, A. Wlodawer, M.L. V. Oliva, Potential of the Lectin/Inhibitor Isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for Controlling *Callosobruchus maculatus* Larva Development, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 10431–10436. doi:10.1021/acs.jafc.5b03634.
- [7] E.V. Pontual, T.H. Napoleão, C.R. Dias de Assis, R. de Souza Bezerra, H.S. Xavier, D.M. do A.F. Navarro, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *aedes aegypti*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79 (2012) 135–152. doi:10.1002/arch.21012.
- [8] E.F. Fang, T.B. Ng, A Trypsin Inhibitor from Rambutan Seeds with Antitumor, Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase, and Nitric Oxide-Inducing Properties, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175 (2015) 3828–3839. doi:10.1007/s12010-015-1550-1.
- [9] L.G. Bermúdez-Humarán, J.-P. Motta, C. Aubry, P. Kharrat, L. Rous-Martin, J.-M. Sallenave, C. Deraison, N. Vergnolle, P. Langella, Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- β anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci, *Microb. Cell Fact.* 14 (2015) 26-36. doi:10.1186/s12934-015-0198-4.
- [10] L.L.S. Patriota, T.F. Procópio, M.F.D. de Souza, A.P.S. de Oliveira, L.V.N. Carvalho, M.G.R. Pitta, M.J.B.M. Rego, P.M.G. Paiva, E. V. Pontual, T.H. Napoleão, A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1–10. doi:10.3389/fmicb.2016.00611.
- [11] S. Srikanth, Z. Chen, Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 470. doi:10.3389/fphar.2016.00470.
- [12] M. Krifa, I. Bouhlel, L. Ghedira-Chekir, K. Ghedira, Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall, *J. Ethnopharmacol.* 146 (2013) 243–249. doi:10.1016/j.jep.2012.12.038.
- [13] M.A. Souza, F.C. Carvalho, L.P. Ruas, R. Ricci-azevedo, M.C. Roque-Barreira, The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties, *Glycoconj. J.* 30 (2013) 641–657. doi:10.1007/s10719-012-9464-4.
- [14] I. Jantan, W. Ahmad, S.N.A. Bukhari, Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials, *Front. Plant Sci.* 6 (2015) 1–18. doi:10.3389/fpls.2015.00655.
- [15] T.K. Dam, F.C. Brewer, Maintenance of cell surface glycan density by lectin-glycan interactions: A homeostatic and innate immune regulatory mechanism, *Glycobiology.* 20 (2010) 1061–1064. doi:10.1093/glycob/cwq084.
- [16] J. Katrlík, J. Švitel, P. Gemeiner, T. Kožár, J. Tkac, Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications, *Med. Res. Rev.* 29 (2010) 394–418. doi:10.1002/med.20195.

- [17] S.P. Mendez-Huergo, S.M. Maller, M.F. Farez, K. Mariño, J. Correale, G.A. Rabinovich, Integration of lectin-glycan recognition systems and immune cell networks in CNS inflammation, *Cytokine Growth Factor Rev.* 25 (2014) 247–255. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.02.003.
- [18] R.S. Singh, P.H. Kaur, V. Rana, J.F. Kennedy, Immunomodulatory and therapeutic potential of a mucin-specific mycelial lectin from *Aspergillus panamensis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 241–248. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.036.
- [19] V. Dhuna, Isolation, purification and characterization of an N-acetyl-D-lactosamine binding mitogenic and anti-proliferative lectin from tubers of a cobra lily *Arisaema utile* Schott, *Adv. Biosci. Biotechnol.* 1 (2010) 79–90. doi:10.4236/abb.2010.12012.
- [20] A. Gorakshakar, K. Ghosh, Use of lectins in immunohematology, *Asian J. Transfus. Sci.* 10 (2016) 12–21. doi:10.4103/0973-6247.172180.
- [21] C.M.L. De Melo, H. Melo, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.B. Da Silva, V.R.A. Pereira, Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice, *Scand. J. Immunol.* 73 (2011) 112–121. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02490.x.
- [22] J.J. Kim, Y.H. Hwang, K.Y. Kang, I. Kim, J.B. Kim, J.H. Park, Y.C. Yoo, S.T. Yee, Enhanced dendritic cell maturation by the B-chain of Korean mistletoe lectin (KML-B), a novel TLR4 agonist, *Int. Immunopharmacol.* 21 (2014) 309–319. doi:10.1016/j.intimp.2014.05.010.
- [23] V.K. Prasanna, Y.P. Venkatesh, Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro, *Int. Immunopharmacol.* 26 (2015) 304–313. doi:10.1016/j.intimp.2015.04.009.
- [24] E. Marinković, I. Lukić, D. Kosanović, A. Inić-Kanada, M. Gavrović-Jankulović, M. Stojanović, Recombinantly produced banana lectin isoform promotes balanced pro-inflammatory response in the colon, *J. Funct. Foods.* 20 (2016) 68–78. doi:10.1016/j.jff.2015.10.019.
- [25] L.C.C. Araújo, J.S. Aguiar, T.H. Napoleão, F.V.B. Mota, A.L.S. Barros, M.C. Moura, M.C. Coriolano, L.C.B.B. Coelho, T.G. Silva, P.M.G. Paiva, Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds, *PLoS One.* 8 (2013) 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0081973.
- [26] R.B. Nóbrega, B.A.M. Rocha, C.A.A. Gadelha, T. Santi-Gadelha, A.F. Pires, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, B.S. Cavada, P. Delatorre, Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production, *Biochimie.* 94 (2012) 900–906. doi:10.1016/j.biochi.2011.12.009.
- [27] M.G. Santos, L.D.S. Sylvestre, Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do estado do Rio de Janeiro, Brasil, *Acta Bot. Brasilica.* 20 (2006) 115–124. doi:10.1590/S0102-33062006000100011.

- [28] M. de F. Agra, K.N. Silva, I.J.L.D. Basílio, P.F. de Freitas, J.M. Barbosa-Filho, Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil, *Rev. Bras. Farmacogn.* 18 (2008) 472–508. doi:10.1590/S0102-695X2008000300023.
- [29] M.T.L.P. Peres, E. Simionatto, S.C. Hess, V.F.L. Bonani, A.C.S. Candido, C. Castelli, N.R. Poppi, N.K. Honda, C.A.L. Cardoso E, O. Faccenda, Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (langsd. & fisch.) copel (polypodiaceae), *Quim. Nova.* 32 (2009) 897–901. doi:10.1590/S0100-40422009000400013.
- [30] L.P. de Albuquerque, G.M. de S. Santana, E.V. Pontual, T.H. Napoleão, L.C. Breitenbach Barroso Coelho, P.M.G. Paiva, Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae), *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 75 (2012) 158–166. doi:10.1016/j.ibiod.2012.06.030.
- [31] L.P. de Albuquerque, G.M. Sá Santana, T.H. Napoleão, L.C.B.B. Coelho, M.V. Da Silva, P.M.G. Paiva, Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 1098–1105. doi:10.1007/s12010-013-0600-9.
- [32] L.P. de Albuquerque, E.V. Pontual, G.M. de S. Santana, L.R.S. Silva, J. dos S. Aguiar, L.C.B.B. Coelho, M.J.B. de M. Rego, M.G. da R. Pitta, T.G. da Silva, A.M.M. de A. Melo, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*, *Acta Trop.* 138 (2014) 23–27. doi:10.1016/j.actatropica.2014.06.005.
- [33] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1966) 1166–1170. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6024827>
- [34] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent, *J. Biol. Chemistry.* 193 (1951) 265–275. doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4
- [35] R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, D.E. Williams, Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels., *Nature.* 195 (1962) 281–283. doi:10.1038/195281a0.
- [36] B.J. Davis, Davis : Disc Electrophoresis -II Method and application to human serum proteins, *Clin. Appl.* (1962) 404–427. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x.
- [37] B.U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature.* 227 (1970) 680–685. doi:10.1038/227680a0
- [38] C.F.R. De Oliveira, I.M. Vasconcelos, R. Aparicio, M.D.G.M. Freire, P.A. Baldasso, S. Marangoni, M.L.R. MacEdo, Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds, *Process Biochem.* 47 (2012) 929–935. doi:10.1016/j.procbio.2012.02.022.

- [39] A.H. Ding, C.F. Nathan, D.J. Stuehr, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J Immunol.* 141 (1988) 2407–2412. <http://www.jimmunol.org/cgi/reprint/141/7/2407.pdf>.
- [40] T.H. Napoleão, F.S. Gomes, T.A. Lima, N.D.L. Santos, R.A. S??, A.C. Albuquerque, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65 (2011) 52–59. doi:10.1016/j.ibiod.2010.05.015.
- [41] P.M. Silva, T.H. Napoleão, L.C.P.B.B. Silva, D.T.O. Fortes, T.A. Lima, R.B. Zingali, E. V. Pontual, J.M. Araújo, P.L. Medeiros, C.G. Rodrigues, F.S. Gomes, P.M.G. Paiva, The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria, *J. Funct. Foods.* 27 (2016) 695–702. doi:10.1016/j.jff.2016.10.015.
- [42] W.I. Weis, K. Drickamer, Structural Basis of Lectin-Carb Ohydrate Recognition, *Anna Rev. Biochen.* 65 (1996) 441–473. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.002301
- [43] W. wen Li, J. ying Yu, H. long Xu, J. ku Bao, Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414 (2011) 282–286. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.072.
- [44] K. Geethanandan, A. Joseph, C. Sadasivan, M. Haridas, Carbohydrate binding and unfolding of *Spatholobus parviflorus* lectin: Fluorescence and circular dichroism spectroscopic study, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171 (2013) 80–92. doi:10.1007/s12010-013-0340-x.
- [45] J.S. Coelho, N.D.L. Santos, T.H. Napole??o, F.S. Gomes, R.S. Ferreira, R.B. Zingali, L.C.B.B. Coelho, S.P. Leite, D.M.A.F. Navarro, P.M.G. Paiva, Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae, *Chemosphere.* 77 (2009) 934–938. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.08.022.
- [46] N. Varejão, M. da S. Almeida, N.N.T. De Cicco, G.C. Atella, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, D. Foguel, Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1), *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1804 (2010) 1917–1924. doi:10.1016/j.bbapap.2010.06.004.
- [47] S. He, B.K. Simpson, M.O. Ngadi, S.J. Xue, J. Shi, Y. Ma, pH stability study of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*) as influenced by guanidinium-HCl and thermal treatment, *Protein Pept. Lett.* 22 (2015) 45–51. doi:10.2174/0929866521666140909155556.
- [48] R.M.P.B. Costa, A.F.M. Vaz, M.L. V Oliva, L.C.B.B. Coelho, M.T.S. Correia, M.G. Carneiro-da-Cunha, A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties, *Process Biochem.* 45 (2010) 526–533. doi:10.1016/j.procbio.2009.11.013.
- [49] H.C. Silva, L.D.S. Pinto, E.H. Teixeira, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, A.L.C. Silva, BUL: A novel lectin from *Bauhinia ungulata* L. seeds with fungistatic and

