

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

Jannyson José Braz Jandú

**Atividade Imunomoduladora de Lectinas de *Cratylia mollis* (pcramoll) em modelo
de Infecção por *Cryptococcus gattii***

RECIFE –PE

2015

Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Ciências Biológicas

Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

Jannyson José Braz Jandú

**Atividade Imunomoduladora de Lectinas de *Cratylia mollis* (pcramoll) em modelo
de Infecção por *Cryptococcus gattii***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientador: Daniel de Assis Santos

RECIFE –PE

2015

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Jandú, Jannyson José Braz

Atividade imunomoduladora de lectinas de *Cratylia* (pcramoll) em modelo de infecção por *Cryptococcus gattii* / Jannyson José Braz Jandú. – Recife: O Autor, 2015. 88 f.: il.

Orientadores: Maria Tereza dos Santos Correia, Daniel de Assis Santos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Micose 2. Fungos 3. Pulmões – Doenças fúngicas 4. Lectinas I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Santos, Daniel de Assis (coorient.) III. Título.

616.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-240

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JANNYSON JOSÉ BRAZ JANDÚ

**Atividade Imunomoduladora de Lectinas de *Cratylia mollis* (pcramoll) em modelo
de Infecção por *Cryptococcus gattii***

APROVADO EM 04/08/2015 POR:

Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia (UFPE)
Presidente e Primeira Examinadora Interna

Profª Drª Rejane Pereira Neves (UFPE)
Primeira Examinadora Externa

Profª Drª Regina C. B. Q. de Figueiredo (CPqAM- FioCruz)
Segunda Examinadora Externa

RECIFE

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neise Maria Braz Jandú e Severino Abdias Braz Jandú, por ensinarem o valor do conhecimento e pelo apoio para que tudo fosse possível na minha vida. Agradeço por todo o esforço que vocês fizeram e ainda fazem para me proporcionar uma vida de qualidade e grandes oportunidades.

Ao meu irmão, Jard Braz Jandú, por participar do meu dia-a-dia.

Aos familiares mais próximos, pela admiração a cada conquista e apoio.

À Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal de Minas Gerais, como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco.

À minha orientadora, professora Maria Tereza dos Santos Correia, pelo acolhimento, paciência, incentivo, principalmente, pela confiança. Juntamente à professora Márcia Vanusa da Silva. Ao meu co-orientador Daniel de Assis Santos, por todo apoio e conhecimento, além de confiança. Obrigado pela oportunidade de trabalhar com pessoas tão competentes e admiráveis.

Aos professores e funcionários do Centro de Ciências Biológicas, pela dedicação e ajuda sempre tão oportuna.

À professora Maria Aparecida Resende, e todos os alunos do laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela amizade e ajuda.

Agradeço a Raiana Apolinário, Lorena Vivien, Daniele Letícia, Hellem Carneiro, Gabriela, Rodrigo, Vanessa e Rafael Bastos por todo apoio, conhecimento, confiança e carinho.

Em especial a Fernanda Andrade, Marliete Carvalho, Julliana Ribeiro, Noelly Queiroz e Thaís Magalhães que contribuíram bastante no desenvolvimento deste projeto.

Aos meus grandes amigos por serem meus amigos.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica, Laboratório de Glicoproteínas e Biologia Molecular pela amizade e ajuda.

RESUMO

Cryptococcus gattii é um dos principais agentes da criptococose em indivíduos saudáveis, e para o tratamento da infecção, drogas antimicóticas em monoterapia ou em associação são utilizadas. Todavia, à toxicidade dessas drogas e o crescente aparecimento de linhagens resistentes impulsiona a busca por novas terapias que sejam eficientes e que causem menos efeitos colaterais. Para isso, estudos *in vitro* e modelos experimentais no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas são utilizadas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito imunomodulador de pCramoll em modelo de infecção intratraqueal por *C. gattii*, analisando parâmetros como carga fúngica nos órgãos alvos, quantificação nos níveis dos fatores inflamatórios envolvidos na doença, como a influência da pCramoll na fagocitose de *C. gatti*. Após escolha terapêutica mais efetiva, na qual pCramoll sozinha ou combinada a fluconazol a 20mg.kg⁻¹ aumentam a sobrevida dos animais infectados, foi observado uma influência expressiva na morbidade dos animais tratados, melhorando aspectos como (estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autonômica, tônus e força muscular e função reflexo/sensorial). Com os tratamentos propostos também houve diminuição de carga fúngica pulmonar e cerebral com 15 e 35 dias pós-infecção. E modulação nos níveis de CXCL/KC, IL-10 e IL-17 como do infiltrado inflamatório. *In vitro*, pCramoll estimulou a fagocitose de *C. gattii* por macrófagos de medula, com grande produção de espécies reativas do oxigênio, diminuindo a proliferação intracelular fúngica. Os achados mostram que a combinação de pCramoll com fluconazol é uma alternativa terapêutica viável frente a criptococose, aumentando a sobrevida e principalmente melhorando a morbidade dos animais infectados.

PALAVRAS-CHAVE: Criptococose, Lectinas, Lectina de *Cratylia mollis*, Fluconazol, Sobrevida

ABSTRACT

Cryptococcus gattii is the main agent of cryptococcosis in healthy individuals and for the treatment of infection antimycotic drugs in monotherapy or in association are utilized. However, the toxicity these drugs and the increasing appearance of resistant strains, driven the search for news therapy that are more effectives and the cause fewer collateral effects. For this, in vitro studies and experimental models for development of new therapeutic strategies are used. Thus, this work aimed to evaluate the immunomodulatory effect of pCramoll in intratracheal infection model with *C. gattii*, analyzing parameters as fungal charge in the target organs, quantifying the levels of inflammatory factors involved in the disease, as influence of pCramoll in *C. gattii* phagocytosis. After choosing the most effective therapy, in which pCramoll alone or in combination with fluconazole the 20 mg.kg⁻¹ increase survival of infected animals, an expressive influence on the morbidity of treated animals was observed, improving aspects such as (neuropsychiatric state, motor behavior, autonomic function, tone and muscle strength and reflex / sensory function). With the treatments there was also decrease pulmonary and cerebral fungal charge with 15 and 35 days post-infection, as well as modulation levels of CXCL / KC, IL-10 and IL-17 and the inflammatory infiltrate. *In vitro*, pCramoll stimulated *C. gattii* phagocytosis by marrow macrophages with large production of reactive oxygen species, and decreasing the intracellular fungal proliferation. The findings show that a combination of pCramoll fluconazole is a viable alternative therapeutic to cryptococcosis, increasing survival and especially improving morbidity of infected animals.

KEYWORDS: Cryptococose, Lectins, *Cratylia mollis* lectin, Fluconazole, Survival

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FCL	Fluconazol
GV	Variação genotípica
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFNγ	Interferon
IL	Interleucina
mL	Mililitro
μm	Micrometro
μL	Microlitro
mM	Micromolar
M	Molar
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetilglucosamina
NO	Óxido Nítrico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

PI	Ponto isoelétrico
PSC	Polissacarídeo
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Células de <i>Cryptococcus gattii</i> isoladas e unibrotantes capsuladas contrastadas com tinta nanquim.....	15
FIGURA 2: Diferentes sorotipos e genótipos de <i>Cryptococcus gatti</i> , <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> e <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	16
FIGURA 3: Distribuição global e epidemiológica dos sorotipos e genótipos de <i>Cryptococcus gattii</i>	17
FIGURA 4: Distribuição de sorotipos (A, B, C, D, AD) de espécies de <i>Cryptococcus</i> no Brasil.....	18
FIGURA 5: Inalação de estruturas fúngicas para acometimento pulmonar e desenvolvimento de Criptococose.....	19
FIGURA 6: Estratégias utilizadas por <i>Cryptococcus</i> para atravessar a barreira hematoencefálica: Cavalos de Troia, Transferência Lateral, Transcitose.....	21
FIGURA 7: Estruturas de representantes das Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.....	27
FIGURA 8: Posição taxonômica de <i>Cratylia mollis</i>	30
FIGURA 9: Etapas principais para extração e purificação das isoformas de lectinas de <i>Cratylia mollis</i>	31
FIGURA 10: Sequência de AA Cramoll isoforma 1.....	31
FIGURA 11: Estrutura Terciária de Cramoll 1	32
FIGURA 12: Alinhamento estrutural de Cramoll isoforma 1 e Concanavalina A.....	32

LISTA DE FIGURAS ARTIGO

FIGURA 1: Avaliação da sobrevivência e perfil comportamental dos animais infectados com *Cryptococcus gattii* e submetidos aos diferentes tratamentos – Protocolo SHIRPA;

FIGURA 2: pCramoll e pCramoll em combinação com fluconazol aumentam a sobrevivência e reduzem a carga fúngica nos pulmões e cérebro dos camundongos infectados com *Cryptococcus gattii*;

FIGURA 3: Efeito imunomodulador de pCramoll na fagocitose de *Cryptococcus gattii* por macrófagos de medula de camundongos C57/BL6, influenciando a produção de EROs e NO;

FIGURA 4: Alteração morfológica de macrófagos de medula de camundongos C57BL/6 infectados com *Cryptococcus gattii* e tratados com pCramoll.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Domínios de ligação a carboidratos das lectinas de plantas.....	29
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
2.1. <i>Cryptococcus gattii</i>	16
2.1.2. Histórico e epidemiologia.....	17
2.1.3. Criptococose.....	19
2.1.4. Interação <i>Cryptococcus</i> -Hospedeiro.....	21
2.1.5. Tratamento Convencional.....	24
2.2. Lectinas: Breve Histórico.....	25
2.2.1. Classificação.....	27
2.2.2. <i>Cratylia mollis</i> e Isolectinas.....	29
2.2.3. pCramoll e Atividades Biológicas	33
2.2.4. Atividade Imunomoduladora de pCramoll.....	34
2.2.5. Imunoterapia e Infecções Fúngicas.....	35
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos Específicos.....	37
4. REFERÊNCIAS.....	37
5. ARTIGO PARA SUBMISSÃO.....	53
6. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	74
7. ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da humanidade as plantas são utilizadas como fontes de nutrientes, e também para tratamento de enfermidades (AZEVEDO, et al 2012). Sendo selecionadas da natureza, mesmo que empiricamente, espécies com atividades farmacológicas diversas. O uso de plantas medicinais é uma alternativa mais acessível para o tratamento de algumas doenças para uma grande parte da população, principalmente nas regiões mal assistidas econômica e socialmente (AMOROZO, 2002).

A partir da comprovação de que plantas são fontes de uma grande diversidade química, com alta atividade farmacológica e curativa (MOHAMMED et al., 2012), a busca de produtos bioativos passou a ser um tema fundamental para a indústria farmacêutica. Contexto no qual, produtos naturais têm sido alvos estratégicos para descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Dentre esses produtos de origem vegetal, as lectinas têm se destacado por sua grande diversidade estrutural e potencial farmacológico (MELO et al., 2011b; OLIVEIRA et al., 2011).

Lectinas são proteínas ubiquamente encontradas na natureza, de origem não imune, que têm a capacidade de se ligar especificamente a carboidratos, e em sua maioria, aglutinar células (SHARON, 2008). Ademais possuem uma grande variedade molecular de especificidade de ligação, o que confere atividades biológicas diversas (SHARON, 2008).

De plantas como *Cratylia mollis* Mart., à qual pertencente à família Phaseoleae, subfamília Dioclineae, espécie endêmica na Região do Semi-Árido pernambucano, e popularmente conhecida como feijão camaratuba ou, camaratú, é obtida a pCramoll. Esta preparação lectínica contém duas isoformas de quatro lectinas purificadas de sementes de *C. mollis* por (Paiva & Coelho, 1992 e Correia & Coelho 1995). Potenciais efeitos farmacológicos foram demonstrados com pCramoll como, imunomoduladora (MACIEL et al., 2004), antiparasitária (MELO et al., 2011a), cicatrizante (MELO et al., 2011c), e biotecnológicas, na marcação de tecidos cancerígenos (LIMA, 2010) e desenvolvimento de sensores para detecção de sorotipos do vírus da dengue (OLIVEIRA et al., 2011b).

Cryptococcus gattii é um dos principais agentes da criptococose, em indivíduos saudáveis. A fonte da infecção é exógena, e ocorre principalmente pela inalação de propágulos fúngicos dispersos no ambiente.

As manifestações clínicas podem variar desde doença pulmonar a meningoencefalite, assim acometendo órgãos como pulmões e cérebro, sendo endêmica em indivíduos imunocompetentes, acometendo também imunodeprimidos (CHEN et al., 2000). Anteriormente, *C. gattii* era considerado como um fungo de ocorrência restrita a regiões tropicais e subtropicais (HEITMAN et al., 2011), relacionados a espécies vegetais onde são encontrados. Contudo, evidências mostraram casos de criptococose por *C. gattii* na Ásia, África, Sul e áreas do Norte da América, em diferente zona climática e vegetação (GALANIS et al., 2010).

Infecções em pacientes imunocompetentes por *C. gattii* podem ser assintomáticas, tipicamente pulmonar, crônicas ou agudas (NADROUS et al., 2003). As infecções agudas exibem um perfil sistêmico com infecções secundárias na pele, próstata e fígado, observadas em casos de infecções por fungos altamente virulentos, como também em pacientes imunocomprometidos, conduz ao acometimento do sistema nervoso central (SPEED et al., 1995). Na qual, meningites e meningoencefalites levam a elevada pressão intracraniana, dor de cabeça, febre, alterações comportamentais, perda de memória e coma (MITCHELL et al., 1995). Adicionalmente, são reportadas terapêuticas deficientes aplicadas ao tratamento de *C. gattii* (TSUNEMI et al. 2001; PERFECT et al., 2010).

Sabe-se que micro-organismos como *C. gattii* usam diversos mecanismos para burlar o sistema imune, como produção de polissacarídeo capsular, pigmentos de melanina, tolerância termal, e síntese de enzimas como proteases, lacase, urease e superóxidodismutase, entre outros mecanismos (ZHAI, et al., 2013). Estes fatores dificultam os tratamentos utilizados para criptococose. Ademais, em um levantamento em 2003, Nishikawa e colaboradores relataram, que dos pacientes com criptococose no Nordeste brasileiro, 87,5% dos HIV positivos foram acometidos por *Cryptococcus gattii*, e uma frequência de 53% dos pacientes HIV negativos que apresentaram alguma doença infecciosa. Consequentemente, além da busca de novos antibióticos, há necessidade de intensificar a prospecção de substâncias imunomoduladoras direcionadas à terapia anticriptocócica com a finalidade de estabelecer novas estratégias para o tratamento da infecção e diminuir sua alta frequência, como também os altos níveis de mortalidade causados por *C. gattii* (NISHIKAWA et al. 2003).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Cryptococcus gattii*

O gênero *Cryptococcus*, pertencente ao Filo *Basidiomycota*, e compreende mais de 70 espécies distintas. Duas espécies, *C. gattii* e *C. neoformans*, são importantes patógenos responsáveis por causar a maioria dos casos de cryptococose em humanos, levando a doença pulmonar e meningoencefalite, com substancial índice de mortalidade (MC MULLAN et al., 2013).

A levedura basidiomicética *C. gattii*, realiza reprodução predominantemente assexuada (anaforma), caracterizado como células com brotamento único ou múltiplo, oval ou cilíndrico, geralmente envolvido por uma cápsula polissacarídica (**Figura 1**). É considerado um patógeno primário emergente, uma vez que acomete principalmente indivíduos saudáveis, embora também possa infectar indivíduos imunocomprometidos (CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011; SOARES et al., 2011; SHARON et al., 2014).

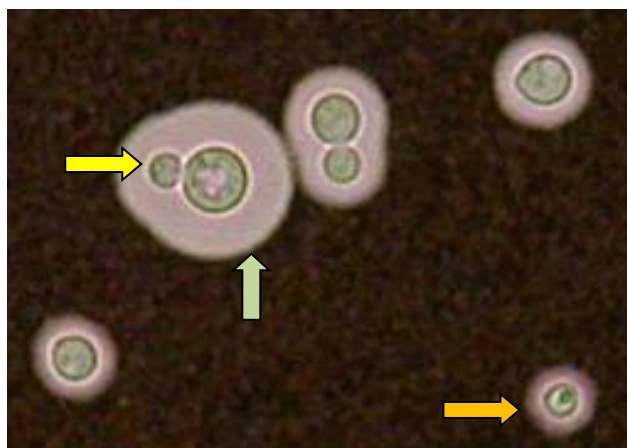


FIGURA 1: Células de *Cryptococcus gattii* isoladas e unbrotantes capsuladas contrastadas com tinta nanquim. (Foto: MAGALHÃES & CARNEIRO, 2015). **Seta Laranja** – Célula fúngica / **Seta Verde** – Cápsula polissacarídica / **Seta Amarela** – Reprodução Assexuada – brotamento

Inicialmente, *C. gattii* foi considerado uma variação do complexo *C. neoformans*, sendo essa, descrita como uma espécie única (KWON-CHUNG et al., 2006) com alguns sorotipos variantes. Baseado em estudos fenotípicos, utilizando

anticorpos monoclonais para antígenos da cápsula, e simples técnicas moleculares (SHARON et al., 2014) foram descritas três variantes desse complexo, *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sorotipo D) e *C. neoformans* var. *gattii* (sorotipo B e C). Posteriormente, por análises morfológicas e moleculares, *C. gattii* foi separado de *C. neoformans*, sendo considerada outra espécie do gênero *Cryptococcus* (KWON-CHUNG et al., 2006, KWONG-CHUNG et al., 2002).

Baseado em comparações de fragmentos de sequências de múltiplos genes, amplificação de segmentos de polimorfismos, e outras técnicas de genotipagem (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012), foram identificados *C. gattii* em quatro tipos moleculares, VGI, VGII, VGIII e VGIV (**Figura 2**), que divergem em até 12,5 milhões de anos (BOVERS et al., 2007). Esses sorotipos apresentam subtipos como: VGIIa, VGIIb e VGIIc, que através dos métodos para caracterização gênica, dados de prevalência, condições ambientais e fatores de virulência, apresentam distinta ocorrência geográfica (SIDRIM et al., 2010, MAYER et al., 2011, COGLIATI et al., 2013).

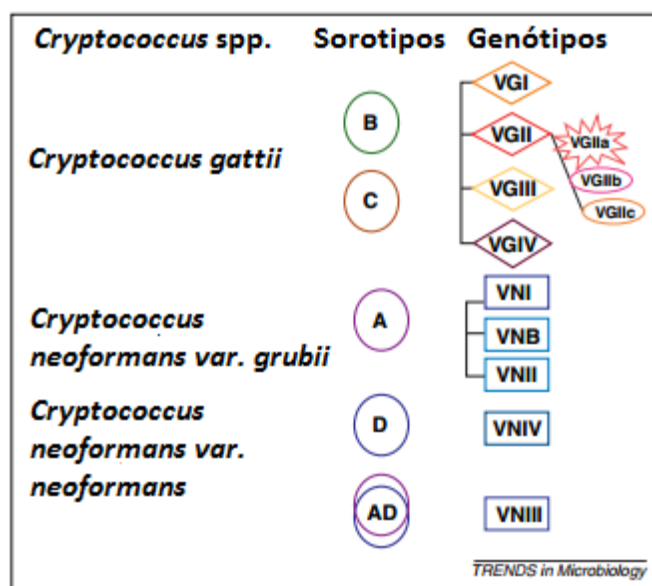


FIGURA 2: Diferentes sorotipos e genótipos de *Cryptococcus gattii*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* (Fonte: Adaptado - CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011).

