

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

MAXMILIANA FERNANDA ALVES MARIANO SOARES DE FARIAS

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE
UMA LECTINA DA SEMENTE DE CASTANHA-DA-ÍNDIA
(*Aesculus hippocastanum* L.)

RECIFE

2020

MAXMILIANA FERNANDA ALVES MARIANO SOARES DE FARIAS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE
UMA LECTINA DA SEMENTE DE CASTANHA –DA-ÍNDIA (*Aesculus
hippocastanum* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Dra. Nataly Diniz de Lima Santos

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Farias, Maxmiliana Fernanda Alves Mariano Soares de
Purificação, caracterização e atividade imunomoduladora de uma lectina da semente da Castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.) / Maxmiliana Fernanda Alves Mariano Soares de Farias – 2020.

77 f.: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão
Coorientador: Nataly Diniz de Lima Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, 2020.
Inclui referências

1. Lectina 2. Toxicidade-testes 3. Matéria médica vegetal I. Napoleão, Thiago Henrique (orient.) II. Santos, Nataly Diniz de Lima (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-035

MAXMILIANA FERNANDA ALVES MARIANO SOARES DE FARIAS

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE
UMA LECTINA DA SEMENTE DE CASTANHA-DA-ÍNDIA (*Aesculus
Hippocastanum* L.)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva (Membro Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual (Membro Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque (Membro Externo)
Universidade Federal do Piauí

Data: 30 / 06 / 2020

Dedico este trabalho ao meu melhor amigo, aquele que chamo de pai e de Deus. Ele me deu tudo que precisava para ser feliz: pais dedicados, filhas carinhosas, esposo compreensivo, amigos que são verdadeiramente irmãos e nunca me julgou pelos meus erros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus de todo coração por ter colocado em minha vida tantas graças e bênçãos: as pessoas ao meu redor, tanto familiares quanto parceiros de trabalho e amigos que foram de vital importância em cada fase da minha vida.

Existem momentos que pensamos e repensamos tudo que passamos, se teríamos feito diferente... esses momentos são cruciais para formação do caráter ético e moral de uma pessoa como profissional. Por isso, preciso agradecer aos meus colegas de trabalho que sempre estiveram dispostos a me ajudar, apoiar e aconselhar. A família BIOPROT, Thamara, Thâmarah, Suéllen, Natália, Carlos, Robson, Lívia, Dayvid, Poliana, Pollyanna, Amanda, Jessica, Jainaldo, Caio, entre outros, meu muito obrigada.

Ao meu orientador, o professor Thiago Henrique, muito obrigada por tudo, primeiramente pela oportunidade. Agradeço por todas as pequenas lições de simplicidade, paciência, empatia, dedicação, entre outras, as quais não consigo enumerar, mas que me fizeram entender o verdadeiro trabalho de um professor pesquisador que é: compartilhar conhecimento, compartilhar amor pelo trabalho, pela descoberta e pela vida.

À minha coorientadora, doutora Nataly Diniz, pela sua preocupação comigo nos momentos difíceis, pela sua compreensão, empatia e amizade, muito obrigada. Admiro a pessoa, a mãe, a profissional e a amiga que você é. Espero um dia conseguir assimilar todas as lições, profissionais e pessoais que obtive de você e de Thiago e também poder repassá-las.

Às pessoas que colaboraram com este estudo, em especial Leyde e Ana Patrícia, por me ensinarem com paciência e dedicação tudo que sabiam e por me ajudarem na realização desse trabalho contribuindo não só com o estudo, mas também com meu crescimento científico, acadêmico, pessoal e profissional. Por tudo, meu muito obrigada. E ainda, a todos os funcionários desta grande casa que é a UFPE, por sempre proporcionarem um ambiente com as melhores condições possíveis de ensino, pesquisa e educação, meus agradecimentos.

À minha família, pela paciência, pela força, pelo amor e pela vida que me proporcionaram, muito obrigada. Sem vocês não saberia buscar os dons os quais me indetifico, como o da sabedoria, o da ciência, o do conselho, o da fortaleza e o da piedade.

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.

“Porque o Senhor dá sabedoria, e da sua boca
vem o conhecimento e o entendimento.”

Provérbios 2:6

RESUMO

A busca por agentes biológicos com capacidade imunomoduladora visa fornecer resposta terapêutica para diversas doenças. Nesse contexto, as lectinas (proteínas que se ligam a carboidratos) apresentam elevado potencial imunomodulador, devido a sua capacidade de modular células imunológicas através da interação com proteínas de superfície gerando uma cascata de sinalização. A *Aesculus hippocastanum*, conhecida como castanheira-da-índia, é comumente utilizada para produção de fitoterápicos com atividades anti-inflamatória e vasoprotetora. O objetivo desse trabalho foi purificar e caracterizar uma lectina das sementes de *A. hippocastanum* (AhSL) e avaliar a sua citotoxicidade e efeito imunomodulador sobre esplenócitos de camundongo. A farinha das sementes foi submetida à extração (10%, p/v) de proteínas em NaCl 0,15 M e o extrato foi submetido à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. As proteínas adsorvidas foram eluídas com o mesmo tampão, porém contendo NaCl 1,0 M, dialisadas e avaliadas quanto às atividades hemaglutinante (AH) e inibidora de tripsina (AIT). Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi realizada para avaliar a homogeneidade e a composição em subunidades de AhSL. A especificidade de ligação a carboidratos, o efeito de cátions divalentes na AH e a estabilidade da AH frente ao aquecimento (30–100°C) e após incubação em diferentes valores de pH (1,0–9,0) também foram avaliadas. Análises fluorimétricas também foram realizadas. Os esplenócitos de camundongo BALB/c foram tratados com AhSL (3,12–50,00 µg/mL) e foi avaliada a ocorrência de apoptose e/ou necrose. A atividade imunomoduladora de AhSL (12,5 µg/mL) foi avaliada através da determinação dos níveis de citocinas e óxido nítrico (NO). AhSL (fator de purificação: 68,8) mostrou uma única banda polipeptídica em PAGE para proteínas ácidas e duas bandas polipeptídicas de aproximadamente 68 e 124 kDa em SDS-PAGE. Sua AH foi inibida por monossacarídeos, dissacarídeos e glicoproteínas, principalmente o ácido n-acetilneuroamínico. A AH foi estável após o aquecimento em todas as temperaturas e incubação na faixa de pH 4,0–8,0 e sua atividade específica não foi alterada por nenhum cátion testado. Análise fluorimétrica revelou que a conformação da lectina não foi alterada após aquecimento a 100 °C e incubação em diferentes valores de pH. AhSL também mostrou AIT específica de 1.280,31 U/mg. A lectina não foi tóxica para os esplenócitos e induziu a liberação de interleucinas 10 e 6, fator de

necrose tumoral α e óxido nítrico, por fim a lectina não induziu despolarização de membrana mitocondrial e não aumentou os níveis de EROs citosólica ou mitocondrial. Em conclusão, uma proteína multifuncional (com atividades lectínica, inibidora de tripsina e imunomoduladora) foi purificada a partir de sementes de *A. hippocastamum*.

Palavras-chave: Castanheira-da-índia. Lectina. Inibidor de tripsina. Citotoxicidade. Atividade imunomoduladora.

ABSTRACT

The search for biological agents with immunomodulatory aims to provide therapeutic response to various diseases. In this context, lectins (proteins that bind to carbohydrates) have high immunomodulatory potential, due to their ability to modulate immune cells through interaction with surface proteins, generating a signaling cascade. *Aesculus hippocastanum*, known as horse chestnut, is commonly used to produce herbal medicines with anti-inflammatory and vasoprotective activities. The objective of this work was to purify and characterize a lectin from *A. hippocastanum* seeds (AhSL) and to evaluate its cytotoxicity and immunomodulatory effect on mouse splenocytes. The seed meal was subjected to extraction (10%, w/v) of proteins in 0.15 M NaCl and the extract was subjected to DEAE-Sephadex column chromatography equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0. The adsorbed proteins were eluted with the same buffer, but containing 1.0 M NaCl, dialyzed and evaluated for hemagglutinating (HA) and trypsin inhibitor (TIA) activities. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed to assess homogeneity and subunit composition in AhSL. The specificity of binding to carbohydrates, the effect of divalent cations on HA and the stability of HA toward heating (30–100 °C) and after incubation at different pH values (1.0–9.0) were also evaluated. Fluorometric analyses were also performed. BALB/c mouse splenocytes were treated with AhSL (3.12–50.00 µg/mL) and the occurrence of apoptosis and/or necrosis was evaluated. The immunomodulatory activity of AhSL (12.5 µg/mL) was assessed by determining the levels of cytokines and nitric oxide (NO). AhSL (purification factor: 68.8) showed a single polypeptide band in PAGE for acidic proteins and two polypeptide bands of approximately 68 and 124 kDa in SDS-PAGE. Its HA was inhibited by monosaccharides, disaccharides and glycoproteins, mainly *N*-acetylneuraminic acid. The HA was stable after heating at all temperatures and incubation in the pH range 4.0–8.0 and its specific activity was not altered by any cation tested. Fluorometric analysis revealed that the lectin conformation was not altered after heating to 100 °C and incubation at different pH values. AhSL also showed a specific TIA of 1,280.31 U/mg. Lectin was not toxic to splenocytes and induced the release of interleukins 10 and 6, tumor necrosis factor α and nitric oxide. Finally, lectin did not induce mitochondrial membrane depolarization and did not increase the levels of cytosolic or mitochondrial ROS. In conclusion, a multifunctional protein

(with lectin, trypsin inhibitor and immunomodulatory activities) was purified from *A. hippocastamum* seeds.

Keywords: Indian chestnut. Lectin. Trypsin inhibitor. Cytokines. Thermostable protein.

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 – Método de detecção de lectinas. (A)Atividade hemaglutinante. (B) Inibição de carboidratos	21
Figura 2 – Grupos de lectinas segundo a estrutura de seus domínios.	22
Figura 3 – Métodos cromatográficos.	25
Figura 4 – Formação das lectinas através do sistema de defesa das plantas e sua ação no reconhecimento celular, sinalização e opsonização de patógenos.	29
Figura 5 – Processo de apoptose e necrose.	36
Figura 6 – <i>Aesculus hippocastanum</i> . (A) Aspecto geral. (B) Folhas. (C) Inflorescência. (D) Frutos. (E) Sementes. (F) Flor. (G) Haste.	37
Figura 7 – Purificação da lectina de sementes de <i>Aesculus hippocastanum</i> (AhSL). (A) Cromatografia do extrato de sementes em matriz DEAE-Sephadex. P1 corresponde a proteínas que não adsorveram à matriz. P2 corresponde às proteínas adsorvidas e eluídas na com tampão contendo NaCl 1,0 M. Esse pico corresponde a AhSL purificada.	45
Figura 8 – Purificação da lectina de sementes de <i>Aesculus hippocastanum</i> (AhSL). (a) Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de P2 para proteínas nativas ácidas: uma única banda polipeptídica (AhSL) foi detectada. O gel foi corado com Azul de Coomassie. (B) PAGE de marcadores de massa molecular (MM) e AhSL em condições desnaturantes (presença de sulfato sódico de dodecila). O gel foi corado com Azul de Coomassie.	46
Figura 9 – Efeitos da temperatura (A) e pH (B) na conformação de AhSL. A fluorescência da sonda extrínseca bis-ANS foi	48

monitorada na presença de AhSL incubada for 30 min a 30 ou 100 °C ou por 24 h em pH 1.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ou 10.0.

- Figura 10**– Avaliação dos efeitos citotóxicos de AhSL sobre 49
esplenócitos de camundongos BALB/c. (A) Análise por citométrica de fluxo utilizando os marcadores anexina V e iodeto de propídio para determinar o número de células em apoptose ou necrose, respectivamente. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de seis experimentos. (B–D) Efeitos de AhSL (12,5 $\mu\text{g/mL}$) no potencial mitocondrial da membrana, $\Delta\Psi\text{m}$ (B), bem como na produção de espécies reativas de oxigênio citosólicas (C) e mitocondrial (D) em esplenócitos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.
- Figura 11**– Efeitos de AhSL (12.5 $\mu\text{g/mL}$) na liberação de citocinas 50
(A–G) e óxido nítrico (H) por esplenócitos de camundongos BALB/c. (*) $p < 0.01$. (**) $p < 0.0001$.

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 – Famílias de lectinas: relacionando organização sequencial dos domínios e homologia de suas estruturas primárias.	23
Tabela 2 – Principais métodos de dosagem de proteínas utilizados em lectinas: princípios, aplicações e interferentes.	26
Tabela 3 – Purificação da lectina de <i>A. hippocastanum</i> (AhSL) baseado nas atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina.	46
Tabela 4 – Atividade hemaglutinante (AH) de AhSL na presença de carboidratos e glycoproteínas.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos	17
1.1.1	Geral	17
1.1.2	Específicos	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	Lectinas	18
2.1.1	Histórico e generalidades	18
2.1.2	Detecção de lectinas	20
2.1.3	Classificação de lectinas	21
2.2	Purificação e caracterização de lectinas	24
2.3	Atividades biológicas e aplicações biotecnológicas de lectinas	28
2.4	Atividade imunomoduladora de lectinas	32
2.5	Avaliação da citotoxicidade de compostos naturais	34
2.6	A espécie <i>Aesculus hippocastanum</i>	37
3	METODOLOGIA	39
3.1	Material vegetal	39

3.2	Aspectos éticos	39
3.3	Purificação de AhSL	39
3.4	Ensaio de atividade hemaglutinante (AH)	40
3.5	Avaliação de atividade inibidora de tripsina (AIT)	40
3.6	Caracterização de AhSL	41
3.6.1	Composição de subunidades	41
3.6.2	Especificidade de ligação a carboidratos	41
3.6.3	Efeito de cátions na AH	41
3.6.4	Estabilidade térmica e frente a variação de pH	41
3.7	Avaliação da atividade imunomoduladora	42
3.7.1	Coleta de esplenócitos de camundongos e condições gerais do ensaio	42
3.7.2	Ensaio de citotoxicidade	43
3.7.3	Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) citosólicas e mitocondriais	43
3.7.4	Determinação do potencial transmembrana mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	43
3.7.5	Quantificação de liberação de citocinas	43
3.7.6	Quantificação de liberação de óxido nítrico (NO)	44
3.8	Análise Estatística	44
4	RESULTADOS	45
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Agentes medicinais de origem vegetal têm sido descritos no meio científico há muitos anos como base para diversas terapias. Dentre esses agentes, encontram-se as proteínas bioativas, como lectinas e inibidores de proteases (AL-MAMUN et al., 2016). Em plantas, essas lectinas são produzidas com objetivo de exercer funções como mecanismo de defesa das plantas a diversos fatores ambientais e biológicos, podendo ser expressas de forma constitutiva ou induzida (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015).

As lectinas são proteínas que apresentam capacidade de interação com carboidratos, de forma específica e não covalente. Essas proteínas podem interagir com carboidratos da superfície celular, resultando na ativação de respostas intracelulares (PAIVA et al., 2013). As lectinas podem promover diversas atividades biológicas como antimicrobiana, antibiofilme, antiprotzoária, antiviral, inseticida, antitumoral e, inclusive, imunomoduladora (DAN; LIU; NG, 2016; IORDACHE et al., 2015; YAU et al., 2015; PATRIOTA et al., 2019a,b).

Diante da ascensão de enfermidades como doenças infecciosas, câncer, doenças inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes, muitas pesquisas têm avaliado o potencial farmacológico das lectinas com ação estimulante ou supressor da atividade imunomoduladora (DHAMA et al., 2015). Essas proteínas interagem com as porções glicídicas de superfícies de células imunológicas alterando a produção de citocinas e óxido nítrico, além da proliferação e ativação de macrófagos, linfócitos e mastócitos (FANG; NG, 2015; ZHANG et al., 2015; DITAMO et al., 2016). Dessa forma, as lectinas capazes de induzir citocinas com respostas estimulantes do sistema imune podem ser utilizadas em terapias para combater doenças de origem microbianas, virais e tumorais, como a AIDS, por exemplo. Já aquelas capazes de induzir citocinas com respostas imunossupressoras podem ser usadas em terapias para combater doenças autoimunes e em transplantes, de forma que as lectinas por meio de citocinas podem agir como agentes bioterapêuticos (BILATE, 2007; MEAGER, 2006; SILVA OLIVEIRA, 2012).

A espécie *Aesculus hippocastanum*, da família *Hippocastanaceae*, conhecida como castanheira-da-índia, é originária da Ásia, mas encontrada em toda a América. É uma espécie medicinal utilizada para produção de diversos fitoterápicos oriundos das sementes, folhas ou casca, com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2016). As sementes contêm metabólitos secundários (como taninos) conhecidos pelas propriedades

circulatórias, anti-inflamatórias e vasoprotetoras (HARRIS et al., 2016; KEDZIERSKI et al., 2016).

Estudos prévios realizados no Laboratório de Bioquímica de Proteínas (BIOPROT) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) revelaram a presença de lectinas em extrato salino das sementes de *A. hippocastanum*. Nesse contexto, esta dissertação descreve a purificação, a caracterização, e a avaliação da atividade imunomoduladora de uma lectina isolada das sementes dessa planta.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Purificar e caracterizar uma lectina das sementes de *A. hippocastanum* (AhSL) e avaliar a sua toxicidade e efeito imunomodulador sobre esplenócitos de camundongo.