- antiproliferative activities, *Process Biochem.* 49 (2014) 203–209. doi:10.1016/j.procbio.2013.10.020.
- [50] G. Gómez, H. Torres, V. Pallás, Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system, *Plant J.* 41 (2005) 107–116. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02278.x.
- [51] V. Pallas, G. Gómez, Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system., *Front. Plant Sci.* 4 (2013) 130. doi:10.3389/fpls.2013.00130.
- [52] K. Kirschner, H. Bisswanger, Multifunctional proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 45 (1976) 143–166. doi: 10.1146/annurev.bi.45.070176001043.
- [53] G. Cai, X. Ma, B. Chen, Y. Huang, S. Liu, H. Yang, W. Zou, Galectin-3 induces ovarian cancer cell survival and chemoresistance via TLR4 signaling activation, *Tumor Biol.* 37 (2016) 11883–11891. doi:10.1007/s13277-016-5038-6.
- [54] T. Tatsuta, M. Hosono, S. Sugawara, Y. Kariya, Y. Ogawa, S. Hakomori, K. Nitta, Sialic acid-binding lectin (Iczyme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells, *Int. J. Oncol.* 43 (2013) 1402–1412. doi:10.3892/ijo.2013.2092.
- [55] S. Franz, B. Frey, A. Sheriff, U.S. Gaipf, A. Beer, R.E. Voll, J.R. Kalden, M. Herrmann, Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis, *Cytom. Part A.* 69A (2006) 230–239. doi:10.1002/cyto.a.20206.
- [56] Y. Zhang, H. Wang, J. Ren, X. Tang, Y. Jing, D. Xing, G. Zhao, Z. Yao, X. Yang, H. Bai, IL-17A synergizes with IFN- γ to upregulate iNOS and NO production and inhibit chlamydial growth, *PLoS One.* 7 (2012) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0039214.
- [57] M.L. Lo Faro, B. Fox, J.L. Whatmore, P.G. Winyard, M. Whiteman, Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation, *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 41 (2014) 38–47. doi:10.1016/j.niox.2014.05.014.
- [58] M. Mihara, M. Hashizume, H. Yoshida, M. Suzuki, M. Shiina, IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions., *Clin. Sci. (Lond).* 122 (2012) 143–159. doi:10.1042/CS20110340.
- [59] P.S.S. De Oliveira, M.J.B.D.M. Rego, R.R. Da Silva, M.B. Cavalcanti, S.L. Galdino, M.T.D.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.G.D.R. Pitta, *Cratylia mollis* 1, 4 lectin: A new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological memory, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1–6. doi:10.1155/2013/263968.
- [60] A.C.M.B. Sansone, M. Sansone, C.T. dos Santos Dias, J.R. Oliveira do Nascimento, A. Claudia, M. Brito, M. Sansone, C. Tadeu, J. Roberto, Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 19–24. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.049.

- [61] M. Croft, C.A. Benedict, C.F. Ware, Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 147–168. doi:10.1038/nrd3930.
- [62] Y.J. Lee, T.J. Won, K.E. Hyung, Y.W. Jang, S.J. Kim, D.I. Lee, S.Y. Park, K.W. Hwang, IL-6 induced proliferation and cytotoxic activity of CD8+T cells is elevated by SUMO2 overexpression, *Arch. Pharm. Res.* 39 (2016) 705–712. doi:10.1007/s12272-016-0736-6.
- [63] G. Murugaiyan, A. Mittal, H.L. Weiner, Identification of an IL-27/osteopontin axis in dendritic cells and its modulation by IFN-gamma limits IL-17-mediated autoimmune inflammation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 11495–11500. doi:10.1073/pnas.1002099107.
- [64] T. Ramani, C.S. Auletta, D. Weinstock, B. Mounho-Zamora, P.C. Ryan, T.W. Salcedo, G. Bannish, Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly, *Int. J. Toxicol.* 34 (2015) 355–365. doi:10.1177/1091581815584918.
- [65] T. Hajto, K. Hostanska, K. Frei, C. Rordorf, H.J. Gabius, Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe extract., *Cancer Res.* 50 (1990) 3322–3326. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2334925>
- [66] G. Ribéreau-Gayon, M.L. Jung, M. Frantz, R. Anton, Modulation of cytotoxicity and enhancement of cytokine release induced by *Viscum album* L. extracts or mistletoe lectins., *Anticancer. Drugs.* 8 Suppl 1 (1997) S3-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9179359>.
- [67] K. Dhama, M. Saminathan, S.S. Jacob, M. Singh, K. Karthik, Amarpal, R. Tiwari, L.T. Sunkara, Y.S. Malik, R.K. Singh, Effect of immunomodulation and immunomodulatory agents on health with some bioactive principles, modes of action and potent biomedical applications, *Int. J. Pharmacol.* 11 (2015) 253–290. doi:10.3923/ijp.2015.253.290.
- [68] I. Voskoboinik, J.C. Whisstock, J.A. Trapani, Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology, *Nat. Publ. Gr.* 15 (2015) 388–400. doi:10.1038/nri3839.
- [69] GAURNIER-HAUSSER, A.; ROTHMAN, V. L.; DIMITROV, S.; TUSZYNSKI, G. P. The Novel Angiogenic Inhibitor, Angiocidin, Induces Differentiation of Monocytes to Macrophages. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5905–5914, 2008.
- [70] FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, 2012.
- [71] M.D. Gainey, J.G. Rivenbark, H. Cho, L. Yang, W.M. Yokoyama, Viral MHC class I inhibition evades CD8+ T-cell effector responses in vivo but not CD8+ T-cell priming., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E3260-7. doi:10.1073/pnas.1217111109.
- [72] E.C. Reilly, E.A. Thompson, S. Aspeslagh, J.R. Wands, D. Elewaut, L. Brossay,

Activated iNKT cells promote memory CD8⁺ T cell differentiation during viral infection, *PLoS One*. 7 (2012) e37991. doi:10.1371/journal.pone.0037991.

- [73] N.L. Berinstein, M. Karkada, A.M. Oza, K. Odunsi, J.A. Vilella, J.J. Nemunaitis, M.A. Morse, T. Pejovic, J. Bentley, M. Buyse, R. Nigam, G.M. Weir, L.D. MacDonald, T. Quinton, R. Rajagopalan, K. Sharp, A. Penwell, L. Sammatur, T. Burzykowski, M.M. Stanford, M. Mansour, Survivin-targeted immunotherapy drives robust polyfunctional T cell generation and differentiation in advanced ovarian cancer patients., *Oncoimmunology*. 4 (2015) e1026529. doi:10.1080/2162402X.2015.1026529.
- [74] S.R. Jackson, J. Yuan, R.M. Teague, Targeting CD8⁺ T-cell tolerance for cancer immunotherapy, *Immunotherapy*. 6 (2014) 833–852. doi:10.2217/imt.14.51.

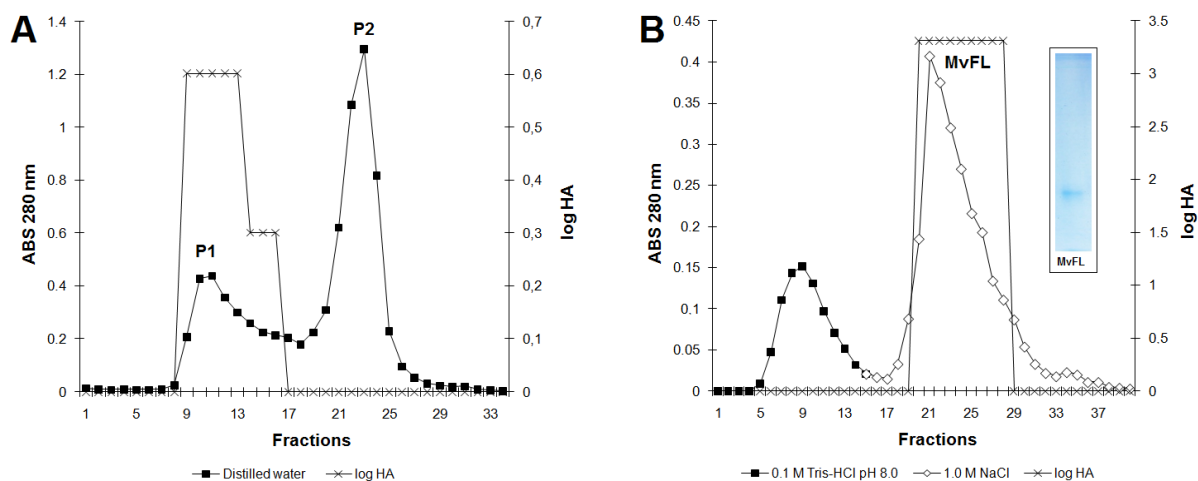


FIGURE 1- Purification of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL). (A) Chromatography of frond extract on Sephadex G-75 column performed using distilled water (flow rate: 0.5 mL/min) as mobile phase. Fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm (ABS 280 nm) and hemagglutinating activity (HA). (B) Ion exchange chromatography of P1 on DEAE-Sephadex column. Washing step used 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. Elution was performed with this buffer containing 1.0 M NaCl. Fractions of 3.0 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL/min and evaluated for ABS 280 nm and HA. The inset shows MvFL polypeptide band PAGE for native acidic proteins stained with Coomassie Brilliant Blue.