2.1.2. Histórico e Epidemiologia

O primeiro isolamento ambiental de *C. gattii* sorotipo C, foi em 1988, de amendoeiras, e do sorotipo B em 1990 por ELLIS E PFEIFFER de árvores de Eucalipto, na Colômbia (CHEN et al., 2014), sendo o mais prevalente em amostras clínicas e ambientais no mundo.

A ocorrência de criptococose por *C. gattii* inicialmente era restrito a regiões tropicais e subtropicais, sendo posteriormente também observada a presença de genótipos na América do Norte a partir de um surto de criptococose na ilha de Vancouver, Canadá, em 1999 (CANNON et al., 2009; VOELZ et al., 2010; CHATURVEDI et al., 2011; NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012) que se disseminou para a região Nordeste do Canadá e para os Estados Unidos (BARTLETT et al., 2013; BILLMYRE et al., 2014). Além de infecções por *C. gattii* já serem comuns em países de clima variado, como França, Itália, Espanha e Grécia (NGAMSKULRUNGROJ et al., 2012), e também tem sido causa de criptococose na Ásia, África e Oceania (CHATURVEDI et al., 2011; CHEN et al., 2014).

Fontes clínicas e relatos de isolamento de *C. gattii* ambiental e amostras biológicas de animais mostram uma emergente distribuição global do patógeno (**Figura 3**). Na Austrália, a infecção é endêmica, e a incidência anual estimada é de 610.000 pessoas ao ano, acometidos por *C. gattii* (VGI) o tipo molecular mais comum (COGLIATI, 2013).

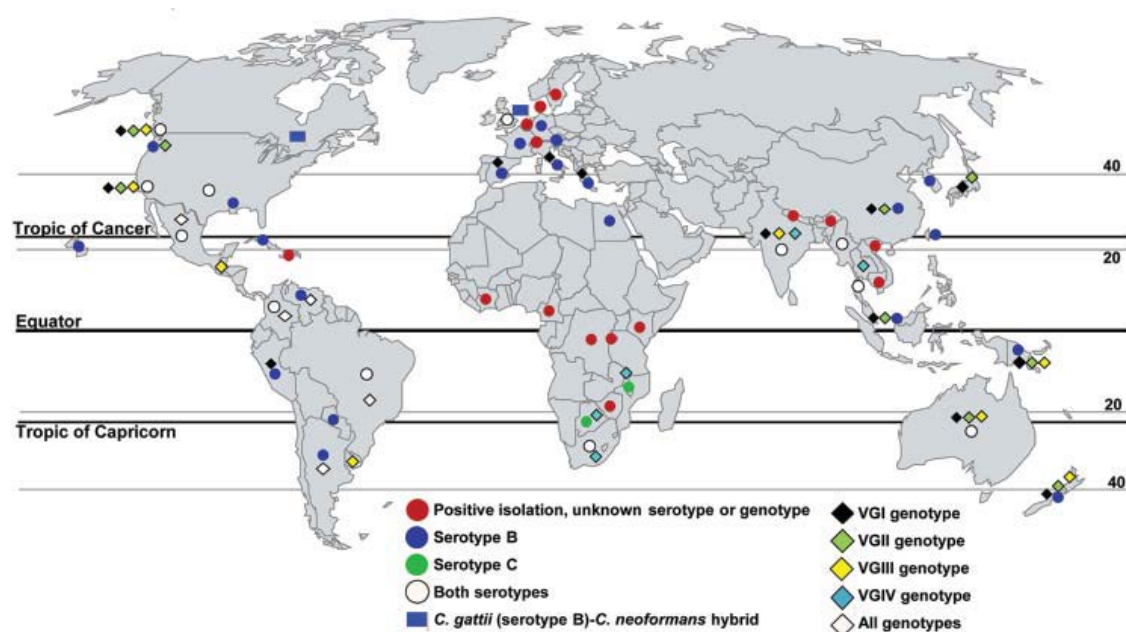


FIGURA 3: Distribuição global e epidemiológica dos sorotipos e genótipos de *Cryptococcus gattii*. (Fonte: Adaptado – (SPRINGER & CHATURVEDI, 2010).

No Brasil tem sido reportada a incidência de ambos os sorotipos, sendo o VGII o predominante em pacientes HIV negativos, na Argentina, uma maior prevalência do sorotipo VGI, e todos os sorotipos isolados na Colômbia. Na América do Norte, isolados do solo e ambientais são na maioria VGIIa e VGIIb, tendo esses tipos alta incidência em isolados de diversos casos clínicos. Na Europa e África, a presença de *C. gattii* também tem sido reportada, e na Ásia todos os sorotipos também evidenciados (McMULLAN, 2013).

No Brasil, espécies do gênero *Cryptococcus* foram isoladas em várias regiões geográficas, tais como Bahia, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (LEITE et al., 2012; CHEN et al., 2014), sendo o Norte e Nordeste regiões endêmicas. De acordo com um estudo realizado no estado do Pará no período de 2003 a 2007, 56 isolados de *Cryptococcus* spp. que causaram criptococose disseminada, 50% eram *C. gattii*, sendo 44.65% sorotipo VGII e 5.26% VGI (SANTOS et al., 2008).

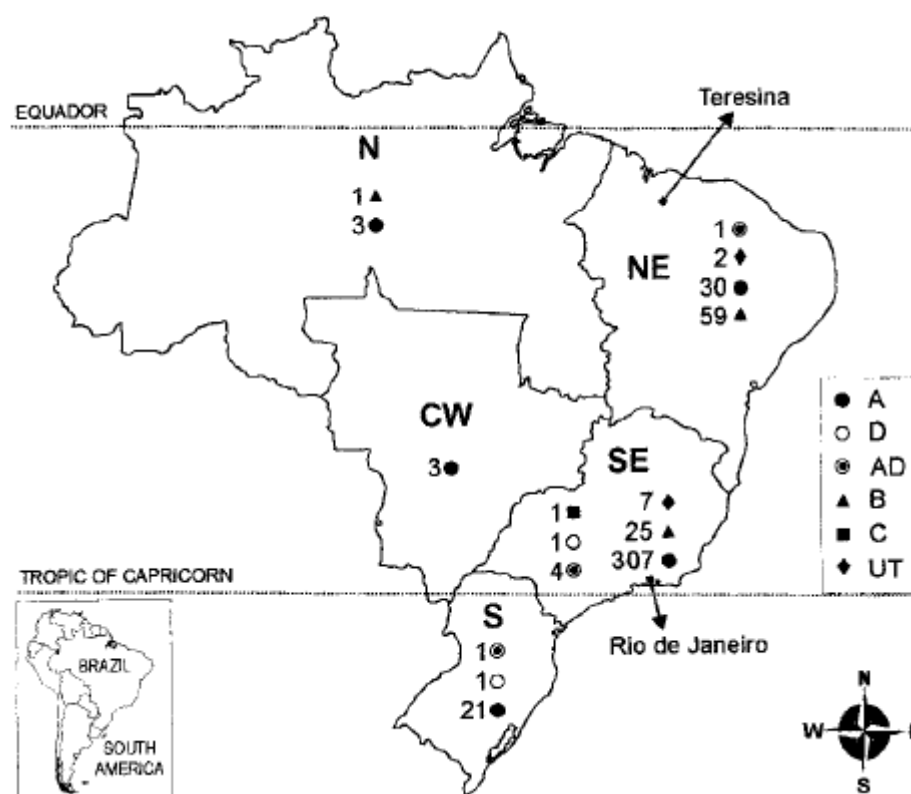


FIGURA 4: Distribuição de sorotipos (A, B, C, D, AD) de espécies de *Cryptococcus* no Brasil. Adaptado: (NISHIKAWA et al., 2003).

NISHIKAWA e colaboradores, em 2003, por sorotipagem de 467 isolados ambientais e clínicos, mostraram o perfil de incidência de espécies *Cryptococcus* no Brasil, onde o sorotipo B de *C. gattii* foi predominantemente incidente no Nordeste brasileiro (**Figura 4**).

2.1.3. Criptococose

A criptococose é adquirida pela inalação de basidiósporos produzidos durante o ciclo sexuado (teleoformo), ou leveduras dessecadas que se depositam nos alvéolos, acometendo inicialmente o pulmão, onde o fungo encontra fatores favoráveis para proliferação e via corrente sanguínea disseminar-se para outros órgãos. (DATTA, et al., 2009).

Os esporos e as leveduras dessecadas presentes no ambiente, são propágulos altamente infecciosos, por serem pequenos (1-3 μm), principalmente em relação às células crescendo ativamente (4-10 μm), o que ocorre no ciclo de vida (**figura 5**), grandes demais para invadir os alvéolos (KRONSTAD et al., 2011).

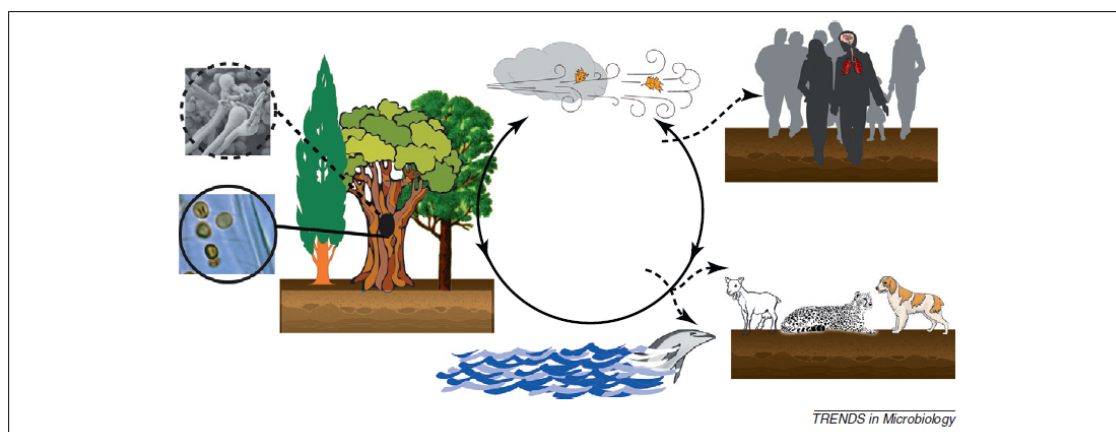


FIGURA 5: Inalação de estruturas fúngicas para acometimento pulmonar e desenvolvimento de Criptococose. (CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011).

Fatores de virulência também auxiliam a invasão e parasitismo e posterior estabelecimento da criptococose, como formação de capsula polissacarídica a 37°C,

produção de melanina, e enzimas como fosfolipase B e uréase. Sendo a interação patógeno-hospedeiro fundamental para determinar o curso da doença (KEONSTRAD et al., 2011). Assim, sistema imune busca defender-se levando a formação de um complexo linfonodal pulmonar primário, que na maioria dos casos, produz uma infecção pulmonar assintomática autolimitada. As leveduras permanecem latentes dentro desse complexo granulomatoso, ou são eliminadas. Já na ocorrência de imunossupressão podem ser reativadas e desenvolverem a doença.

Nos casos de indivíduos com baixa imunidade, inalação de uma grande quantidade do fungo ou acometimento por determinados sorotipos de *C. gattii*, a infecção pode apresentar sintomas pulmonares já característicos, conduzindo a quadros de pneumonia grave (CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011; NEGRONI, 2012). Com a progressão da doença, para que alcance o sistema nervoso central (SNC), as leveduras precisam passar pela barreira hematoencefálica (BHE), levando a casos de meningite ou meningoencefalite que é a forma mais grave da doença. Os principais sinais e sintomas nesta fase da doença são: cefaleia, febre, neuropatia craniana (danos nos nervos cranianos), alteração da consciência, letargia (perda temporária ou completa da sensibilidade do movimento), perda de memória, sinais de irritação meníngea e coma (NADROUS et al., 2003).

O mecanismo pelo qual as leveduras penetram a BHE não é totalmente entendido, embora várias possibilidades são propostas (**Figura 6**), incluindo passagem direta entre células endoteliais próximas (entrada paracelular), migração para o SNC dentro de fagócitos infectados (modelo Cavalo de Tróia), ou por absorção e travessia através de células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos no cérebro (transcitose) (CHANG et al., 2004; CHALIER et al., 2009). Diversos fatores do patógeno modulam a interação *Cryptococcus*-BHE e estão envolvidas nessa transmigração para o SNC, como urease, lacase, cápsula e ácido hialurônico (EISENMAN, CASADEVALL & MCCLELLAND, 2009; HUANG et al., 2011).

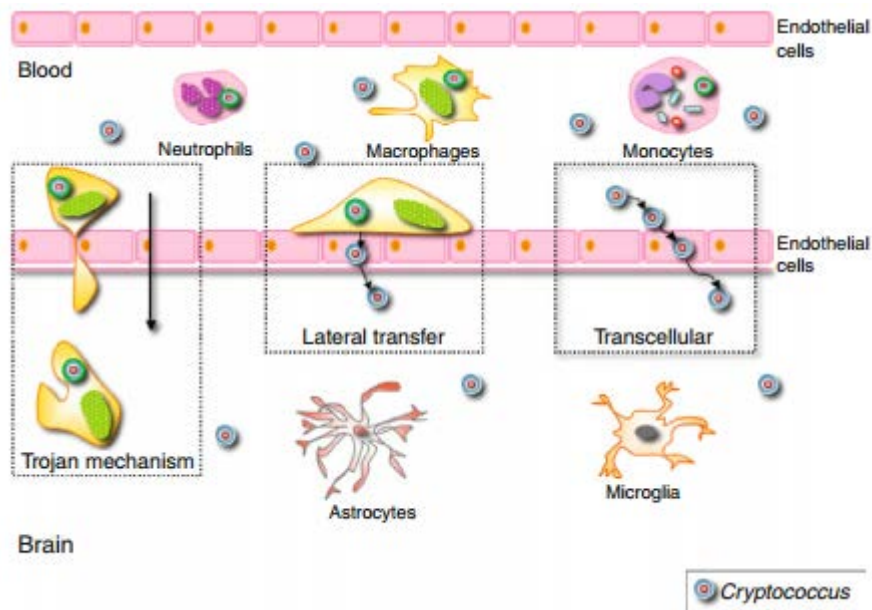


FIGURA 6: Estratégias utilizadas por *Cryptococcus* para atravessar a barreira hematoencefálica: Cavalo de Tróia; Transferência Lateral; Transcitosose (Fonte: Adaptado de MA e MAY, 2009).

O tropismo para o SNC está relacionado à alta concentração de substratos assimiláveis pelo fungo no líquido, como tiamina, ácido glutâmico, carboidratos e minerais, além da presença abundante de catecolaminas que são fundamentais para síntese de melanina pelo fungo. Essa preferência pelo SNC serve como “refúgio” contra a resposta imune do hospedeiro (KIM, 2008).

2.1.4. Interação *Cryptococcus*-Hospedeiro

A importância clínica dos patógenos oportunistas tem aumentado cada vez mais nas últimas décadas, principalmente pela epidemia da AIDS. *Cryptococcus* é um agente comum nas infecções fatais em indivíduos imunodeprimidos, entretanto casos de cryptococose em indivíduos hígidos são recorrentes, como o surto em Vancouver (CHATURVEDI et al, 2011). Esse drástico curso epidemiológico da cryptococose revela uma expressiva influência do sistema imune frente ao patógeno e no desenvolvimento da doença.

Há vários fatores da resposta imune inata que interferem no estabelecimento da infecção: barreiras físicas (pele e mucosa), fatores séricos (sistema complemento) e moléculas com ação antifúngica são estratégias primárias já reportadas, fundamentais dessa resposta inespecífica (VOELZ et al., 2010).

O sistema complemento, é uma cascata antipatógenos que uma vez ativada por

via (clássica, de lectinas ou alternativa), convergem na formação da C3 convertase. Esta enzima quando clivada, auxilia na opsonização de patógenos, facilitando a fagocitose e aumentando a resposta inflamatória, estimulando a quimiotaxia de mais fagócitos. Estudos em modelo animal mostram que a ausência de fatores do sistema complemento diminuem a sobrevivência e a eliminação do *Cryptococcus*. Entretanto, mecanismos de resistência desenvolvidos pelo fungo, como a formação da cápsula polissacarídica impede sua fagocitose e inibe a via clássica de ativação do complemento (VOELZ et al., 2010), sendo o orquestramento desses fatores necessário para o desenvolvimento de uma resposta mais efetiva.

A fagocitose é o principal mecanismo efetor para inativação ou eliminação das leveduras, que ao encontrarem macrófagos alveolares ou células dendríticas, desencadeiam uma resposta imune. Assim, culmina com esterilização ou, mais frequentemente, na restrição da infecção dentro de granulomas inflamatórios a partir da reação tecidual com formação de estruturas compostas principalmente por fagócitos mononucleares, histiócitos e células gigantes multinucleadas que envolvem as células fúngicas (SHIBUYA et al., 2005).

Macrófagos e células dendríticas reconhecem Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por meio de seus receptores, e possuem papel relevante e paradoxal no decorrer da infecção, atuando para o controle e permanência da doença (MCQUISTON & WILLIAMSON, 2012). Estudos revelaram que a depleção de macrófagos diminui a sobrevivência de animais com criptococose (OSTERHOLZER, et al 2009). Contudo, foi demonstrado que essas células também são importantes para que o fungo se dissemine pelo organismo, principalmente para o SNC (KECHICHIAN, 2007). Existem quatro famílias de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que desencadeiam a ativação do sistema imunológico, os receptores do tipo Toll (TLR), receptores do tipo NOD (Domínios de Ligação e Oligomerização de Nucleotídeos) (NLR), receptores do tipo RIG-I (Ácido Retinóico Induzível do Gene 1) (RLR) e receptores de lectina tipo C (CLR). Inicialmente, os NLRs e os RLRs não são muito importantes para reconhecimento fúngico, ao contrário dos TLRs (HARDISON & BROWN, 2012), os quais estão fortemente relacionados ao reconhecimento de fungos, incluindo TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7 e TLR9 (BOURGEOIS et al., 2011; BROWN, DENNING & LEVITZ, 2011; HARDISON & BROWN, 2012). Em relação à criptococose, os TLRs 2 e 9 se mostraram os mais importantes, uma vez que animais

Knockout para esses receptores são mais sensíveis às infecções por espécies de *Cryptococcus* (BOCCA & CASADEVALL, 2014).