1.1.2 Específicos

- Estabelecer um procedimento de purificação para AhSL.
- Determinar a natureza da carga líquida e a composição em subunidades de AhSL, através de eletroforeses.
- Avaliar a especificidade de ligação de AhSL a carboidratos e glicoproteínas através da inibição de carboidratos.
- Investigar os efeitos de variações de temperatura e pH na atividade hemaglutinante e na conformação de AhSL.
- Avaliar a citotoxicidade de AhSL para esplenócitos de camundongo.
- Investigar a capacidade da AhSL em modular a produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria e no citosol dos esplenócitos.
- Avaliar o potencial imunomodulador de AhSL sobre esplenócitos de camundongo, através da análise da liberação de citocinas e de óxido nítrico.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Lectinas

2.1.1 Histórico e generalidades

As plantas sempre foram fontes ricas e variadas de moléculas com potencial biotecnológico e medicinal. Impulsionados pelo conhecimento empírico sobre as plantas, muitos cientistas passaram a estudar a produção de compostos químicos em resposta a agentes biológicos (ex. fitopatógenos) e fatores abióticos (ex. alterações de temperatura, umidade e radiação), bem como compostos bioativos que estão relacionados com as propriedades medicinais descritas para os vegetais (TANIGUCHI et al., 2015; AL-MAMUN et al., 2016).

Os compostos bioativos de vegetais podem ser metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, que compõem as estruturas celulares básicas e atuam nos diversos aspectos do metabolismo básico da planta, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Eles são a base para formação dos metabólitos secundários (como compostos nitrogenados, terpenóides e compostos fenólicos (AKHTAR et al., 2015). Os quais atuam como atrativos de polinizadores, na defesa contra micro-organismos, insetos e até predadores maiores, entre outras funções (RIBEIRO, SILVA, SILVA, 2020; CORDEIRO et al, 2020).

As proteínas produzidas como forma de defesa podem ser produzidas constitutivamente pelos tecidos vegetais, mas também podem ser produzidas de forma induzida (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015). Elas podem atuar como receptores de reconhecimento de patógeno, ativando uma cascata de sinalização que reprograma a transcrição celular ativando a imunidade efetora da planta e genes de resistência, levando à produção de outras proteínas de defesa. Dentre essas proteínas estão as lectinas, também conhecidas como proteínas hemaglutinantes (LANNO; VAN DAMME; 2014).

As lectinas foram descobertas a partir da sua capacidade de aglutinar eritrócitos, descrita primeiramente em 1888, para a proteína ricina, obtida de sementes de *Ricinus communis* (KILPATRICK, 2002; VAN DAMME, 2008). Em seguida outras proteínas com essa propriedade foram descobertas. Algumas delas eram tóxicas, como a ricina e a abrina, e outras apresentavam seletividade frente a hemácias da mesma espécie e de diferentes animais. Essa especificidade foi descrita por vários autores de 1948 a 1953, o que contribuiu para o

entendimento da fundamentação das bases moleculares que formam o grupo sanguíneo ABO (SHARON E LIS , 2004).

A propriedade de ligação a carboidratos foi descrita em 1936, quando Sumner e Howell sugeriram que a Concanavalina A (ConA) interagia com carboidratos de superfície das hemácias. Em 1954, William Boyde propôs o termo “lectina” para nomear essas proteínas (originário do latim *lectus*, que significa “selecionar”), isso por causa da sua capacidade de ser seletiva a hemácias de diferentes grupos sanguíneos e através da sua seletividade a carboidratos de membrana presentes nos eritrócitos (LAM; NG, 2011; VAN DAMME, 2008).

As lectinas estão distribuídas amplamente na natureza, entre animais, vegetais e microorganismos. Nos vegetais, são encontradas em todos os tecidos da planta, sendo as sementes a principal fonte. Em plantas, as lectinas podem estar armazenadas em vacúolos, no espaço extracelular ou em tecidos de armazenamento e atuam no transporte e armazenamento de carboidratos, no reconhecimento celular, na indução de mitose, na morfogênese, fagocitose e simbiose, imobilização de patógenos, entre outros processos (SILVA *et al.*, 2012 ; MOURA, 2015).

Em 1988, Sharon & Lis redefiniram lectinas como proteínas de origem não imune com um ou mais sítios de ligação, sendo essa ligação reversível e específica a glicídios (NG, WONG, 2019). A origem não imune das lectinas refere-se ao fato de não serem expressas pelas células de defesa, apesar de participarem dos mecanismos imunológicos de animais e plantas. As lectinas são capazes de interagir com carboidratos através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals sem alterar a estrutura covalente do açúcar (SILVA *et al.*, 2014; HAMID *et al.*, 2013).

As lectinas podem se ligar a carboidratos presentes na superfície celular, sendo capazes de interpretar o glicocódigo, ou seja, de decodificar informações biológicas constituídas pelos glicanos em processos fisiológicos vitais. É por meio dessa ligação a carboidratos que as lectinas conseguem exercer diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, imunomoduladora, mitogênica, antitumoral, antiviral, angiogênica entre outras (AURNAUD *et al.*, 2013; BATISTA, 2019; RAMOS, 2019; FERREIRA, BRITO *et al.*, 2018; CORIOLANO, 2018; CARVALHO, 2018).

O potencial biotecnológico das lectinas é bastante extenso, sendo uma importante ferramenta analítica tanto na área da Bioquímica como em áreas correlatas, pois podem ser usadas nas análises clínicas em laboratórios de Imunohematologia, como no caso da lectina H,

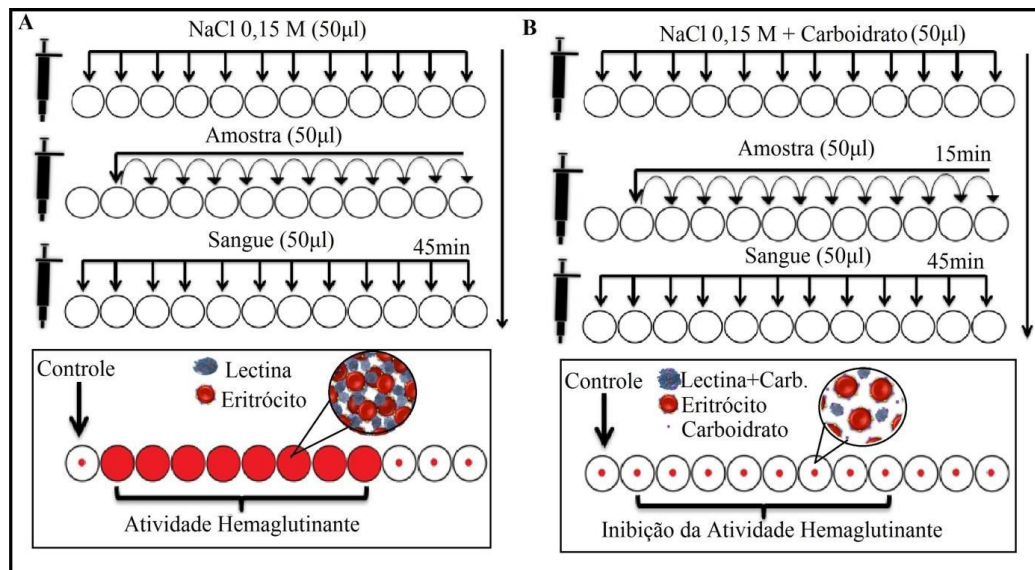
usada para diagnosticar fenótipos O bombay, que são falsos resultados de caracterização de grupo sanguíneo pela falta de um carboidrato de superfície no eritrócito (ALVES, 2010, BRASIL, 2014). Na Agricultura, as lectinas também têm demonstrado uma importância significativa como inseticidas naturais (NAPOLEÃO, 2012; OLIVEIRA, LIMA, 2020) e na avaliação de impacto ambiental (ARAUJO, ARAUJO, et al., 2019). Além disso, podem ser ferramentas para uso na identificação de marcadores tumorais, com alta sensibilidade e especificidade; isso ocorre através da construção de microarranjos, onde a lectina age como biossensor de bioreconhecimento, ou como constituinte de um suporte para purificação de biomoléculas sinalizadoras (PENG et al., 2009; FIRMINO, 2018; HASHIM; JAYAPALAN, LEE, 2017; OLIVEIRA, CABRERA, 2020).

2.1.2 Detecção de lectinas

A detecção das lectinas em amostras é feita pelo método de hemaglutinação (Figura 1A), um ensaio semiquantitativo que consiste em realizar uma diluição seriada da amostra e posterior incubação com eritrócitos, permitindo a interação das lectinas, caso presentes, com carboidratos da superfície de eritrócitos (SANTOS et al., 2013). Determina-se então a maior diluição da amostra que ainda foi capaz de promover hemaglutinação, sendo o resultado expresso como o inverso dessa diluição (título⁻¹). A capacidade de ligação da proteína com os eritrócitos forma uma rede e os eritrócitos não se depositam no fundo da placa. Já na ausência de lectinas, ocorre formação de um precipitado no fundo da placa. Podem ser utilizados eritrócitos de animais ou de humanos, previamente tratados quimicamente ou enzimaticamente (PAIVA et al., 2010).

Porém, alguns compostos (como os taninos) podem dispersar os eritrócitos dando uma falsa impressão de hemaglutinação. Para confirmar a presença de lectinas em uma preparação realizar-se o ensaio de inibição da hemaglutinação (Figura 1B), no qual carboidratos ou glicoconjugados livres em solução são incubados previamente com a amostra antes da adição dos eritrócitos (NG, 2019). Dessa forma, se na amostra houver lectina, esta vai se ligar ao carboidrato livre e não com o carboidrato de superfície da superfície do eritrócito. Esse resultado confirma que o que estava sendo observado no teste era realmente hemaglutinação e que a formação da rede envolvia moléculas capazes de reconhecer carboidratos (PAIVA et al., 2013).

Figura 1: Método de detecção de lectinas. (A) Atividade hemaglutinante. (B) Inibição de carboidratos.



Fonte: PATRIOTA, 2017.

O ensaio de inibição da atividade hemaglutinante também define a especificidade de uma lectina a um ou mais glicídios, utilizando soluções de diferentes carboidratos durante a etapa de incubação (COELHO, 2017). Sabendo disso, pode-se usar o carboidrato com maior afinidade para separar a lectina das outras proteínas da fonte de onde foi obtida em futuras etapas da purificação. Adicionalmente, pode-se sugerir que a lectina apresente uma determinada aplicação biológica dependendo do carboidrato ao qual ela tenha afinidade (HAMID et al., 2013).

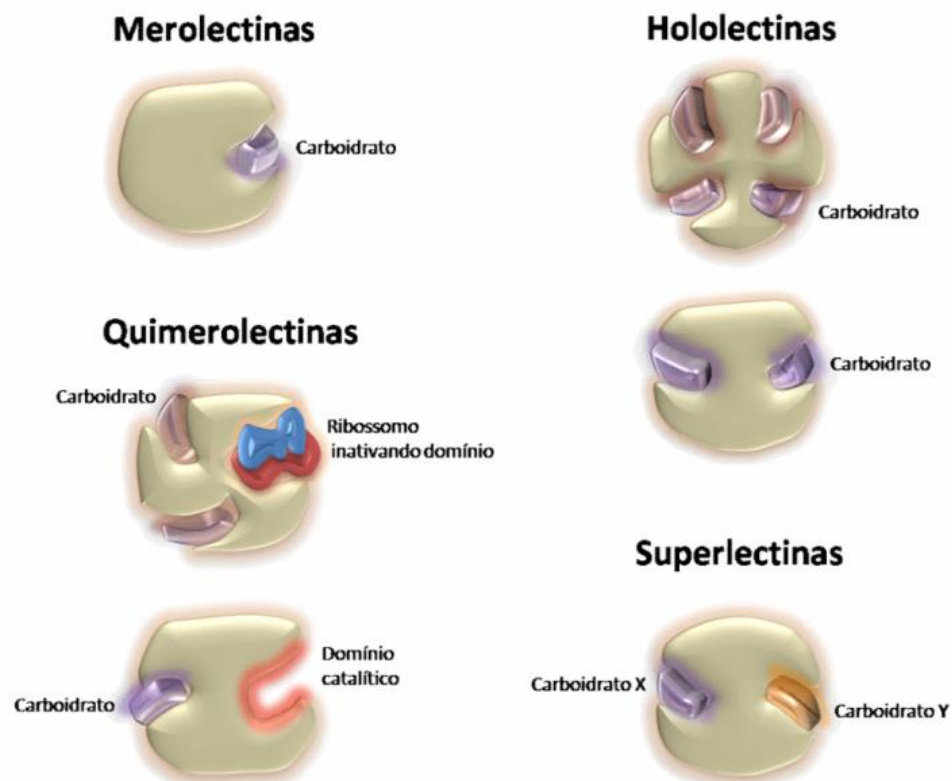
2.1.3 Classificação de lectinas

As lectinas podem ser classificadas quanto à estrutura, funcionalidade e quanto à especificidade de ligação a carboidratos. Há uma grande variedade estrutural de lectinas conhecidas, sendo uma característica comum a presença de pelo menos um sítio ligante a carboidrato. Esse domínio pode precisar de íons bivalentes ou não para se tornar ativo (KUMAR et al., 2012). Algumas lectinas podem ser glicoproteínas, apresentando um aumento da sua estabilidade (WANG; HE, 2018).

De acordo com a estrutura, as lectinas advindas de plantas são subdivididas: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectinas (Figura 2). As merolectinas são proteínas monovalentes (com apenas um sítio de ligação) e, portanto, não produzem

aglutinação celular (NB, 2019). As hololectinas são proteínas divalentes ou polivalentes, com sítios de ligação a carboidratos homólogos, sendo capazes de aglutinar células. As superlectinas também são proteínas divalentes ou polivalentes, mas seus sítios não são homólogos (HAMID et al., 2013 e ŠULÁK et al., 2011). Diferentes dos demais subtipos, as quimerolectinas apresentam um ou mais sítios de ligação a carboidratos e pelo menos um domínio com função diferente, como enzimática ou de transporte (HAMID et al., 2013; NB, 2019).

Figura 2: Subtipos de lectina de plantas segundo a estrutura de seus domínios.



Fonte: BEZERRA (2009).

Quanto à funcionalidade, pode-se classificar as lectinas, principalmente as de origem animal, em três famílias: selectinas (E, P e L), galectinas e lectinas tipo C. As selectinas são proteínas de membrana com especificidade pelo resíduo de ácido sálico e atuam no reconhecimento celular, na adesão e no sistema de defesa dos animais (KUMAR et al., 2012; RIVANOR, 2017). As galectinas são conhecidas como lectina tipo-S, que possuem domínio de ligação específico para galactose e também estão envolvidas no reconhecimento e na adesão celular. Elas dependem do grupamento sulfidríla encontrado no resíduo de cisteína e

de cálcio para interação com carboidratos. As lectinas tipo C são dependentes de cátions divalentes (como o cálcio, o potássio, o manganês e o magnésio), que atuam tanto diretamente na mediação da interação da lectina com o glicídio quanto indiretamente através da estabilização dos domínios de ligação a carboidratos (BEZERRA, 2009).

Tabela 1: Famílias de lectinas relacionando organização sequencial dos domínios e homologia de suas estruturas primárias.

Lectina representativa	Abreviatura	Família	Especificidade
<i>Agaricus bisporus</i> aglutinina	ABA	Aglutinina homóloga à <i>Agaricus bisporus</i> Amarantinas	Galactose
Aglutinina relacionada a quitinase	CRA	Homólogos da quitinase classe V com atividade lectínica	Glicanos de manose
Cianovirina-N	CV-N	Família Cianovirina	Manose
<i>Euonymus europaeus</i> aglutinina	EEA	Família EEA	Manose/galactose
<i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	Família GNA	Manose/ácido siálico
Wheat germ aglutinina	WGA	Proteínas com domínio de heveína	N-acetil-D-glucosamina
Jacalina	JAC	Jacalinas	Manose
Concanavalina A	ConA	Leguminosas Domínio motivo de lisina	D-manose
<i>Cucurbitaceae phloem</i>	CPL	Família Nictaba	
European mistletoe	ML-1	Família Ricina-B	β -galactose

Fonte: VAN DAMME (2008).

Quanto à organização sequencial dos domínios específicos aos carboidratos, as lectinas são classificadas em: lectinas ligadoras de manose, manose/glicose, manose/maltose, galactose/*N*-acetilgalactosamina, *N*-acetilgalactosamina/ (*N*-acetilgalactosamina)_n, fucose e ácido siálico (SHARMA et al., 1998). Com o advento do sequenciamento, as lectinas foram agrupadas de acordo com a homologia de suas estruturas primárias em doze famílias (tabela

1): 1) homólogas a *Agaricus bisporus*, 2) amarantinas, 3) homólogos de quitinase classe V, 4) cianovirinas, 5) homólogos de *Euonymus europaeus*, 6) homólogos de *Galantus nivalis*, 7) proteínas com domínio heveínico, 8) jacalinas, 9) lectinas de leguminosas, 10) com domínio Lys M, 11) homólogas de *Nicotiana tabacum*, e 12) homólogas de ricina-B; contudo, muitas lectinas ainda não se enquadram nessas famílias (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA, 2017).