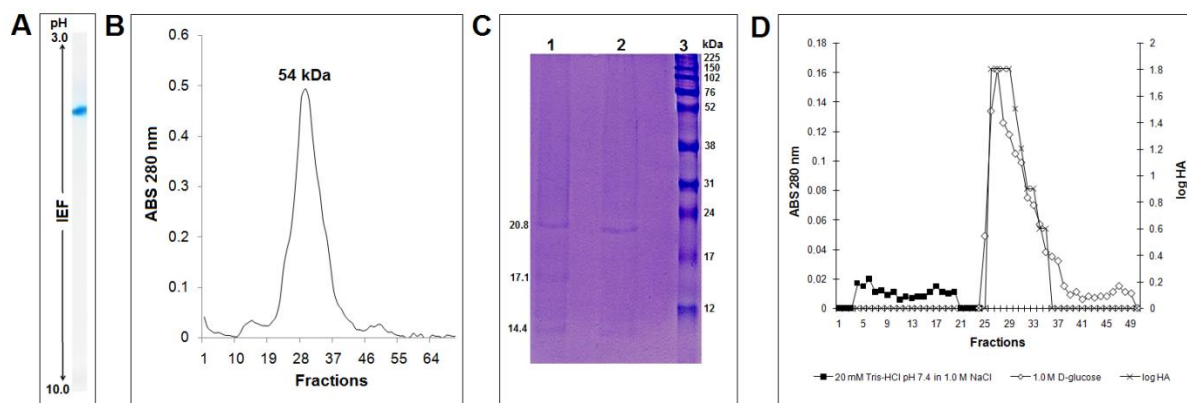


FIGURE 2- Characterization of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL). (A) Isoelectric focusing (IEF) of MvFL under native conditions. The isoelectric point of lectin is 4.51. (B) Gel filtration chromatography of MvFL (2.0 mg of protein) on a Hiprep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to AKTAprime plus system. (C) Electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) of MvFL (1), MvFL treated with β -mercaptoethanol (2) and molecular mass markers (3). The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. (D) Chromatography of MvFL on ConA-Sepharose column. Washing step used 20 mM Tris-HCl pH 7.4 in 1.0 M NaCl. Adsorbed proteins were eluted with 1.0 M D-glucose. Fractions of 3.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm (ABS 280 nm) and hemagglutinating activity (HA).

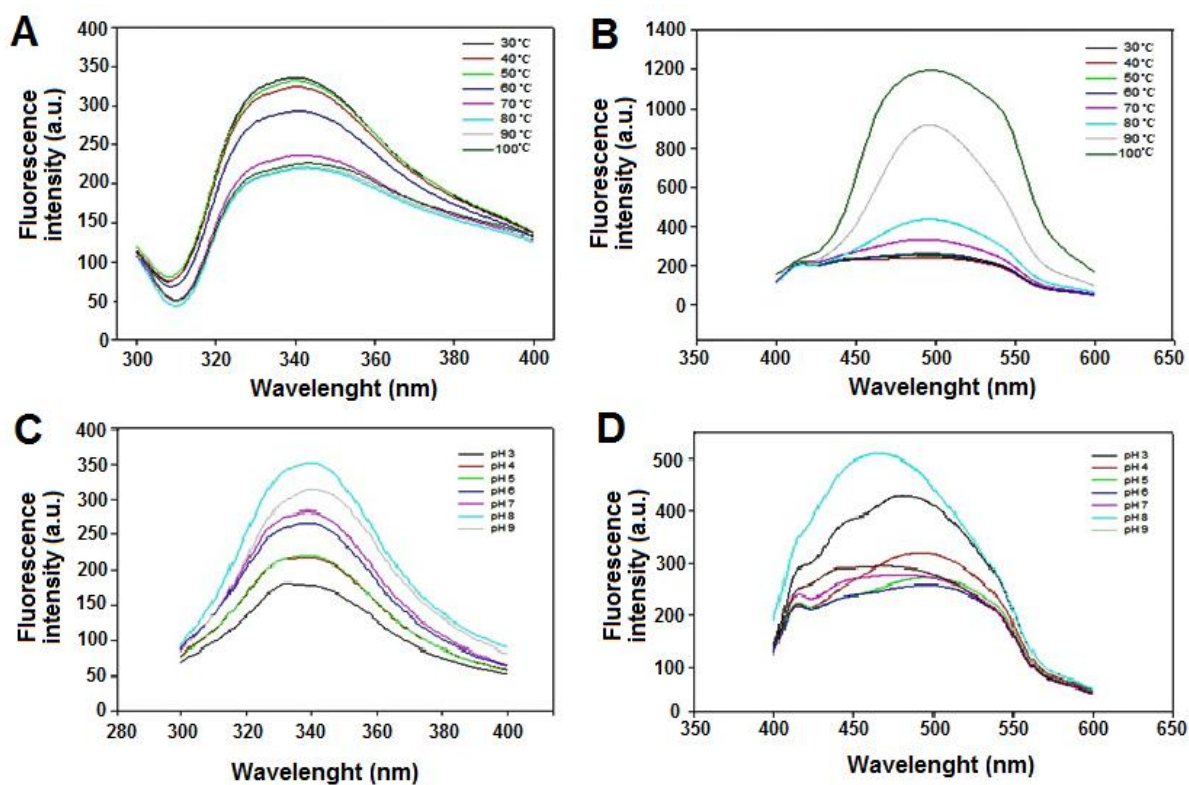


FIGURE 3- Effects of temperature (A and B) and pH (C and D) on conformation of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL). Intrinsic fluorescence of MvFL tryptophan residues (A and C) and fluorescence of extrinsic probe bis-ANS in presence of MvFL (B and D) were evaluated.

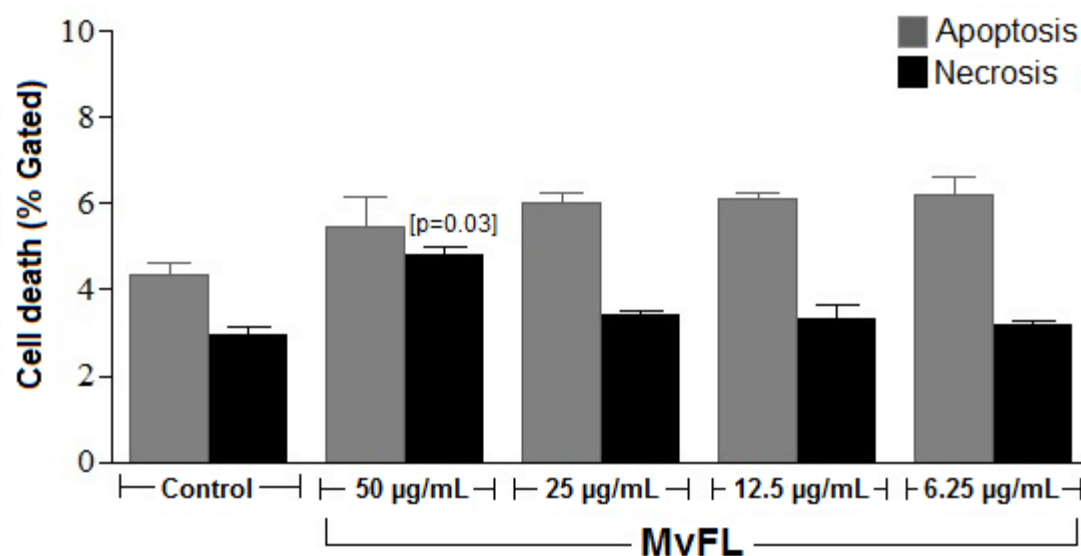


FIGURE 4- Evaluation of cytotoxic effects of MvFL on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by flow cytometry using the markers annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV–/PI+ cells were considered as necrotic and AnnV+/PI– cells were considered apoptotic. Cell death by necrosis was significant higher than in control only in treatment with 50 µg/mL, as indicated by the p-value. Vertical bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate.

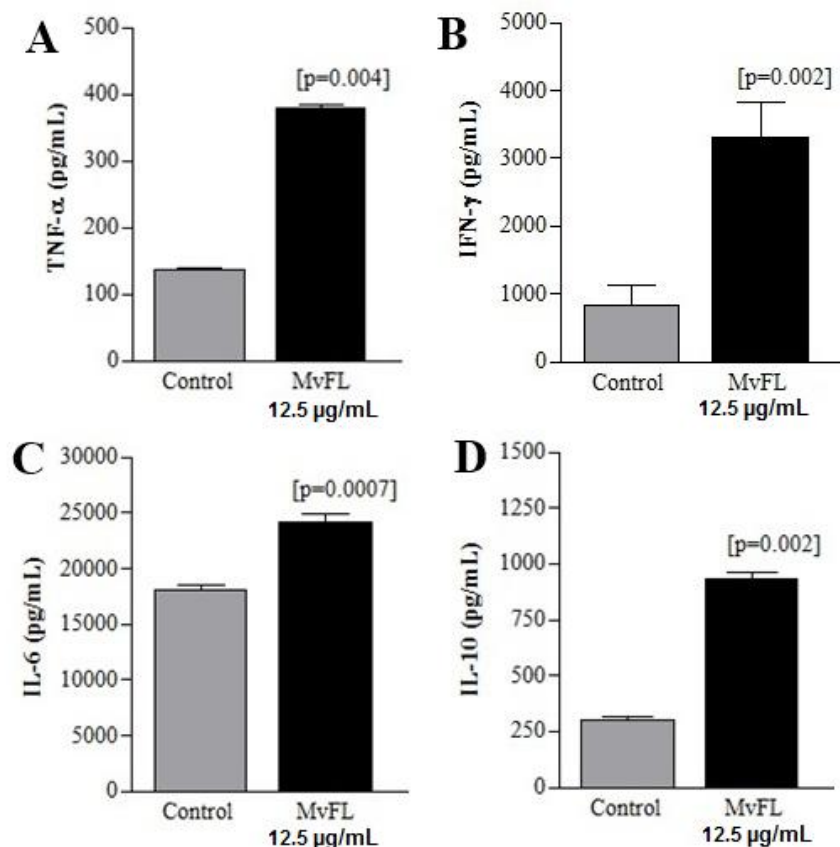


FIGURE 5- Evaluation of immunomodulatory effects of MvFL on human PBMCs in 24-h incubation. TNF- α (A), IFN- γ (B), IL-6 (C) and IL-10 (D) production was stimulated by MvFL in comparison with control, as indicated by the p-values. The bars represent the average of independent experiments performed in duplicate for each of the six individuals (blood donors)