Os CLRs, assim como os TLRs, são bastante importantes para o reconhecimento fúngico e para a resposta antimicótica. Esses receptores fazem parte de uma superfamília heterogênea de moléculas solúveis ou transmembranas e possuem em comum um domínio lectina do tipo C, que se liga a praticamente todos os fungos patogênicos para humanos. Esses receptores interagem com carboidratos presentes na parede celular fúngica, como β -glucana e manana (HARDISON & BROWN, 2012).

Os CLRs, como a dectina-1 e 2, ao se ligarem e reconhecerem a célula fúngica, ativam cascatas de sinalização que culminam na ativação de fagócitos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e na ativação do inflamossoma e do fator nuclear kappa B (NF- κ B). EROs e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são importantes fatores microbicidas. Já a ativação do NF- κ B e do inflamossoma, que também precisa de ativação via TLR, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-1 β , IL-18, IL-6 e IL-12, as quais atuam no recrutamento e ativação de células imunes para diferenciação de outras células, como os linfócitos (COELHO, BOCCA & CASADEVALL, 2014). Citocinas associadas à resposta Th1 são essenciais para o controle do agentes infecciosos, com a expressão de TNF α e IFN γ . Os receptores de manana presentes nas células dendríticas, reconhece o antígeno fúngico e por endocitose e posterior processamento antigênico, apresenta o antígeno a células T, promovendo uma resposta antifúngica, via Th17 (ROMANI et al., 2011). Em adição, Muller e colaboradores (2007) demonstraram que o significativo aumento de IL-17 associado a resposta Th17 modula a sobrevivência de camundongos infectados com *C. neoformans* (MÜLLER et al., 2007).

Uma característica marcante de *Cryptococcus* spp. é a sua capacidade de sobreviver dentro dos macrófagos, ao contrário do que acontece com outras leveduras, como *Candida albicans*. *C. neoformans*, por exemplo, não inibe a formação do fagolisossoma, sendo capaz de replicar-se no seu interior. Dentro desse compartimento, a levedura é exposta a baixo pH, EROs, RNS e carência nutricional e tem que vencer todos esses obstáculos para conseguir sobreviver e replicar (SHOHAM & LEVITZ, 2005). Para isso, *Cryptococcus* spp. aumenta a expressão de genes de resposta à carência nutricional e de estresse oxidativo (DERENGOWSKI et al., 2013).

O eficiente controle da infecção criptocócica requer um balanço nas respostas pró e anti-inflamatórias, sendo a primeira mais importante para contenção da doença.

Isso tem sido comprovado com trabalhos que inibem ou que silenciam geneticamente citocinas pró-inflamatórias (DECKEN et al, 1998; ZARAGOZA et al., 2007). Quando isso acontece, a sobrevivência dos animais infectados por *Cryptococcus* diminui. Já quando se realiza o mesmo procedimento com marcadores da resposta anti-inflamatória, observa-se aumento na sobrevivência dos animais (DECKEN et al., 1998; MÜLLER et al., 2007).

Ainda não estão elucidados os mecanismos que permitem *C. gattii* infectar pessoas imunocompetentes, mas *C. neoformans* não. Algumas hipóteses são sugeridas as quais propõem que *C. gattii* afeta indivíduos hígidos por ser capaz de impedir a migração neutrofílica (CHATUVERDI & CHATUVERDI, 2011), o que não se observa com *C. neoformans* (DONG & MURPHY, 1995). Algumas pesquisas demonstraram que determinadas moléculas produzidas por *C. gattii*, como acetoína e diidroxiacetona, estimulam menos a resposta pró-inflamatória do que metabólitos produzidos por *C. neoformans*, o que resultaria em maior permanência e sobrevivência de *C. gattii* no hospedeiro (WRIGHT et al., 2002; CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011). Acredita-se, também, que *C. gattii* poderia estimular menos o sistema imunológico por conter uma cápsula maior do que *C. neoformans* (CHATURVEDI & CHATURVEDI, 2011).

2.1.5. Tratamento Convencional

A escolha do tratamento para criptococose está ligada a fatores como toxicidade, biodisponibilidade da droga, sítio de infecção, estado imunológico e principalmente ao quadro clínico do paciente (SAAG et al., 2010; PERFECT et al., 2010). Em casos de manifestações clínicas leves a moderada, a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas preconiza o tratamento da criptococose causada por *C. gattii*, por meio da terapia com fluconazol ou itraconazol (entre outros azólicos) por 6 a 12 meses. Contudo, para casos mais graves como meningoencefalite, o itraconazol não é recomendado por não ter boa penetração no sistema nervoso central (SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005). Comumente, os antifúngicos utilizados são a anfotericina B combinada com fluconazol e/ou 5-flucitosina (NOONEY, MATTHEWS & BURNIE, 2005), já que a monoterapia pode se mostrar pouco eficiente por causa da resistência antimicótica (REVANKAR et al., 2004; SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005).

Além da crescente resistência aos antimicrobianos, determinantes de cada droga como forma de administração e toxicidade, limitam o seu uso. O fluconazol apresenta alta eficácia, baixa toxicidade, tolerada administração parenteral e oral, rápida absorção, e ação fungistática, embora o aumento das taxas de falha clínica, em decorrência da resistência, expresse grandes implicações na morbidade e mortalidade (GHANNOUM e RICE, 1999). A anfotericina B, apresenta ação antifúngica frente a vários patógenos, sendo que apresenta elevada nefrotoxicidade e não consegue atuar em todos os sítios do organismo (NOONEY, MATTHEWS & BURNIE, 2005; SUBRAMANIAN & MATHAI, 2005; ZHAI & LIN, 2011). Dessa forma, o interesse na busca por tratamentos menos tóxicos ao hospedeiro e mais eficientes do que as monoterapias convencionais são fundamentais, principalmente em associação com essas drogas diminuindo efeitos colaterais e aumentando a qualidade de vida dos indivíduos em tratamento.

2.2. Lectinas: Breve Histórico

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram um sofisticado e elaborado sistema de defesa diante do grande número de patógenos potenciais que as cercam, como fungos, insetos, bactérias, vírus, ácaros, nematóides e mamíferos. Esse mecanismo de defesa é mediado por reações complexas, muitas dessas sendo ativadas em resposta as agressões (BRAGA, 2009). Essas respostas dispõem de um vasto número de peptídeos e proteínas, dentre outras substâncias, capazes de protegê-las contra o ataque de pragas e patógenos (VAN DEN BERGH et al., 2002, OLIVEIRA et al., 2004; BRAGA, 2009).

As lectinas são importantes como proteínas de defesa por sua vasta atuação contra herbívoros e patógenos. Tal proteção ocorre devido à sua capacidade de ligação a glicoconjugados e, conseqüentemente, desestabilização do metabolismo do agressor, exercendo, assim, efeitos deletérios (BANDYOPADHYAY et al., 2001).

Há anos sabe-se que animais, plantas e vários produtos de diversos organismos são tóxicos aos seres humanos (SINGH & SARATHI, 2012). Sementes de leguminosas, cruas ou mal cozidas, quando ingeridos, em alguns casos, levam a sintomas intestinais agudos e pode estar relacionada à presença de substâncias com uma incrível estabilidade térmica, resistentes a enzimas digestivas e ácidos (KUMAR et al., 2012).

Embora, lectinas estão relacionadas à certa toxicidade, e muitos estudos mostram a diminuição da alergenicidade dessas proteínas usando várias técnicas, como o uso de radiação ionizante (VAZ et al., 2012; VAZ et al., 2013), seus benefícios são também documentados na literatura como uma ferramenta de interesse terapêutico para diversas pesquisas como terapia do câncer, imunologia, ação antibacteriana, antiparasitária, entre outras (SINGH & SARATHI, 2012).

Em 1888, Stillmark foi o primeiro a experimentalmente mostrar que a fração protéica do feijão castor (*Ricinus communis*), chamado “Ricina” era capaz de aglutinar células vermelhas denominando de “Fitohemaglutininas” (OLSNES & KOZLOV, 2001). Em 1936, Landsteiner afirmou que a atividade hemaglutinante de vários extratos de sementes varia quando testadas com eritrócitos de diferentes animais, e essa especificidade, para determinados eritrócitos, foi posteriormente melhor investigada por BOYD & SHAPLEIGH, os quais cunharam o termo “Lectinas”, derivado do latim “legere”, escolher, selecionar. A partir da década de 60, começaram a tomar evidência como potentes ferramentas na biologia e medicina (NICOLSON & SINGER 1971), sendo até hoje denominadas como proteínas ubiquamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em micro-organismos, plantas, animais, etc, geralmente holigoméricas, de estruturas, variadas apresentando um domínio não catalítico e de ligação específica a carboidratos (DA SILVA, 2014). Originalmente comparadas com anticorpos devido a similaridades na especificidade de ligação, em 1972 por Sharon & Lis o termo lectina foi generalizado para todas proteínas de origem não imunológica com capacidade de ligação a carboidratos com atividade hemaglutinante ou não (SHARON; LIS 2004).

A ligação lectina-carboidrato é realizada por ligações não-covalentes com pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e hidrofóbicas, estando o(s) domínio(s) de ligação a carboidratos dispostos preferencialmente na superfície protéica (VAN DAMME, 1998a; SHARON, 2008). Outra característica das lectinas é a não modificação bioquímica dos carboidratos aos quais se ligam. Essa propriedade as diferencia das glicosiltransferases, glicosidases e enzimas que introduzem um substituinte (grupo sulfatos, por exemplo) em um carboidrato. Essa distinção é necessária porque algumas glicosidases podem se ligar aos carboidratos e, sob algumas condições, como a baixa temperatura, podem aglutinar células rapidamente ao se ligar a carboidratos na superfície celular (BRECHTEL et al., 2001). Em contrapartida, algumas lectinas de plantas e animais podem apresentar atividade enzimática, porém essa

atividade está relacionada a um domínio estrutural distinto do sítio de ligação a carboidrato (TRAINOTTI et al., 2001; RAO et al., 2012).

Lectinas medeiam processos biológicos como reconhecimento célula-célula, interações da matrix extracelular, fertilização gamética, desenvolvimento embrionário, crescimento celular, diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação, inflamação, interação parasita-hospedeiro, enovelamento e direcionamento de glicoproteína, indução mitogênica e homeostase (MODY et al., 1995; GORELIK et al., 2001; MINKO, 2004; NIMRICHTER et al., 2004; SHARON & LIS, 2004; RUSEVA et al., 2009; GHAZARIAN et al., 2011).

2.2.1. Classificação das Lectinas

Baseada na arquitetura global das lectinas de plantas, quatro grupos principais podem ser distinguidos: apenas um domínio de ligação a carboidrato (merolectinas), dois ou mais domínios de ligação idênticos (hololectinas), no mínimo dois domínios de ligação a carboidratos diferentes (superlectinas), um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio que exerce atividade biológica independente do domínio de ligação a carboidratos (quimerolectinas), (**Figura 7**). Todos esses grupos possuem a capacidade de aglutinar células exceto as merolectinas por possuírem apenas um domínio de ligação a carboidrato (VAN DAMME et al., 1998a; VANDENBORRE et al., 2011).

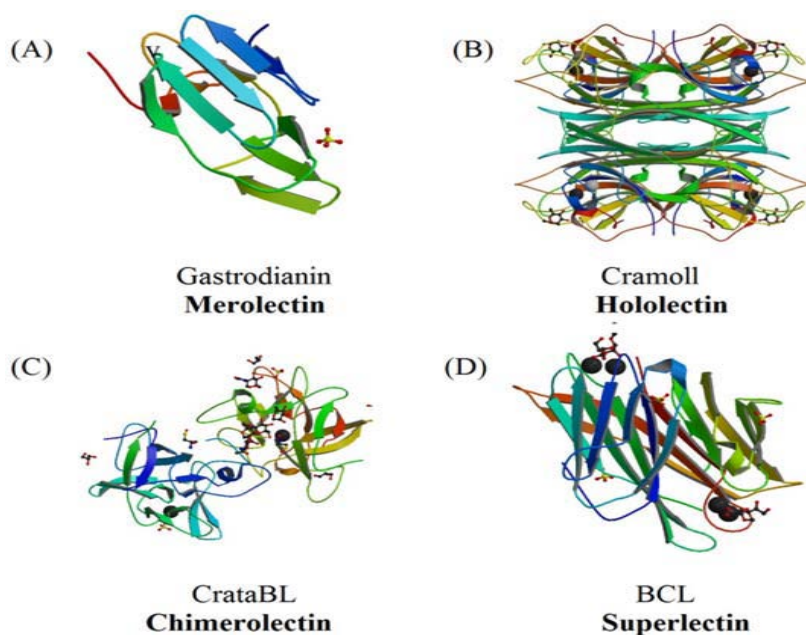


FIGURA 7: Estruturas de representantes das Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas. (A) Gratrodianina de *Gastrodia elata* (PDB: 1XD6); (B) Cramoll de *Cratylia mollis* (1MVQ); (C) CrataBL de *Crataeva tapia* (4IHZ); (D) *Burkholderia cenocepacia* lectin A (2XR4);

Hoje, existe outra importante classificação considerando sequências disponíveis nos bancos de dados através de análises de genoma/transcriptoma, onde há doze famílias de lectinas de plantas relacionadas por seus domínios de ligação a carboidratos (**Tabela 1**), (VAN DAMME et al., 2008, VANDENBORRE et al, 2011), que inclui: (1) Domínios típicos de aglutininas homólogas de *Agaricus bisporus*, (2) Amarantina, (3) Homólogos de Classe V de quitinasas com atividade de lectina, (4) Família *Nicotiana tabacum*, (5) Família Cyanovirin, (6) Família EEA - *Eonymus europaeus*, (7) Família GNA - *Galanthus nivalis*, (8) Jacalinas, (9) Domínios de LysM, (10) Proteínas com domínio heveina, (11) Proteínas com domínios de lectinas de leguminosas, e (12) Família de Ricin-B.

TABELA 1: Domínios de ligação a carboidratos das lectinas de plantas (adaptado de VANDENBORRE et al., 2011 E DA SILVA, et al., 2014). PDB: Protein data bank

Domínio	Especificidade	Exemplo
Domínio típico de aglutininas de <i>Agaricus bisporus</i>	Antígeno-T	ABA (PDB: 1Y2T)
Domínio tipo Amarantina	Antígeno-T	Amaranthin (PDB: 1JLY)
Domínio homólogo a Quitinasas Classe V	Grupo sanguíneo B; Carboidratos com resíduos de manose	TCLL (PDB: 4B16)
Domínio típico da aglutinina de <i>Nicotiana tabacum</i>	N-acetil-D-glicosamina	NICTABA

Domínio Cyanovirin	Carboidratos com resíduos de manose	CV-N (PDB: 2JZJ)
Domínio típico da aglutinina de <i>Euonymus europaeus</i>	Grupo sanguíneo B; Carboidratos com resíduos de manose	EEA
Domínio típico da aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i>	Manose, oligomanosídeos, ácido siálico	PCL (PDB: 3A0C)
Domínio tipo Jacalina	Manose	JAC (PDB: 3P8S)
Domínio LysM	Quitina	LysM
Domínio tipo Heveina	N-acetil-D-glicosamina	WGA (PDB: 2UVO)
Domínio das lectinas de legumes	Glicose/Manose	Cramoll (PDB: 1MVQ)
Domínio tipo Ricin-B	Galactose/ N-acetil-D-glicosamina ML-I	(PDB ID: 1M2T)

2.2.2. *Cratylia mollis* e Isolectinas

A família das leguminosas ou Fabaceae é a terceira maior família de angiospermas compreendendo cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005), apresenta uma grande importância ecológica, medicinal e econômica. Dentre suas tribos, a Phaseoleae compreende um vasto número de gêneros, nessa tribo, encontra-se a subtribo Diocleinae que apresenta treze gêneros reconhecidos, compreendendo entre tantos outros os de *Canavalia* e *Cratylia*. (VARELA et al., 2004).

Cratylia mollis, popularmente conhecida como feijão Camaratu ou Camaratuba, é uma espécie do semi-árido do nordeste do Brasil (LIMA-RIBEIRO et al., 2012).

Cratylia, (**Figura 8**), é uma planta arbustiva, tolerante à seca e a solos ácidos e tem potencial para adubação verde e forrageamento (ARAÚJO et al, 2011).

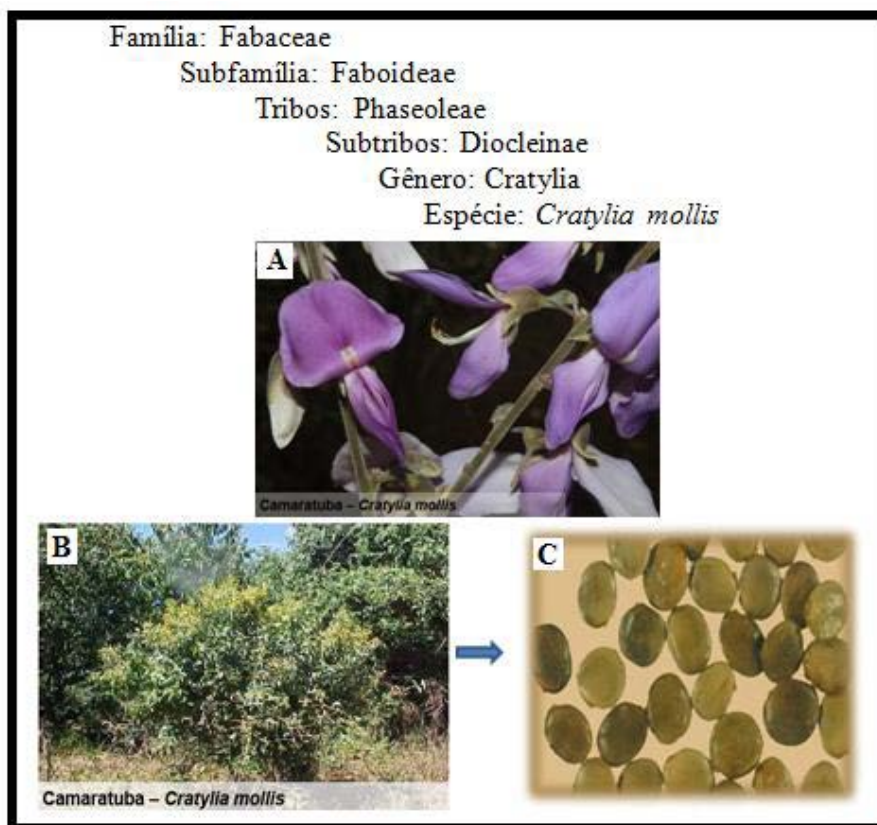


FIGURA 8: Posição taxonômica de *Cratylia mollis*. A. Flores, B. Árvore, C. Sementes

Das sementes de *C. mollis* foram purificadas quatro isoformas de lectinas, (Cramoll 1, 2, 3, 4), essas lectinas foram classificadas de acordo com a migração eletroforética em gel para proteínas básicas, a isoforma 1 sendo mais básica e de maior migração, e podem ser separadas pelos diferentes estágios do processo de fracionamento com sulfato de amônio. Em 1992 as isoformas 2 e 3 foram purificados por PAIVA & COELHO, logo em 1995 CORREIA & COELHO purificaram as isoformas (1,4), hoje chamadas de pCramoll, em apenas uma etapa cromatográfica em coluna com sephadex G-75, sendo essas isoformas separadas através de mais uma etapa cromatográfica com CM-celulose gerando um rendimento de 94% para a isoforma 1 (**Figura 9**).