2.2. Purificação e caracterização de lectinas

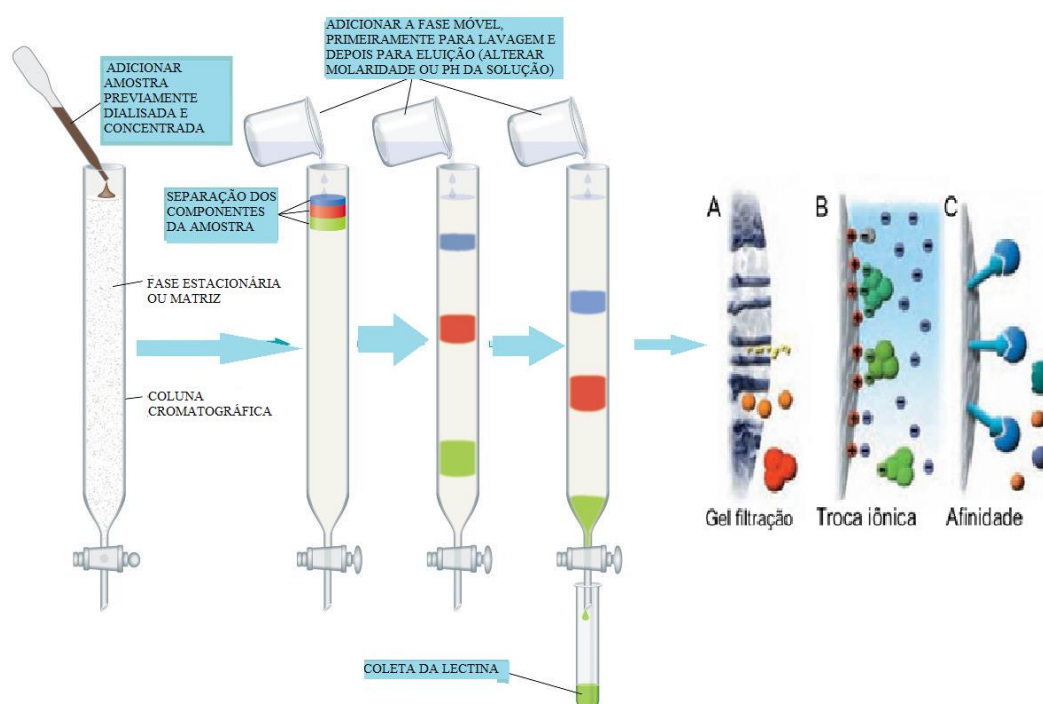
As proteínas bioativas, dentre elas as lectinas, precisam ser isoladas para que seja demonstrado que a atividade biológica em estudo está realmente relacionado com a proteína identificada. O isolamento é realizado através de diferentes técnicas, visando sempre obter a maior concentração de proteínas, porém com elevado grau de pureza e, geralmente, com manutenção da atividade biológica.

De forma geral, são utilizadas três etapas para purificação de proteínas: a primeira é a extração. No caso de culturas de células e tecidos, o material é submetido à lise das membranas por sonicação, pressão ou trituração. Outros materiais podem ser transformados em farinha ou pó e homogeneizados em uma solução aquosa, tamponada ou não, para promover a solubilização das proteínas (NELSON & COX, 2008). A segunda etapa é uma purificação parcial onde se retiram alguns contaminantes de um extrato bruto através de diferenças de solubilidade (através de fracionamento salino, por exemplo) ou diferença de pH ótimo e estabilidade frente à temperatura ou íons. O fracionamento salino é o mais comumente aplicado e utiliza uma solução saturada de sais, como o sulfato de amônio, para remover a camada de solvatação e precipitar as proteínas sem causar desnaturação (THAKUR et al., 2007). A terceira etapa é a utilização de um ou mais de um métodos cromatográficos (Figura 3), que se baseiam em propriedades das proteínas como carga elétrica (cromatografia de troca iônica), tamanho (cromatografia de exclusão molecular) e especificidade (cromatografia de afinidade) para isolar a proteína de interesse (QU et al., 2015). Métodos de clarificação (filtração, centrifugação, diálise e outros) também podem ser usados durante a purificação para separar compostos e concentrar a proteína de interesse (POHLEVEN et al., 2012).

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma solução constituído em duas fases: estacionária e móvel. A separação é provocada por uma

migração ou interação diferencial com a fase estacionária, enquanto há passagem da fase móvel. A fase estacionária é composta de uma matriz, onde a proteína fica ligada, e essa matriz determina o tipo de cromatografia (PAN et al., 2010). Como ilustrado na Figura 3A, na cromatografia por exclusão molecular, ou gel filtração, as moléculas são separadas por tamanho, ou peso molecular. A matriz contém microesferas porosas que permitem mais facilmente a passagem de moléculas maiores, enquanto menores penetram nas esferas e por isso têm seu percurso retardado (LAM et al., 2011).

Figura 3. Métodos cromatográficos.



Fonte: Disponível em (<http://slideplayer.com.br/slide/289119/>) adaptado pelo autor.

O segundo tipo de cromatografia é o de afinidade (Figura 3C), que leva em consideração as propriedades de ligação da proteína de interesse. No caso de uma lectina, o componente da matriz é um carboidrato para o qual a lectina esta proteína apresenta afinidade e se mantém retida na coluna, enquanto as outras moléculas são eluídas. Após a remoção do material não ligado, a lectina pode ser eluída por meio de alteração de pH, aumento da concentração de sal da fase móvel, ou pelo uso de solução contendo o carboidrato ligante na sua forma livre (SÁ et al., 2009).

O terceiro tipo é o de troca iônica (Figura 3B), que se baseia na carga líquida da lectina, conforme o pH do meio. As lectinas estabelecem interações eletrostáticas com a matriz da fase estacionária, que possui carga elétrica oposta à da proteína, retardando sua

passagem. A eluição das proteínas adsorvidas é feita através de alterações no pH ou na força iônica da fase móvel (VARROT et al., 2013).

Durante todo o processo de purificação é necessário verificar a estabilidade e atividade hemaglutinante (AH) da lectina. O processo deve aumentar a AH específica (relação entre a AH da lectina em estudo e a concentração de todas as proteínas), indicando que a lectina está sendo concentrada e outras substâncias que não são de interesse ou que sejam contaminantes estão sendo eliminados (SANTOS et al., 2013; PATRIOTA, 2017). A Tabela 2 mostra os principais métodos para dosagem de proteínas, incluindo seus princípios, aplicações e interferentes.

Após o isolamento da lectina utiliza-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para a identificação do seu grau de pureza (SANTOS et al., 2013). A sua carga líquida pode ser avaliada por técnicas de eletroforese para proteínas ácidas ou básicas (PAIVA et al., 2011). Na presença do agente desnaturante dodecilsulfato de sódio (SDS), pode ser verificada a composição em subunidades da proteína. E na presença de agentes redutores, como β -mercaptoetanol ou ditioneitol, é possível investigar a presença de pontes dissulfeto na estrutura proteica (PROCÓPIO, 2018). Outra forma de verificação de grau de pureza é a utilização da cromatografia líquida de desempenho rápido (FPLC) ou de alto desempenho (HPLC-RP) que podem ser utilizadas também como um método de caracterização de massa molecular de proteínas (BARBOSA, 2013).

Tabela 2. Principais métodos de dosagem de proteínas utilizados em lectinas, princípios, aplicações e interferentes.

MÉTODOS	PRINCÍPIO	APLICAÇÕES	LIMITAÇÕES E INTERFERENTES
---------	-----------	------------	----------------------------

Biureto	O reativo do Biureto é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante (tartarato de sódio). Em meio alcalino, o cobre reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica e o produto da reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm.	Determina a concentração de proteínas totais em diversos meios e tecidos animais e de humanos. É utilizado em análise por injeção em fluxo e em alguns métodos cinéticos. É rápido, de baixo custo e não apresenta grande variação da absortividade específica, porém este método não é muito sensível.	Sofre interferência de substâncias que possam: reagir com os íons cobre como amônio, Dextran-40 e 70, peptídeos, aminoácidos, tampão tris-HCl e glicose; substâncias que possam aumentar a turbidez e com isso a absorção das amostras como, bilirrubina, lipídios e hemoglobina; e há ainda substâncias que provocam falso positivo como melanina, lactose e amido.
Lowry	O reagente Folin-Ciocalteu é uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico, que sofre uma redução, pelo catalisador cobre (II), quando reage com cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) produzindo um composto com absorção em 750 nm.	Determina a concentração de proteínas totais em diversos meios, como também tecido animal e tecido vegetal. Apresenta alta sensibilidade e tem sido utilizado em diversos tipos de equipamentos automatizados.	Sofre interferência de substâncias que possam: reagir com a mistura gerando um falso positivo, como Compostos fenólicos, Ácido úrico, Guanina e xantina, Melanina, 4-metilumbeliferona, Mercaptanas e cisteína, Tampão tris-HCl, Açúcares; provocar turbidez das amostras, como lipídios; provocar a formação de precipitado como detergentes; diminuir ou aumentar a absortividade como sulfato de amônio, bilirrubina e RNA, respectivamente. Possui absortividade específica altamente variável, não é rápida a análise e a reação é fotossensível.
Bradford	O método utiliza o corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 que interage com aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas da proteína, causando deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve a luz fortemente em 595 nm.	Determina a concentração de proteínas totais em diversos meios, como produtos alimentícios, tecidos de plantas e suspensões de células. É um método mais rápido e sensível, utilizado em equipamentos automatizados.	Sofre interferência de substâncias que possam: reagir com o corante provocando falso positivo como tolbutamida, uréia, ciclodextrinas, glicerol e clorpromazina; resultar em falso negativo como cloreto de sódio e de potássio; alargar a banda de absorção como detergentes (Triton X-100, SDS, Tween-20); reagir com as proteínas como polifenóis e oxidases; diminuir a absorção da

			amostra como 2-mercaptoetanol, guanadina e fluoreto; causar turbidez na amostra como Lipídios. A presença de proteínas de baixo peso molecular e a variação da absorvidade específica subestima a concentração de proteínas totais. Além disso o grau de pureza do corante pode causar baixa reprodutibilidade.
--	--	--	---

Elaborada pela autora.

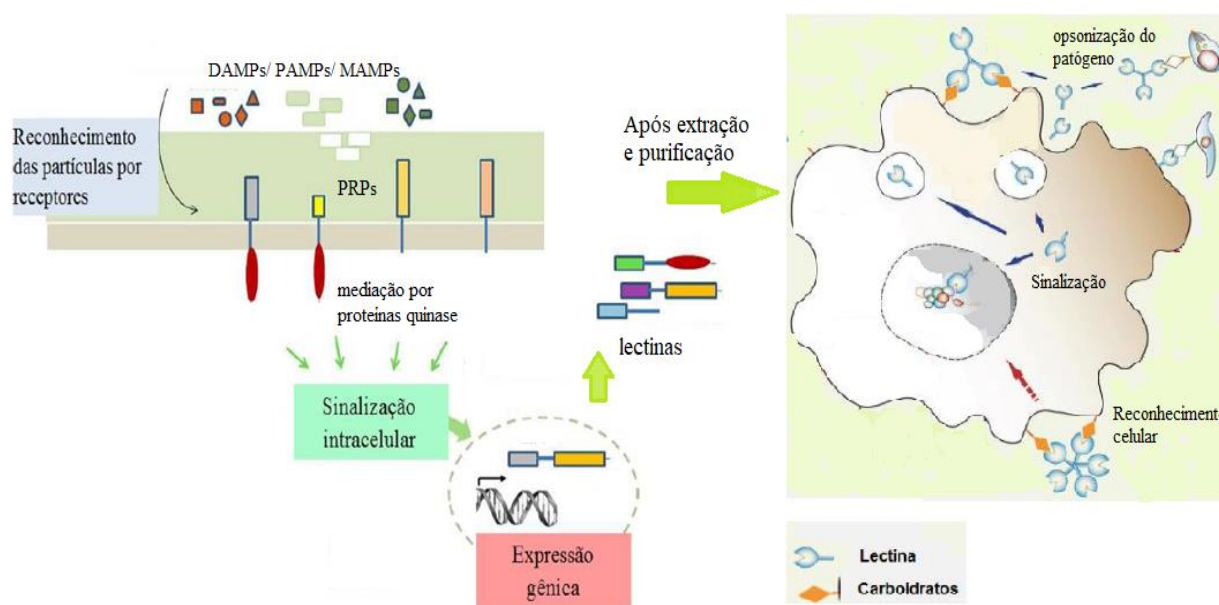
Técnicas fluorimétricas para caracterização estrutural de proteínas são úteis para obter informações sobre conformação, sítios de ligação, interações com solventes, grau de flexibilidade e distâncias intermoleculares. Quando a energia da luz é absorvida, a molécula passa de um nível de energia fundamental para um nível de energia ativado, fenômeno chamado de transição quântica. Porém, esta energia vibracional é rapidamente dissipada como calor pela emissão de luz (fluorescência). A luz emitida terá menos energia (maior comprimento de onda) que a luz absorvida (MARQUEZIN, 2008; TSUTAE, 2016). Dois tipos de fluoróforos são usados em análise de fluorescência de macromoléculas – fluoróforos intrínsecos (para proteínas são triptofano, tirosina e fenilalanina) e fluoróforos extrínsecos (adicionados ao sistema e que se ligarão à macromolécula, como o bis-ANS). Na prática, a fluorescência do triptofano é a mais estudada, pois a fenilalanina tem um rendimento quântico muito baixo e a fluorescência da tirosina é frequentemente muito baixa devido à supressão se ela estiver ionizada, ou próxima de um grupo amino, de um grupo carboxil, ou do triptofano (COSTA, 2009; PATRIOTA, 2017; PROCÓPIO, 2018).

2.3. Atividades biológicas e aplicações biotecnológicas de lectinas vegetais

Diversas funções têm sido sugeridas para as lectinas vegetais, como por exemplo, transporte e armazenamento de carboidratos, proteínas de reserva, entre outras (PUSZTAI, 1991; PEREIRA, 2019). Uma função importante relacionada as lectinas é como mecanismo de defesa contra diversos agentes, isso porque algumas lectinas podem ser formadas após receptores de reconhecimento ao patógeno (PRPs), reconhecerem moléculas associadas ao dano celular (DAMPs) e moléculas associadas ao patógeno (PAMPs/MAMPs) (Figura 4) de

forma que ocorre a ativação de uma cascata de sinalização através de proteínas quinase que reprograma a transcrição celular ativando a imunidade efetora da planta (ETI), que “liga” genes de resistência gerando a produção das lectinas (LANNO; VAN DAMME; 2014). Por serem capazes de promover sinalização e reconhecimento celular, sua função de defesa de lectinas vegetais contra diferentes tipos de patógenos se destaca, de forma que se observa o grande potencial das lectinas contra diversos agentes. A Figura 4 mostra como ocorre a expressão de algumas lectinas e o caminho pelo qual a lectina pode gerar tantos efeitos biológicos como: antitumoral (RAMOS, 2019), antimicrobiana (FERREIRA, BRITO et al, 2018; PROCÓPIO, 2017) antiviral (GODIM, 2014) mitogênica (MELO, 2011; CARVALHO, 2018), angiogênica (BATISTA, 2019) atividade antinociceptiva (RIVANOR, 2017) e atividade imunomoduladora (PATRIOTA, 2017; CORIOLANO, 2018).

Figura 4. Representação da expressão gênica de lectinas através do sistema de defesa das plantas e sua ação no reconhecimento celular, sinalização e opsonização de patógenos.



Fonte: VASTA (2012), adaptada.

Essa capacidade de promover reconhecimento celular e sinalização celular permite a lectina ser utilizada no tratamento de diversas doenças, como o câncer. O câncer é caracterizado pela complexidade e heterogeneidade entre os vários tipos de tumores malignos como também pelas limitações e processos invasivos no tratamento dessa patologia. Além disso, os tumores podem criar rotas de sinalização para contornar a cascata de morte celular e criar resistência ao tratamento. Sendo assim, há sempre necessidade de busca de novos

compostos para tratamento dessas doenças e dentre esses agentes estão as lectinas. Algumas lectinas têm efeitos antiproliferativos para certas linhagens de células tumorais (BATISTA et al., 2017). As lectinas podem ser tóxicas para células tumorais e vários mecanismos estão envolvidos nessa toxicidade, tais como indução de apoptose, autofagia, necrose e inibição do crescimento celular. Por meio de interação com receptores específicos, que podem ou não ser glicosilados ou não, as lectinas podem modular importantes vias de sinalização envolvendo proteínas pró-apoptóticas (como Bcl-2, caspases, p53, ERK e Ras-Raf), levando a morte celular (ZHANG, 2010).

O potencial antiviral das lectinas é investigado desde a década de 80, principalmente contra o vírus HIV (LIU et al., 2014). A lectina de sementes de *Dioclea sclerocarpa* (DSL), por exemplo, inibiu a ploriferação dos vírus HIV-1 e HIV-2, (GONDIM, 2014). Algumas lectinas possuem capacidade de bloquear a ligação da partícula viral à molécula-alvo, impedindo assim a sua disseminação. As lectinas reconhecem e alteram glicoproteínas presentes no envelope viral, induzem a formação de vírions com baixa resistência e, assim, mais susceptíveis à neutralização pela resposta imunológica (MAHALIGAM et al., 2011). A lectina da cianobactéria *Lyngabya confervoides* (MK012409) mostrou atividade antiviral contra HSV-1, que causa infecções por vírus herpes simplex, inibindo a formação de placas em células Vero infectadas com HSV-1 (EL-FAKHARANY et al., 2020). Trinta e três lectinas de plantas com diferentes especificidades por carboidratos foram testadas contra o coronavírus SARS-CoV e o vírus da peritonite infecciosa (FIPV) e mostraram propriedades antivirais marcantes na faixa nanomolar, sendo as lectinas que se ligam a manose apresentaram maior atividade (KEYAERTS et al., 2007).