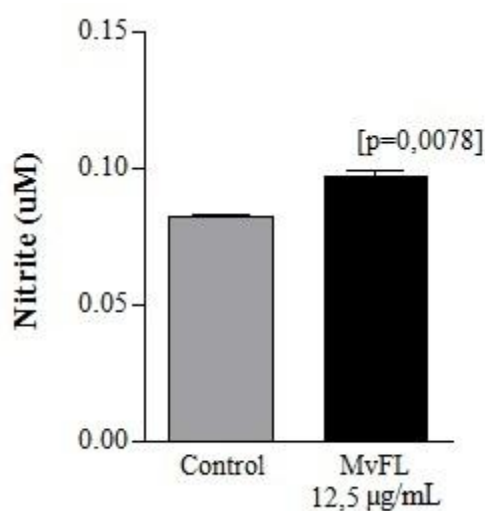


FIGURE 6- Evaluation of production of nitric oxide by MvFL on human PBMCs in 24-h incubation. Nitric oxide production was stimulated by MvFL in comparison with control, as indicated by the p-values. The bars represent the average of independent experiments performed in duplicate for each of the six individuals (blood donors)

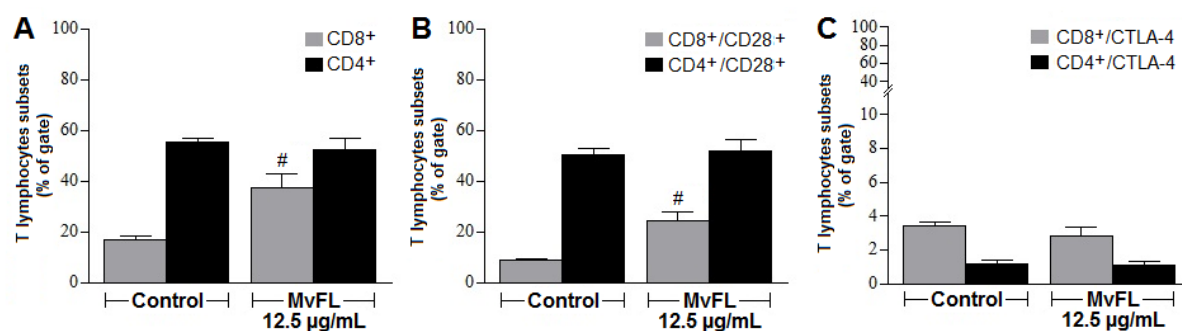


FIGURE 7- Evaluation of differentiation and activation of T cells in absence (control) and presence of MvFL during 24 h. (A) MvFL was able to stimulate the differentiation of T CD8⁺ subset in comparison with control (# indicates a p=0.02). (B) The labeling for cells expressing CD28 stimulatory protein revealed that MvFL was able to induce the activation T CD8⁺ cells in comparison with control (# indicates a p=0.02). (C) The expression of CTL4-A, a down-regulator of immune response, was not promoted by MvFL. Vertical bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate.

TABLE 1- Purification of *Microgramma vacciniifolia* frond lectin (MvFL) in basis of its hemagglutinating and trypsin inhibitor activities.

Sample	Protein (mg/mL)	Yield (%)	Hemmagglutinating activity (HA)			Trypsin inhibitor activity (TIA)		
			Units	Specific HA	Purification factor	Units	Specific TIA	Purification factor
Extract	1.33	100	4	3.0	1.0	2.32	174.3	1.0
P1	2.20	54.8	8	3.6	1.2	48.8	2,221.7	12.7
MvFL	0.20	7.5	2,048	10,240	3,413	6.72	3,360.1	19.2

Yield corresponded to the percentage of protein recovered in each step, starting the purification process with 2.66 mg of protein (2 mL of the extract). Specific HA corresponds to the ratio between the number of units and protein concentration (mg/mL). Specific TIA corresponds to the ratio between the number of units and the amount of protein (mg) in the assay. Purification factor was calculated by the ratio between the specific activity in the stage and the specific activity of the extract.

TABLE 2- Sequence similarities between peptides derived from trypsin digestion of MvFL and the sequence of a RNA-binding family protein isoform 2 from *Theobroma cacao* (EOY11515.1).

Peptide	Mass (Da)	Sequence	Position in RNA- binding protein chain
1	1345.80	MREVEDLFYK (Oxidation M)	19–28
2	1107.67	LRVELAHGGR	74–83
3	2240.28	VLVTGLPSSASWQDLKDHR	110–129
4	1066.65	SHSYSSRSR	210–218
5	1140.69	HSRQSPSVSR	230–239
6	1109.65	SVSPARSYSR	247–256
7	1494.88	SGSLRQSGDWMLGT	257–270

Polypeptide band of MvFL from PAGE for acidic proteins was used for analysis. The similarity score was 84 and the sequence coverage was 32%.

5 CONCLUSÕES

- ✓ MvFL, isolada com elevado fator de purificação, é uma glicoproteína termoestável, com pI 4,51 e massa molecular nativa de 54 kDa, sendo composta por 3 subunidades distintas. Sua capacidade de aglutinar células foi inibida somente por porções oligossacarídicas de glicoproteínas. Ainda, essa lectina apresentou atividade inibidora de tripsina e similaridades com a sequência de uma proteína ligadora de RNA de origem vegetal.
- ✓ MvFL apresentou baixa citotoxicidade para PBMCs, não sendo capaz de induzir apoptose nas concentrações testadas e causando pequeno aumento na porcentagem de células em necrose somente na concentração de 50 µg/mL.
- ✓ MvFL (12,5 µg/mL) apresentou efeito imunomodulador sobre PBMCs humanos, induzindo predominantemente repostas do tipo Th1, bem como a diferenciação e ativação de células T CD8⁺.
- ✓ Os resultados obtidos estimulam estudos futuros *in vivo* relacionados com a ação imunomoduladora de MvFL, como a avaliação de atividade antitumoral, por exemplo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 560, 2012.

AGRA, M. de F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008.

AL-MAMUN, M. A.; AKTER, Z.; UDDIN, M. J.; FERDAUS, K. M. K. B.; HOQUE, K. M. F.; FERDOUSI, Z.; REZA, M. A. Characterization and evaluation of antibacterial and antiproliferative activities of crude protein extracts isolated from the seed of *Ricinus communis* in Bangladesh. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 211–221, 2016.

AL ATALAH, B.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Oryzata, a jacalin-related lectin from rice, could protect plants against biting-chewing and piercing-sucking insects. **Plant Science**, v. 221–222, p. 21–28, 2014.

ALBUQUERQUE, L. P. de; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. de S.; SILVA, L. R. S.; AGUIAR, J. dos S.; COELHO, L. C. B. B.; REGO, M. J. B. de M.; PITTA, M. G. da R.; SILVA, T. G. da; MELO, A. M. M. de A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the Schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta Tropica**, v. 138, p. 23–27, 2014a.

ALBUQUERQUE, L. P. de; SÁ SANTANA, G. M.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. V.; PAIVA, P. M. G. Antifungal activity of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on genetically distinct *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Races. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1098–1105, 2014b.

ALBUQUERQUE, L. P. de; SANTANA, G. M. de S.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 75, p. 158–166, 2012.

AMBASTA, R. K.; JHA, S. K.; KUMAR, D.; SHARMA, R.; JHA, N. K.; KUMAR, P. Comparative study of anti-angiogenic activities of luteolin, lectin and lupeol

biomolecules. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, p. 307-316, 2015.

ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; NASCIMENTO, S. C.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 435–445, 2004.

ARAÚJO, L. C. C.; AGUIAR, J. S.; NAPOLEÃO, T. H.; MOTA, F. V. B.; BARROS, A. L. S.; MOURA, M. C.; CORIOLANO, M. C.; COELHO, L. C. B. B.; SILVA, T. G.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–15, 2013.

ARAÚJO, R. M. S.; VAZ, A. F. M.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G.; MELO, A. M. M.; SILVA, T. G.; CORREIA, M. T. S. Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammatory and analgesic activities. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 1, n. 2, p. 97–100, 2011.

ARUL, D.; SUBRAMANIAN, P. Naringenin (citrus flavonone) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Pathology Oncology Research**, v. 19, n. 4, p. 763–770, 2013.

ASARE, Y.; SCHMITT, M.; BERNHAGEN, J. The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF): Expression and effects in inflammation, atherogenesis and angiogenesis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 109, n. 3, p. 391–398, 2013.

ASSAF, A. M.; HADDADIN, R. N.; ALDOURI, N. A.; ALABBASSI, R.; MASHALLAH, S.; MOHAMMAD, M.; BUSTANJI, Y. Anti-cancer, anti-inflammatory and anti-microbial activities of plant extracts used against hematological tumors in traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 728–736, 2013.

AUDFRAY, A.; BELDJOUDE, M.; BREIMAN, A.; HURBIN, A.; BOOS, I.; UNVERZAGT, C.; BOURAS, M.; LANTUEJOL, S.; COLL, J. L.; VARROT, A.; LE PENDU, J.; BUSSE, B.; IMBERTY, A. A recombinant fungal lectin for labeling truncated glycans on human cancer cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–23, 2015.

BACHELERIE, F.; BEN-BARUCH, A.; BURKHARDT, A. M.; COMBADIÈRE, C.; FARBER, J. M.; GRAHAM, G. J.; HORUK, R.; SPARRE-ULRICH, A. H.; LOCATI, M.; LUSTER, A. D.; MANTOVANI, A.; MATSUSHIMA, K.; MURPHY,

P. M.; NIBBS, R.; NOMIYAMA, H.; POWER, C. a; PROUDFOOT, A. E. I.; ROSENKILDE, M. M.; ROT, A.; SOZZANI, S.; THELEN, M.; YOSHIE, O.; ZLOTNIK, A. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 1–79, 2014.

BARBOSA-LORENZI, V. C.; CECILIO, N. T.; DE ALMEIDA BURANELLO, P. A.; PRANCHEVICIUS, M. C.; GOLDMAN, M. H. S.; PEREIRA-DA-SILVA, G.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. Recombinant ArtinM activates mast cells. **BMC Immunology**, v. 17, n. 1, p. 22-32, 2016.

BATISTA, J.; RALPH, M.; VAZ, R.; SOUZA, P.; SILVA, A.; NASCIMENTO, D.; SOUZA, L.; RAMOS, M.; MASTROENI, P.; LIMA-FILHO, J. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, v. 25, p. 52–60, 2017.