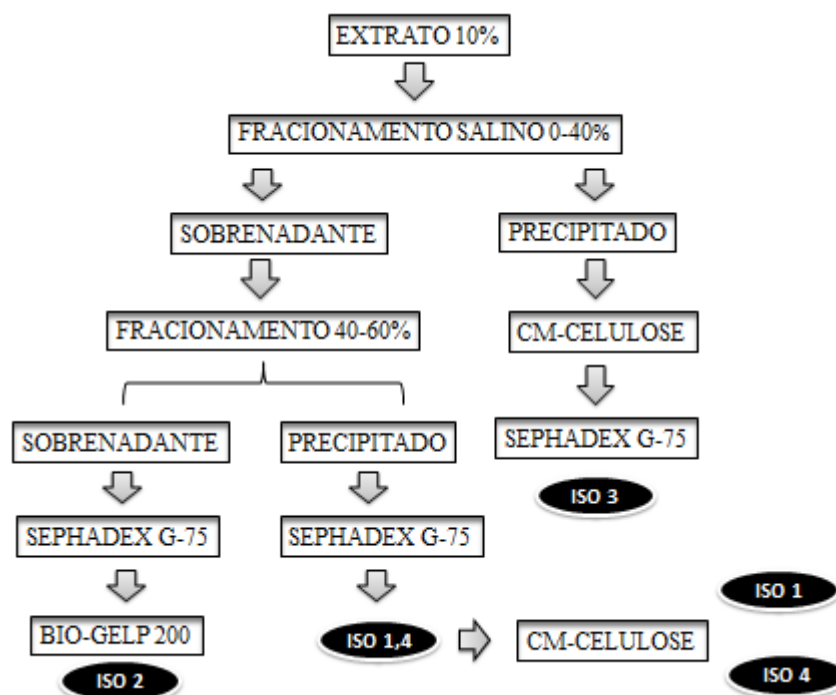


FIGURA 9: Etapas principais para extração e purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia molli* (Fonte: Autor).

As isoformas 1 (31kDa), 2 (60kDa) e 4, não são glicosiladas, e ligam-se a resíduos de glicose/manose, enquanto que a isoforma 3, que é uma glicoproteína (31kDa) se liga a galactose. As isoformas 1, 2, e 3 apresentam diferenças de migração eletroforética, Cramoll 1 (pI 8.5-8.6), Cramoll 2 (pI 4.15-6.7), Cramoll 3 (pI 5.25-5.8) (PAIVA & COELHO, 1992). As isolectinas 1 e 3 de sementes de *C. mollis*, como várias lectinas de leguminosas, ocorrem na matriz amorfa dos corpos protéicos e nas paredes celulares dos eixos embrionários, a co-localização dessas isolectinas, com perfis de glicosilação e especificidade de reconhecimento a carboidrato diferentes, sugerem diferentes funções, seja na defesa contra predadores, com ação mitogênica nos processos embrionários, ou como reserva proteica (SANTOS et al., 2004, DA SILVA, 2014).

Cramoll 1 é a lectina majoritária da preparação ISO1,4 (pCramoll) e consiste de 236 resíduos de aminoácidos (**Figura 10**), dentro os quais quatro são triptofanos. A estrutura terciária de Cramoll 1 foi determinada por cristalografia de raio-X a 1.77Å e revelou três β-folha conectada por loops, estrutura conhecida como domínio jellyroll (**Figura 11**), essencialmente semelhante a Concanavalina A (SOUZA et al., 2003; VAREJÃO et al., 2010).

```

ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYQHIGINIKSIRSKATTRWDVQNGKVGTAHISYNSVAKR 60
LSAVVSYPGGSSATVSYDVLNNILPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNT 120
ADAQSLHFTFNQFSQSPKDLILQGDASTDSDGNLQLTRVSNQSPQSDSVGRALYYAPVHI 180
WDKSAVVASFDATEFTFLIKSPDREIADGIAFFIANTDSSIPHGSGGRLLGLFPDAN 236
  
```


Figura 10: Sequencia de AA Cramoll isoforma 1

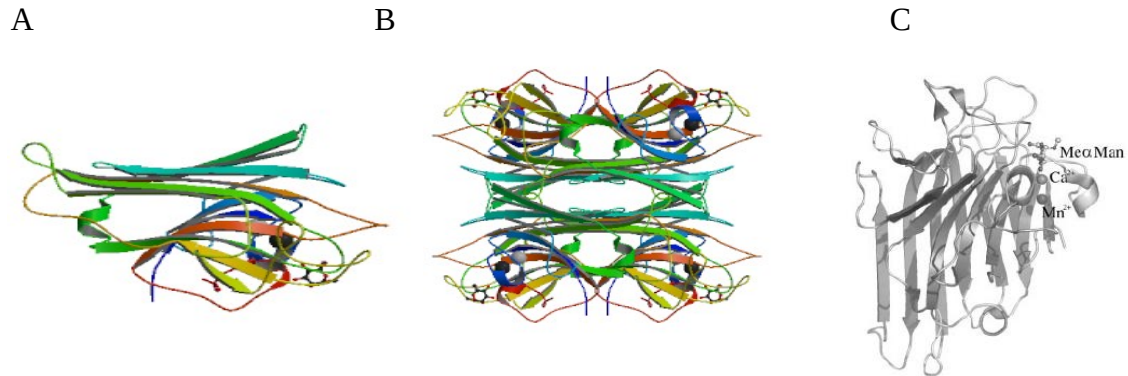


FIGURA 11: Estrutura Terciária de Cramoll 1 PDB ID: 1MVQ (adaptado de DA SILVA, 2014). **(A)** Monômero, **(B)** Tetrâmero e **(C)** Sítio de ligação a monossacarídeo e aos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} .

Essa similaridade corresponde a 82% de identidade com ConA (**Figura 12**), apresentando um sítio de ligação idêntico para metil- α -manopiranosídeo, Mn^{2+} e Ca^{2+} entretanto, são observadas diferenças de ligação a oligossacarídeos e glicoproteínas pelas duas lectinas. Os dois sítios que se ligam aos metais são encontrados na proximidade do sítio de ligação a monossacarídeo e é indispensável para ligação do carboidrato. Os metais interagem diretamente com a cadeia polipeptídica, como também via interação com moléculas de água (SOUZA et al., 2003).

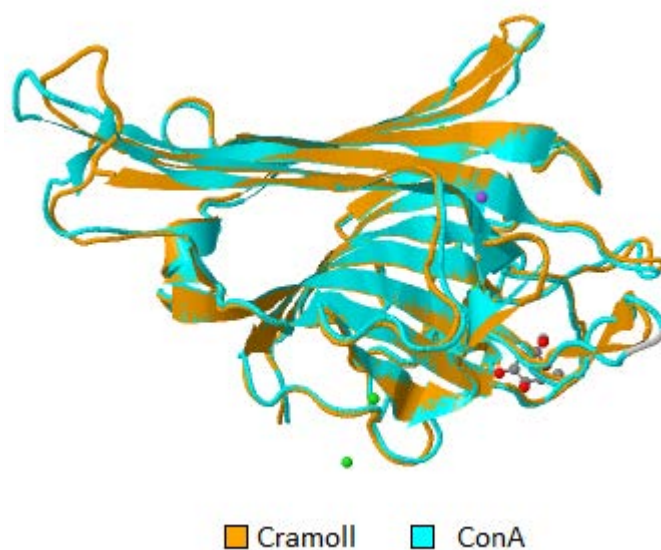


FIGURA 12: Alinhamento estrutural de Cramoll isoforma 1 e Concanavalina A

2.2.3. pCramoll e Atividades Biológicas

O potencial de pCramoll tem sido mostrado tanto para diagnóstico quanto na terapêutica em diversos âmbitos de pesquisa. A atividade anticâncer com uso de pCramoll, foi avaliado o perfil diferencial de marcação tecidual. Tendo uma maior marcação dos tecidos neoplásicos em relação aos sadios, e mais do que Concanavalin A (ConA), lectina comercial reconhecida com ação antitumoral (BELTRÃO et al, 1998). Também foi visto o perfil de glicosilação diferencial de tecidos normal, hiperplásico e carcinoma de próstata, o padrão de coloração foi mais intenso no tecido hiperplásico quando comparado ao tecido normal (LIMA et al., 2010). A ação anticâncer com as lectinas encapsuladas foi investigada contra Sarcoma 180 em camundongos Swiss, na qual pCramoll apresentou aumento na atividade antitumoral e diminuída toxicidade (ANDRADE et al., 2004).

A ação antiparasitária de pCramoll foi demonstrada contra *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni*. pCramoll apresentou atividade tripanocida contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* com potencial de aglutinação, inibição da proliferação e morte celular por necrose. Este mecanismo molecular de morte envolve permeabilização da membrana plasmática, seguido por influxo e acúmulo de Ca^{+2} mitocondrial, estimulando a geração de espécies reativas do oxigênio mitocondrial com diminuição do potencial de membrana, dificultando a fosforilação do ADP (FERNANDES et al., 2010). O efeito frente a *S. mansoni*, foi elucidado em modelo de infecção em camundongos Swiss. Esses foram infectados via subcutânea e caudal e foram tratados via intraperitoneal. Os tratamentos propostos foram eficientes, com redução da oviposição e recuperação das formas adultas, e formação de granuloma (MELO et al., 2011a).

O efeito cicatrizante de pCramoll foi primeiro avaliado no tratamento das lesões cutâneas experimentais em camundongos imunocompetentes e imunocomprometidos, mostrando alto poder de reparação tecidual e grande potencial como futuro composto cicatrizante (MELO et al., 2011c). Ainda, em um estudo posterior, com tratamento regular utilizando hidrogel contendo pCramoll, em queimaduras de segundo grau em camundongos, acelerou a granulação, o processo de reepitelização e retração da ferida (LIMA-RIBEIRO et al., 2012), mostrando o potencial terapêutico da lectina, que pode

ser utilizado com outros bioprodutos para o tratamento desse problema (PEREIRA, 2012).

Alguns estudos com viés biotecnológico foram feitos com pCramoll, quando imobilizadas em matriz de Sepharose CL4B e preparada uma coluna de afinidade, foi possível o isolamento e caracterização de glicoproteínas do plasma humano (LIMA et al., 1997). O mesmo sistema pCramoll-Sepharose possibilitou isolar proteínas com ação anticoagulante (SILVA et al., 2011), e pelo método de difusão em gel, foi possível isolar proteínas que apresentam glicose/manose na sua estrutura (DA SILVA, et al., 2014).

Para fim diagnóstico, pCramoll foi imobilizada em nanopartículas de ouro adsorvidas em eletrodos, esse sistema foi usado na construção de um biossensor sensível a glicoproteínas ou glicoconjugados em solução (OLIVEIRA et al., 2008). Em 2011 um novo sensor utilizando pCramoll foi desenvolvido com alta sensibilidade e seletiva discriminação para lipossacarídeo bacteriano, e vista capacidade de pCramoll de ligação com LPS de vários micro-organismos a exemplo de *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Klebsiella pneumonia* (OLIVEIRA et al., 2011a). As lectinas também mostraram ter um grande potencial na detecção de padrões anormais de glicoproteínas no soro de pacientes com dengue, apresentando padrões diferentes para os sorotipos virais 1, 2 e 3 e forte reação para o sorotipo 2 (OLIVEIRA et al., 2011b).

Dessa forma, as lectinas de *C. mollis* têm mostrado diversas atividades biológicas podendo ser utilizada como fonte para diversas aplicações biomédicas e médicas.

2.2.4 Atividade Imunomoduladora de pCramoll

A primeira referência que pCramoll apresentou propriedade imunomoduladora foi na indução mitogênica de linfócitos T, similar efeito também visto com ConA, essa habilidade em células T foi inibida por metil-D-manose, indicando o envolvimento do sítio de ligação a carboidratos da lectina com a resposta imune desenvolvida. Ainda foi observada a ação apenas da Cramoll 1 e não foi vista diferença significativa entre as isoformas (MACIEL et al., 2004). Essa propriedade mitogênese também foi demonstrada em esplenócitos de camundongos, obtidos 72 horas após administração intraperitoneal de 100µg/mL da lectina, além da produção de altos níveis de IL-2, IL-6,

INF- γ e óxido nítrico. pCramoll também não induziu apoptose e estimulou um número significativo de células na fase S do ciclo celular, mostrando que essa lectina pode ser usada como agente mitogênico nos ensaios de imunoestimulação (MELO et al., 2010a).

Posteriormente, num estudo experimentalmente similar usando uma dose de 235 μ g/mL, após sete dias, a análise dos linfócitos retirados do baço indicou um aumento de resposta Th2, expressando IL-6, IL-10 e IL-1 β e aumentando EROs mitocondrial e citosólico e Ca⁺² (MELO et al., 2011).

A atividade immunomodulatória nos linfócitos do baço e na produção de IFN- γ e supressão óxido nítrico foi observada com uso de pCramoll (MELO et al., 2010b). Recentemente, também foi avaliada a habilidade da lectina na indução da via Th17, expressando IL-6, IL-17A, IL-22, e IL-23 melhor que a comercial ConA, além de gerar memória imunológica por reestimulação de linfócitos (OLIVEIRA et al., 2013).

2.2.5. Imunoterapia e Infecções Fúngicas

Apesar dos agentes antifúngicos usados, infecções fúngicas invasivas são responsáveis por altas taxas da mortalidade (STEELE e WORMLEY, 2012). A exemplo, a criptococose, é responsável por 1 milhão de casos de meningoencefalite, principalmente em indivíduos HIV positivo, com 624.000 mortes, anualmente (MCMULLAN et al., 2013). Doenças imunossupressoras, em geral, associados ao crescente fenômeno de resistência antifúngica (GULLO et al., 2013; CHOWDHARY et al., 2014), torna o tratamento de grande parte dessas infecções oportunistas ineficaz e impulsiona estudos *in vitro* e modelos experimentais no desenvolvimento de imunoterapias. Citocinas, anticorpos, opsoninas, terapia celular, gênica e imunomodulatória são alternativas descritas na regulação do sistema imunológico (AMSTRONG-JAMES AND HARISON, 2012), combinados ou não aos antifúngicos em infecções como criptococose (ANTACHOPOULOS et al., 2012), candidíase (SAFDAR et al., 2004) e aspergilose (STUERLER et al., 2011). Vários estudos mostram efeitos imunorregulatórios por lectinas, particularmente, na migração e ativação de células mononucleares e polimorfonucleares, desenvolvimento de resposta Th1, Th2, Th17 e estímulo da fagocitose.

Modelos experimentais e análises *in vitro*, que aumentam a resposta antifúngica por estratégias imunorregulatórias por lectinas são reportadas. Em estudo com modelo de infecção por *Candida albicans*, usando como terapêutica Con A (Concanavalina A) observou-se a ativação de respostas antifúngicas por aumento da fagocitose por

macrófagos (LOYOLA et al., 2002; MORESCO et al., 2002).

A lectina Artin M, presente em sementes de *Artocarpus integrifolia*, apresentou atividade imunorregulatória estimulando a migração de neutrófilos por haptotaxia. Essa lectina tem habilidade de ligação a glicanos que apresentam manose (GANIKO et al., 1998), frequentes em componentes da matriz extracelular (como laminina) auxiliando a migração celular para tecidos injuriados (GANIKO et al., 2005), importante fenômeno na resposta inflamatória frente infecções. Também em modelo frente *C. albicans*, Artin M demonstrou efeito protetor por aumento de resposta Th1 e Th17. Em combinação com Jacalina (lectina galactose específica) também presente no extrato das sementes de *A. integrifolia*, estimula a produção de IL-12 por macrófagos intraperitoneais, e aumentou TNF α mediado por receptor Dectin-1 (LOYOLA et al., 2012), e maior estímulo de IFN- γ e IL-17. Esses mecanismos favorecem a fagocitose e ação anti *C. albicans* (CUSTODIO et al., 2011).

COLTRI e colaboradores (2008) demonstraram o efeito protetor de Artin M (nativa e recombinante) com administração terapêutica em camundongos acometidos por *Paracoccidioides brasiliensis*. Este efeito via produção de IL-12 por mecanismo dependente de TLR-2, essencial no estímulo de linfócitos B, que diferenciadas produzem citocinas tipo-1, principalmente IFN- γ , fundamentais para resistência frente à paracoccidioidomicose (TRICHERI et al., 2003).

Em outros estudos, foi demonstrado que a paracoccina (lectina de ligação a N-acetilglicosamina) induz a produção de TNF- α e NO por macrófagos, tem ação N-acetilglicosaminidase (DOS REIS ALMEIDA et al., 2010) e influencia na morfogênese e crescimento do *Paracoccidioides brasiliensis* (DOS REIS ALMEIDA et al., 2011). Tanto a paracoccina nativa (PCN) quanto recombinante (rPCN), apresentam propriedades imunorregulatórias que auxiliam na resposta contra o próprio fungo, levando a diminuição da carga fúngica, formação de granulomas menores e menos densos, associado com aumento dos níveis de IL-12 e IFN- γ (ALEGRE et al., 2014). Esta ação é resultante da interação da rPCN com receptores TLRs, observado em células HEK293T transfectadas com plasmídeos TLR 2/1, TLR 2/6 e TLR 4, e detecção da expressão de IL-8. A ativação por TLR2 é dependente do reconhecimento do carboidrato e independente da heterodimerização com TLR1 e TLR6 e presença dos co-receptores CD14 ou CD36 (ALEGRE et al. 2014). Como outras lectinas, a paracoccina, apresenta efeito imunomodulador por interagir com glicanos celulares do sistema inato e adaptativo do hospedeiro, e reforçam o combate a doenças infecciosas (UNITT AND

HOMIGOLD, 2011; SOUZA et al., 2011; DA SILVA & CORREIA, 2014). Esses estudos imunoterapêuticos implicam num enorme conhecimento da interação patógeno-sistema imune, como também, na descoberta de agentes que atuem no aumento da eficácia antifúngica

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito imunomodulador de pCramoll em modelo de infecção intratraqueal por *C. gattii*

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar e purificar lectinas de *Cratylia mollis* do Semi-árido do Estado de Pernambuco-Brasil;
- Avaliar a progressão da criptococose em modelo murino de infecção;
- Determinar melhor estratégia de tratamento do modelo animal com a pCramoll;
- Investigar o papel imunomodulador da pCramoll após o tratamento do modelo animal;
- Avaliar a influência da pCramoll na fagocitose de *C. gattii* por macrófagos murinos.