As propriedades antimicrobianas das lectinas estão relacionadas com a sua capacidade de reconhecer carboidratos na superfície das células bacterianas ou fúngicas, alterando a permeabilidade de sua membrana. As lectinas interagem com diversos componentes da parede celular bacteriana, dentre eles, os ácidos teicóicos, os peptídeoglicanos e os lipopolissacarídeos (NIZET; VARKI; AEBI, 2018). Outro modo da ação antimicrobiana das lectinas é promover a aglutinação das cepas microbianas, bloqueando os sítios de ligação das bactérias e impedindo a ligação com células do hospedeiro (MOURA et al., 2015). Em fungos, pode ocorrer pela ligação da lectina com a quitina e resíduos de manose presentes em suas paredes celulares, o que resulta em uma ação inibitória sobre o crescimento e desenvolvimento desses microrganismos (DIAS et al., 2015; ZIATABAR et al., 2018; PROCÓPIO et al., 2017).

Métodos alternativos para o controle de insetos que gerem menor risco à saúde humana e ao meio ambiente e produtos alimentícios saudáveis e isentos de resíduos de agrotóxicos têm sido investigados. Diversos estudos apresentam a eficiência de compostos isolados de plantas com atividade inseticida, tais como as lectinas (FILHO; NETO, 2014; OLIVEIRA, LIMA, 2020). Ensaio utilizando lectinas vegetais na dieta artificial de insetos constataram suas propriedades tóxicas às pragas, de modo que, aumentam a mortalidade ou retardam o desenvolvimento destes insetos. A ação inseticida pode ocorrer por diversos mecanismos que envolvem a desestabilização do metabolismo do patógeno/predador. Podem formar conjugados com as células epiteliais do intestino médio ou atingir o sistema circulatório, interferindo no mecanismo de defesa do inseto e desencadeando a inibição do desenvolvimento larval ou da sobrevivência de formas adultas (MACEDO; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2015; HUANG et al., 2016).

Mitógenos são indutores de proliferação celular que promovem o avanço das fases (interfase e mitose) do ciclo celular culminando no crescimento celular, na duplicação de material genético e na divisão celular. Para ocorrer o crescimento e a proliferação celular são necessários sinais que induzam o ciclo celular, chamados de fatores de crescimento os quais se ligam aos seus receptores transmembrana ativando a cascata via tirosina-quinase e por fim estimulando o ciclo celular (MELO, 2011; CARVALHO, 2018). Lectinas ligadoras de glicose/manose têm sido utilizadas como agentes mitogênicos, sendo capazes de ativar linfócitos através de ligações ao receptor de células T, disparando a transição do ciclo celular de G0 para G1 (CARVALHO, 2018).

A nocicepção é um mecanismo sensorial e molecular que permite detectar e reagir a estímulos nocivos contra os tecidos (TRACEY, 2017). Esse mecanismo tem sua devida importância baseado no fato de que, sem o estímulo da dor, não conseguiríamos associar a lesão com o objeto que a causou e assim criar uma memória protetiva contra esses objetos, bem como detectar processos danosos que estejam ocorrendo no nosso organismo. Porém, há casos nos quais se precisa controlar a sensação de dor, para simultaneamente tratar o quadro patológico com maior eficiência, diversos fármacos são utilizados com esse fim antinociceptivo, porém estão associados com dependência, ineficácia ou resistência. Na literatura diversas lectinas apresentam atividades nociceptiva (BARI, 2016; FIGUEIREDO et al., 2010; PINTO et al., 2013).

As lectinas são utilizadas como ferramentas para distinguir as células tumorais das não tumorais e determinar o tipo celular do tumor. Durante o processo tumoral a maioria dos

biomarcadores utilizados são glicoproteínas, que são expressas em níveis muito superiores aos normais e/ou sofrem alterações estruturais em sua porção glicano (HASHIM; JAYAPALAN; LEE, 2017). Sabe-se que a detecção antecipada do câncer é essencial no prognóstico, de forma que lectinas como biomarcadores podem trazer algumas vantagens sobre os métodos padrão, como a especificidade e a possibilidade de detecção de peptídeos glicosilados expressos mesmo em níveis baixos (PONRAJ et al., 2016; HASSANPOUR; DEGHANI, 2017)

Há ainda outras atividades e aplicabilidades das lectinas como, por exemplo, anti-inflamatória (MUSZYNSKA et al., 2018), o isolamento, a purificação e os estudos estruturais de polímeros contendo carboidratos (FAIS et al., 2009), a tipagem sanguínea (GORAKSHAKAR; GHOSH, 2016), a identificação de cepas de micro-organismos (ATHAMNA et al., 2006); produção de plantas transgênicas com resistência ao ataque de pragas (ZUO et al., 2012) e uso de lectinas como carreadores de drogas (BIES; LEHR; WOODLEY, 2004; DANHIER; FERON; PRÉAT, 2015).

2.4 Atividade imunomoduladora de lectinas

Agentes imunomoduladores são aqueles que alteram o funcionamento do sistema imunológico de forma a equilibrar ou restaurar a sua função fisiológica. Assim, dependendo da situação que o sistema se encontre o agente pode estimular (imunoestimulação) ou inibir (imunossupressão) a resposta imunológica de maneira terapêutica. Lectinas podem ativar células do sistema imunológico, entre elas macrófagos, mastócitos e linfócitos (DIAS-NETIPANYJ et al., 2016; MELO et al., 2011; BARBOSA-LORENZI et al., 2016). Essa ação imunomoduladora ocorre através da interação com porções glicídicas da superfície de células imunológicas, promovendo uma cascata de transdução de sinais para a produção de certas citocinas (KATRLÍK et al., 2010; GAO et al., 2013; SUNG et al., 2013) que estimulam respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (PRASANNA; VENKATESH, 2015; MARINKOVIĆ et al., 2016; CAMPOS et al., 2016). A indução da secreção de óxido nítrico (NO) e citocinas, pode contribuir em parte para a capacidade antitumoral das lectinas ou estimular a resposta imunológica contra infecções microbianas ou ainda minimizar a resposta imune em casos de doenças autoimunes e transplantes (SINGH et al., 2017).

O sistema imune é dividido em sistema imune inato e sistema imune adaptativo ou específico. Este último, diferente do primeiro, aumenta sua resposta se adequando à exposição

repetida e por isso exibe especificidade e memória. Esses sistemas são constituídos por componentes celulares e humorais (proteínas, incluindo as citocinas). As citocinas são produzidas por várias células imunológicas, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, células B e células T. Essas citocinas atuam através de receptores de superfície expressos pelas células-alvo para regular cascatas de ativação ou inibição de certas condições fisiológicas de forma que podem apresentar potencial autócrino, parácrino e endócrino (RAMANI et al., 2015; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

As citocinas são proteínas pleiotrópicas, ou seja, podem atuar de várias maneiras a depender da via de sinalização, da célula-alvo, etc. Por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF- α) é um mediador pró-inflamatório, sendo tanto iniciador quanto modulador da extensão do processo inflamatório, induz febre e ativação de macrófagos e neutrófilos; por esse motivo, essa citocina é muito importante na inibição de doenças autoimunes e no tratamento de alguns tumores, como sarcomas e melanomas (AKDIS et al., 2016; CROFT; BENEDICT; WARE, 2013). A interleucina 6 (IL-6) é uma outra citocina pró-inflamatória, porém também apresenta atividade regenerativa e anti-inflamatória (SCHELLER et al., 2011). Já a interleucina 10 (IL-10) é uma proteína anti-inflamatória com propriedades imunossupressoras sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias (OUYANG et al., 2011).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre sintetizado por uma via que é catalisada por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). O NO é expresso após os estímulos imunológico e inflamatório e é uma molécula sinalizadora envolvida em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos que inibem a adesão e migração de células inflamatórias e a morte microbiana, através da geração de peroxinitrito (ONOO⁻) (LO FARO et al., 2014; KAPRAL et al., 2015; MOHSENZADEGAN et al., 2015).

De forma geral, ação das lectinas sobre as células imunológicas pode estimular especificamente um tipo celular, como no caso da lectina de *Viscum album coloratum* (VCA-B) (KIM et al., 2014), que é uma potente estimuladora da maturação e da ativação de células dendríticas (CDs), ou estimular vários tipos/subtipos celulares como no caso da lectina de inflorescências da *Alpinia purpurata* (ApuL) (BRITO et al., 2017) que estimulou a diferenciação e a ativação de células CD8 +, CD4 + e co-estimulou CD28, subconjuntos de linfócitos. Assim, de acordo com seu perfil estimulatório as lectinas podem ação imunoadjuvante como terapêutico tumoral, ou ter ação imunorreguladora com potencial terapêutico para doenças autoimunes, por exemplo.

O perfil estimulatório das lectinas varia não apenas conforme o tipo de célula imunológica, mas também com o modelo experimental, por exemplo, em esplenócitos murinos a lectina de *Musa paradisiaca* (BanLec) mostrou um perfil de resposta pró-inflamatório diferente do modelo experimental em linfócitos, e a BanLec também apresentou diferenças de perfil estimulatório variando com a via de administração (por via venosa inibiu interferon-gama (IFN- γ) e, por via retal estimulou a produção de interleucinas 2, 4 e IFN- γ) (SANSONE et al, 2016; STOJANOVIC et al., 2010).

Algumas lectinas podem induzir a secreção de NO, como ocorreu com a lectina de frondes da *Microgramma vacciniifolia*, a MvFL (PATRIOTA et al., 2017), contribuindo em parte, para suas propriedades antitumorais, ou as lectinas podem não ter esse efeito sobre o NO como no caso da *Calliandra surinamensis* (CasuL) (PROCOPIO et al., 2018), no entanto a CasuL revelou efeito estimulador sobre espécies reativas de oxigênio (EROs) e sobre IL-2 e TNF- α .

Outro exemplo de lectinas com atividade imunomodulatória é a lectina de sementes *Moringa oleifera* (WSMoL) (CORIOLANO et al., 2018), que, em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano induziu a liberação de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10 e NO o que traduz um modelo de imunoregulação compatível com o perfil de cicatrização de feridas, sendo então um potencial adjuvante em doenças imunossupressoras e no reparo de ferimentos. A lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) induziu um estado pró-inflamatório, estimulando a interleucina-17A, TNF- α , IFN- γ e IL-2, e também anti-inflamatório, estimulando IL-4, portanto esse perfil regulatório pode prevenir inflamações exacerbadas o que é apropriado em infecções graves e sepses, sendo então essa lectina um potencial adjuvante para fármacos antimicrobianos, antiparasitários e anti-infecciosos (SANTOS, 2020).

2.5 Avaliação da citotoxicidade de compostos naturais

A morte celular tem um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual, porém a desregulação, positiva ou negativa, desse processo sustenta patologias diversas. Analisar a capacidade de potenciais ferramentas farmacológicas causarem danos a células e ao organismo é de suma importância, pois uma grande quantidade de produtos naturais pode apresentar toxicidade a nível genético, celular ou sistêmico (MAAG et al., 2015). A

toxicidade é a principal razão para a alta taxa de falha (40-50%) de medicamentos farmacêuticos (MATIĆ et al., 2013).

Sendo um processo fisiológico regulado, a morte celular tem um importante papel biológico em vários processos, tais como o colapso endometrial durante a menstruação, na embriogênese, e até na imunidade (TAIT; ICHIM; GREEN, 2014). As alterações morfológicas e bioquímicas associadas à morte celular por apoptose (Figura 5) incluem a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática.

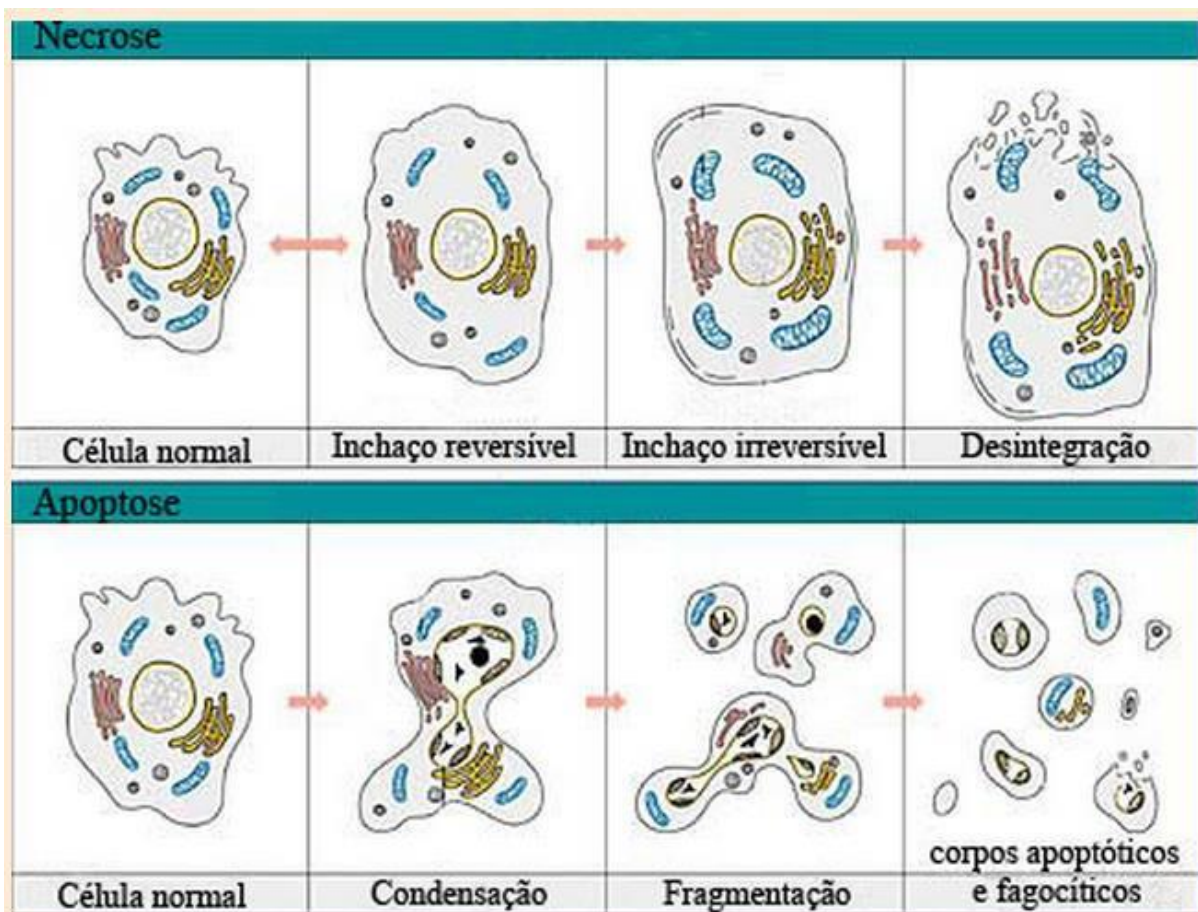
Quando a morte celular é devido à necrose, ela ocorre por resposta a lesões celulares e é caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Isso gera uma resposta inflamatória causando a morte de outras células não lesadas, ou seja, nesta condição há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013)

A Figura 5 também mostra o processo de necrose e a indução da inflamação por meio de alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP que interfere na função da bomba Na^+/K^+ , levando à tumefação celular devido ao aumento de Na^+ citosólico. O aumento do Ca^{2+} citosólico provoca ativação de fosfolipases e de proteases, que juntamente com o aumento de EROs induzem a perda da permeabilidade seletiva da membrana, ativação de proteases com consequente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando a migração de macrófagos (BLÉRIOT; LECUIT, 2016). Já a apoptose gera uma cascata de autodestruição (mediada por caspases) que culmina em degradação do DNA via ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos, que são retirados do tecido por macrófagos, esta sinalização ocorre devido a translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana sinalizando as células que serão fagocitadas (GALLUZZI et al., 2014; SHIBUTANI et al., 2015).

Há várias rotas distintas para a ativação de caspases, dependendo do estímulo, sendo iniciadas via receptores de morte tais como Fas, também chamado de CD95 ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor fator de necrose tumoral) ou por meio de a via mitocondrial, com envolvimento de alterações de permeabilidade de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol mediada por Bcl-2 (Bax, Bid), que se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o complexo apoptossomo. A caspase-9 ativa (iniciadora) pode então clivar as caspases

efetoras subsequentes como um mecanismo de amplificação de sinais durante o processo apoptótico (PARRISH; FREEL; KORNBLUTH, 2013).

Figura 5. Processo de apoptose e necrose.



Fonte: Disponível em (<http://envelhecimento97unb.blogspot.com/2013/05/apoptose-celular-apoptose-ou-morte.html>)

As lectinas vegetais, foram inicialmente conhecidas por sua toxicidade devido à identificação da ricina, e então outras lectinas tóxicas para células normais humanas têm sido descritas (LORD et al., 2003; ARAÚJO et al., 2013). Porém, várias lectinas têm se mostrado atóxicas para células normais humanas nas doses em que apresentam suas atividades biológicas, como é o caso da lectina de frondes da *Microgramma vacciniifolia* (MvFL), da lectina de sementes *Moringa oleifera* (WSMoL) e da lectina de folhas de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) (BATISTA et al., 2017). Alguns dos tipos celulares atualmente empregados para avaliar a citotoxicidade de lectinas *in vitro* são PBMCs e os esplenócitos de camundongo (FERREIRA et al., 2016).