BECKER, E.; ROBISSON, B.; CHAPPLE, C. E.; GUÉNOCHE, A.; BRUN, C. Multifunctional proteins revealed by overlapping clustering in protein interaction network. **Bioinformatics**, v. 28, n. 1, p. 84–90, 2012.

BELOVOLOVA, L. V; GLUSHKOV, M. V; VINOGRADOV, E. a. Effect of acetone and the probe 1-anilino-8-naphthalenesulfonate on water as estimated by fluorescence in the UV region. **Biofizika**, v. 56, n. 2, p. 197–204, 2011.

BERINSTEIN, N. L.; KARKADA, M.; OZA, A. M.; ODUNSI, K.; VILLELLA, J. A.; NEMUNAITIS, J. J.; MORSE, M. A.; PEJOVIC, T.; BENTLEY, J.; BUYSE, M.; NIGAM, R.; WEIR, G. M.; MACDONALD, L. D.; QUINTON, T.; RAJAGOPALAN, R.; SHARP, K.; PENWELL, A.; SAMMATUR, L.; BURZYKOWSKI, T.; STANFORD, M. M.; MANSOUR, M. Survivin-targeted immunotherapy drives robust polyfunctional T cell generation and differentiation in advanced ovarian cancer patients. **Oncoimmunology**, v. 4, n. 8, p. e1026529, 2015.

BERTAZZA, L.; MOCELLIN, S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. **Current medicinal chemistry**, v. 17, p. 3337–3352, 2010.

BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 669–677, 2007.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2291–2300, 2011.

BLÉRIOT, C.; LECUIT, M. The interplay between regulated necrosis and bacterial infection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 11–12, p. 2369–2378, 2016.

BONIFÁCIO, B. V.; DA SILVA, P. B.; APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, M.; MARIA SILVEIRA NEGRI, K.; MARIA BAUAB, T.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: A review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2013.

BOYMAN, O.; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 3, p. 180–190, 2012.

CAMPOS, J. K. L.; ARAÍJO, C. S. F.; ARAÚJO, T. F. S.; SANTOS, A. F. S.; TEIXEIRA, J. A.; LIMA, V. L. M.; COELHO, L. C. B. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, v. 2, p. 62–68, 2016.

CARMENATE, T.; PACIOS, A.; ENAMORADO, M.; MORENO, E.; GARCIA-MARTÍNEZ, K.; FUENTE, D.; LEÓN, K. Human IL-2 mutein with higher antitumor efficacy than wild type IL-2. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 12, p. 6230–6238, 2013.

CHAN, Y. S.; WONG, J. H.; FANG, E. F.; PAN, W.; NG, T. B. Isolation of a glucosamine binding leguminous lectin with mitogenic activity towards splenocytes and anti-proliferative activity towards tumor cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38961, 2012.

CHAN, Y. S.; ZHANG, Y.; NG, T. B. Brown kidney bean Bowman-Birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 4, p. 1306–1314, 2013.

CHAPLIN, D. D. Overview of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S3–S23, 2010.

CHAPPLE, C. E.; ROBISSON, B.; SPINELLI, L.; GUIEN, C.; BECKER, E.; BRUN, C. Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network. **Nature communications**, v. 6, n. May, p. 7412-7420, 2015.

CHEUNG, A. H. K.; WONG, J. H.; NG, T. B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**, v. 16, n. 6–7, p. 594–600, 2009.

CHOI, A. M. K.; RYTER, S. W.; LEVINE, B. Autophagy in Human Health and Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 7, p. 651–662, 2013.

CHOI, K. S. Autophagy and cancer. **Experimental and molecular medicine**, v. 44, n. 2, p. 109–120, 2012.

CHUANG, M. T.; LIN, Y. S.; HOU, W. C. Ancordin, the major rhizome protein of madeira-vine, with trypsin inhibitory and stimulatory activities in nitric oxide productions. **Peptides**, v. 28, n. 6, p. 1311–1316, 2007.

COELHO, L. C. B. B.; SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. Protein Purification by Affinity Chromatography. In: **Protein Purification**. InTech, p. 53–72, 2012.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S53–S72, 2010.

COSTA, E. C. B. da. **Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não estrutural 3 (ns3) do vírus da dengue do tipo 2**. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 153p, 2009.

COTA, A. M.; MIDWINTER, M. J. The immune system. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 16, n. 7, p. 353–355, 2015.

CROFT, M.; BENEDICT, C. A.; WARE, C. F. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 2, p. 147–168, 2013.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Medicinal Research Reviews**, v. 36,

n. 2, p. 221–247, 2016.

DANG, L.; VAN DAMME, E. J. M. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, v. 117, n. 1, p. 51–64, 2015.

DHAMA, K.; SAMINATHAN, M.; JACOB, S. S.; SINGH, M.; KARTHIK, K.; AMARPAL; TIWARI, R.; SUNKARA, L. T.; MALIK, Y. S.; SINGH, R. K. Effect of immunomodulation and immunomodulatory agents on health with some bioactive principles, modes of action and potent biomedical applications. **International Journal of Pharmacology**, v. 11, n. 4, p. 253–290, 2015.

DHUNA, V. Isolation, purification and characterization of an N-acetyl-D-lactosamine binding mitogenic and anti-proliferative lectin from tubers of a cobra lily *Arisaema utile* Schott. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 79–90, 2010.

DIAS-NETIPANYJ, M. F.; BOLDRINI-LEITE, L. M.; TRINDADE, E. S.; MORENO-AMARAL, A. N.; ELIFIO-ESPOSITO, S. Bjcul, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 118–124, 2016.

DIAS, R. O.; SANTOS MACHADO, L.; MIGLIOLO, L.; FRANCO, O. L. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519–541, 2015.

DÍAZ-RAMOS, À.; ROIG-BORRELLAS, A.; GARCÍA-MELERO, A.; LÓPEZ-ALEMANY, R. α -enolase, a multifunctional protein: Its role on pathophysiological situations. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

DINARELLO, C. a. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 1, p. S34–S45, 2007.

DITAMO, Y.; RUPIL, L. L.; SENDRA, V. G.; NORES, G. A.; ROTH, G. A.; IRAZOQUI, F. J. In vivo immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus*. **Food & function**, v. 7, n. 1, p. 262–269, 2016.

DOKKA, M. K.; KONALA, G.; DAVULURI, S. P. Hemagglutinating activity of trypsin inhibitors from seeds of *Albelmoschus moschatus* L. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 184–199, 2014.

DOMINGUEZ-VILLAR, M.; HAFLER, D. A. An Innate Role for IL-17. **Science**, v. 332, n. 6025, p. 47–48, 2011.

EL ENSHASY, H. A.; HATTI-KAUL, R. Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 12, p. 668–677, 2013.

FAN, W.; LIU, Q.; ZHU, X.; WU, Z.; LI, D.; HUANG, F.; HE, H. Regulatory effects of anesthetics on nitric oxide. **Life Sciences**, v. 151, p. 76–85, 2016.

FANG, E. F.; LIN, P.; WONG, J. H.; TSAO, S. W.; NG, T. B. A lectin with anti-HIV-1 reverse transcriptase, antitumor, and nitric oxide inducing activities from seeds of *Phaseolus vulgaris* cv. Extralong Autumn Purple Bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2221–2229, 2010a.

FANG, E. F.; NG, T. B. A Trypsin Inhibitor from Rambutan Seeds with Antitumor, Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase, and Nitric Oxide-Inducing Properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3828–3839, 2015.

FANG, E. F.; WONG, J. H.; BAH, C. S. F.; LIN, P.; TSAO, S. W.; NG, T. B. *Bauhinia variegata* var. *variegata* trypsin inhibitor: From isolation to potential medicinal applications. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 4, p. 806–811, 2010b.

FARIA, B. A; SILVA, S. M.; ABREU, M. T. C. L.; NAPIMOGA, M. H. Ação dos linfócitos T regulatórios em transplantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 309–315, 2008.

FEAR, G.; KOMARNYTSKY, S.; RASKIN, I. Protease inhibitors and their peptidomimetic derivatives as potential drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 354–368, 2007.

FERREIRA, F. R. B.; DA SILVA, P. M.; SOARES, T.; GONÇALVES MACHADO, L.; DE ARAÚJO, L. C. C.; DA SILVA, T. G.; DE MELLO, G. S. V.; GALDINO DA ROCHA PITTA, M.; DE MELO REGO, M. J. B.; PONTUAL, E. V.; ZINGALI, R. B.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiodora* sp. **Toxicon**, v. 122, p. 119–126, 2016.

FRANZ, S.; FREY, B.; SHERIFF, A.; GAIP, U. S.; BEER, A.; VOLL, R. E.; KALDEN, J. R.; HERRMANN, M. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. **Cytometry Part A**, v. 69, n. 4, p. 230–239, 2006.

FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 298–306, 2012.

GABIUS, H. J.; ANDRÉ, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; SOLÍS, D. From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n.6, p. 298-313, 2011.

GAINEY, M. D.; RIVENBARK, J. G.; CHO, H.; YANG, L.; YOKOYAMA, W. M. Viral MHC class I inhibition evades CD8+ T-cell effector responses in vivo but not CD8+ T-cell priming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 47, p. E3260-7, 2012.

GALLUZZI, L.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; ANDREWS, D. W.; BAEHRECKE, E. H.; BAZAN, N. G.; BLAGOSKLONNY, M. V.; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BREDESEN, D. E.; BRENNER, C.; CASTEDO, M.; CIDLOWSKI, J. A.; CIECHANOVER, A.; COHEN, G. M.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DESHMUKH, M.; DYNLACHT, B. D.; EL-DEIRY, W. S.; FLAVELL, R. A.; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOLSTEIN, P.; GOUGEON, M. L.; GREEN, D. R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HENGARTNER, M. O.; ICHIJO, H.; JAATTELA, M.; KEPP, O.; KIMCHI, A.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. A.; KORNBLUTH, S.; KUMAR, S.; LEVINE, B.; LIPTON, S. A.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALOMI, W.; MARINE, J. C.; MARTIN, S. J.; MEDEMA, J. P.; MEHLEN, P.; MELINO, G.; MOLL, U. M.; MORSELLI, E.; NAGATA, S.; NICHOLSON, D. W.; NICOTERA, P.; NUNEZ, G.; OREN, M.; PENNINGER, J.; PERVAIZ, S.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PREHN, J. H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. A.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; SCORRANO, L.; SIMON, H. U.; STELLER, H.; TSCHOPP, J.; TSUJIMOTO, Y.; VANDENABEELE, P.; VITALE, I.; VOUSDEN, K. H.; YOULE, R. J.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; KROEMER, G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 8, p. 1093–1107, 2009.