4. REFERÊNCIAS

- 1) ALEGRE-MALLER ACP, MENDONÇA FC, DA SILVA TA, OLIVEIRA AF, FREITAS MS, HANNA ES, ALMEIDA IC, GAY NJ, ROQUE-BARREIRA MC (2014). Therapeutic Administration of Recombinant Paracoccin Confers Protection against Paracoccidioides brasiliensis Infection: Involvement of TLRs. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(12):3317.
- 2) ALEGRE-MALLER ACP, OLIVEIRA AF, DOS REIS ALMEIDA FB, ROQUE-BARREIRA MC, HANNA ES (2014). Recombinant Paracoccin Reproduces the Biological Properties of the Native Protein and Induces Protective Th1 Immunity against Paracoccidioides brasiliensis Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(4):e2788.
- 3) AMOROZO, MCM (2002). Use and diversity of medicinal plants in Santo Antonio do Leverger. *Acta Bot Bra*, 16(2):189-203.

- 4) ANDRADE CAS, CORREIA MTS, COELHO LCBB, NASCIMENTO SC, SANTOS-MAGALHÃES NS (2004). Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int J of Pharm*, 278(2):435-445.
- 5) ANTACHOPOULOS C, WALSH TJ (2012). Immunotherapy of *Cryptococcus* infections. *Clin Microbiol Infect*, 18(2):126-133.
- 6) ANTACHOPOULOS C, WALSH TJ (2012). *Clin Microbiol Infect*, (2):126-33.
- 7) ARAUJO SN, MATRANGOLO WJR, MIRANDA GA, NETTO DAM, DA SILVA IHS (2011). Análises das sementes de *Cratylia argentea*: cultura potencial para adubação verde e forragem / Sete Lagoas: *Embrapa Milho e Sorgo*, 36:1679-0154.
- 8) ARMSTRONG-JAMES D, TEO IA, SHRIVASTAVA S, PETROU MA, TAUBE D, DORLING A, SHAUNAK S (2010). Exogenous interferon-gamma immunotherapy for invasive fungal infections in kidney transplant patients. *Am J Transplant*, 10:1796-1803.
- 9) AZEVEDO PR, SILVA LCN, SILVA AG, ARAÚJO JM, MACEDO AJ, SILVA MV (2012). Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. *Scientia Plena*, 8:1-4.
- 10) BANDYOPADHYAY S, ROY A, DAS S (2001). Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopter a pests is correlated to its insecticidal activity. *Plant Science*, 161:1025-1033.
- 11) BARTLETT KH, MORTENSON JA, WILSON RW, LOCKHART SR (2013). Detection of *Cryptococcus gattii* in Selected Urban Parks of the Willamette Valley, Oregon. *Mycopath*. 175:351–355.
- 12) BELTRÃO EI, CORREIA MTS, FIGUEREDO-SILVA J, COELHO LCBB (1998). Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl Biochem Biotechnol*, 74:125-134.
- 13) BILLMYRE RB, CROLL D, LI W, MIECZKOWSKI P, CARTER DA, CUOMO CA, KRONSTAD JW, HEITMAN J (2014). Highly Recombinant VGII *Cryptococcus gattii* Population Develops Clonal Outbreak Clusters through both Sexual Macroevolution and Asexual Microevolution. *mbio.asm.org*. 5.
- 14) BOURGEOIS C, MAJER O, FROHNER IE, LESIAK MI, HEIDERING KS, GALER W, STOCKINGER S, DECKER T, AKIRA S, MÜLLE M, KUCHLER K (2011). Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against

- Candida* spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN- β signaling. *J Immunol*, 186:3104–3112.
- 15) BOVERS M, DIAZ MR, HAGEN F, SPANJAARD L, DUIM B, VISSER CE, HOOGVELD H, SCHARRINGA J, HOEPELMAN IM, FELL JW, BOEKHOUT T (2007). Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol*, 45:1874–1883.
 - 16) BOYD WC, SHAPLEIGH E (1954). Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). *Science*, 119:419.
 - 17) BRAGA AB (2009). Potenciais fungicida e inseticida de proteínas presentes em sementes de *Dioclea megacarpa* Rolfe. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal do Ceará.
 - 18) BRECHTEL R, WÄTZIG H, RÜDIGER H (2001). The lectin from the mushroom *Pleurotus ostreatus*: a phosphatase-activating protein that is closely associated with an alpha-galactosidase activity. A part of this paper has been presented as a preliminary report at the 17th Interlec. Meeting 1997 in Würzburg, Germany. *Plant Sci*, 160(5):1025-1033.
 - 19) BROWN GD, DENNING DW, LEVITZ SM (2012). Tackling human fungal infections. *Science*, 336:647.
 - 20) CAMPBELL LT, FRASER JA, NICHOLS CB, DIETRICH FS, CARTER D, HEITMAN J (2005). Clinical and environmental isolates of *Cryptococcus gattii* from Australia that retain sexual fecundity. *Euk Cell*, 4:1410–1419.
 - 21) CANNON RD, LAMPING E, HOLMES AR, NIIMI K, BARET PV, KENIYA MV, TANABE K, NIIMI M, GOFFEAU A, MONK BC (2009). Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 291–321.
 - 22) CHANG YC, STINS MF, MCCAFFERY MJ, MILLER FG, PARE DR, DAM T, PAUL-SATYASEELA M, KIM KS, KWON-CHUNG KJ (2004). Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier. *Infect Immun*, 72:4985-4995.
 - 23) CHARLIER C, NIELSEN K, DAOU S, BRIGITTE M, CHRETIEN F, DROMER F. (2009), Evidence the role of monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun*. 77:120–127.
 - 24) CHATURVEDI V, CHATURVEDI S (2011). *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. *Trend in Microbiol*, 19:11.

- 25) CHEN S, SORRELL T, NIMMO G, SPEED B, CURRIE B, ELLIS D, MARRIOTT D, PFEIFFER T, PARR D, BUTHY K (2000). Epidemiology and host- and variety dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. *Clin Infect Dis*, 31:499–508.
- 26) CHEN SCA, MEYER W, SORRELL TC (2014). *Cryptococcus gattii* Infections. *Clin Microbiol Rev*, 27:980-1024.
- 27) CHOWDHARY A, PRAKASH A, RANDHAWA HS, KATHURIA S, HAGEN F, KLAASSEN, CH, MEIS JF (2013). First environmental isolation of *Cryptococcus gattii*, genotype AFLP5, from India and a global review. *Mycoses*, 56:222–228.
- 28) CHOWDHARY A, SHARMA C, HAGEN F, MEIS JF (2014). Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiol*, 2014;9(5):697-711.
- 29) COELHO C, BOCCA AL, CASADEVALL A (2014). The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Pathol* 24:219-238.
- 30) COELHO LCB, BELTRÃO EIC, CORREIA MTS (2010). Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J of Biomed and Biotech*.
- 31) COGLIATI M (2013). Global molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: an atlas of the molecular types. *Scientifica*, 2013:23.
- 32) COLTRI KC, OLIVEIRA LL, PINZAN CF (2013). Therapeutic administration of KM⁺ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 173(2):423-432.
- 33) COLTRI KC, OLIVEIRA LL, PINZAN CF, VENDRUSCOLO PE, MARTINEZ R, GOLDMAN MH, PANUNTO-CASTELO A, ROQUE-BARREIRA MC (2008). Therapeutic administration of KM⁺ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol*, 2008 173(2):423-32.
- 34) CORREIA MTS, COELHO LCB (1995). Purification of a glucose/manose specific Lectin. Isoforma 1, from seeds of *Cratylia molli* sMart. (Camaratubean). *App Biochem Biotechol*, 55:261-73.

- 35) CUSTODIO LA, LOYOLA W, CONCHON-COSTA I, DA SILVA QUIRINO GF, FELIPE I (2011). Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol*. 11(10):1510-1515.
- 36) D'SOUZA CA, KRONSTAD JW, TAYLOR G (2011). Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts. *MBio* 342.
- 37) DA SILVA LCN, CORREIA MTS (2014). Plant Lectins and Toll-like receptors: implications in therapy for microbial infections. *Frontiers in Microbiology*, 5:20.
- 38) DA SILVA LCN, MACÊDO CBF, PAULA RA, COELHO LCBB, SILVA MV, CORREIA MTS, (2014). *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies, 2014:44-54.
- 39) DATTA K, BARTLETT K H, MARR KA (2009). *Cryptococcus gattii*: emergence in western north America: exploitation of a novel ecological niche. *Inter Discip Perspect Infect Dis*, 2009:1-8.
- 40) DECKEN KK, OHLER G, PALMER-LEHMANN, K (1998). Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 66:4994-5000.
- 41) DERENGOWSKI LS, PAES HC, ALBUQUERQUE P (2013). The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation into the mammalian host. *Eukaryot Cell*, 12:761-774.
- 42) DONG ZM, MURPHY JW (1995). Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect Immun*, 63:2632-2644.
- 43) Dos Reis Almeida FB, Carvalho FC, Mariano VS, Alegre ACP, Silva R do N, ROQUE BARREIRA MC, HANNA ES (2011). Influence of N-glycosylation on the morphogenesis and growth of *Paracoccidioides brasiliensis* and on the biological activities of yeast proteins. *PLoS One*, 6(12): ee29216.
- 44) DOS REIS ALMEIDA FB, OLIVEIRA LL, SOUSA MV, ROQUE BARREIRA MC, HANNA ES (2010) Paracoccin from *Paracoccidioides brasiliensis* purification through affinity with chitin and identification of N-acetyl-b-D-glucosaminidase activity. *Yeast*, 27: 67-76

- 45) EISENMAN HC, CASADEVALL A, MCCLELLAND EE (2009). New insights on the pathogenesis of invasive *Cryptococcus neoformans* infection. *Curr Infect Dis Rep*, 9:457-464.
- 46) ELLIS DH, PFEIFFER TJ (1990). Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J Clin Microbiol*, 28:1642–1644.
- 47) ENGELTHALER DM, HICKS ND, GILLECE JD, ROE CC, SCHUPP JM, DRIEBE EM, GILGADO F, CARRICONDE F, TRILLES L, FIRACATIVE C, NGAMSKULRUMGROJ P, CASTAÑEDA E, LAZERA MS, MELHEM MSC, PÉREZ-BERCOFF S, HUTTLEY G, SORREL TC, VOELZ K, MAY RC, FISHER MC, THOMPSON GR, LOCKHART SR, KEIM P, MEYER W (2014). *Cryptococcus gattii* in North American Pacific Northwest: Whole-Population Genome Analysis Provides Insights into Species Evolution and Dispersal. *mbio.asm.org*. 5.
- 48) FENG X, FU X, LING B, WANG L, LIAO W, YAO Z (2013). Development of a singleplex PCR assay for rapid identification and differentiation of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii* and hybrids. *J Clin Microbiol*, 51(6):1920–1923.
- 49) FERNANDES MP, INADA NM, CHIARATTI MR, ARAÚJO FF, MEIRELLES FV, CORREIA MTS, COELHO LCB, ALVES MJM, GADELHA FR, VERCESI AE (2010). Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J of bioenerget and biomemb*, 42(1):69-78.
- 50) FIRAT YH, SIMANSKI M, RADEMACHER F, SCHROEDER L, BRASCH J, HARDER J (2014). Infection of keratinocytes with *trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PLoS One*, 9(4):3-9.
- 51) GALANIS, E.; MACDOUGALL, L.; KIDD, S.; MORSHED, M.G (2010). The British Columbia *Cryptococcus* working group. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg Infect Dis*, 16:251–7.
- 52) GANIKO L, MARTINS AR, ESPREAFICO EM, ROQUE-BARREIRA MC (1998). Neutrophil haptotaxis induced by the lectin KM+. *Glycoconj* , 15: 527–530.

- 53) GANIKO L, MARTINS AR, FREYMÜLLER E, MORTARA RA, ROQUE-BARREIRA MC (2005). Lectin KM⁺-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1721:1–3.
- 54) GHANNOUM MA, RICE LB (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol*, 12(4):501-17.
- 55) GHAZARIAN H, IDONI B, OPPENHEIMER SB (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemical*, 113(2011):236–247.
- 56) GORELIK E, GALILI U, RAZ A (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 20:245–77.
- 57) GULLO FP, ROSSI SA, SARDI JD, CO, TEODORO VLI, MENDES-GIANNINI MJS, FUSCO-ALMEIDA AM (2013). Cryptococcosis: Epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 32(11):1377-1391.
- 58) HARDISON SE, BROWN GD (2012). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat Immunol*. 9:817-822.
- 59) HEITMAN J, KOZEL T, KWON-CHUNG KJ, PERFECT JR, CASADEVALL A (2011). *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. Washington, DC: ASM Press.
- 60) HOANG LM, PHILLIPS P, GALANIS E (2011). *Cryptococcus gattii*: a review of the epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management of this endemic yeast in the Pacific Northwest. *Clin Microbiol Newsl* 33:187–195 (2011).
- 61) HUANG SH, LONG M, WU CH. (2011). Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3). *J Biol Chem* 286:34761–34769.
- 62) KECHICHIAN TB, SHEA J, DEL POETA M (2007). Depletion of alveolar macrophages decreases the dissemination of a glucosylceramide-deficient mutant of *Cryptococcus neoformans* in immunodeficient mice. *Infect. Immun*, 75:4792–4798.

- 63) KIM KS (2008). Mechanism of microbial transversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev*, 6:625-634.
- 64) KOLEV MM, DAGNAES-HANSEN F, HANSEN SB, TAKAHASHI K, EZEKOWITZ A, THIEL S, JENSENIUS JC, GADJEVA M (2009). Mannan-binding lectin deficiency modulates the humoral immune response dependent on the genetic environment. *Immunology*, 127:279–88.
- 65) KRONSTAD JW, ATTARIAN R, CADIEUX B, CHOI J, D’SOUZA CA, GRIFFITHS EJ, GEDDES JMH, HU G, HEE JUNG W, KRETSCHMER M, SAIKIA S, WANG J (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, 9(3):193-203.
- 66) KUMAR KK, CHANDRA KLP, SUMANTHI J, REDDY GS, SHEKAR PC, REDDY BVR (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of Orofacial Sciences*, 20(4)1.
- 67) KWON-CHUNG KC, VARMA A (2006). Do major species concepts support one, or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res*, 6:574–587.
- 68) KWONG-CHUNG K, BOEKHOUT T, FELL JW, DIAZ M (2002). Proposal to conserve the name *gattii* against *C. hondurianus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon*, 51:804–806.
- 69) LANDSTEINER K (1936). The Specificity of Serological Reactions. 3rd ed. Springfield: Charles C Thomas.
- 70) LEITE JR DP, AMADIO JVR, MARTINS ER, SIMÕES SAA, YAMAMOTO ACA (2012). *Cryptococcus spp* isolated from dust microhabitat in Brazilian libraries. *J of Occupat Med and Toxicol*, 7:11.
- 71) LEWIS G, SCHRIRE B, MACKINDER B, LOCK M (2005). Legumes of the world. *Royal Botanic Gardens*, 1-577.
- 72) LIMA AL, CAVALCANTI CC, SILVA MC, PAIVA PM, COELHO LC, BELTRÃO EIC (2010). Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J Biomed Biotech*, 2010:1-7.
- 73) LIMA VLM, CORREIA MTS, CECHINEL YMN, SAMPAIO CA, OWEN JS, COELHO LCB (1997). Immobilized *Cratylia mollis* lectin as potential matrix to isolate plasma glycoproteins including lecithin cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers*, 33(1)27-32.

- 74) LIMA-RIBEIRO MHM, SANTOS-OLIVEIRA R, SANTANA MFD, PINTO TDJA, KIKUCHI IS, MOTHE CG, CARNEIRO-LEÃO AMDA (2012). In Vitro Evaluation of Gamma Irradiation on a Gel Formulation of *Cratylia Mollis*: Rheological Properties and Microbiological Control. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 2(2), 45-50.
- 75) LOYOLA W, CUSTODIO LA, FELIPE I (2012). Artin M enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. *Int Immunopharmacol*, 12(2):378-383.
- 76) LOYOLA W, CUSTODIO LA, FELIPE I, CONCHON-COSTA I, CARVALHO PG, QUIRINO GF, SILVA LF, GAZIRI LC (2012). Artin M enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. *Int Immunopharmacol*, 12(2):378-83.
- 77) MA H, HAGEN F, STEKEL DJ, JOHNSTON S, SIONOV E, FALK R, POLACHEK I, BOEKHOUT T, MAY RC (2009). The fatal fungal outbreak on Vancouver Island is characterized by enhanced intracellular parasitism driven by mitochondrial regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31):12980-12985.
- 78) MA H, MAY RC (2009) Virulence in *Cryptococcus* species. *Advances in Applied Microbiology*, 67:131-190.
- 79) MACIEL EVM, ARAÚJO-FILHO VS, NAKAZAWA M, COELHO LCB, CORREIA MTS (2004). Mitogenic Activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, (32):57-60.
- 80) MCMULLAN BJ, SORRELL TC, SHARON CHIH-AC (2013). *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. *Future Microbiol*, 8(12):1613–1631
- 81) MCQUISTON T J, WILLIAMSON PR, (2009). Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Chemother*, 18:1-9.
- 82) MELO CM, MELO H, CORREIA MTS, COELHO LCB, DA SILVA MB, PEREIRA VR (2011). Mitogenic response and cytokine production induced by Cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scandinavian Journal Immunology*, 73(2):112-121.
- 83) MELO CM, PAIM BA, ZECCHIN KG, MORARI J, CHIARATTI MR, CORREIA MTS, COELHO LCB, PAIVA PMG (2010). Cramoll 1,4 lectin

- increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 342(1-2):163-169.
- 84) MELO CML, PORTO CS, MELO-JUNIOR MR, MENDES CM, CAVALCANTI CBB, COELHO LCBB (2011). Healing activity induced by Cramoll1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Inter J Pharma* 408:113-9.
 - 85) MELO CML, LIMA ALR, BELTRÃO EIC, CAVALCANTI CCB, MELO-JÚNIOR MR, MONTENEGRO SML, CORREIA MTS, CARNEIRO-LEAO AMA (2011). Potential effects of Cramoll1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Tropica*, 1:1-7.
 - 86) METZLER KD, GOOSMANN C, LUBOJEMSKA A, ZYCHLINSKY A, PAPAYANNOPOULOS V (2014). A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. *Cell Rep*, 8(3):883-96.
 - 87) MEYER W, GILGADO F, NGAMSKULRUNGROJ P, HEITMAN J, KOZEL TR, KWON-CHUNG J, PERFECT J, CASADEVALL (2011). Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. In: *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. A (Eds). American Society for Microbiology, Press, Washington, DC, USA, 327–357.
 - 88) MINKO T, (2004). Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, 56:491–509.
 - 89) MITCHELL TG, PERFECT JR (1995). Cryptococcosis in the era of AIDS—100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev*, 8:515–548.
 - 90) MODY R, JOSHI SHA, CHANEY W (1995). Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33(1):1-10.
 - 91) MOHAMMED HKP, ANU A, SARASWATHI R, GURU PM, CHANDINI N (2012). Formulation and Evaluation of Herbal Gel of *Basella alba* for wound healing activity. *J Pharm Sci Res*, 4(1):1642-1648.
 - 92) MORESCO TR, GAZIRI LCJ, YASUMOTO Y, FELIPE I (2002). Phagocytic and candidacidal activities of macrophages from suckling and adult mice pretreated with concanavalin-A. *Med Mycol*, 40(4):393-7.