A detecção da apoptose pode ser feita pelo monitoramento da externalização de resíduos de fosfatidilserina no exterior da membrana plasmática, utilizando a proteína anexina V, ligante da fosfatidilserina, conjugada com marcadores fluorescentes, como o isotiocianato de fluoresceína. Em relação à necrose, que promove a permeabilidade da membrana, é utilizado o iodeto de propídeo (corante impermeável, ou seja, apenas penetra quando há perda de integridade da membrana) capaz de marcar as células quando se associa com as moléculas de ácidos nucleicos (KEPP et al., 2011; SUMANTRAN, 2011).

2.6. A *Aesculus hippocastanum*

Figura 6. *Aesculus hippocastanum*. (A) Aspecto geral. (B) Folhas. (C) Inflorescência. (D) Frutos. (E) Sementes. (F) Flor (G) Haste.



Fonte: ISSAKOWICZ et. al. (2005).

A *Aesculus hippocastanum* (Figura 6A), conhecida como castanheira-da-índia, pertence à família Hippocastanaceae (composta de 3 gêneros e 20 espécies), e está taxonomicamente classificada na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae e ordem Sapindales (CRONQUIST, 1988). Porém, também pode ser da Sapindaceae, pois essas duas famílias são filogeneticamente muito semelhantes, quase includentes. A Sapindaceae possui alguns espécimes com frutos comestíveis (como a litchia), árvores

ornamentais e espécies medicinais, como o guaraná e a própria castanheira-da-índia. (ISSAKOWICZ, 2005).

É uma planta nativa do Irã, norte da Índia, Sul da Ásia, Sudeste da Europa e dos Estados Unidos. Adaptável a variações climáticas encontra-se por todos continentes, no Brasil foi trazida para o Brasil pelos imigrantes e se espalhou por todo território nacional rapidamente em princípio como árvore ornamental, mas é muito utilizada com fins medicinais em várias composições farmacológicas, tais como Novarrutina e Varicell Phyto, Venocur Fit, Hemorrimed, Varivax, entre outros (HARRIS et al., 2016). É descrita como uma árvore de caule ramificado, vertical e cilíndrico, de copa densa e regular com folhas pecioladas (Figura 6B), irregularmente dentadas com ponta obtusa, suas flores formam uma inflorescência piramidal ereta (Figura 6C) e pétalas branco-amareladas.

A espécie *A. hippocastanum* é a segunda em número de registros na ANVISA, sendo usada no tratamento de hemorróidas, varizes, diarreia, flebites, dismenorrea e hiperplasia prostática (ARAÚJO; CARVALHO, 2008; DUDEK-MAKUCH; STUDZIŃSKA-SROKA, 2015; FELIPE et al., 2013). Suas sementes, cascas e folhas são as partes mais utilizadas na fitoterapia. A composição química das sementes é de escina; outras saponinas (afrodescina, argirescina, criptoescina); taninos (ácido esculitânico, epicatequina, leucocianidina, leucodelfinina); pectina; leuceantocianina; potássio; óleo volátil; cálcio; fósforo; flavonoides (canferol, quercetina, rutina, astragalin e quercetina); heterosídeos cumarínicos (fraxina, escopolina, aesculetina, aesculosídeo e aesculina); óleos fixos (ácidos oléico, linoléico, palmítico, esteárico, e linolênico), bases nitrogenadas (guanina, adenina, e adenosina); alcaloides imidazólicos (alantoína); aminoácidos (arginina); ácidos orgânicos (cítrico, úrico); resina; vitaminas (B, C, K, caroteno e pró-vitamina D); proteínas e açúcares (HARRIS et al., 2016).

As propriedades venotônicas, vasoprotetoras, venotrópica, antiexudativa (inibindo a hialuronidase), antiedematosa, anticoagulante, anti-inflamatória, e antioxidante (inibindo a lipoperoxidação) da *A. hippocastanum* estão geralmente associadas a seus metabólitos secundários (ISSAKOWICZ, 2005; SIRTORI, 2001). Eles atuam reduzindo a permeabilidade e aumentando a resistência dos capilares melhorando a circulação, inibindo produtos da via do ácido araquidônico e agindo sobre a via do complemento. Além disso, esta planta possui atividades antigranulativa (ou seja, que impede a fibrinogênese), analgésica e antiviral (KEDZIERSKI et al., 2016; ZHANG; LI; LIAN, 2010).

3. METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

As sementes de *A. hippocastanum* foram obtidas em lojas de produtos naturais localizadas em Recife, Pernambuco. O acesso foi registrado (A2C6E1D) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado. As sementes foram trituradas com um martelo e o pó foi obtido utilizando liquificador. A farinha de sementes obtida foi estocada a -20 °C.

3.2 Aspectos éticos

O Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) aprovou o método de coleta de eritrócitos de coelho (processo nº. 23076.033782/2015-70) e de esplenócitos de camundongo (autorização nº 0048/2016).

3.3 Extração e Purificação de AhSL

Para preparação do extrato salino, 10 gramas da farinha de sementes foram adicionados a 100 mL de solução salina (NaCl 0,15 M na proporção de 10%, p/v) e a suspensão foi mantida sob agitação constante durante por 16 h a 28 °C utilizando uma barra magnética. O extrato das sementes foi obtido após filtração em gaze e centrifugação ($12.000 \times g$, 25 °C, 15 min, 25°C). Em seguida, o extrato foi dialisado com água destilada durante 4 h (com duas trocas do líquido) e liofilizado por aproximadamente 24 h a -50 °C. O extrato seco foi então ressuscitado em tampão de equilíbrio Tris (Tris-HCl 0,1M, pH 8,0) para uma concentração proteica de 1,0 mg/mL e aplicado em coluna de DEAE-Sephadex (GE Healthcare Life Sciences, Suécia) equilibrada com o tampão Tris. A eluição das proteínas foi monitorada seguindo a absorbância de 280 nm. As proteínas não-adsorvidas foram coletadas na etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio. As proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão Tris contendo NaCl 1,0 M. Todos os picos proteicos foram avaliados quanto às atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina (AIT) que estão descritas nas próximas seções. AhSL correspondeu ao pico de proteínas adsorvidas. A homogeneidade de AhSL foi avaliada em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para proteínas básicas

(REISFELD et al. 1962) ou ácidas (DAVIS 1962) usando géis de poliacrilamida de 10% (p/v). A concentração de proteínas ao longo das etapas de purificação foi determinada de acordo com o método de LOWRY et al. (1951).

3.4 Ensaio de atividade hemaglutinante (AH)

A AH foi realizada para monitorar a propriedade de ligação da lectina a carboidratos. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação (96 poços). A amostra (50 μ L) foi adicionada no segundo poço e, em seguida, foi realizada uma diluição seriada em NaCl 0,15 M. Então, foi adicionado em cada poço 50 μ L de uma suspensão (2,5% v/v) de eritrócitos de coelho, previamente tratados com glutaraldeído (BING et al. 1967). Após 45 min de incubação a 28 °C, a AH foi definida como o inverso da última diluição que promoveu total aglutinação. AH específica (AHE) correspondeu à razão entre AH e a concentração de proteínas (mg/mL).

3.5 Atividade inibidora de tripsina (AIT)

A atividade inibidora de tripsina foi determinada seguindo o efeito das amostras sobre a hidrólise do N- α -benzoyl-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) promovido pela enzima, gerando p-nitroanilina, cuja presença pode ser acompanhada pela leitura na absorbância de 405 nm. Uma solução de tripsina (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,1 mg/mL foi preparada em Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) contendo CaCl₂ 0,2M. Em uma microplaca de titulação, foram adicionados 50 μ L da amostra, 5 μ L da solução de tripsina e 140 μ L do tampão Tris. A placa foi incubada por 15 min a 28 °C e, em seguida, 5 μ L de 8 mM BAPNA foi adicionado. A leitura da absorbância a 405 nm foi realizada no tempo zero e após a incubação a 37 °C por 30 min. Para determinar a atividade 100% da tripsina, um ensaio foi realizado usando o tampão Tris como controle. Ensaios brancos (ausência de amostra, ausência de tripsina e substrato, ausência de tripsina) foram também realizados. Uma unidade de atividade inibidora de tripsina foi definida como a quantidade de inibidor que reduz a absorbância em 0,01 após 30 min de incubação. A atividade inibidora de tripsina específica foi definida como a razão entre o número de unidades e a quantidade de proteínas na amostra (mg).

3.6 Caracaterização de AhSL

3.6.1 Composição de subunidades

A composição de subunidades de AhSL foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) sob condições desnaturantes (10%, p/v), na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) (LAEMMLI, 1970). Marcadores de massa molecular (12-225 kDa, GE Healthcare Life Sciences) foram submetidos a eletroforese no mesmo gel. As bandas polipeptídicas foram reveladas com solução de Azul de Coomassie a 0,02% (v/v) em ácido acético a 10% (v/v).

3.6.2 Especificidade de ligação a carboidratos

A especificidade de ligação da AhSL a carboidratos foi avaliada através o ensaio de inibição da AH com monossacarídeos, dissacarídeos e glicoproteínas. AhSL foi previamente incubada por (30 min) com soluções de carboidratos a 200 mM (D-arabinose, D-glicose, D-frutose, D-fucose, D-galactose, D-manose, D-ramnose, D-ribose, D-lactose, D-maltose, *N*-acetyl-D-glicosamina, *N*-acetyl-D-galactosamina ou ácido *N*-acetyl-neuramínico) ou de glicoproteínas a 0,5 mg/mL (azocaseína, albumina sérica bovina, tireoglobulina) antes da adição dos eritrócitos. A AH na presença de açúcares foi comparada com os resultados na ausência destas moléculas.

3.6.3 Efeito de cátions na AH

Para avaliar os efeitos de cátions na AH de AhSL, a lectina foi incubada com diferentes cations divalentes, como CaCl_2 , MnCl_2 ou MgCl_2 a 20 ou 40 mM por 30 min em uma razão de 1:1 (v/v). Em seguida, a AH foi determinada.

3.6.4 Estabilidade térmica e frente a variação de pH

A estabilidade de AhSL frente a variações de temperatura e pH foi primeiramente avaliada pelo ensaio de AH. Aliquotas (100 μL) de AhSL (1,0 mg/mL) foram incubadas separadamente por 30 min em banho-maria a 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 °C e por 60 min a

100 °C. Então, foi avaliada a AH das amostras aquecidas. Para avaliar a estabilidade em diferentes valores de pH, AhSL (100 µL) foi incubada por 24 h nos tampões fosfato de citrato 0,1 M (pH 3,0 a 6,0), fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) ou Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0 e 9,0) e, em seguida, foi realizado o ensaio de AH.

Os efeitos de pH e temperatura na conformação de AhSL foram também avaliadas por análise fluorimétrica usando a sonda extrínseca bis-ANS [bis(8-anilidonaphthalene-1-sulfonate)]. As medidas de fluorescência foram realizadas utilizando as seguintes amostras de lectina (2,0 µM): AhSL em água; AhSL incubada por 24 h a pH 1.0 a 10.0; ou AhSL incubada por 30 min a 30° ou 100 °C. Em uma cubeta de quartzo (caminho óptico: 10 × 10 mm; Hellma GmbH & Co. KG, Alemanha), a sonda bis-ANS (excesso molar de 50 vezes) foi adicionada à amostra e teve seu espectro de emissão de fluorescência (400–600 nm) registrado em um espectrofluorímetro Jasco FP-6300 (Jasco Corporation, Japão) a 25 °C, usando um comprimento de onda de excitação de 360 nm. A ligação do bis-ANS foi avaliada pela área de intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias. O espectro do solvente foi descontado. Os espectros apresentados constituem uma média de 5 varreduras.

3.7 Avaliação da atividade imunomoduladora

3.7.1 Coleta de esplenócitos de camundongos e condições gerais do ensaio

Fêmeas de camundongos BALB/c (6–8-semanas de vida) foram obtidas do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco. Os camundongos foram anestesiados (xilazina a 10 mg/kg e quetamina a 115 mg/kg e sacrificados para remoção dos esplenócitos. Os esplenócitos foram obtidos como descrito por PROCÓPIO et al. (2018). A viabilidade das células foi determinada pelo método de exclusão com Azul de Trypan. Somente culturas com viabilidade > 98% foram usadas nos ensaios. Em todos os experimentos, o cultivo de células (10⁶ células/poço) foi realizado por 24 h usando meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo soro fetal bovino a 10% (v/v) e em uma atmosfera de 5% CO₂. Para as análises, células não tratadas ou tratadas com AhSL foram coletadas por centrifugação (450 × g, 4 °C, 10 min) e lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS). A plataforma FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA) foi usada para análises por citometria de fluxo e o número de eventos coletados foi de 20.000 por amostra. Dois experimentos independentes foram realizados em sextuplicata.

3.7.2 Ensaio de citotoxicidade

Os esplenócitos foram cultivados na ausência (controle) ou na presença de AhSL (3,12–50 µg/mL). A morte celular foi então analisada usando o kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II* (BD Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. A citometria de fluxo foi realizada na plataforma FACSCalibur (BD Biosciences). Os resultados foram analisados usando o software CellQuest Pro (BD Biosciences). As células coradas apenas com iodeto de propídio foram consideradas necróticas e as coradas apenas com anexina V foram registradas como apoptóticas. As células não coradas foram consideradas viáveis.

3.7.3 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) citosólicas e mitocondriais

Também foi empregada citometria de fluxo para avaliar os níveis de EROs no citosol e mitocôndrias de esplenócitos não tratados e tratados com AhSL (12,5 µg/mL). As sondas dihidroetídio (DHE; Sigma-Aldrich) e MitoSox Red (Thermo Fisher Scientific, EUA) foram utilizadas para determinar os níveis citosólicos e mitocondriais, respectivamente. Em placas de 24 poços, os esplenócitos não tratados e tratados foram incubados com DHE a 5 µM por 40 min ou MitoSox Red a 5 µM por 10 min. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas e o sedimento foi ressuspenso em PBS e transferido para tubos de citômetro. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram estabelecidos em 488 e 620 nm, respectivamente.

3.7.4 Determinação do potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células não tratadas e tratadas com AhSL foram determinadas usando a sonda MitoStatus (BD Biosciences). As células foram incubadas com 0,1 mM MitoStatus a 37 °C por 30 min. Após lavagem com PBS e centrifugação (300 × g, 25 °C, 5 min), as células foram submetidas ao citômetro de fluxo, configurados os comprimentos de excitação e emissão a 488 e 620 nm, respectivamente.

3.7.5 Quantificação de liberação de citocinas

As células foram cultivadas na ausência ou presença de AhSL (12,5 µg/mL) e os sobrenadantes foram depois coletados para quantificação de citocinas usando o kit *CBA (Cytometric Bead Array) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine* (Becton Dickinson Biosciences, USA). Foram analisados os níveis de interleucinas (IL) 2, 4, 6, 10 e 17A, fator de necrose tumoral alpha (TNF-α) e o interferon gama (IFN-γ). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante e os dados analisados usando o software FCAP 3.1 software (BD Biosciences). A curva padrão para cada citocina (0-5000 pg/mL) foi obtida e a faixa de detecção foi entre 2–5000 pg/mL.

3.7.6. Quantificação de liberação de óxido nítrico (NO)

Os sobrenadantes das culturas não tratadas e tratadas com AhSL (12,5 µg/mL) foram usados para avaliar os níveis de NO pelo método colorimétrico de Griess (DING et al. 1988). A concentração de NO foi estimada utilizando uma curva padrão (3,12-100 µmol/mL) e um espectrofotômetro de microplacas a 595nm.

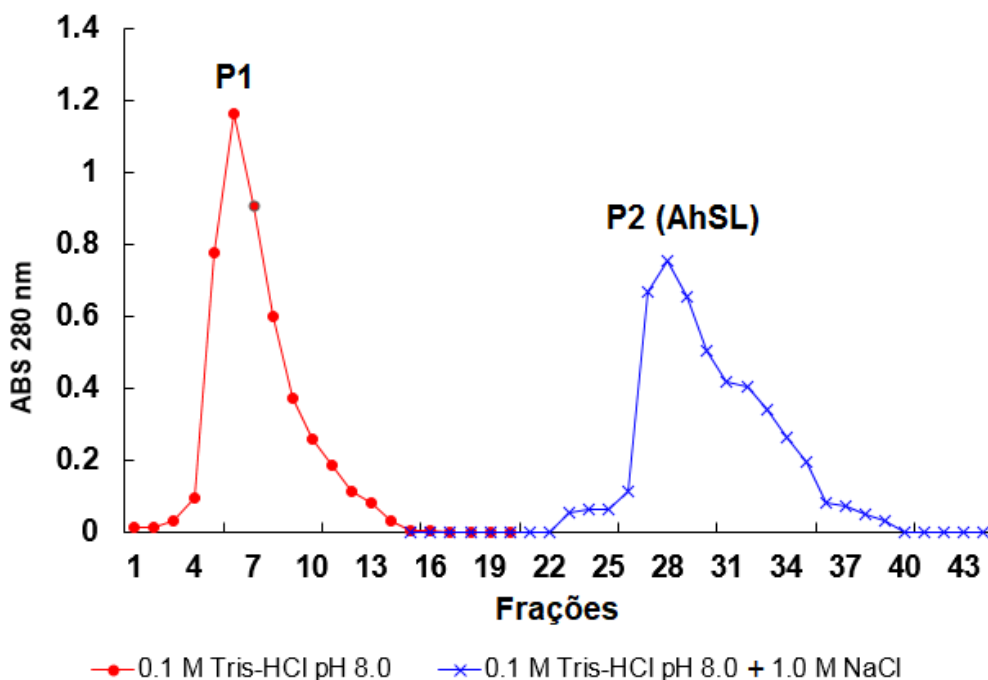
3.8 Análise Estatística

Os desvios-padrão (DP) foram calculados usando o programa GraphPad Prism 5.01 software GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os dados foram expressos utilizando testes não paramétricos. O teste Shapiro-Wilk foi usado para testar a hipótese de normalidade. As diferenças estatísticas entre dois grupos de dados foram analisadas pelo teste Wilcoxon ou por análise de variância (ANOVA) no caso de três ou mais grupos de dados. O nível de significância foi configurado em 95% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

O extrato salino de sementes de *A. hippocastanum* apresentou uma concentração proteica de 4.0 mg/mL e atividade hemaglutinante específica (AHE) de 140,8 (Tabela 3). O fracionamento com sulfato de amônio não resultou em aumento da AHE nas frações precipitadas e sobrenadantes, sendo então esta etapa eliminada. O extrato foi então aplicado em cromatografia de troca iônica utilizando a matriz DEAE-Sephadex. Foram observados um pico não adsorvido (P1) e depois um adsorvido (P2) (Figura 7), os quais foram avaliados quanto à AH e concentração de proteínas. Apenas P2 promoveu hemaaglutinação (AH: 9.690), correspondendo ao rendimento de purificação de 68,8 (Tabela 3). O processo de purificação, portanto, resultou em um aumento da AHE.