GALLUZZI, L.; PIETROCOLA, F.; LEVINE, B.; KROEMER, G. Metabolic control of autophagy. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1263-1276, 2014.

GAO, P. Introduction of the World Health Organization project of the International Classification of Traditional Medicine. **Journal of Chinese**

Integrative Medicine, v. 9, n. 11, p. 1161–1164, 2011.

GAO, W.; SUN, Y.; CHEN, S.; ZHANG, J.; KANG, J.; WANG, Y.; WANG, H.; XIA, G.; LIU, Q.; KANG, Y. Mushroom lectin enhanced immunogenicity of HBV DNA vaccine in C57BL/6 and HBsAg-transgenic mice. **Vaccine**, v. 31, n. 18, p. 2273–2280, 2013.

GARROD, K. R.; MOREAU, H. D.; GARCIA, Z.; LEMAÎTRE, F.; BOUVIER, I.; ALBERT, M. L.; BOUSSO, P. Dissecting T Cell Contraction In Vivo Using a Genetically Encoded Reporter of Apoptosis. **Cell Reports**, v. 2, n. 5, p. 1438–1447, 2012.

GAURNIER-HAUSSER, A.; ROTHMAN, V. L.; DIMITROV, S.; TUSZYNSKI, G. P. The Novel Angiogenic Inhibitor, Angiocidin, Induces Differentiation of Monocytes to Macrophages. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5905–5914, 2008.

GEETHANANDAN, K.; JOSEPH, A.; SADASIVAN, C.; HARIDAS, M. Carbohydrate binding and unfolding of *Spatholobus parviflorus* lectin: Fluorescence and circular dichroism spectroscopic study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, n. 1, p. 80–92, 2013.

GHOSH, S.; TAYLOR, A.; CHIN, M.; HUANG, H. R.; CONERY, A. R.; MERTZ, J. A.; SALMERON, A.; DAKLE, P. J.; MELE, D.; COTE, A.; JAYARAM, H.; SETSER, J. W.; POY, F.; HATZIVASSILIOU, G.; DEALMEIDA-NAGATA, D.; SANDY, P.; HATTON, C.; ROMERO, F. A.; CHIANG, E.; REIMER, T.; CRAWFORD, T.; PARDO, E.; WATSON, V. G.; TSUI, V.; COCHRAN, A. G.; ZAWADZKE, L.; HARMANGE, J. C.; AUDIA, J. E.; BRYANT, B. M.; CUMMINGS, R. T.; MAGNUSON, S. R.; GROGAN, J. L.; BELLON, S. F.; ALBRECHT, B. K.; SIMS, R. J.; LORA, J. M. Regulatory T cell modulation by CBP/EP300 bromodomain inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 25, p. 13014–13027, 2016.

GOMES, F. S.; PROCÓPIO, T. F.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 672–679, 2013.

GONÇALVES, R.; TERCEIRO, D.; PEIXOTO, G. M.; GOMES, V. S. Estrutura populacional de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel em um fragmento de Floresta Ombrófila Aberta no Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Biociências**, p. 5–12, 2012.

GOWDY, K. M.; MARTINU, T.; NUGENT, J. L.; MANZO, N. D.; ZHANG, H. L.; KELLY, F. L.; HOLTZMAN, M. J.; PALMER, S. M. Impaired CD8⁺ T cell immunity after allogeneic bone marrow transplantation leads to persistent and severe respiratory viral infection. **Transplant Immunology**, v. 32, n. 1, p. 51–60, 2015.

GREEN, D. R. . Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms. **Chicago Journals**, v. 87, n. 1, p. 20–21, 2011.

GUO, P.; WANG, Y.; ZHOU, X.; XIE, Y.; WU, H.; GAO, X. Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests. **Plant Science**, v. 211, p. 17–22, 2013.

GURJAÚ, E. De; FLORA, A.; PEREIRA, D. N.; CARNEIRO, I.; BARROS, L. Florística e distribuição geográfica das samambaias e licófitas da Reserva Ecológica de Gurjaú, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2011.

HAGEMANN, T.; LAWRENCE, T.; MCNEISH, I.; CHARLES, K. a; KULBE, H.; THOMPSON, R. G.; ROBINSON, S. C.; BALKWILL, F. R. “Re-educating” tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 6, p. 1261–1268, 2008.

HAMID, R.; MASOOD, A.; WANI, I. H.; RAFIQ, S. Lectins: Proteins with diverse applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 4, p. 93–103, 2013.

HAN, S.-Y.; HONG, C.-E.; KIM, H.-G.; LYU, S.-Y. Anti-cancer effects of enteric-coated polymers containing mistletoe lectin in murine melanoma cells in vitro and in vivo. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 408, n. 1, p. 14–16, 2015.

HANCOCK, R. E. W.; NIJNIK, A.; PHILPOTT, D. J. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 243–254, 2012.

HARTL, M.; GIRI, A. P.; KAUR, H.; BALDWIN, I. T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors: defense against herbivores and beyond. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 7, p. 1009–1011, 2011.

Hawe, A.; POOLE, R.; JISKOOT, W. Misconceptions over Förster resonance energy transfer between proteins and ANS/bis-ANS: Direct excitation dominates dye fluorescence. **Analytical Biochemistry**, v. 401, n. 1, p. 99–106, 2010.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000.

HIRAHARA, K.; POHOLEK, A.; VAHEDI, G.; LAURENCE, A.; KANNO, Y.; MILNER, J. D.; O'SHEA, J. J. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: Implications for immune-mediated disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 131, n. 5, p. 1276–1287, 2013.

IBRAHEEM, D.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Administration strategies for proteins and peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 578–589, 2014.

IORDACHE, F.; IONITA, M.; MITREA, L. I.; FAFANEATA, C.; POP, A. Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 152–161, 2015.

IZCUE, A.; COOMBES, J. L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 313–338, 2009.

JACKSON, S. R.; YUAN, J.; TEAGUE, R. M. Targeting CD8⁺ T-cell tolerance for cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 6, n. 7, p. 833–852, 2014.

JANTAN, I.; AHMAD, W.; BUKHARI, S. N. A. Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 8, p. 655–672, 2015.

KAECH, S. M.; CUI, W. Transcriptional control of effector and memory CD8⁺ T cell differentiation. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 11, p. 749–761, 2012.

KAKADE, M.; SIMONS, N.; LIENER, I. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, v. 46, p. 518–526, 1969.

KAPRAL, M.; WAWSZCZYK, J.; SOSNICKI, S.; WEGLARZ, L. Down-Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression By Inositol Hexaphosphate in Human Colon Cancer Cells. **Acta Pol Pharm**, v. 72, n. 4, p. 705–711, 2015.

KATRLÍK, J.; ŠVITEL, J.; GEMEINER, P.; KOŽÁR, T.; TKAC, J. Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 6, p. 394–41, 2010.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 2011.

KIM, D. K.; CHOI, H.; NISHIDA, H.; OH, J. Y.; GREGORY, C.; LEE, R. H.; YU, J. M.; WATANABE, J.; AN, S. Y.; BARTOSH, T. J.; PROCKOP, D. J. Scalable production of a multifunctional protein (TSG-6) that aggregates with itself and the CHO cells that synthesize it. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2016.

KIM, J. J.; HWANG, Y. H.; KANG, K. Y.; KIM, I.; KIM, J. B.; PARK, J. H.; YOO, Y. C.; YEE, S. T. Enhanced dendritic cell maturation by the B-chain of Korean mistletoe lectin (KML-B), a novel TLR4 agonist. **International Immunopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 309–319, 2014.

KIM, J. Y.; PARK, S. C.; HWANG, I.; CHEONG, H.; NAH, J. W.; HAHM, K. S.; PARK, Y. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2860–2872, 2009.

KIRSCHNER, K.; BISSWANGER, H. Multifunctional proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 45, n. 2, p. 143–166, 1976.

KITAGAKI, J.; YANG, Y.; SAAVEDRA, J. E.; COLBURN, N. H.; KEEFER, L. K.; PERANTONI, A. O. Nitric oxide prodrug JS-K inhibits ubiquitin E1 and kills tumor cells retaining wild-type p53. **Oncogene**, v. 28, n. 4, p. 619–624, 2009.

KLOMKLAO, S.; BENJAKUL, S.; KISHIMURA, H.; CHAIJAN, M. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from *Thai mung* bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1348–1354, 2011.

KRIFA, M.; BOUHLEL, I.; GHEDIRA-CHEKIR, L.; GHEDIRA, K. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 1,

p. 243–249, 2013.

LACERDA, R. R.; NASCIMENTO, E. S.; LACERDA, J. T. J. G.; PINTO, L. S.; RIZZI, C.; BEZERRA, M. M.; PINTO, I. R.; FILHO, S. M. P.; PINTO, V. P. T.; FILHO, C. G.; GADELHA, A. A. C.; SANTI GADELHA, T. Lectin from seeds of a *Brazilian lima* bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1072–1081, 2016.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Front Plant Sci**, v. 5, p. 397–413, 2014.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Nucleocytoplasmic plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1800, n. 2, p. 190–201, 2010.

LAROUX, F. S.; BHARWANI, S.; PAVLICK, K. P.; HOFFMAN, J. M.; GRISHAM, M. B.; HINES, I. N.; KAWACHI, S.; HARADA, H. Role of nitric oxide in inflammation. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 173, n. 1, p. 113–118, 2001.

LEE, S.; KIM, H.-S.; LEE, H.-J.; LEE, J.; JEON, B.; JUN, C.; LEE, S.; KIM, E. Dual effect of nitric oxide in immortalized and malignant human oral keratinocytes: induction of apoptosis and differentiation. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 35, n. 6, p. 352–360, 2006.

LI, C.; MENG, L.; LIU, B.; BAO, J. *Galanthus nivalis* Agglutinin (GNA)-Related Lectins: Traditional Proteins, Burgeoning Drugs? **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 3, p. 323–333, 2009.

LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; JIANG, J. H.; ZHAO, X. J.; DU, L. F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: Isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 4, p. 653–658, 2007.

LIAO, W.; LIN, J.-X.; WANG, L.; LI, P.; LEONARD, W. J. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. **Nature immunology**, v. 12, n. 6, p. 551–9, 2011.

LICHTENSTEIN, R. G.; RABINOVICH, G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate. **Cell Death. Differ**, v. 20, n. 8, 2013.

LIMA, T. A.; FERNANDES, K. M.; OLIVEIRA, A. P. S.; DORNELLES, L. P.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. Termiticidal lectins from *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae) cause midgut damage when ingested by *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae) workers. **Pest Management Science**, p. 1-8, 2016.

LO FARO, M. L.; FOX, B.; WHATMORE, J. L.; WINYARD, P. G.; WHITEMAN, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 41, p. 38–47, 2014.

LORD, M. J.; JOLLIFFE, N. A.; MARSDEN, C. J.; PATEMAN, C. S. C.; SMITH, D. C.; SPOONER, R. A.; WATSON, P. D.; ROBERTS, L. M. Ricin. **Toxicological Reviews**, v. 22, n. 1, p. 53–64, 2003.

LOURENÇO, J. D.; NEVES, L. P.; OLIVO, C. R.; DURAN, A.; ALMEIDA, F. M.; ARANTES, P. M. M.; PRADO, C. M.; LEICK, E. A.; TANAKA, A. S.; MARTINS, M. A.; SASAKI, S. D.; LOPES, F. D. T. Q. S. A treatment with a protease inhibitor recombinant from the cattle tick (*Rhipicephalus Boophilus microplus*) ameliorates emphysema in mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98216, 2014.

LYU, S.-Y.; KWON, Y.-J.; JOO, H.-J.; PARK, W.-B. Preparation of alginate/chitosan microcapsules and enteric coated granules of mistletoe lectin. **Archives of pharmacal research**, v. 27, n. 1, p. 118–126, 2004.

MAAG, D.; ERB, M.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Defensive weapons and defense signals in plants: Some metabolites serve both roles. **BioEssays**, v. 37, n. 2, p. 167-174, 2015.

MACEDO, M. L. R.; OLIVEIRA, C. F. R.; OLIVEIRA, C. T. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2014–2033, 2015.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; DA SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. das G. as M.; PARRA, J. R. P. Adenanthera pavonina trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 4, p. 213–231, 2010.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. das G. M.; DA SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and

Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486–498, 2007.

MAHIMA; RAHAL, A.; DEB, R.; LATHEEF, S. K.; SAMAD, H. A.; TIWARI, R.; VERMA, A. K.; KUMAR, A.; DHAMA, K. Immunomodulatory and therapeutic potentials of herbal, traditional/indigenous and ethnoveterinary medicines. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 16, p. 754–774, 2012.

MAJOR, I. T.; CONSTABEL, C. P. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. **Plant physiology**, v. 146, n. 3, p. 888–903, 2008.

MAJUMDAR, D. D. Recent updates on pharmaceutical potential of plant protease inhibitors. **International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 101–120, 2013.

MANDAL, S.; KUNDU, P.; ROY, B.; MANDAL, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. Characterization, post-translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistant plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37161–37168, 2002.

MARINKOVIĆ, E.; LUKIĆ, I.; KOSANOVIĆ, D.; INIĆ-KANADA, A.; GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M. Recombinantly produced banana lectin isoform promotes balanced pro-inflammatory response in the colon. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 68–78, 2016.

MATIĆ, I. Z.; ALJANČIĆ, I.; ŽIŽAK, Ž.; VAJS, V.; JADRANIN, M.; MILOSAVLJEVIĆ, S.; JURANIĆ, Z. D. In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, p. 36-47, 2013.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.

MELO, C. M. L.; MELO, H.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B.; PEREIRA, V. R. A. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 2, p. 112–121, 2011.

MELO, C. M. L. de; DE CASTRO, M. C. A. B.; DE OLIVEIRA, A. P.; GOMES, F. O. S.; PEREIRA, V. R. A.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 11, p. 1631–1636, 2010.

MESQUITA, J. X. **Caracterização estrutural e atividade hipoglicemiante da lectina da alga vermelha *Amansia multifida* C.Lamourox**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 67p, 2010.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 122, n. 4, p. 143–59, 2012.

MILLER, J. F. A. P. Events that led to the discovery of T-cell development and function - A personal recollection. **Tissue Antigens**, v. 63, n. 6, p. 509–517, 2004.

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: Chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 431–450, 2012.

MIZUSHIMA, N. Autophagy in protein and organelle turnover. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 76, p. 397–402, 2011.

MOELLER, E. H.; JORGENSEN, L. Alternative routes of administration for systemic delivery of protein pharmaceuticals. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 5, n.2-3, 2009.

MOHSENZADEGAN, M.; FAYAZI, M. R.; ABDOLMALEKI, M.; BAKHSHAYESH, M.; SEIF, F.; MOUSAVIZADEH, K. Direct immunomodulatory influence of IFN-beta on human astrocytoma cells. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 37, n. 2, p. 214–219, 2015.

MORISHITA, M.; PEPPAS, N. A. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery?. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 19-20, p. 905-910, 2006.

MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; CORIOLANO, M. C.; PAIVA, P. M. G.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; COELHO, L. C. B. B. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and

pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 666–676, 2015.

MUSTAPHA, N.; MOKDAD-BZÉOUICH, I.; SASSI, A.; ABED, B.; GHEDIRA, K.; HENNEBELLE, T.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Immunomodulatory potencies of isolated compounds from *Crataegus azarolus* through their antioxidant activities. **Tumor Biology**, v. 37, n. 6, p. 7967–7980, 2016.

NAPOLEÃO, T. H.; GOMES, F. S.; LIMA, T. A.; SANTOS, N. D. L.; S??, R. A.; ALBUQUERQUE, A. C.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 1, p. 52–59, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios De Bioquímica De Lehninger**. Nova York, 1273p, 2011.

NÓBREGA, R. B.; ROCHA, B. A. M.; GADELHA, C. A. A.; SANTI-GADELHA, T.; PIRES, A. F.; ASSREUY, A. M. S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; DELATORRE, P. Structure of *Dioclea virgata* lectin: Relations between carbohydrate binding site and nitric oxide production. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 900–906, 2012.

NUNES, N. N. S.; FERREIRA, R. S.; SILVA-LUCCA, R. a.; DE SÁ, L. F. R.; DE OLIVEIRA, A. E. a.; CORREIA, M. T. D. S.; PAIVA, P. M. G.; WLODAWER, A.; OLIVA, M. L. V. Potential of the Lectin/Inhibitor Isolated from *Crataeva tapia* Bark (CrataBL) for Controlling *Callosobruchus maculatus* Larva Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 48, p. 10431–10436, 2015.

ODEI-ADDO, F.; FROST, C.; SMITH, N.; OGAWA, T.; MURAMOTO, K.; OLIVA, M. L. V.; GRÁF, L.; NAUDE, R. Biochemical characterization of *Acacia schweinfurthii* serine proteinase inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 187–199, 2013.

OLIVEIRA, C. F. R.; MOURA, M. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MACEDO, M. L. R. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, doi: 10.1016/j.pestbp.2017.01.006, 2017.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K.

Programmed cell death pathways in cancer: A review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487–498, 2012.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. IY29CH04-Ouyang Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. **Annual Review in Immunology**, v. 29, p. 71–109, 2011.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 590-601, 2014.

PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; CORREIA, M. T. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B. Plant compounds with *Aedes Aegypti* larvicidal activity and other biological properties. **Bioprocess Sciences and Technology**, p. 271–296, 2011.

PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. **Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae**. first ed, Nova Science Publishers Inc , Nova York, 52p, 2013.

PARRISH, A. B.; FREEL, C. D.; KORNBLUTH, S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 6, p. a008672, 2013.

PATRIOTA, L. L. S.; PROCÓPIO, T. F.; DE SOUZA, M. F. D.; DE OLIVEIRA, A. P. S.; CARVALHO, L. V. N.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M.; PAIVA, P. M. G.; PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H. A trypsin inhibitor from *Tecoma stans* leaves inhibits growth and promotes ATP depletion and lipid peroxidation in *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–10, 2016.

PAUL, W. E.; ZHU, J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified? **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 4, p. 225–235, 2010.

PERES, M. T. L. P.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; BONANI, V. F. L.; CANDIDO, A. C. S.; CASTELLI, C.; POPPI, N. R.; HONDA, N. K.; CARDOSO E, C. A. L.; FACCENDA, O. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (langsd. & fisch.) copel (polypodiaceae). **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, p. 897–901, 2009.

PEUMANS, W. J.; PROOST, P.; SWENNEN, R. L.; VAN DAMME, E. J. M. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1063–1072, 2002.

PONTUAL, E. V. **Inibidor de tripsina de flores de *Moringa oleifera*: investigação de atividades inseticidas, antifúngicas e tripanocida**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 156p, 2012.

PONTUAL, E. V.; NAPOLEÃO, T. H.; DIAS DE ASSIS, C. R.; DE SOUZA BEZERRA, R.; XAVIER, H. S.; NAVARRO, D. M. do A. F.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Effect of *Moringa oleifera* flower extract on larval trypsin and acetylcholinesterase activities in *aedes aegypti*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, n. 3, p. 135–152, 2012.

PRADO, J.; HIRAI, R. Y.; SCHWARTSBURD, P. B. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. **Hoehnea**, v. 37, n. 3, p. 445–460, 2010.

PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, n. 1, p. 80–88, 2010.

PRASANNA, V. K.; VENKATESH, Y. P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 304–313, 2015.

PROCÓPIO, T. F. **Purificação, caracterização e avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de *Calliandra surinamensis* Benth. (FABACEAE)**. Exame de Qualificação (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 87p, 2016.

RAMANI, T.; AULETTA, C. S.; WEINSTOCK, D.; MOUNHO-ZAMORA, B.; RYAN, P. C.; SALCEDO, T. W.; BANNISH, G. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. **International Journal of Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 355–365, 2015.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SHEPHERD, I.; LOPES,

R. O. D. M.; SAMPAIO, A. H. Carbohydrate/glycan-binding specificity of legume lectins in respect to their proposed biological functions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, p. 1–11, 2000.