- 93) MÜLLER U, STENZEL WK, OHLER G (2007). IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol*, 179:5367-5377.
- 94) NADROUS HF, ANTONIOS VS, TERRELL CL, RYU JH (2003). Pulmonary cryptococcosis in non immunocompromised patients. *Chest*, 124:2143– 2147.
- 95) NGAMSKULRUNGROJ P, CHANG Y, SIONOV E, KWON-CHUNG KJ (2012). The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio*.
- 96) NGAMSKULRUNGROJ P, GILGADO F, FAGANELLO J (2009). Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties, *PLoS ONE* 4:5862.
- 97) NICOLSON GL, AND SINGER SJ (1971) Ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: application to saccharides bound to cell membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 68:942–945
- 98) NIMRICHTER L, GARGIR A, GORTLER M, ALTSTOCK RT, SHTEVI A, WEISSHAUS O, FIRE E, DOTAN N, SCHNAAR RL (2004). Intact cell adhesion to glycan microarrays. *Glycobiology*, 14:197–203.
- 99) NISHIKAWA MM, LAZERA MS, BARBOSA GG, TRILLES L, BALASSIANO BR, MACEDO RCL, BEZERRA CF, PEREZ MA, CARDARELLI P, WANKE B (2003). Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: Analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 41: 73-77.
- 100) NOONEY L, MATTHEWS RC, BURNIE JP (2005), Evaluation of Mycograb, amphotericin B, caspofungin, and fluconazole in combination against *Cryptococcus neoformans* by checkerboard and time-kill methodologies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 51:19-29.
- 101) OLIVEIRA AL (2009). O papel dos simbióticos na prevenção, tratamento e modulação da resposta inflamatória em pacientes com carcinoma colorretal. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, 1(4):23- 31.
- 102) OLIVEIRA JTA, RIOS FJB, VASCONCELOS IM, FERREIRA FVA, NOJOSA GBA, MEDEIROS DA (2004). *Cratylia argentea* seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: effects on rat metabolism and gut histology. *Food and Chem Toxicol*, 42:1737–1747.

- 103) OLIVEIRA MDL, CORREIA MTS, COELHO LCBB, DINIZ FB (2008). Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 66(1):13-9.
- 104) OLIVEIRA MDL, NOGUEIRA ML, CORREIA MTS, COELHO LCBB, ANDRADE CAS (2011b). Detection of dengue virus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. *Sensors and Actuators B* 155:789–795.
- 105) OLIVEIRA MDL, NOGUEIRA ML, CORREIA MTS, COELHO LCBB, ANDRADE CAS (2011b). Detection of dengue vírus serotypes on the surface of gold electrode based on *Cratylia mollis* lectin affinity. *Sensor Actuat B-Chem*, 155:789-95.
- 106) OLIVEIRA PSS, RÊGO MJB, SILVA RR, CAVALCANTI MB, GALDINO SL, CORREIA MTS, COELHO LCBB, PITTA MGR (2013). *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. *Biomed Research International*.
- 107) OLSNES S, KOZLOV J V (2001). Ricin. *Toxicon*, 39:1713-1728.
- 108) OSTERHOLZER JJ, MILAM JE, CHEN GH (2009). Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*, 77:3749-3758.
- 109) PAIVA PMG, COELHO LCBB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (camaratu vean) (1992). *App Biochem Biotech*, 36:133-8.
- 110) PEREIRA DST, LIMA-RIBEIRO MHM, SANTOS-OLIVEIRA R, CAVALCANTI CLB, PONTES-FILHO NT, COELHO LCBB, CARNEIRO-LEÃO AMA, CORREIA MTS (2012). Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- 111) PERFECT WE, DISMUKES F, GOLDMAN DL, GRAYBILL JR, HAMILL RJ, HARRISON TS, LARSEN RA, LORTHOLARY O, NGUYEN MH, PAPPAS PG, POWDERLY WG, SINGH N, SOBEL JD, SORRELL TC (2010). Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010

- Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 50:291–322.
- 112) REVANKAR SG, FU J, RINALDI MG (2004). Cloning and characterization of the lanosterol 14-demethylase (ERG11) gene in *Cryptococcus neoformans*. *Biochem Biophys Res Commun*, 324:719 -728.
 - 113) SAAG MS, GRAYBILL RJ, LARSEN RA, PAPPAS PG, PERFECT JR, POWDERLY WG, SOBEL JD, DISMUKES WE (2000). Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 30:710-718.
 - 114) SAFDAR A, RODRIGUEZ G, OHMAGARI N, KONTOYIANNIS DP, ROLSTON KV, RAAD II, CHAMPLIN RE (2005)The safety of interferon-gamma-1b therapy for invasive fungal infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* , 103:731-739.
 - 115) SANTOS JR, HOLANDA RA, FRASES S, BRAVIM M, ARAUJO GDE S, SANTOS PC, COSTA MC, RIBEIRO MJ, FERREIRA GF, BALTAZAR LM, MIRANDA AS, OLIVEIRA DB, SANTOS CM, FONTES AC, GOUVEIA LF, RESENDE-STOIANOFF MA, ABRAHÃO JS, TEIXEIRA AL, PAIXÃO TA, SOUZA DG, SANTOS DA (2014). Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. *PLoS One*, 19(11):e112669.
 - 116) SANTOS WRA, WIELAND M, BODO W, SOLANGE PSEC, TRILLES L, NASCIMENTO JLM, MEDEIROS R, MORALES BP, BEZERRA CCF, MACÊDO RCL, FERREIRA SO, BARBOSA GG, PEREZ MA, NISHIKAWA MM, LAZÉRA MS (2008). Primary endemic Cryptococcosis gattii by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil, *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 103(8):813-818.
 - 117) SANTOS JRA, ASSUNÇÃO HR, FRASES S, BRAVIM M, ARAUJO GS, SANTOS PC, COSTA MC,MAIRA RIBEIRO JA, FERREIRA GF,BALTAZAR LM, MIRANDA AM, OLIVEIRA DB, SANTOS CMA,SANTOS DA (2013). Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine cryptococcosis. 9(11): e112669.
 - 118) SHARON N (2008). Lectins: past, present and future. *Biochemical Society Transactions*, 36:1457-60.

- 119) SHARON N, LIS H (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14:53R–62R.
- 120) SHIBUYA K, HIRATA A, OMUTA J, (2005). Granuloma and cryptococcosis. *J Infect Chemother*, 11:115-122.
- 121) SHOHAM S, LEVITZ SM (2005). The immune response to fungal infections. *Br. J. Haematol*, 129: 569-582.
- 122) SHUN LI S, MODY CH (2010). *Cryptococcus*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 10:186–196.
- 123) SIDRIM JJ, COSTA AK, COSTA F (2010). Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Can J Microbiol*, 56: 445–458.
- 124) SILVA DC, MARTINS MA, SXESXS MW, BONFIETTI LX, MATOS D, MELHEM SCM (2012). Susceptibility to antifungal agents and genotypes of Brazilian clinical and environmental *Cryptococcus gattii* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 72:332–339.
- 125) SILVA MCC, SANTANA LA, SILVA-LUCCA RA, LIMA ALR, FERREIRA JG, PAIVA PMG, COELHO LCBB, OLIVA MLV, ZINGALI RB, CORREIA MTS (2011). Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycinemax*) seed protein with *in vitro* platelet antiaggregation and anticoagulant activities. *Process Biochemistry*, 46(1):74-80.
- 126) SINGH H, SARATHI SP (2012). *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 3(4):2229-5518.
- 127) SOUZA GA, OLIVEIRA PSL, TRAPANI S, SANTOS ACO, ROSA JC, LAURE HJ, FAÇA VM, CORREIA MTS, TAVARES GA, OLIVA G, COELHO LCBB, GREENE LJ (2003). Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology*, 13(12):961-972
- 128) SOUZA MA, CARVALHO FC, RUAS LP, RICCI-AZEVEDO R, ROQUE-BARREIRA MC (2013) The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, 30(7):641-57.
- 129) SPEED B, DUNT D (1995). Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Infect Dis*, 21:28–34.
- 130) SPRINGER DJ, REN P, CHATURVEDI S, CHATURVEDI V (2010). Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for

- ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PLoSOne*, 5(6):e10978.
- 131) STUEHLER C, KHANNA N, BOZZA S, ZELANTE T, MORETTI S, KRUHM M, LURATI S, CONRAD B, WORSCHKECH E, STEVANOVIC S (2011). Cross-protective TH1 immunity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Blood*, 117(22):5881-91.
 - 132) SUBRAMANIAN S, MATHAI D (2005). Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. *J Postgrad Med*, 51:S21-26.
 - 133) TRINCHIERI G (2003). INTERLEUKIN-12 AND THE REGULATION OF INNATE RESISTANCE AND ADAPTIVE IMMUNITY. *NAT REV IMMUNOL*, 3: 133–146.
 - 134) TSUNEMI T, KAMATA T, FUMIMURA Y, WATANABE M, YAMAWAKI M, SAITO Y, KANDA T, OHASHI K, SUEGARA N, MURAYAMA S, MAKIMURA K, YAMAGUCHI H, MIZUSAWA H (2001). Immuno histochemical diagnosis of *Cryptococcus neoformans* var. *Gattii* infection in chronic meningoencephalitis: the first case in Japan. *Intern Med*, 40:1241–1244.
 - 135) UNITT J, HORNIGOLD D (2011) Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem Pharmacol* 81: 1324–1328.
 - 136) VAN DAMME EJM, LANNOO N, PEUMANS WJ 2008. Plant lectins. *Adv Bot Res*, 48:107–209.
 - 137) VAN DAMME EJM, PEUMANS WJ, BARRE A, ROUGÉ P (1998a). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci*, 17:575–692.
 - 138) VAN DEN BERGH KPB, PROOST P, VAN DAMME J, COOSEMANS J, VAN DAMME EJM. PEUMANS WJ (2002). Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.). *FEBS Letters*, 530:181-185.
 - 139) VANDENBORRE G, VAN DAMME EJM, SMAGGHE G. Natural products: plant lectins as important tools in controlling pest insects. In: Ishaaya, I., Horowitz, A.R. (Eds.) (2009b). Biorational Control of Arthropod Pests: Application and Resistance Management. *Springer Science*, 163–187.
 - 140) VAREJÃO N, ALMEIDA MS, DE CICCIO NNT, ATELLA GC, COELHO LCBB, CORREIA MTS, FOGUEL D (2010). Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds

- (CRAMOLL 1). *Biochimica et Biophysica Acta*. Proteins and Proteomics, 1804:1917-1924.
- 141) VARELA ES, LIMA JPMS, GALDINO AS, PINTO LS, BEZERRA WM, NUNES EP, ALVES MAO, GRANGEIRO TB (2004). Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochemistry*, 65(1):59 - 69.
 - 142) VAZ AFM, SOUZA MP, CARNEIRO-DA-CUNHA MG, MEDEIROS PL, MELO AMMA, AGUIAR JS, SILVA TG, SILVA-LUCCA RA, OLIVA M LV, CORREIA MTS (2012). Molecular fragmentation of wheat-germ agglutinin induced by food irradiation reduces its allergenicity in sensitised mice. *Food Chemistry*, 132:1033-1039.
 - 143) VAZ AFM, SOUZA MP, MEDEIROS PL, MELO AMMA, SILVA-LUCCA RA, SANTANA LA, OLIVA MLV, PEREZ K, CUCCOVIA I, CORREIA MTS (2013). Low-dose gamma irradiation of food protein increases its allergenicity in a chronic oral challenge. *Food and Chemical Toxicology*, 51:46-52.
 - 144) VAZ, A. F. M.; MARTHYNA, P. S.; ARGÔLO, A. C. C. M.; MELO, A. M. M. A.; OLIVA, M. L. V.; XAVIER, S. H.; COELHO, L. C. B. B; CORREIA, M. T. S. Gamma irradiation as an alternative treatment to abolish allergenicity of lectins in food. *Food Chemistry*, 124 1289–1295, 2011.
 - 145) VOELZ K, MAY RC (2010). Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. *Eukaryotic Cell*, 9:835–846.
 - 146) WRIGHT L, BUBB W, DAVIDSON J (2002). Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. *Microbes Infect* 4:1427-1438.
 - 147) ZARAGOZA O, ALVAREZ M, TELZAK A (2007). The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect Immun*, 75:2729-2739.
 - 148) ZHAI B, ZHU P, FOYLE D, UPADHYAY S, IDNURM A, LIN X (2013). Fungal and Parasitic Infections: Congenic Strains of the Filamentous Form of *Cryptococcus neoformans* for Studies of Fungal Morphogenesis and Virulence. *Infect Immun*, 81(7):2626-2637.

5. **ARTIGO PARA SUBMISSÃO NA REVISTA**

Glycobiology

**Immunotherapeutic effect with pCramoll in murine model of
*Cryptococcus gatti***

Immunotherapeutic effect with pCramoll in murine model of *Cryptococcus gattii*

Jandú JJB^a, Santos JRA^b, Andrade F^b, Costa MC^b, Silva MV^a, Coelho LCBB^a, Magalhães TFF^b,
Santos DA, Correia MTS^{a*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

^bDepartamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Pernambuco, Brasil

*Corresponding author.

Tel.: +55 8121268540;

fax: +55 8121268576.

email address: mtscorreia@gmail.com

Abstract

Cryptococcus gattii is one of the main causative agents of cryptococcosis in immunocompetent individuals. The treatment for the infection is based on the use of antimycotic drugs in monotherapy or in association therapy. However, the toxicity of these drugs and the increase of drug-resistant strains have driven the search for new therapies for cryptococcosis that are more effective with fewer side effects. This work aimed to evaluate the immunomodulatory effect of pCramoll on the murine infection model using intratracheal inoculation of *C. gattii*. The use of pCramoll alone or in combination with fluconazole showed to be the most effective therapy with an expressive effect on the morbidity of treated animals and an improving of behavioral parameters as the neuropsychiatric state, motor behavior, autonomic function, tone and muscle strength and reflex/sensory function. The treatment with pCramoll also decrease pulmonary and cerebral fungal burden up to 35 days post-infection and the inflammatory infiltrate as well as modulate the levels of CXCL/KC, IL-10 and IL-17. The in vitro assay demonstrated that pCramoll are able to stimulate the phagocytosis of *C. gattii* by the Bone marrow-derived macrophages, with an enhanced production of reactive oxygen species and decreasing of intracellular fungal proliferation. Taken together, these findings points towards the use of pCramoll in combination with fluconazole as a viable therapeutic alternative to cryptococcosis, increasing the survival and improving the morbidity of infected animals.

KEYWORDS: Cryptococcosis, Immunomodulatory, Lectins, Cratylia mollis lectin, Fluconazole, Survival

INTRODUÇÃO

A inalação de leveduras dessecadas ou esporos de *Cryptococcus gattii*, fungo patogênico emergente que afeta principalmente indivíduos imunocompetentes, pode causar desde infecção pulmonar até o acometimento do sistema nervoso central (SNC) (Santos et al. 2014). A meningoencefalite criptocócica (CM) é a forma mais grave da criptococose, tipicamente em pacientes HIV/AIDS e transplantados, como também em indivíduos sem aparente imunossupressão (Sharon et al. 2013). Diante dos mecanismos de resistência utilizados pelo micro-organismo frente aos antifúngicos (Zhai et al. 2013) e os efeitos colaterais decorrente das terapias convencionais, há necessidade de intensificar a prospecção de substâncias imunomoduladoras direcionadas à terapia anticriptocócica, além da busca de novos antimicóticos.

Estudos mostram efeitos imunorregulatórios por lectinas na migração e ativação de células mononucleares e polimorfonucleares, desenvolvimento de resposta Th1, Th2, Th17 e estímulo da fagocitose (Da Silva e Correia 2014). pCramoll são duas isoformas de lectinas purificadas de *Cratylia mollis*, com sítios de reconhecimento específico para glicose/manose e baseado em propriedades imunorregulatórias já reportadas, como indução mitogênica de linfócitos T (Maciel et al. 2004), produção de altos níveis de citocinas pró inflamatórias (Da Silva 2014), aumento de resposta Th2, (Melo et al. 2011), e indução da produção de Th17, (Oliveira et al. 2013), o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito imunomodulador de pCramoll em modelo de infecção por *C. gattii*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Purificação de pCramoll

Lectinas de *C.mollis* Mart. foram coletadas no Semi-Árido do Estado de Pernambuco e purificadas de acordo com Correia e Coelho, 1995. O extrato das sementes fracionado em solução de sulfato de amônio e purificado por cromatografia de afinidade.

Avaliação de Toxicidade em *Canohabditis elegans*

Cepas de *C. elegans* WT N2 Bristol foram mantidas e propagadas utilizando como substrato *Escherichia coli* OP50 (Porta De La Riva et al. 2011). Após sincronização, 15 vermes (estágio L4) foram transferidos para placas contendo *E. coli* OP50, meio de crescimento de nematódeos (NGM), e pCramoll em várias concentrações. As placas

foram incubadas a 25°C, e a sobrevivência foi mensurada periodicamente para análise de LT50 (tempo em que metade dos vermes morreram). Para o grupo controle, foram feitas placas com vermes e OP50 crescidos em NGM. O experimento foi realizado em triplicata, e os vermes foram dados como mortos quando não houve resposta ao toque com a alça de platina.

Atividade de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Combinação com Fluconazol pelo Método Checkerboard

Segundo a metodologia de microdiluição em caldo presente no documento M27-A3 (2008) do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, foi avaliada a concentração inibitória mínima de pCramoll frente a linhagem L27/01 de *C.gattii*. E para testar o efeito combinatório das lectinas e fluconazol, o método checkerboard foi usado, a interação avaliada algebricamente determinando os índices de concentração inibitória fracionária (ICIF). Dessa forma, a interação foi classificada como sinergismo se $ICIF \leq 0,5$, indiferente se $0,5 < ICIF < 4$ e antagonismo se $ICIF > 4,0$ (Shin e Lin 2004).

Obtenções dos Inóculos

Foi utilizada linhagem L27/01 de *C. gattii* da Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais. A linhagem foi cultivada por 48h a 37°C, os inóculos foram preparados em PBS 1X e ajustados por contagem em câmara de Neubauer utilizando corante azul de Trypan, para 10^4 UFC.