Figura 7. Isolamento da lectina de sementes de *Aesculus hippocastanum* (AhSL). Cromatografia do extrato bruto em matriz DEAE-Sephadex. P1 corresponde a proteínas não adsorvidas à matriz. P2 (AhSL) corresponde às proteínas adsorvidas e eluídas com NaCl 1,0 M.



A eletroforese em PAGE de AhSL, para proteínas ácidas (Figura 8A), revelou a única presença de uma única banda polipeptídica (Figura 8A) enquanto nenhuma banda foi detectada para proteínas nativas básicas, indicando a homogeneidade da proteína. A proteína

presente em P2 foi denominada AhSL e o sumário de purificação desta lectina está descrito na Tabela 3. SDS-PAGE, apresentou duas bandas polipeptídicas de 68 e 124 kDa (Figura 8B).

Figura 8. Purificação da lectina de sementes de *Aesculus hippocastanum* (AhSL). (a) Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) de AhSL para proteínas nativas ácidas (10%, p/v) (A). SDS-PAGE (10%, p/v) de AhSL em condições desnaturantes (B). Marcadores moleculares (MM) forma utilizados como padrões da eletroforese. Os géis foram corados com Azul de Coomassie 0,02% (v/v) em ácido acético a 10%.

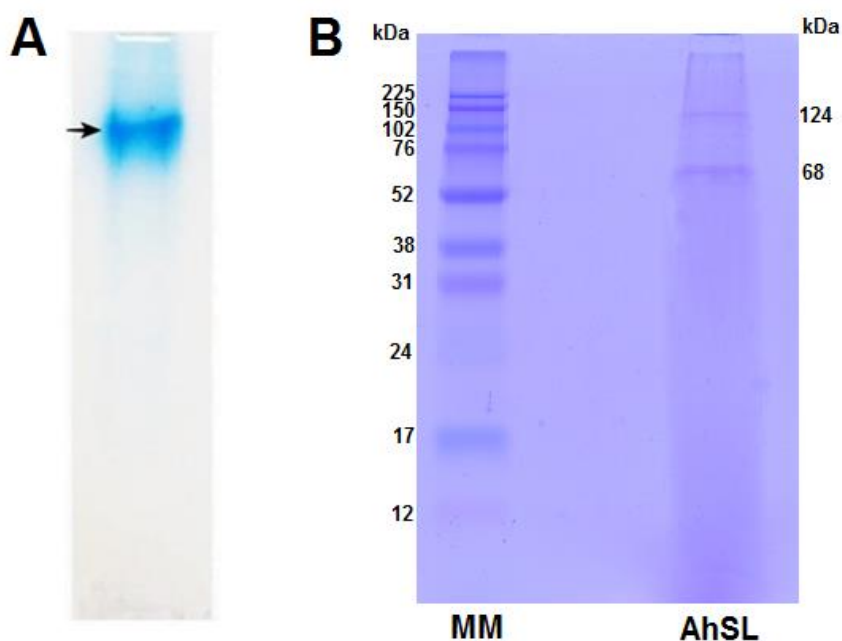


Tabela 3. Purificação da lectina de *A. hippocastanum* (AhSL) com base nas atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina.

Amostra	Proteína (mg/mL)	Atividade hemaglutinante (AH)			Atividade inibidora de tripsin (AIT)		
		Unidade	AH específica	Fator de purificação	Unidade	AIT específica	Fator de purificação
Extrato	0,9	128	140,81	1,0	14,95	149,57	1,0
AhSL	0,212	2048	9.690	68,8	4,57	1280,31	8,5

O fator de purificação foi calculado pela razão entre a atividade específica de AhSL e a do extrato.

A AH específica de AhSL foi totalmente inibida por tireoglobulina e praticamente abolida por ácido N-acetil-neuroamínico e albumina sérica bovina (AHE de 4,3), já pelos

carboidratos arabinose, manose, maltose e lactose a AHE foi reduzida em 75%, (Tabela 4). A presença de cátions bivalentes não modificaram qualquer efeito na habilidade de AhSL em aglutinar eritrócitos. O extrato e AhSL inibiram a atividade de tripsina (atividade específica de 149,5 e 1.280,3, respectivamente com fator de purificação: 8,5 para AhSL).

Tabela 4. Atividade hemaglutinante (AH) específica de AhSL na presença de carboidratos e glicoproteínas.

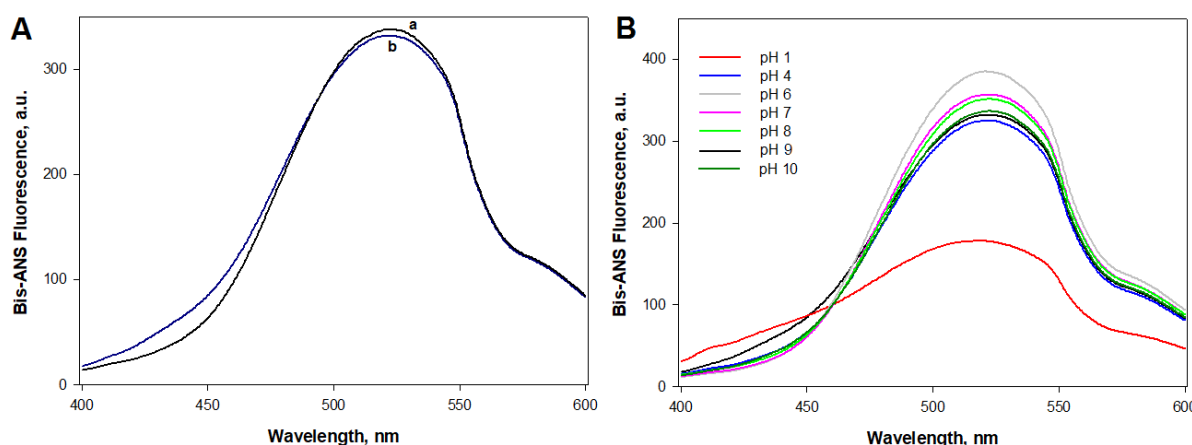
Carboidratos	AH específica
<i>Monossacarídeos (200 mM)</i>	
Arabinose	560
Frutose	1.120
Galatose	1.120
Glicose	1.120
Manose	560
Metil- α -D-glicopiranosídeo	1.120
N-acetil-glicosamina	1.120
Ácido N-acetil-neuroamínico	4,37
Ribose	1.120
<i>Dissacarídeos (200 mM)</i>	
Lactose	560
Maltose	560
<i>Glicoproteínas (0,5 mg/mL)</i>	
Azocaseína	2.240
Albumina sérica bovina	4,37
Tireoglobulina	0

AH específica de AhSL em NaCl 0,15 M na ausência de moléculas glicosiladas: 2.240.

AhSL mostrou ser uma proteína termoestável, pois a AHE não sofreu alterações após aquecimento em todas as temperaturas testadas. A AH também não foi modificada após incubação da lectina na faixa de pH 4,0 a 8,0. A estabilidade da conformação de AhSL com alterações de temperatura e de pH foi avaliada através de análise fluorimétrica utilizando a

sonda extrínseca bis-ANS. As análises revelaram que as amostras de AhSL, após aquecimento a 30°C e 100 °C (Figura 9A), indicando estabilidade conformacional a qual corrobora com os resultados do ensaio de estabilidade térmica da AH. A conformação de AhSL também revelou grande estabilidade quando esta proteína foi incubada em diferentes valores de pH, sendo detectada sua desnaturação somente no pH 1,0 (Figura 9B), com diminuição de sua fluorescência de bis-ANS devido à exposição dos centros hidrofóbicos à água. Os comprimentos máximos de onda de emissão e intensidades de fluorescência não variaram significativamente (Figura 9B) quando a AhSL foi incubada em todos os valores de pH testados. De fato, o AH da lectina não variou de acordo com alteração do pH do meio.

Figura 9. Efeitos da temperatura (A) e pH (B) na conformação de AhSL. A fluorescência da sonda extrínseca bis-ANS foi monitorada na presença de AhSL incubada por 30 min a 30 ou 100 °C ou por 24 h em pH 1.0 a 10.0.



AhSL (3,12–50 µg/mL) não foi citotóxica para esplenócitos de camundongo desde que a porcentagem de células apoptóticas e necróticas não foi significativamente diferente ($p > 0.05$) do controle (Figura 10A). O tratamento com AhSL (12,5 µg/mL) não induziu a despolarização da membrana mitocondrial (Figura 10B) e nem aumentou os níveis de EROs citosólicas e mitocondriais (Figuras 10C e 10D, respectivamente). A Figura 11 mostra que AhSL (12.5 µg/mL) induziu significativamente ($p < 0.05$) a liberação de IL-6I, L-10, , TNF- α e NO pelos esplenócitos.

Figura 10. Avaliação dos efeitos citotóxicos de AhSL sobre esplenócitos de camundongos BALB/c. (A) Análise por citometria de fluxo utilizando os marcadores anexina V e iodeto de propídio para determinar o número de células em apoptose ou necrose, respectivamente. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de seis experimentos. (B–D) Efeitos de AhSL (12,5 $\mu\text{g/mL}$) no potencial mitocondrial da membrana, $\Delta\Psi_m$ (B), bem como na produção de espécies reativas de oxigênio(ERO) citosólicas (C) e mitocondrial (D) em esplenócitos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

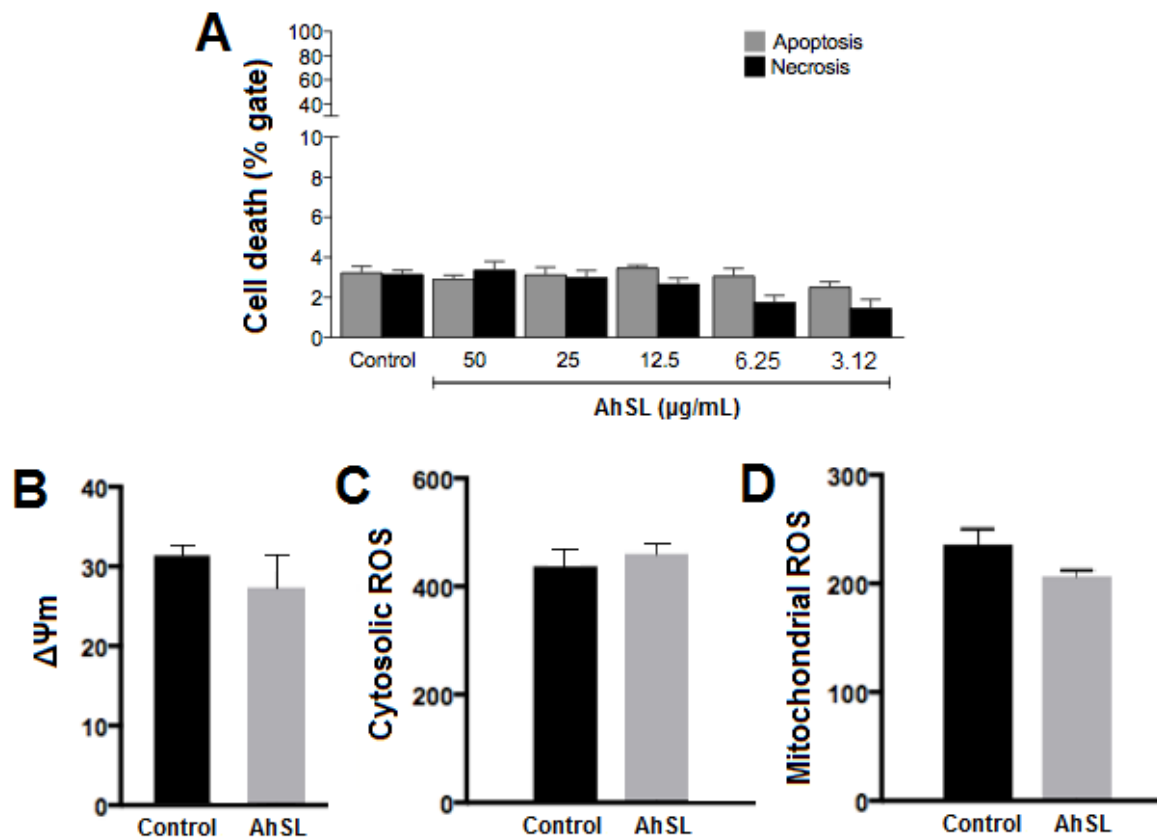
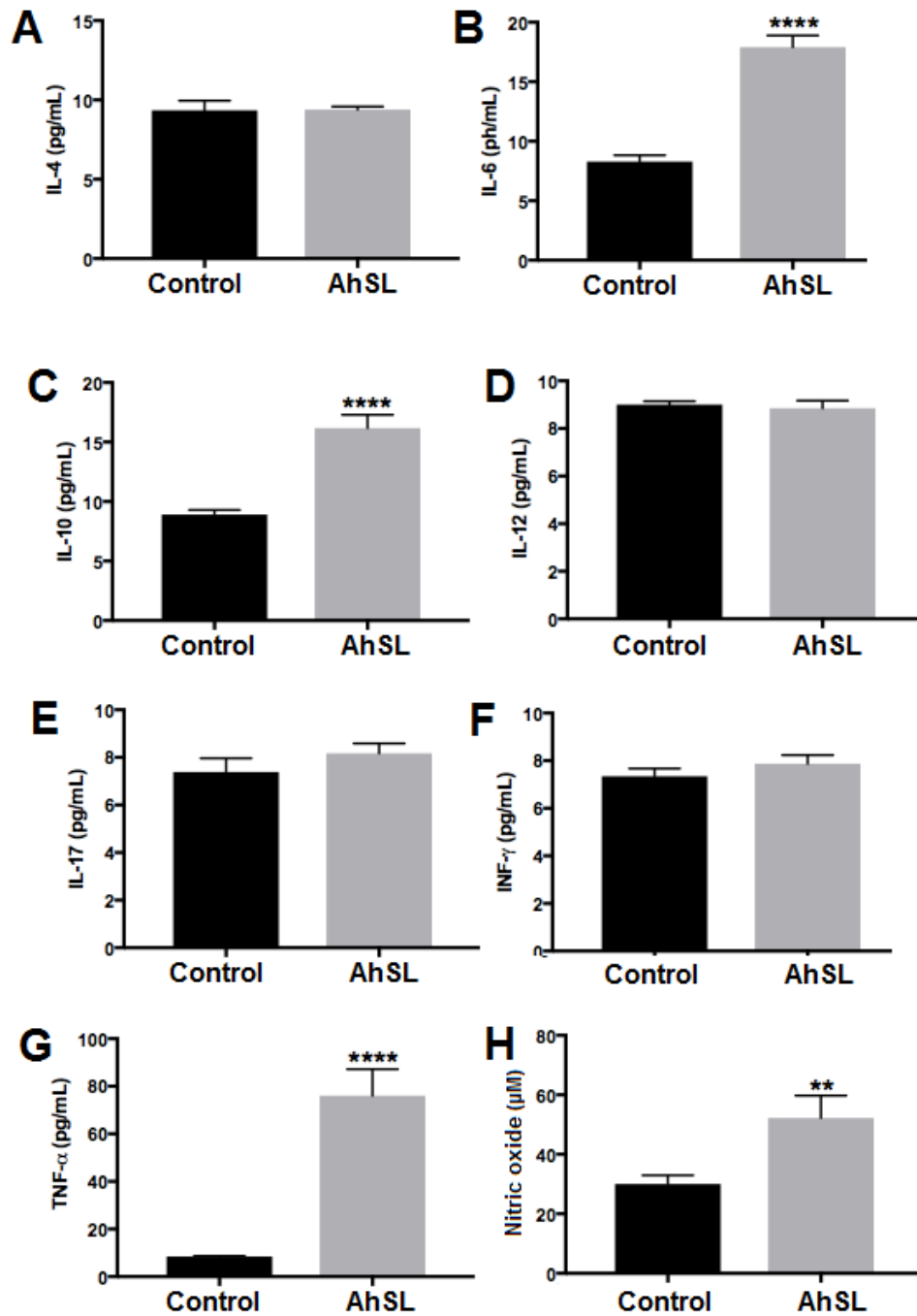


Figura 11. Efeitos de AhSL (12.5 $\mu\text{g/mL}$) na liberação de citocinas (A–G) e óxido nítrico (H) por esplenócitos de camundongos BALB/c. (*) $p < 0.01$. (**) $p < 0.0001$ (***).