RAO, C. V.; GUPTA, P. K.; ARTI, R. a J. V.; VIJAYAKUMAR, M. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Fumaria\rindica* whole plant extract in experimental animals. **Acta Pharm.**, v. 57, p. 491–498, 2007.

REILLY, E. C.; THOMPSON, E. A.; ASPESLAGH, S.; WANDS, J. R.; ELEWAUT, D.; BROSSAY, L. Activated iNKT cells promote memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37991, 2012.

SALANGA, C. L.; HANDEL, T. M. Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: The role of structural dynamics in function. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 5, p. 590–601, 2011.

SANSONE, A. C. M. B.; SANSONE, M.; DOS SANTOS DIAS, C. T.; OLIVEIRA DO NASCIMENTO, J. R.; CLAUDIA, A.; BRITO, M.; SANSONE, M.; TADEU, C.; ROBERTO, J. Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 19–24, 2016.

SANTANA, G. M.; ALBUQUERQUE, L. P.; NAPOLEÃO, T. H.; SOUZA, S. R.; COELHO, L. C. B. B.; PAIVA, P. M. G. Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 56–60, 2012.

SANTOS, A. F. S.; NAPOLEÃO, T. H.; BEZERRA, R. F.; CARVALHO, E. V. M. M.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. In: **Advances in Medicine and Biology**. Nova Science Publishers, Inc., 63p. 34–60, 2013.

SANTOS, M. G.; SYLVESTRE, L. D. S. Aspectos florísticos e econômicos das pteridófitas de um afloramento rochoso do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 115–124, 2006.

SANTOS, P. B. Dos; ZANETTI, J. S.; VIEIRA-DE-MELLO, G. S.; RÊGO, M. B. M.; ALFREDO RIBEIRO-SILVA, A.; BELTRÃO, E. I. C. Lectin histochemistry reveals SNA as a prognostic carbohydrate-dependent probe for invasive ductal carcinoma of the breast: A clinicopathological and immunohistochemical auxiliary tool. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 5, p. 2337–2349, 2014.

SATO, Y.; MORIMOTO, K.; KUBO, T.; YANAGIHARA, K.; SEYAMA, T. High Mannose-Binding Antiviral Lectin PFL from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 Promotes Cell Death of Gastric Cancer Cell MKN28 via Interaction with $\alpha 2$ -Integrin. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45922, 2012.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011.

SHAH, K.; LEE, W.-W.; LEE, S.-H.; KIM, S. H.; KANG, S. W.; CRAFT, J.; KANG, I. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, n. 12, p. 1–10, 2010.

SHI, Z.; AN, N.; ZHAO, S.; LI, X.; BAO, J. K.; YUE, B. S. In silico analysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 1, p. 86–96, 2013.

SHI, Z.; CHEN, J.; LI, C.; AN, N.; WANG, Z.; YANG, S.; HUANG, K.; BAO, J. Antitumor effects of Concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 248–256, 2014.

SHIBUTANI, S. T.; SAITOH, T.; NOWAG, H.; MUNZ, C.; YOSHIMORI, T. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. **Nat Immunol**, v. 16, n. 10, p. 1014–1024, 2015.

SILVA, P. M.; NAPOLEÃO, T. H.; SILVA, L. C. P. B. B.; FORTES, D. T. O.; LIMA, T. A.; ZINGALI, R. B.; PONTUAL, E. V.; ARAÚJO, J. M.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, C. G.; GOMES, F. S.; PAIVA, P. M. G. The juicy sarcotesta of *Punica granatum* contains a lectin that affects growth, survival as well as adherence and invasive capacities of human pathogenic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 695–702, 2016a.

SILVA, P. M. S.; LIMA, A. L. R.; SILVA, B. V. M.; COELHO, L. C. B. B.; DUTRA, R. F.; CORREIA, M. T. S. Biosensors and Bioelectronics *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 85, p. 171–177, 2016b.

SINGH, A.; DILNAWAZ, F.; SAHOO, S. K. Long circulating lectin conjugated

paclitaxel loaded magnetic nanoparticles: A new theranostic avenue for leukemia therapy. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e26803, 2011.

SINGH, R.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; SURESH, C. G. Two Chitotriose-Specific Lectins Show Anti- Angiogenesis , Induces Caspase-9-Mediated Apoptosis and Early Arrest of Pancreatic Tumor Cell Cycle. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146110, 2016.

SINGH, R. S.; KAUR, H. P.; SINGH, J. Purification and characterization of a mycelial mucin specific lectin from *Aspergillus panamensis* with potent mitogenic and antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 12, p. 2251–2258, 2015.

SINGH, R. S.; KAUR, P. H.; RANA, V.; KENNEDY, J. F. Immunomodulatory and therapeutic potential of a mucin-specific mycelial lectin from *Aspergillus panamensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 241–248, 2017.

ŠLECHTOVÁ, T.; GILAR, M.; KALÍKOVÁ, K.; TESAŘOVÁ, E. Insight into Trypsin Miscleavage: Comparison of Kinetic Constants of Problematic Peptide Sequences. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 15, p. 7636–7643, 2015.

SMIGIEL, K. S.; SRIVASTAVA, S.; STOLLEY, J. M.; CAMPBELL, D. J. Regulatory T-cell homeostasis: steady-state maintenance and modulation during inflammation. **Immunological Reviews**, v. 259, n. 1, p. 40–59, 2014.

SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxon**, v. 55, n. 3, p. 705–731, 2006.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell Online**, v. 11, n. 3, p. 431–443, 1999.

SOUZA, M. A.; CARVALHO, F. C.; RUAS, L. P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 30, n. 7, p. 641–657, 2013.

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on

Cancer Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 470-488, 2016.

STENKEN, J. A.; POSCHENRIEDER, A. J. Bioanalytical chemistry of cytokines - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, n. 1, p. 95–115, 2015.

STOJANOVIĆ, M. M.; ŽIVKOVIĆ, I. P.; PETRUŠIĆ, V. Ž.; KOSEC, D. J.; DIMITRIJEVIĆ, R. D.; JANKOV, R. M.; DIMITRIJEVIĆ, L. A.; GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ, M. D. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 120–129, 2010.

SUMANTRAN, V. N. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview. In: **Methods**. v. 731, p. 219–236, 2011.

SUNG, N.; BYUN, E.; SONG, D.; JIN, Y.; KIM, J.; PARK, J.; SONG, B.; JUNG, P.; BYUN, M.; LEE, J.; PARK, S.; KIM, J. Effect of gamma irradiation on mistletoe (*Viscum album*) lectin-mediated toxicity and immunomodulatory activity. **FEBS Open Bio**, v. 3, p. 106–111, 2013.

TAIT, S. W. G.; ICHIM, G.; GREEN, D. R. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 10, p. 2135–2144, 2014.

TAKANASHI, K.; SHITAN, N.; YAZAKI, K. The multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family in plants. **Plant Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 417–430, 2014.

TANIGUCHI, M.; OCHIAI, A.; TAKAHASHI, K.; NAKAMICHI, S. ichi; NOMOTO, T.; SAITOH, E.; KATO, T.; TANAKA, T. Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic helical octadecapeptide derived from amylase of rice. **Biopolymers**, v. 104, n. 2, p. 73–83, 2015.

TATENO, H.; ONUMA, Y.; ITO, Y.; MINOSHIMA, F.; SAITO, S.; SHIMIZU, M.; AIKI, Y.; ASASHIMA, M.; HIRABAYASHI, J. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 5, p. 811–820, 2015.

TATENO, H.; WINTER, H. C.; PETRYNIAK, J.; GOLDSTEIN, I. J. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of novel members of jacalin-related lectins from rhizomes of the true fern *Phlebodium aureum* (L) J.

Smith (polypodiaceae). **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 13, p. 10891–10899, 2003.

TATSUTA, T.; HOSONO, M.; SUGAWARA, S.; KARIYA, Y.; OGAWA, Y.; HAKOMORI, S.; NITTA, K. Sialic acid-binding lectin (lecyzme) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 5, p. 1402–1412, 2013.

TSOI, A. Y. K.; NG, T. B.; FONG, W. P. Immunomodulatory activity of a chymotrypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis* seeds. **Journal of Peptide Science**, v. 12, n. 9, p. 605–611, 2006.

VAINAUSKAS, S.; DUKE, R. M.; MCFARLAND, J.; MCCLUNG, C.; RUSE, C.; TARON, C. H. Profiling of core fucosylated N-glycans using a novel bacterial lectin that specifically recognizes α 1,6 fucosylated chitobiose. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34195-34207, 2016.

VALLI, M.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, Â. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; DA SILVA BOLZANI, V. Tropical biodiversity: Has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Quimica Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278–2287, 2012.

VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. Perforin and granzymes : function , dysfunction and human pathology. **Nature Publishing Group**, v. 15, n. 6, p. 388–400, 2015.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death.Differ.**, v. 10, n. 1350–9047, p. 45–65, 2003.

WALLACH, D.; KANG, T.-B.; KOVALENKO, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 1, p. 51–59, 2014.

WANG, X. W.; ZHAO, X. F.; WANG, J. X. C-type lectin binds to integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 4, p. 2405–2414, 2014.

WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **The international journal of biochemistry & cell**

biology, v. 38, n. 2, p. 234–243, 2006.

WU, J.; WANG, J.; WANG, S.; RAO, P. Lunatin , a novel lectin with antifungal and antiproliferative bioactivities from *Phaseolus lunatus* billb. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, n. 2, p. 717–724, 2016.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C. C. W.; NG, T. B. Lectins with potential for anti-cancer therapy. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 3, p. 3791–810, 2015.

ZERNECKE, A.; WEBER, C. Chemokines in atherosclerosis: Proceedings resumed. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 4, p. 742–750, 2014.

ZHANG, Z.; HE, L.; HU, S.; WANG, Y.; LAI, Q.; YANG, P.; YU, Q.; ZHANG, S.; XIONG, F.; SIMSEKYILMAZ, S.; NING, Q.; LI, J.; ZHANG, D.; ZHANG, H.; XIANG, X.; ZHOU, Z.; SUN, H.; WANG, C. Y. AAL exacerbates pro-inflammatory response in macrophages by regulating mincle/Syk/Card9 signaling along with the Nlrp3 inflammasome assembly. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 10, p. 1812–1825, 2015.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 233–52, 2015.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations *. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.