Modelo de Infecção Intra-traqueal por *Cryptococcus gattii*

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo: 310/2014, os animais foram divididos em grupos de seis por gaiola, e foram fornecidos água e ração “ad libitum” sendo os ciclos de claro/escuro mantidos.

Inicialmente, os camundongos foram anestesiados, por via intraperitoneal, com xilazina (0,02 mg/mL) e ketamina (50 mg/mL) em PBS 1X e em seguida realizada uma pequena incisão na pele, próxima da região das glândulas tireoide. Após a separação das camadas dos tecidos, a traqueia foi exposta e foi inoculado 30 µL de inóculo fúngico com 10^4 UFC de *C. gatti*.

Na análise da atividade imunomoduladora de pCramoll, inicialmente, foi padronizada a estratégia terapêutica mais efetiva usando concentrações 1µg, 250µg e

500µg de pCramoll por via intraperitoneal. A primeira dose foi administrada 1 dia antes da infecção e repetida a cada 10 dias para visualizar a influência da pCramoll na infecção, como também associada ao fluconazol a 20mg.kg⁻¹. Os grupos controle foram representados por animais não tratados e animais tratados diariamente apenas com fluconazol a 20mg.kg⁻¹. Após avaliação da sobrevivência dos camundongos frente à infecção, e aos tratamentos propostos, a concentração que apresentou melhor resposta foi utilizada para uma nova infecção, na qual os camundongos foram anestesiados e eutanasiados nos tempos de 15 e 35 dias pós-infecção. Foram obtidos o lavado broncoalveolar (LBA), os pulmões, e o cérebro; para avaliação de carga fúngica, e dosagem de citocinas e quimiocinas.

Avaliação da Carga Fúngica e Contagem de Leucócitos Total e Diferencial

Após centrifugação do lavado broncoalveolar a 1200 rpm, a 4°C, por 5 min, o pellet foi ressuspensão em BSA 10% para contagem diferencial entre neutrófilos e leucócitos mononucleares, por meio da confecção de esfregaço em Cytospin (Thermo) a 450 rpm, por 5 min (Maxeiner et al. 2007). Os pulmões e o cérebro foram removidos, homogeneizados, diluídos em PBS 1X e os homogenatos dos órgãos distribuídos em meio Agar Sabouraud Dextrose para quantificação da carga fúngica expressa como UFC/g de órgão.

Atividade Mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase e Quantificação da Concentração de Citocinas e Quimiocinas nos Pulmões

O infiltrado neutrofílico pulmonar foi mensurado por meio do ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO), de acordo com Souza e colaboradores (2000), pela mensuração da mudança na densidade óptica (DO), utilizando tetrametilbenzidina, em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 450 nm. Para atividade NAG, foi seguido protocolo descrito anteriormente (Baltazar et al.,2014) o seu teor quantificado a 405 nm num espectrofotômetro (Barcelos et al. 2005). Os níveis de IL-10, IL-17 e CXCL1/KC foram medidos nos pulmões por meio da técnica de ELISA de captura, empregando anticorpos específicos de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). Sendo a curva padrão óptica (D.O.) em espectrofotômetro de microplaca com filtro de 492nm e a concentração calculada a partir da curva padrão (Souza et al. 2000).

Ensaio de Fagocitose, Índice de Proliferação Intracelular e Quantificação de ROS

Camundongos machos de 8-10 semanas foram eutanasiados por deslocamento cervical. Com remoção das pernas, todo tecido muscular foi retirado e a medula foi coletada pelo canal medular do fêmur e da tíbia com 2 a 5 mL de RPMI gelado. Após coleta da medula, as células foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspense em 20 mL de RPMI e as células contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de 2×10^5 /mL células por poço contendo lamínulas circulares de 13mm. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C, por sete dias, sendo o meio trocado a cada três dias.

Para infecção dos macrófagos, foi preparada uma suspensão fúngica de *C. gattii* L27/01 (cultivado em ágar Saboraud por 48 horas) em PBS 1X, e as leveduras viáveis foram ajustadas para $0,4 \times 10^5$ células por poço (5:1 de macrófagos para leveduras), posteriormente, os macrófagos foram incubados com a suspensão de *C. gattii*, e tratados com pCramoll nas concentrações de 1µM, 5µM e 10µM para avaliar a influência na fagocitose. Foram feitos dois controles: um apenas com a suspensão de macrófagos e outro com macrófagos mais *C. gattii* sem tratamento.

Após incubação, o sobrenadante foi coletado para quantificação de EROs, com 2,7-diacetato de diclorofluorescina (Invitrogen, Life Technologies) e mensurada a fluorescência (Varioskan Flash, Thermo) usando excitação de 485nm e emissão de 530nm. As lamínulas foram cuidadosamente retiradas, fixadas com metanol gelado, montadas em lâminas e coradas com o corante panótico. A contagem dos macrófagos foi realizada por meio de microscopia óptica e a capacidade fagocítica foi expressa pelo percentual de macrófagos fagocíticos (macrófagos com *C. gattii* internalizado) e o índice de proliferação intracelular pelo quociente do número de leveduras viáveis recuperadas nos tempos de 3h e 24h. O experimento foi realizado em quintuplicata.

Dosagem Óxido Nítrico

A geração de nitrito estável é o produto final da geração de óxido nítrico pelos macrófagos, e foi determinado usando reação de Griess, como descrito por (Da Silva e Correia 2014).

Análise Morfométrica

As imagens foram obtidas com câmera Nikon COOLPIX 4500 acoplada ao microscópio Nikon ECLIPSE E200 e analisadas segundo protocolo ImageJ

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) para análise de células, também descrito por Barviskar (2009).

Teste de comportamento animal (PROTOCOLO SHIRPA)

O protocolo SHIRPA foi concebido como uma bateria de múltiplos testes usados para estudos longitudinais com diretrizes e materiais padronizados (Rogers et al. 1997), para avaliar mudanças comportamentais durante o curso da infecção. Os parâmetros individuais avaliados pelo SHIRPA são agrupados em cinco categorias funcionais (estado neuropsiquiátrico, comportamento motor, função autonômica, tônus e força muscular; reflexo e função sensorial) de acordo com Lackner e colaboradores (2006).

Análise Estatística

A análise estatística de todos os dados foram realizados utilizando GraphPad Prism versão 5.0, com $p < 0.05$ considerado significativo. A curva de sobrevida foi traçada pela análise de Kaplan- Meier e os resultados foram analisados por meio do teste de log rank. Além disso, os resultados do ensaio de fagocitose, taxa de proliferação intracelular, medição de EROs e NO por macrófagos, atividade de MPO e NAG, quantificação de citocinas e análise de comportamento foram analisados por análise de variância (ANOVA) e o teste t de Student.

RESULTADOS

Toxicidade e ação anti-*C. gattii* de pCramoll sozinha e associada a fluconazol

Na análise de toxicidade em cepas de *C.elegans* por pCramoll nas concentrações 36.5, 73.3, 146, 250, 500, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, não houve diferença significativa no tempo de morte entre os grupos, mostrando a não toxicidade de pCramoll neste animais. Posteriormente, investigado o potencial antifúngico das lectinas frente *C. gattii*, as concentrações (0.93, 1.87, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) avaliadas não inibiram o crescimento de *C. gattii*, como também não influenciaram a resposta frente à levedura quando combinado ao fluconazol nas concentrações (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentando ação indiferente pelo teste checkerboard.

pCramoll e Fluconazol aumentam a sobrevida de animais infectados por *C. gattii*

Camundongos C57/BL6 foram infectados com 10^4 células de *C. gattii* e submetidos e tratados com pCramoll sozinha e combinada com fluconazol. Com os tratamentos

propostos, foi observado um aumento no tempo de sobrevida dos animais comparado ao grupo não tratado (NT), que apresentou média de sobrevida (MS) de 20 dias (**Figura1A**). Nos grupos tratados apenas com as lectinas nas doses de 500ug, 250ug e 1ug, foram obtidas médias de sobrevida (MS) de 30.5 ($*p<0.05$), 30 ($*p<0.01$) e 29,5 ($*p<0.01$) dias, respectivamente, apresentando um aumento de 50% (aproximadamente) para todas as doses testadas.

Quando combinada ao fluconazol (20mg.kg^{-1}), a influência das lectinas na sobrevida dos animais foi dose dependente. Onde apresentou uma (MS) de 46 dias para o grupo tratado apenas com fluconazol 20mg.kg^{-1} , e quando administrada pCramoll a cada 10 dias (em combinação com o fluconazol), possibilitou uma melhora significativa em relação a progressão da doença. Nos tratamento (pC500ug + FLC) os animais apresentaram uma MS de 51 dias e pCramoll a 1ug, também combinado a fluconazol, uma MS de 62 dias $*p<0.05$ aumentando 34,8% a sobrevida dos animais infectados com *C. gatti*.

O polissacarídeo extraído da cepa L27/01 (PSC) e sua associação com as lectinas e fluconazol foram administrados, entretanto, anteciparam a morte dos animais infectados. Quando tratados com 50ug de PSC, morreram com 17.5 dias em média, 2.5 dias (MS) menos $*p<0.05$ que os animais NT. O mesmo ocorreu com (PSC + pC250ug + FLC) antecipando a morte dos animais quando comparado a combinação pcamoll + FLC. Assim, além da estratégia terapêutica mais eficiente, uma considerável melhora na morbidade dos animais foi observada, desta forma, avaliamos o perfil comportamental dos animais não infectados e infectados (tratados e não tratados) por protocolo SHIRPA.

Análise comportamental dos animais infectados com *C. gattii* e submetidos aos diferentes tratamentos

Na observação de funções sensório-motora básicas como força e tônus muscular (**Figura 1B**), 20 dias pós-infecção já houve diferença significativa entre os grupos não tratados (NT) e os submetidos aos tratamentos propostos $*p<0.05$. Essa diferença na melhora da morbidade entre o grupo NT comparado aos tratados apenas com pCramoll (pC1) $^{+}p<0.05$, apenas fluconazol (FLC) $^{+}p<0.05$ e a combinação (pC1 + FLC) $^{++}p<0.05$, sendo esta, significativamente melhor que apenas o uso de FLC $^{#}p<0.05$, apresentando menor diferença de força e tônus muscular quando comparado aos animais não infectados (NI) $*p<0.05$. Similar perfil comportamental foi observado para

parâmetros envolvidos no estado neuropsiquiátrico (**Figura 1G**) e peso corporal (**Figura 1C**). Nessas análises, 22 dias após infecção, observamos diferença entre os grupos NT em relação aos demais grupos tratados $*p<0.05$, e quando comparado FLC e o seu uso combinado com pCramoll (pC1 + FLC) uma menor perda de peso corporal $^{\#}p<0.05$ com melhora no estado neuropsiquiátrico $^{\#}p<0.05$ foi observado, favorecendo atividade espontânea, medo, irritabilidade, agressão e vocalização, tendo esses parâmetros mais próximos ao grupo NI $*p<0.05$.

Em relação à função reflexo e função sensorial (**Figura 1C**) tanto FLC sozinho $^{+}p<0.05$ como combinado com a pCramoll $^{+}p<0.05$ apresentaram melhoras em relação ao posicionamento visual, *pinnareflex*, reflexo corneal e beliscada da pata traseira comparado aos animais infectados e não tratados. Para parâmetros envolvidos com comportamento motor, não houve diferença estatística entre os grupos tratados e não tratado (**Figura 1E**). Já parâmetros fundamentais na progressão da doença, como taxa de respiração, defecação, micção, fechamento de pálpebras, piloereção, frequência cardíaca, lacrimejação, salivação, observados na função autônoma (**Figura 1D**), apenas a combinação mostrou uma melhora significativa quando comparado aos animais não tratados $^{+}p<0.05$.

Diminuição de carga fúngica nos pulmões e cérebro e balanço da resposta inflamatória com uso de fluconazol em combinação com pCramoll.

Na análise de fatores inflamatórios envolvidos na criptococose pulmonar com os tratamentos propostos. Com 15 dpi foi observado um grande infiltrado celular com alta produção de NAG (FIGURA 2D) e MPO (FIGURA 2E) por macrófagos e neutrófilos, respectivamente, e significativo aumento na síntese dessas enzimas para o grupo tratado com FCZ em associação com pCramoll. No LBA foi observado um aumento no infiltrado inflamatório para os grupos onde a lectina foi administrada e não houve diferença significativa entre o NT e apenas FCZ (FIGURA 2F). Entretanto, com 35 dpi, apenas o uso do fluconazol apresentou um expressivo infiltrado inflamatório, significativamente maior que quando usado em associação com pCramoll ($^{\#}p<0.05$) (FIGURA 2G). Para os grupos NT ($*p<0.05$), apenas tratados com a lectina ($^{**}p<0.05$), e apenas tratados com fluconazol ($*p<0.05$) ocorreu um predomínio de mononucleares no infiltrado do LBA, mas para os animais tratados com a combinação houve um balanço entre mononucleares e polimorfonucleares, com 15 e 35 dpi. Todos os tratamentos propostos - apenas pCramoll, apenas fluconazol, fluconazol + pCramoll -

(* $p<0.05$), com 15 dpi, levaram a diminuição da carga fúngica pulmonar (FIGURA 2H). Trinta e cinco dias pós infecção, o fluconazol sozinho foi capaz de reduzir a carga fúngica pulmonar (* $p<0.05$), entretanto quando associado a pCramoll o conteúdo fúngico significativamente menor ($^{\#}p<0.05$). No tecido cérebral, apenas o uso do fluconazol levou a diminuição da carga fúngica 15dpi (FIGURA 2I), entretanto, com 35dpi a combinação (FLC +pCramoll), foi capaz diminuir significativamente a carga fúngica cerebral, quando comparado com apenas o uso do fluconazol como tratamento ($^{\#}p<0.05$).

Após análise da curva de sobrevida e escolha terapêutica mais efetiva que ou a sobrevida e morbidade dos animais, alguns parâmetros como carga fúngica e fatores inflamatórios envolvidos foram investigados, e para isso, os animais foram sacrificados. Após 15 dias de infecção, tanto pCramoll a 1ug, Fluconazol a 20mg.kg⁻¹ e a combinação terapêutica possibilitaram diminuição significativa da carga fúngica pulmonar * $p<0.05$ (**Figura 2H**), com aumento no número de leucócitos totais no LBA, principalmente para os tratamentos com pCramoll sozinha ou combinada ao fluconazol * $p<0.05$ (**Figura 2F**).

Quando administrado apenas pCramoll houve um predomínio de leucócitos mononucleares, e uma diminuição significativa na produção de CXCL/KC * $p<0.05$ (**Figura 2A**), já em combinação, não houve diferença significativa entre polimorfonucleares e leucócitos mononucleares (**Figura 2G**), fornecendo um balanço no infiltrado inflamatório no LBA, também não havendo diferença para os tratamentos com fluconazol e sua forma combinada para CXCL/KC. Contudo, com 15 dpi, nesses tratamentos propostos ocorreu aumento significativo na produção de IL-10 e IL-17 (**Figura 2C**) e elevada ação das enzimas NAG * $p<0.05$ (**Figura 2D**) e MPO * $p<0.01$ (**Figura 2E**). Com 15 dpi não houve recuperação fúngica do tecido cerebral (**Figura 2I**), apenas para o grupo tratado com fluconazol sozinho. Entretanto, após 35 dias de infecção, houve redução significativa da carga fúngica no cérebro dos animais infectados e tratados com pCramoll em combinação com o fluconazol. Como Também, o uso de pC1 + FLC reduziu significativamente CFU pulmonar tanto comparado aos animais não infectados ** $p<0.01$ como comparado ao uso do fluconazol sozinho. Havendo diferença também na diminuição de CFU cerebral $^{\#}p<0.05$ e maior produção de CXCL/KC $^{\#}p<0.05$ (**Figura 2A**) e IL10 $^{\#}p<0.05$ (**Figura 2B**).

Influência imunomodulatória de pCramoll na fagocitose e na proliferação intracelular de *Cryptococcusgattii* por macrófagos de medula

O efeito imunomodulador de pCramoll na fagocitose de *C. gattii*, pôde ser observado 3h após incubação. Levando ao aumento expressivo no índice fagocítico quando tratado com pCramoll a 1 μ M * $p < 0.05$ (**Figura 3A**), comparado com grupo sem tratamento (apenas macrófagos e *C. gattii*). Neste mesmo momento, nas células infectadas e tratadas com as lectinas nas concentrações de 1 μ M e 5 μ M * $p < 0.05$, houve uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio, estímulo anti-*C. gattii* por pCramoll. Esse potencial efeito na produção de espécies oxidativas foi comprovado também em macrófagos não infectados, tendo em todas as concentrações testadas um expressivo aumento de EROs em 3h * $p < 0.05$ (**Figura 3C**), que permaneceram elevados após 24h de incubação, principalmente, com pCramoll a 1 μ M ** $p < 0.01$ (**Figura 3D**), com um significativo aumento na produção de espécies nitrosativas * $p < 0.05$ (**Figura 3E**).

Vinte e quatro horas após incubação, não houve diferença entre os grupos no índice fagocítico (**Figura 3B**). Contudo, o rápido aumento na fagocitose, com elevada produção de EROs nos grupos tratados com pCramoll a 1 μ M e 5 μ M reduziram a proliferação intracelular fúngica * $p < 0.05$ (**Figura 3F**), visto por menor recuperação de células viáveis após 24h de incubação. A ativação dos macrófagos por pCramoll foi visivelmente observado, e quanto maior a concentração estimulante ou tempo de incubação, maior presença de células agregados, vacualização e expressivo aumento de tamanho (área) celular (**Figura 4A e 4B**). Com 3h horas pós-incubação, os macrófagos de medula estimulados por pCramoll nas concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M apresentaram 0.080 μ m² 0.122 μ m² e 0.197 μ m², e com 24h após incubação, 0.214 μ m², 0.483 μ m² e 0.528 μ m², respectivamente (**Figura 4C**). Com um aumento de até 5x de área celular comparado com os macrófagos apenas estimulados por *C. gattii* após 3h de incubação, e até 7x após 24h de incubação.