5. DISCUSSÃO

Aesculus hippocastanum apresenta um amplo potencial terapêutico e diversos compostos bioativos, principalmente metabólitos secundários, têm sido identificados nesta espécie. Entretanto, há pouco relato sobre as bioatividades de suas proteínas. Neste presente estudo, descrevemos a purificação e caracterização de uma lectina das sementes de *A. hippocastanum* e seu potencial como agente imunomodulador.

A homogeneidade de AhSL foi revelada por PAGE para proteínas nativas ácidas, confirmando a sua natureza aniônica. SDS-PAGE revelou que AhSL é uma proteína de elevada massa molecular, com 124 kDa, e pode ser uma proteína composta de subunidades com aproximadamente 68 kDa. Antonjuk et al. (1993) descreveram a purificação de uma lectina de sementes de *A. hippocastanum* que mostrou uma massa molecular de 132 kDa em cromatografia de gel filtração e uma única banda polipeptídica de 32 kDa em SDS-PAGE. É possível que estes autores isolaram a mesma proteína que foi purificada por nós, mas eles não relataram mais dados que pudessem ser comparados com outras características encontradas até o momento para AhSL.

AhSL revelou ser uma proteína termoestável e ativa em uma ampla faixa de pH. Esta estabilidade pode ser uma vantagem da proteína em estudo, sugerindo que ela possa ser aplicada em diversas condições ambientais sem perda de sua funcionalidade de ligação a carboidratos. A AH de AhSL foi inibida principalmente pelo monossacarídeo ácido *N*-acetil-neuroamínico (componente do ácido siálico) e as glicoproteínas albumina sérica bovina e tireoglobulina. Lectinas ligadoras de ácido siálico são ferramentas analíticas potenciais para detecção, purificação, localização citoquímica e quantificação de resíduos de ácido siálico nas células (MANDAL e MANDAL, 1990). Algumas das cadeias oligossacarídicas ligadas à tireoglobulina contêm ácido siálico como resíduo terminal (ZĄBCZYŃSKA et al. 2018) e isso pode explicar a afinidade de AhSL por esta glicoproteína. As lectinas também têm sido empregadas com sucesso como ligantes imobilizados em matrizes para cromatografia de afinidade visando purificação de albumina e tireoglobulina (NAPOLEÃO et al. 2013). Essas podem ser algumas das futuras aplicações biotecnológicas para AhSL.

Estudos prévios sobre lectinas que também agem como inibidores de tripsina nos estimularam a avaliar se AhSL poderia apresentar esta propriedade. Devido sua capacidade de inibir protease e de se ligar a carboidratos, AhSL pode ser considerada uma proteína multifuncional, similarmente às lectinas como CrataBL (isolada da casca de *Crataeva tapia*) e

MvFL (isolada do fronde de *Microgramma vacciniifolia*) ambas atividades de lectinicas e inibidora de tripsina (FERREIRA et al. 2013; PATRIOTA et al. 2017).

AhSL não foi citotóxica para esplenócitos de camundongos indicando que as concentrações testadas poderiam ser utilizadas nos ensaios imunomoduladores. A ausência de alterações no potencial da membrana mitocondrial ou dos níveis de EROs citosólicas e mitocondriais corrobora com a ausência de efeitos tóxicos aos esplenócitos. A lectina dos folíolos de *Calliandra surinamensis* (CasuL) também não provocou estresse celular nem induziu a formação de radicais livres nos esplenócitos de camundongos (PROCÓPIO et al., 2018).

AhSL induziu a liberação de IL-6, IL-10, TNF- α e NO pelos esplenócitos. A IL-10 inibe a produção de outras citocinas por monócitos, granulócitos e células B, bem como inibe a ativação das células T, mostrando uma capacidade anti-inflamatória que pode ser explorada para controlar reações auto imunes e alergias. Por sua vez, a IL-6 estimula o crescimento, a diferenciação das células B e T e também a produção de anticorpos, de forma que estimulantes dessa citocina podem ser utilizados como coadjuvantes em vacinas (MELO et al., 2011; GUO et al., 2017). O fator de necrose tumoral, TNF- α , tem um efeito citotóxico sobre células tumorais, parasitas e bactérias, exibindo uma atividade pro-inflamatória que pode ser utilizada em terapias antitumorais, por exemplo (CROFT et al., 2013; GEIJTENBEEK e GRINGHUIS, 2016). O radical livre NO age como uma molécula pluripotente, tendo propriedades pró- e anti-inflamatórias, sendo o balanço entre estes dois efeitos dependente do local e da quantidade de produção. A indução da liberação de NO por lectinas têm sido correlacionada com efeitos antitumorais e modulação do sistema imune (PATRIOTA et al., 2019a).

Sendo assim, AhSL tem potencial para ser avaliada futuramente visando avaliar a aplicação potencial de sua estabilidade e de seus efeitos pró-inflamatórios que poderiam ser regulado ao mesmo tempo pelo estímulo da produção de IL-10. A lectina MvFL estimulou, in vitro, as PBMCs humanas a liberem TNF- α , IFN- γ , IL-6, e NO (PATRIOTA et al. 2017) e a lectina ApuL promoveu o aumento dos níveis de IL-6, IL-17A, IFN- γ , e TNF α (BRITO et al. 2017), em ambos os casos com concomitante estímulos da citocina regulatória IL-10, similarmente à AhSL.

AhSL também pode apresentar um potencial biotecnológico como um imunomodulador para ser usado em estudos com células imunes, similarmente à lectina das

folhas de *Schinus terebinthifolia*, a qual induziu predominantemente uma resposta pro-inflamatória em esplenócitos de camundongos (SANTOS et al., 2020).

Em resumo, uma proteína multifuncional chamada AhSL foi purificada das sementes de *A. hippocastamum*. AhSL mostrou ambas atividades de lectina e inibidora de tripsina, é uma proteína termoestável e mostrou atividade imunomoduladora in vitro sobre esplenócitos de camundongos. Estas características tornaram a AhSL uma proteína bioativa com potencial biotecnológico, estimulando estudos futuros.

6. CONCLUSÕES

- AhSL, foi isolada com fator de purificação e AHE elevados, é uma proteína acídica, termoestável, de massa molecular de aproximadamente 124 kDa e com afinidade por ácido *N*-acetilneuroamínico.
- AhSL demonstrou baixa citotoxicidade para esplenócitos de camundongo, não sendo capaz de induzir apoptose e necrose em todas as concentrações testadas.
- AhSL apresentou efeito imunomodulador sobre esplenócitos de camundongo, induzindo proliferação celular e liberação de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α) e de óxido nítrico.
- Os resultados obtidos estimulam estudos futuros *in vivo* relacionados à propriedade imunomoduladora de AhSL, como exemplo a atividade antitumoral.

REFERÊNCIAS

ADAMOVIĆ, L., MALINOVSKEĆ, L., WIMMEROVĆ, M. New Sensitive Detection Method for Lectin Hemagglutination using Microscopy. *Microscopy research and technique*, v. 77, p. 841–849, 2014.

AKHTAR, S. et al. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food chemistry*, v. 174, p. 417-425, 2015.

ALEXANDRE, R. F.; GARCIA, F.N.; SIMÕES, C. M. O. Fitoterapia Baseada em Evidências. Parte 2. Medicamentos Fitoterápicos elaborados com Alcachofra, Castanha-da-Índia, Ginseng e Maracujá. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 24, n. 2, p.310-314, 2005.

AL-MAMUN, M. A. et al. 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, p. 211–221, 2016.

ALMEIDA, ALYSSON CHAVES. Caracterização estrutural e biológica de uma lectina de sementes de *Centrosema tomentosum* GUILL. EX BENTH. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

ALVES, V. M. Frequência de aloanticorpos irregulares antieritrocitários em receptores de concentrados de hemácias atendidos com emergências médicas e/ou com doenças agudas no hospital de clínicas da uftm. 2010. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Patologia Clínica da UFTM, Uberaba, MG

AMBROSI, M. et al. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic & biomolecular chemistry*, v. 3, n. 9, p. 1593-1608, 2005.

ANTONJUK VA, NYSENLO ZN, EROKHINA EA, PISKAREV VE, SAKHAROV AM (1993) Carbohydrate specificity of lectin from horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *Glycoconjugate Journal* 10: 274.

ARAUJO, C S F; ARAUJO, T F S et al. Avaliação da toxicidade em camundongos e atividade artemicida da lectina foliar de Bauhinia monandra (BmoLL) Teoria e aplicações da microbiologia e biotecnologia. Capítulo 05, vol. 11, dezembro 2019.

ARAUJO, C. B. F. Síntese de derivados solúveis de β escina e algumas avaliações físico-químicas e biológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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.

ARNAUD, J; AUDFRAY, A; IMBERTY, A. Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. Chem Soc Ver. In press. 2013.

ATHAMNA, A. et al. Rapid identification of Mycobacterium species by lectin agglutination. Journal of Microbiological Methods, v. 65, n. 2, p. 209-215, 2006.

BARBOSA, P P S. Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de canavalia brasiliensis (feijão-bravo-do-Ceará). Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

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.

BARI, A. U. et al. Lectins from Parkia biglobosa and Parkia platycephala: A comparative study of structure and biological effects. International Journal of Biological Macromolecules, v. 92, p. 194–201, 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.

BATISTA, P F; et al. A lectina da casca da tapia *Crataeva* (CrataBL) é um quimioatraente para células endoteliais que tem como alvo o sulfato de heparano e promove a angiogênese in vitro. *Biochimie*. Volume 166, páginas 173-183, novembro de 2019.

BEZERRA, R F; Purificação e caracterização parcial da lectina presente no soro do peixe amazônico tambaqui (*Colossoma macropomum*), Tese de Doutorado em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2016.

BIES, C.; LEHR, C.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting : history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 56, p. 425–435, 2004.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia clínica*. V. 8, n. 2, p. 47-51, jun, 2007.

BING DH, WEYAND JGM, STAVISTSKY AB (1967) Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 124: 1166-1170.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2016. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_ .

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. Imuno-hematologia laboratorial / Ministério da Saúde, Secretaria de

Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Hospitalar e de Urgência. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRAZ FILHO, R. Construção da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRINKMANN, CR; JENSEN, L; DAGNAES-HANSEN, F; HOLM, IE; ENDO, Y; FUJITA, T; THIEL, S; JENSENIUS, JC; DEGN, SE. Mitochondria and the lectin pathway of complement. *JBC*, In Press. 2013.

BRITO, J S; FERREIRA GRS, KLIMCZAK E, GRYSHUK L, SANTOS NDL, PATRIOTALLS, MOREIRA LR, SOARES AKA, BARBOZA BR, PAIVA PMG, NAVARRO DMAF, LORENA VMB, MELO CML, CORIOLANO MC, NAPOLEÃO TH. Lectina das inflorescências de culturas ornamentais *Alpinia purpurata* atua nas células imunológicas para promover respostas Th1 e Th17, liberação de óxido nítrico e ativação de linfócitos *Biomedicina e Farmacoterapia*; volume 94, páginas 865-872, 2017

CAMPOS, J. K. L.; ARAÚJO, 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.

CARVALHO A. C. B., BALBINO E E, MACIEL A, PERFEITO J P. S. . Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(2): 314-319, Abr./Jun. 2008

CARVALHO, E V M M; et al. Lectinas como fatores estimulantes da mitose: revisadas brevemente. *Ciências da Vida*, volume 207, páginas 152-157, 2018.

CASTAÑO, J. et al. Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) starch: Basic physicochemical characteristics and use as thermoplastic material. *Carbohydrate Polymers*, v. 112, p. 677–685, 2014.

COELHO, L C B B; et al. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. Hindawi Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, volume 2017 , 22 pages, 2017.

CORDEIRO, B M P C; et al. Atividade anticriptocócica do extrato de hexano de *Spondias tuberosa* Arruda e eventos celulares associados. *Journal de Mycologie Médicale*, Volume 30, Edição 2 , Junho 2020.

CORIOLO, C M; et al. Efeitos imunomoduladores da lectina solúvel em água de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC). *Protein & Peptide Letters*, volume 25, Edição 3, 2018.

COSTA, E. C. B. da. Caracterização termodinâmica e funcional da proteína não estrutural 3 (ns3) do vírus da dengue do tipo 2. Tese de 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.

COULIBALY, F. S.; YOUAN, B. C. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Molecular Science*, v. 4, n. 1, p. 1–27, 2017.

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.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. *Opera Botanica*, v. 2, 555p, 1988.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. *Medicinal Research Reviews*, v. 36, p. 221–247, 2016.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment : Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 148, n. 2, p. 135–146, 2015.

DAVIS BJ (1962) Disc electrophoresis – II method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404-427.

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.

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.

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

DING AH, NATHAN CF, STUEHR DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *Journal of Immunology* 141: 2407-2412.

DITAMO, Y. et al. In vivo immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Food & function*, v. 7, p. 262–269, 2016.

DUDEK-MAKUCH, M.; STUDZIŃSKA-SROKA, E. Horse chestnut – efficacy and safety in chronic venous insufficiency: an overview. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 533–541, 2015.

FAIS, M.; KARAMANSKA, R.; RUSSELL, D. A.; FIELD, R. A. Lectin and carbohydrate microarrays : New high-throughput methods for glycoprotein , carbohydrate-binding protein and carbohydrate-active enzyme analysis. *Journal of Cereal Science*, v. 50, n. 3, p. 306–311, 2009.

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, p. 3828–3839, 2015.

FELIPE, M. B. M. C. et al. Evaluation of genotoxic and antioxidant activity of an *Aesculus hippocastanum* L. (Sapindaceae) phytotherapeutic agent. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, v. 3, p. 261–266, 2013.

FERREIRA RS, ZHOU D, FERREIRA JG, SILVA MCC, SILVA-LUCCA RA, MENTELE R, PAREDES-GAMERO EJ, BERTOLIN TC, CORREIA MTS, PAIVA PMG, GUSTCHINA A, WLODAWER A, OLIVA MLV. Crystal structure of *Crataeva tapia* bark protein (CrataBL) and its effect in human prostate cancer cell lines. *PLoS ONE* 8: e64426, 2013.

FERREIRA, F. R. B. et al. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic, and hemolytic activities from venom of the spider *Lasiadora* sp. *Toxicon*, v. 122, p. 119–126, 2016.

FERREIRA, G R S; BRITO, J S; et al. Potencial antimicrobiano da lectina de *Alpinia purpurata* (ApuL): ação inibidora do crescimento, efeitos sinérgicos em combinação com antibióticos e atividade de antibiofilme. *Patogênese Microbiana*, volume 124, páginas 152-162, novembro de 2018.

FIGUEIREDO, J.G.; DA SILVEIRA BITENCOURT, F.; BESERRA, I.G.; TEIXEIRA, C.S.; LUZ, P.B.; BEZERRA, E.H.; MOTA, M.R.; ASSREUY, A.M.; DE QUEIROZ CUNHA, F.; CAVADA, B.S.; DE ALENCAR, N.M. Antinociceptive activity and toxicology of the lectin from *Canavalia boliviana* seeds in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, Fortaleza, v. 380, n. 5, p. 407-14, 2009b.

FILHO, G.; NETO, A. Boheman em feijão-fava armazenado. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 16, n. 3, p. 499–504, 2014.

FIRMINO, THIAGO VÉRAS CAVALCANTI. Lectinas conjugadas a quantum dots na avaliação de glicofenótipos das neoplasias prostáticas. . Recife, 2018. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2018.

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

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.

GEIJTENBEEK TB, GRINGHUIS SI (2016) C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 16: 433-448.

GOMES, F. S. et al. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, p. 672–679, 2013.

GONDIM, A. C. S. Atividade antitumoral e antiviral de lectinas de Leguminosas (Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinae): ConBr, ConM, DLasiL e DSclerL. 2014. 135 f. Tese em Bioquímica-Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2014.

GORAKSHAKAR, A. C.; GHOSH, K. Use of lectins in immunohematology Lectins in Immunohematology Determinants of ABO , MN , and P Blood Group Systems Anti-A Anti-B. *Asian Journal of Transfusion Science*, v. 10, n. 1, p. 12–21, 2016.

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

GUO M, TANG X, SHENG X, XING J, ZHAN W (2017) The Immune Adjuvant Effects of Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Interleukin-6 on E. tarda Subunit Vaccine OmpV.

HAMID, R. et al. Lectins: Proteins with diverse applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 3, p. 93–103, 2013.

HARRIS, A. J. et al. Testing the monophyly of *Aesculus* L. and *Billia* Peyr., woody genera of tribe Hippocastaneae of the Sapindaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 102, p. 145–151, 2016.

HASHIM, O. H.; JAYAPALAN, J. J.; LEE, C. Lectins : an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, v. 5, p. 1–30, 2017.

HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular Abstract. *Journal of Cancer Research and Practice*, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.

HUANG, X.; LI, W.; JIN, M.; MA, F.; HUANG, Y.; SHI, Y.; ZHAO, L.; FENG, J.-L.; REN, Q.; WANG, W. Single CRD containing Lectin from *Macrobrachium rosenbergii* (MrLec) participates in innate immunity against pathogen infections. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 51, p. 282–290, 2016.

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.

ISSAKOWICZ, R. F. Castanha da Índia. Ponta Grossa, 2005. Disponível em: <https://www.uepg.br/fitofar/dados/Castanha%20da%20%C3%8Dndia.pdf>

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.

KARLIŃSKI, L. et al. Fine root parameters and mycorrhizal colonization of horse chestnut trees (*Aesculus hippocastanum* L.) in urban and rural environments. *Landscape and Urban Planning*, v. 127, p. 154–163, 2014.

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

KEDZIERSKI, B. et al. Impact of harvest time of *Aesculus hippocastanum* seeds on the composition, antioxidant capacity and total phenolic content. *Industrial Crops and Products*, v. 86, p. 68–72, 2016.

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.

KEYAERTS et al. Plant lectins are potente inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle. *Antiviral Rev.* V. 3, p.179-87. 2007.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview,” *Biochimica et Biophysica. Acta*, vol. 1572, n. 2-3, pp. 187–197, 2002.

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.

KUMAR, B. S. G. .; SUROLIA, A. Comprehensive analysis of α 2 – 3-linked sialic acid specific *Maackia amurensis* leukagglutinin reveals differentially occupied N -glycans and C-terminal processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 94, p. 114–121, 2017.

KUMAR, R.; KUMAR, A. N.; SRIVASTAVA, A. Breast cancer tumor markers. *Journal of Solid Tumors*, v. 2, n. 1, p. 43–46, 2012.

LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

LAM, Sze Kwan & NG, Tzi Bun. Lectins: production and practical applications. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2011.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci*, v. 5, p. 1–16, 2014.

LIMA, A.L., RODRIGUES, D.P., ARAÚJO, M.S., REIS, E.M.F., FESTIVO, M.L., RODRIGUES, E.C.P., LÁZARO, N. S. Sorovares e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 68, n. 1, p. 39–47, 2016.

LIU, F. et al. Complement and HIV-1 infection/ HIV associated neurocognitive disorders. *J Neurovirol.* V. 20, p. 184-98, 2014

LLOP, E.; FERRER-BATALLÉ, M.; BARRABÉS, S.; GUERRERO, P. E.; RAMÍREZ, M.; SALDOVA, R.; RUDD, P. M.; ALEIXANDRE, R. N.; COMET, J.; LLORENS, R.; PERACAULA, R. Improvement of Prostate Cancer Diagnosis by Detecting PSA Glycosylation-Specific Changes. *Theranostics*, v. 6, n. 8, p. 1190–1204, 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. et al. Ricin. *Toxicological Reviews*, v. 22, p. 53–64, 2003.

MAAG, D. et al. Defensive weapons and defense signals in plants: Some metabolites serve both roles. *BioEssays*, v. 37, p. 167–174, 2015.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

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.

MAHALIGAM, A et al. Activity and safety of synthetic lectin based on benzoboroxole-functionalized polymers for inhibition of HIV entry. *Mol. Pharmaceutics*. V. 8, P. 2465-2475. 2011.

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.

MANDAL C, MANDAL C (1990) Sialic acid binding lectins. *Experientia* 46: 433-441.

MARANHÃO, P. A. C. et al. cDNA cloning, molecular modeling and docking calculations of L -type lectins from *Swartzia simplex* var. *grandiflora* (Leguminosae, Papilionoideae), a member of the tribe Swartzieae. *Phytochemistry*, v. 139, p. 60–71, 2017.

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.

MARQUEZIN, C A. Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo. Tese de doutorado em física aplicada a medicina e biologia- Faculdade de filosofia, ciências e letras/USP, Ribeirão Preto, SP, 2008.

MATIĆ, I. Z.; ALJANČIĆ, I.; I AK, .; 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.

MEAGER, A. Measurement of cytokines by bioassays: theory and application. *Method*. V. 38, n. 4, p. 237-252, apr, 2006.

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.

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.

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.

MUSZYNSKA, B.; GRZYWACZ-KISIELEWSKA, A.; KALA, K.; GDULA-ARGASINSKA, J. Anti-inflammatory properties of edible mushrooms : A review. *Food Chemistry*, v. 243, p. 373–381, 2018.

NAPOLEÃO, Thiago Henrique. Atividade inseticida e mecanismos de ação de lectinas de *Myracrodruon urundeuva* contra *Nasutitermes corniger*, *Aedes aegypti* e *Sitophilus zeamais*. Recife, 2012. 142f. : Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Bioquímica e Fisiologia, 2012.

NAPOLEÃO TH, SANTOS-FILHO TG, PONTUAL EV, FERREIRA RS, COELHO LCBB, PAIVA PMG (2013) Affinity matrices of *Cratylia mollis* seed lectins for isolation of glycoproteins from complex protein mixtures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 744-755.

NASCIMENTO, K. S.; CUNHA, A. I.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. An overview of lectins purification strategies †. *Journal of Molecular Recognition*, v. 25, n. April, p. 527–541, 2012.

NASCIMENTO, K. S.; SANTIAGO, M. Q.; PINTO-JUNIOR, V. R.; OSTERNE, V. J. S.; MARTINS, F. W. V.; NASCIMENTO, A. Pa. M.; WOLIN, I. A. V.; HEINRICH, I. A.; MARTINS, M. G. Q.; SILVA, M. T. L.; LOSSIO, C. F.; ROCHA, C. R. C.; LEAL, R. B.; CAVADA, B. S. Structural analysis of Dioclea lasiocarpa lectin : A C6 cells apoptosis-inducing protein. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 92, p. 79–89, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios De Bioquímica De Lehninger*. Editora sarvier, 6ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2014.

NG, T B; WONG, J; TSE, R; TSE, T F; CHANN, H. *Hemaglutininas: Estruturas, Funções e Mecanismos. Tendências de pesquisa em bioquímica*. Editora: Nova, 2019.

NGUYEN, C. T. et al. Computational analysis of the ligand binding site of the extracellular ATP receptor, DORN1. *PLoS ONE*, v. 11, n. 9, p. 1–20, 2016.

NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. Chapter 37 Microbial Lectins : Hemagglutinins , Adhesins , and Toxins. *National Library of Medicine*, n. Chapter 37, p. 1–7, 2018.

OLIVEIRA, A P S; LIMA, T A ; et al. Avaliação da atividade inseticida do extrato e lectina de sementes de Moringa oleifera (WSMoL) contra Sitophilus zeamais. *Journal of Stored Products Research*, Volume 87 , maio de 2020.

OLIVEIRA, A S. Produção e caracterização físico-química e biológica da cadeia alfa da lectina recombinante de canavalia brasiliensis. Tese de Doutorado- Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Centro de ciências agrárias, Ceará, 2017.

OLIVEIRA, F W; CABRERA, M P; SANTOS, N R M; et al. Avaliando perfis de glicose e manose em espécies de Candida usando pontos quânticos conjugados com a lectina de Cramoll como nanoprobos fluorescentes. *Pesquisa Microbiológica* Volume 230, Janeiro 2020.

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.

PAIVA, P. M. G. et al. *Lectins and Trypsin Inhibitors from Plants: Biochemical Characteristics and Adverse Effects on Insect Larvae*. first ed, Nova Science Publishers Inc , Nova York, 52p, 2013.

PAIVA, P. M. G. et al. Plant compounds with *Aedes aegypti* larvicidal activity and other biological properties. *Bioprocess Sciences and Technology*, cap. 11, p. 271–296, 2011.

PAIVA, P. M.; PONTUAL, E. V; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Effects of Plant Lectins and Trypsin Inhibitors on development , morphology and Biochemistry of Insect Larvae . Nova Science Publishers, v. 3, n. 2, p. 37–55, 2015.

PAN, S. et al. Isolation and characterization of a novel fucose-binding lectin from the gill of bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 133, n. 2, p. 154-164, 2010.

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 TF, BRITO JS, SEBAG V, OLIVEIRA APS, SOARES AKA, MOREIRA LR, LIMA TA, SOARES T, SILVA TD, PAIVA PMG, LORENA VMB, MELO CML, ALBUQUERQUE LP, NAPOLEÃO TH. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 103, p. 36–46, 2017.

PATRIOTA LLS, BRITO JS, BARBOZA BR, PAIVA PMG, MELO CML, NAPOLEÃO TH (2019a) A review on the immunomodulatory effects of plant lectins. In: Ng TB, Wong J, Tse R, Tse TF, Chan H (ed) *Hemagglutinins: structures, functions and mechanisms*. Nova Science Publishers, New York, pp 53-82.

PENG, H.; LV, H.; WANG, Y.; LIU, Y.; LI, C.; MENG, L.; CHEN, F.; BAO, J. Clematis montana lectin , a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. *Peptides*, v. 30, p. 1805–1815, 2009.

PEREIRA R. ; SILVA A L C. Uma revisão do potencial biotecnológico de lectinas do gênero Canavalia e Dioclea. *Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management*, v. 15, n. 3, jul/set 2019 ISSN 1983-4209 revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm184

PINTO, M. dos S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. de. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. *Brazilian Journal of Biosciences*, v. 9, n. 2, p. 241–248, 2011.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the Dioclea lasiophylla Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. *Biochimie*, v. 135, p. 126–136, 2017b.

PINTO-JUNIOR, V. R. et al. Structural studies of a vasorelaxant lectin from Dioclea reflexa Hook seeds: Crystal structure, molecular docking and dynamics. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 12–23, 2017a.

POHLEVEN, J.; RENKO, M.; MAGISTER, S.; SMITH, D. F.; KUNZLER, M.; STRUKELR, B.; TURK, D.; KOS, J.; SABOTIC, J. Bivalent Carbohydrate Binding Is Required for Biological Activity of Clitocybe nebularis Lectin (CNL), the N , N - Diacetyllactosediamine (GalNAc $\square$ 1 – 4GlcNAc , LacdiNAc) - specific Lectin from Basidiomycete *C . nebularis*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 13, p. 10602–10612, 2012.

POL-FACHIN, L. Insights into the effects of glycosylation and the monosaccharide binding activity of the plant lectin CrataBL. *Glycoconjugate Journal*, 15 mar. 2017.

PONRAJ, T.; PAULPANDI, M.; VIVEK, R.; VIMALA, K.; KANNAN, S. Protein regulation and apoptotic induction in human breast carcinoma cells (MCF-7) through lectin from G. beaults. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 30, p. 1–11, 2016.

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. et al. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 98, p. 419–429, 2017.

PROCÓPIO, T. F. Purificação, caracterização e avaliação de atividades biológicas de lectina de folhas de *Calliandra surinamensis* Benth. (FABACEAE). Tese de Doutorado em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2018.

PROCÓPIO TF, PATRIOTA LLS, BARROS BRS, AGUIAR LMS, LORENA VMB, PAIVA PMG, MELO CML, NAPOLEÃO TH (2018) *Calliandra surinamensis* lectin (CasuL) does not impair the functionality of mice splenocytes, promoting cell signaling and cytokine production. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 107: 650-655.

QU, M. et al. Purification of a secreted lectin from *Andrias davidianus* skin and its antibacterial activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 167, p. 140-146, 2015.

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, D B M; et al. Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do extrato de folhas de *Schinus terebinthifolia* e lectina (SteLL) em camundongos com sarcoma 180. *Jornal de Etnofarmacologia*. Volume 233, páginas 148-15, abril de 2019.

RAMSLAND, P. A.; YURIEV, E.; HOLIEN, J. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review. *Journal of Molecular Recognition*, v. 28, n. 10, p. 581–604, 2015.

REISFELD RA, LEWIS UJ, WILLIAMS DE (1962) Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature* 195: 281-283.

RIBEIRO, I A T A; SILVA, R S; SILVA, A G S; et al. Caracterização química e efeito inseticida contra *Sitophilus zeamais* (gorgulho do milho) de óleo essencial de folhas de *Croton rudolphianus*. *Proteção de Cultivos*, volume 129 , Março 2020.

RIVANOR, R L C. Lectina da alga *Caulerpa cupressoides*: caracterização parcial, eficácia e possíveis mecanismos envolvidos na hipernocicepção inflamatória da articulação temporomandibular de rato. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Fortaleza, 2017.

SÁ, R. A. et al. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 149, p. 300–306, 2009.

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.

SANTOS, A. F. S. et al. Strategies to Obtain Lectins from Distinct Sources. In: *Advances in Medicine and Biology*. Nova Science Publishers, Inc., v. 63, p. 34–60, 2013.

SANTOS, AJCA, DA SILVA BARROS, BR, DE SOUZA AGUIAR, LM et al. A lectina foliar de *Schinus terebinthifolia* (SteLL) é um agente imunomodulador, alterando a liberação de citocinas pelos esplenócitos de camundongos. *3 Biotech* 10, 144 (2020).

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.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of Carbohydrate Recognition by Legume Lectins : Size of the Combining Site Loops and their Primary Specificity. p. 433–445, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v. 14, n. 11, p. 53–62, 2004.

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 OLIVEIRA F., Atividade moduladora de lectina isoladas das sementes de *Canavalia Brasiliensis* Tese (Doutorado em Ciência animal) - Centro de morfologia e fisiologia animal, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SILVA, M. C. C. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novellectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 1049–1059, 2012.

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.

SIRTORI, C.R. Aescin: Pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacological Research* . V. 44, n. 3, p 183-193, 2001.

SOUZA, L. J.; MOMESSO, L. S. *Aesculus hippocastanum* (CASTANHA-DA-ÍNDIA): DESCRIÇÃO BOTÂNICA, POTENCIAL TERAPÊUTICO E CONTROLE DE QUALIDADE - UMA REVISÃO. Disponível em: https://cic.unifio.edu.br/anaisCIC/anais2018/pdf/10_15.pdf

SRIKANTH, S.; CHEN, Z. Plant Protease Inhibitors in Therapeutics-Focus on Cancer Therapy. *Frontiers in Pharmacology*, v. 7, p. 1-19, 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.; IVKOVIĆ, I. P.; PETRUŠIĆ, V. .; 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.

ŠULÁK, O. et al. Burkholderia cenocepacia bc21-c is a super lectin with dual specificity and proinflammatory activity. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 9, 2011.

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.

TANIGUCHI, M. et al. Antimicrobial activity and mechanism of action of a novel cationic-helical octadecapeptide derived from amylase of rice. *Biopolymers*, v. 104, p.73–83, 2015.

THAKUR, A. et al. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: Lectin from *Ganoderma lucidum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1770, n. 9, p. 1404-1412, 2007.

TRACEY, W. D. Nociception. *Current Biology*, v. 27, n. 4, p. R129–R133, 2017.

TSUTAE, F. M. Espectroscopia de correlação de fluorescência aplicada em estudos de sistemas moleculares, biológicos e celulares. Tese de doutorado – Universidade de São Paulo, Programa de pós graduação em física aplicada, Instituto de física de São Carlos, SP, 2016.

VAINAUSKAS, S. et al. Profiling of core fucosylated N-glycans using a novel bacterial lectin that specifically recognizes α 1,6 fucosylated chitobiose. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-12, 2016.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, v. 72, n. 13, p. 1538–1550, 2011.

VARROT, A. et al. Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Current opinion in structural biology*, v. 23, n. 5, p. 678-685, 2013.

VERLI et al. Bioinformática: da Biologia Molecular à Flexibilidade Molecular. Centro de Biotecnologia, UFRGS, 2014.

VOLKART, P. A.; SPAGIARI, M. S.; BIZANI, D. AGENTES CONTROLADORES DO CRESCIMENTO DE USO HOSPITALAR. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, v. 20, n. 1, p. 25–32, 2017.

WANG, C.; HE, X. Supramolecular glycorhodamine-polymer dot ensembles for the homogeneous , fluorogenic analysis of lectins. *Carbohydrate Research*, v. 455, p. 1–4, 2018.

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.

YAU, T. et al. Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 20, p. 3791–3810, 2015

ZĄBCZYŃSKA M, KOZŁOWSKA K, POCHĘĆ E (2018) Glycosylation in the thyroid gland: vital aspects of glycoprotein function in thyrocyte physiology and thyroid disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2792.

ZHANG, L.; LUO, S.; ZHANG, B. The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins. *MABS*, v. 8, n. 3, p. 524–535, 2016.

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.

ZHANG, Z.; LI, S.; LIAN, X.-Y. An Overview of Genus *Aesculus* L.: Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacological Activities. *Pharmaceutical Crops*, v. 1, p. 24–51, 2010.

ZHANG, Z.; PENG, H.; LI, C.; LIU, J.; ZHOU, T.; YAN, Y.; LI, Y.; BAO, J. Polygonatum cyrtonema lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis via a caspases dependent pathway as compared to *Ophiopogon japonicus* lectin. *Phytomedicine*, v. 18, p. 25–31, 2010.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual review of entomology*, v. 60, p. 233–252, 2015.

ZIATABAR, S.; ZEPF, J.; RICH, S.; DANIELSON, B. T.; BOLLYKY, P. I.; STERN, R. Chitin, chitinases, and chitin lectins: Emerging roles in human pathophysiology. *Pathophysiology*, v. 934, p. 1–34, 2018.

ZUO, Z.; FAN, H.; WANG, X.; ZHOU, W.; LI, L. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. *SpringerPlus*, v. 1, n. 13, p. 1–9, 2012.