DISCUSSÃO

A criptococose é responsável por altas taxas da mortalidade, em geral, associadas ao crescente fenômeno de resistência antifúngica. O uso de pCramoll como alternativa terapêutica nos mostrou que, quinze dias pós-infecção os animais apenas tratados com pCramoll a 1 μ g apresentaram diminuição na produção de CXCL/KC e na migração de neutrófilos, que levou ao predomínio de monócitos/macrófagos no LBA, cruciais na

fagocitose e depleção fúngica (Poeta 2004). Esses mecanismos de resposta refletem em significativa diminuição de UFC no tecido pulmonar, aumentando a sobrevivência dos animais e melhorando a morbidade. Trabalhos anteriores já retrataram o efeito imunorregulatório de pCramoll, no estímulo da fagocitose induzida por resposta Th1 (Da silva et al. 2014) e em modelo de infecção por *Candida albicans*, tratados com Artin M (lectina manose específica), a fagocitose também foi o principal mecanismo de eliminação fúngica por ativação de resposta Th1, reduzindo carga fúngica nos órgãos alvo (Loyola et al. 2012). Quando pCramoll a 1µg foi combinado ao fluconazol (20mg.kg⁻¹), apesar de apresentar grande infiltrado inflamatório, houve um balanço entre leucócitos mononucleares e neutrófilos, isso não ocorreu nos animais apenas tratados com FLC, que não apresentaram diferença significativa no número de leucócitos totais, com 71,2% de mononucleares no LBA, todavia, ambos os tratamentos diminuíram UFC nos pulmões com 15 dpi. Provavelmente, pela ação fungistática no uso do fluconazol (Santos et al. 2012), e principalmente quando associado com pCramoll modulando o recrutamento de monócitos e neutrófilos com grande produção de NAG e MPO, respectivamente, fundamentais no combate a patógenos intracelulares facultativos como *C. gattii* (Feldmesser et al. 2000; Stringer et al. 2010; Quershi et al. 2011). Sendo MPO regulador de mecanismos e proteínas antimicrobianas (Metzler et al. 2014).

A associação além de estimular a fagocitose também estimula grande produção de espécies reativas do oxigênio, diminuindo IPR, consequentemente levando a significativa redução de UFC recuperadas do pulmão, mostrando ser mais efetiva do que apenas o uso do fluconazol na ação anti-*C. gattii*. Pois como observado anteriormente, isolados de paciente que apresentaram alta taxa de fagocitose com elevada taxa de proliferação intracelular, quando relacionado com prognóstico, tinham cinco vezes mais risco de morte (ALANIO et al., 2011).

Como possível produto de ativação pró-resposta Th2, todos tratamentos apresentaram uma elevada produção de IL-10 atuando na proteção e na ativação de mecanismo para eliminação do fungo, processo descrito em processos imunorregulatórios por ativação de receptores TLR e receptores de lectina tipo c em macrófagos M2, típico em infecções por patógenos extracelulares (Martins e Gordon 2014). Após 15 dpi foram recuperadas leveduras do cérebro dos animais tratados com a combinação (pC1 + FLC), o que não aconteceu quando foram tratados apenas com fluconazol. Corroborando com um modelo de infecção cerebral por *C. gattii*, no qual o

uso do fluconazol em 14 dpi atingiu maior concentração no sistema nervoso central, com grande redução de UFC (Mendes et al, 2010), já pCramoll por não atravessar a barreira hematoencefálica (Patrício et al. 2011) e estimular a fagocitose de *C. gattii*, possibilita maior transmigração do fungo (Charlier et al. 2009), contudo, resulta num maior contato fungo-sistema imune para ativação de respostas ao combate a infecção, além de diminuir a permanência e proliferação fúngica nos alvéolos, inibindo o crescimento de leveduras mais virulentas (Kronstad et al. 2011).

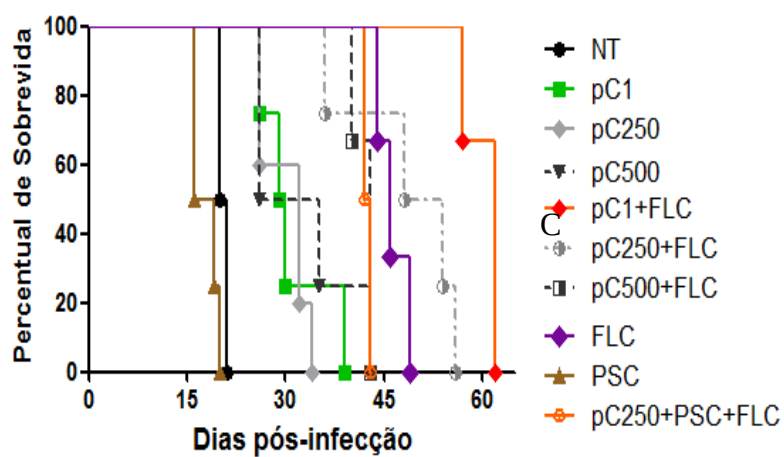
Trinta e cinco dias pós-infecção ocorreu significativa diminuição de UFC nos pulmões e no cérebro nos animais tratados com a combinação comparada apenas ao uso de fluconazol, aumentando a produção de IL-17, e CXCL/KC mantendo um balanço entre monócitos/macrófagos e neutrófilos no infiltrado celular no LBA, seguido de um significativo aumento de IL-10, também demonstrando ação protetora no curso da infecção. Sabe-se que a presença de uma resposta inflamatória balanceada é crítica para o prognóstico da criptococose, de modo que citocinas do tipo TH1 e TH17 resultam em redução da proliferação intracelular (VOELZ et al., 2009). Vias que são estimuladas por pCramoll (Oliveria et al., 2013), tendo possível efeito na modulação e balanço dessas respostas, fundamentais na ação antifúngica. Portanto, a combinação do fluconazol com este imunorregulador aumenta substancialmente a sobrevida dos animais com criptococose melhorando aspectos de morbidade presentes na progressão da doença (Santos et al. 2014). Diminuindo sintomas e melhorando a qualidade de vida dos animais.

CONCLUSÃO

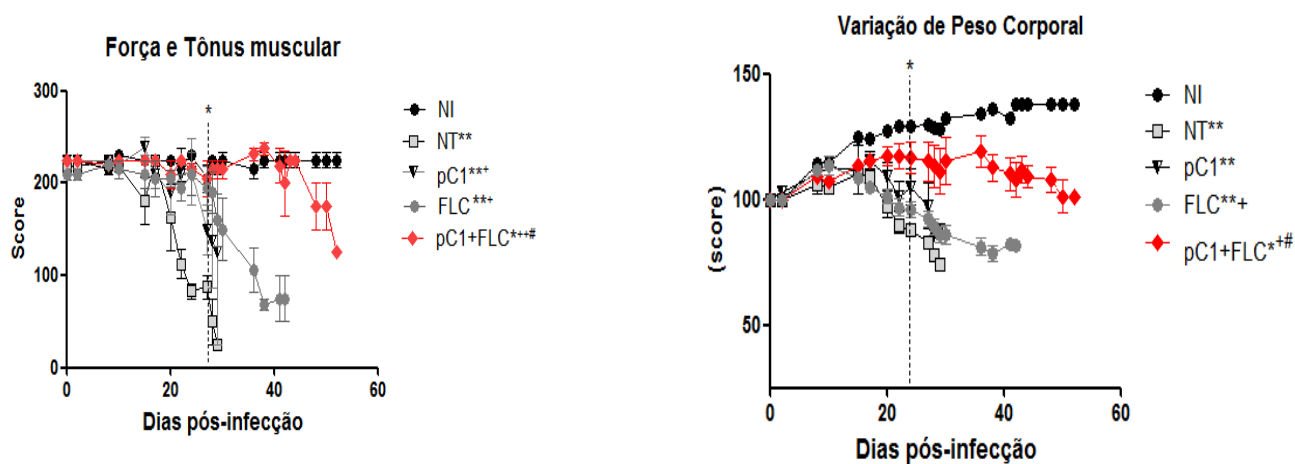
A imunoterapia por lectinas no tratamento da criptococose ainda não foi reportada, sendo este trabalho pioneiro. O efeito imunorregulador de pCramoll aumenta a sobrevida dos animais e melhora sinais clínicos presentes na doença. Sua associação com fluconazol é uma escolha eficiente, sendo capaz de diminuir a carga fúngica nos pulmões e no cérebro de animais infectados, ativar e estimular a fagocitose de *C. gattii*, com aumento da produção de EROs. Desta forma, a associação entre fluconazol e pCramoll, como imunoquimioterápico, representa uma alternativa promissora para o tratamento da criptococose.

FIGURA 1

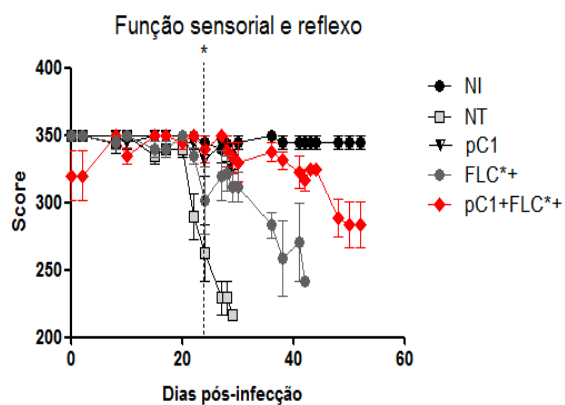
A



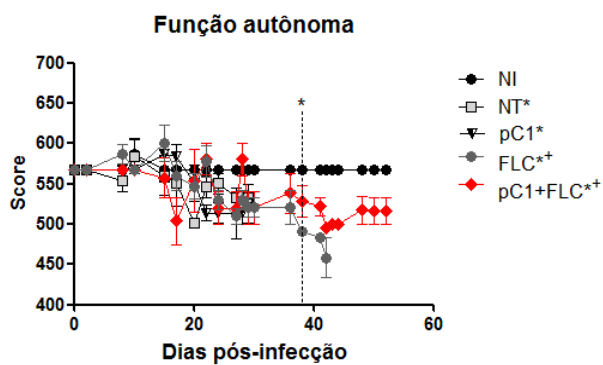
B



D



E



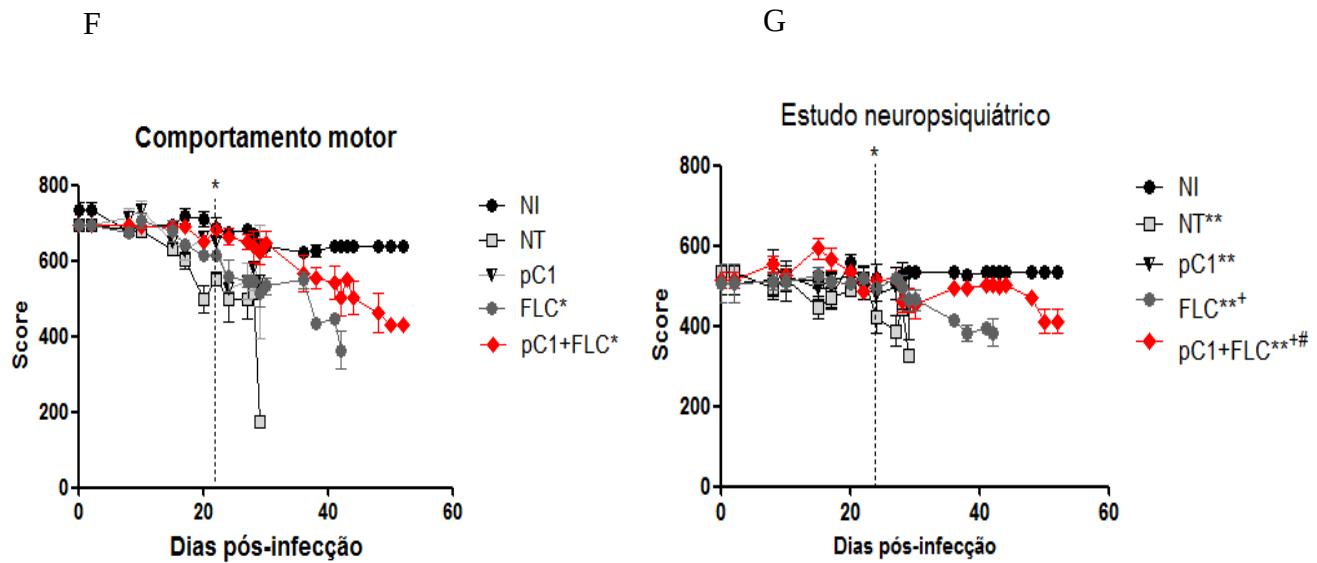
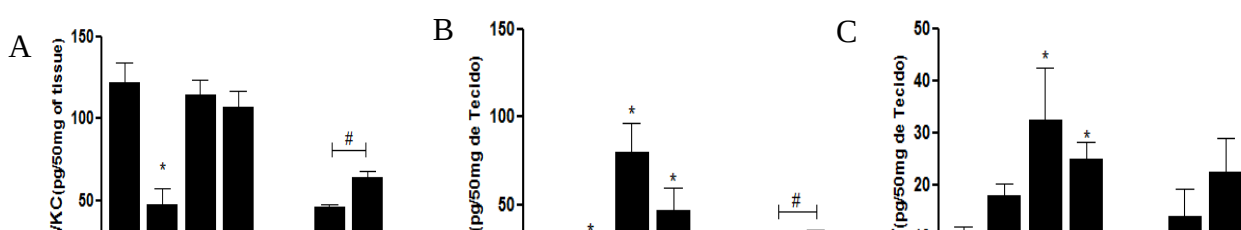


FIGURA 1: Avaliação da sobrevivência e perfil comportamental dos animais infectados com *Cryptococcus gattii* e submetidos aos diferentes tratamentos – Protocolo SHIRPA.

(A) Curva de sobrevivência de camundongos C57/BL6 foram infectados com 10^4 células de *C. gattii* e submetidos aos tratamentos com pCramoll sozinha nas concentrações de 1µg, 250µg e 500µg (pC1, pC250 e pC500, respectivamente) e combinada com fluconazol (pC1+FLC, pC250+FLC e pC500+FLC), polissacarídeo extraído da própria cepa (PSC), também associado a pCramoll 250µg e fluconazol (PSC+pC250+FLC). Como controles o grupo não tratado NT e um tratado apenas com fluconazol a 20mg.kg⁻¹. (B-G). n= 5 animais/ grupo. (B) Tônus e força muscular; (C) Variação de peso corporal; (D) Função e Reflexo (E) Função autônoma; (F) Comportamento Motor; (G) Estado Neuropsiquiátrico. NI (não infectado); NT (Controle, infectado e não tratado), pC1(pCramoll 1µg), pC1 + FLC (pCramoll 1µg em combinação com fluconazol), FLC (Fluconazol). *p<0.05; **p<0.001 (diferença quando comparado ao NI); +p<0.5; ++p<0.001(diferença quando comparado ao NT); #p<0.05 (diferença quando comparado FLC e combinação). Não houve diferença significativa entre NI e NI quando tratados com pC1 (dados não mostrados).

FIGURA 2



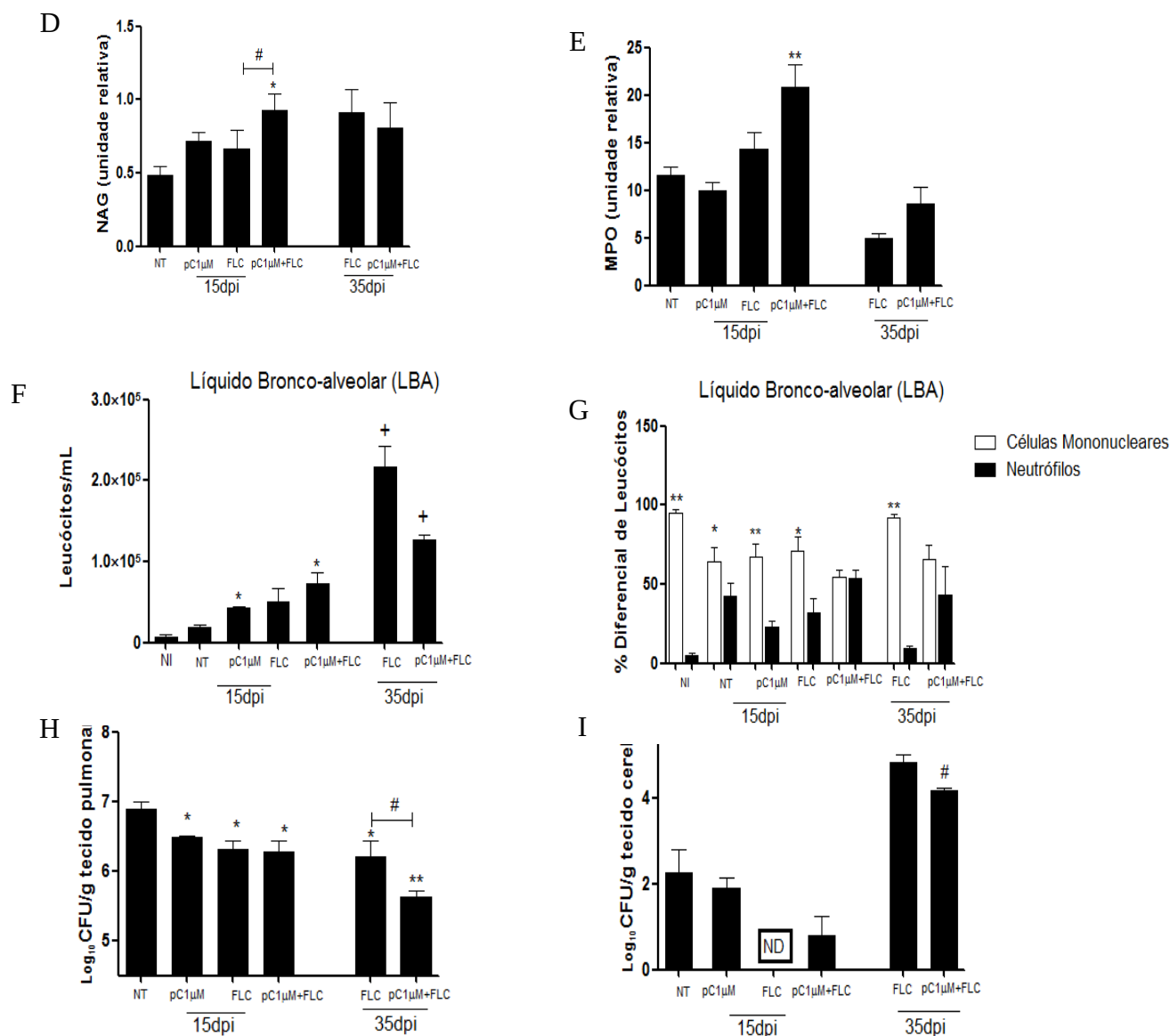


FIGURA 2: pCramoll e pCramoll em combinação com fluconazol modulam fatores inflamatórios e reduzem a carga fúngica nos pulmões e cérebro dos camundongos infectados com *Cryptococcus gattii*. (A, B e C) Níveis de IL-10, IL-17 e CXCL/KC nos pulmões dos camundongos infectados. (D-E) Atividade NAG e MPO 15 e 35 dias pós-infecção. (F-G) Contagem de Leucócitos totais e diferencial (mononucleares e

neutrófilos) do lavado bronco-alveolar 15 e 35 dpi, respectivamente. **(H-I)** Unidades Formadora de Colônias (UFCs) recuperadas dos pulmões e cérebros após 15 e 35 dpi, respectivamente. NT (Controle, não tratado), pC1 (pCramoll 1µg), pC250 (pCramoll 250µg), p500 (pCramoll 500µg), Fluconazol (FLC), os grupos com animais não infectados (NI), não houve recuperação de UFCs. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; ⁺ $p < 0.05$ (diferença quando comparado o tempo 15 e 35 dias).

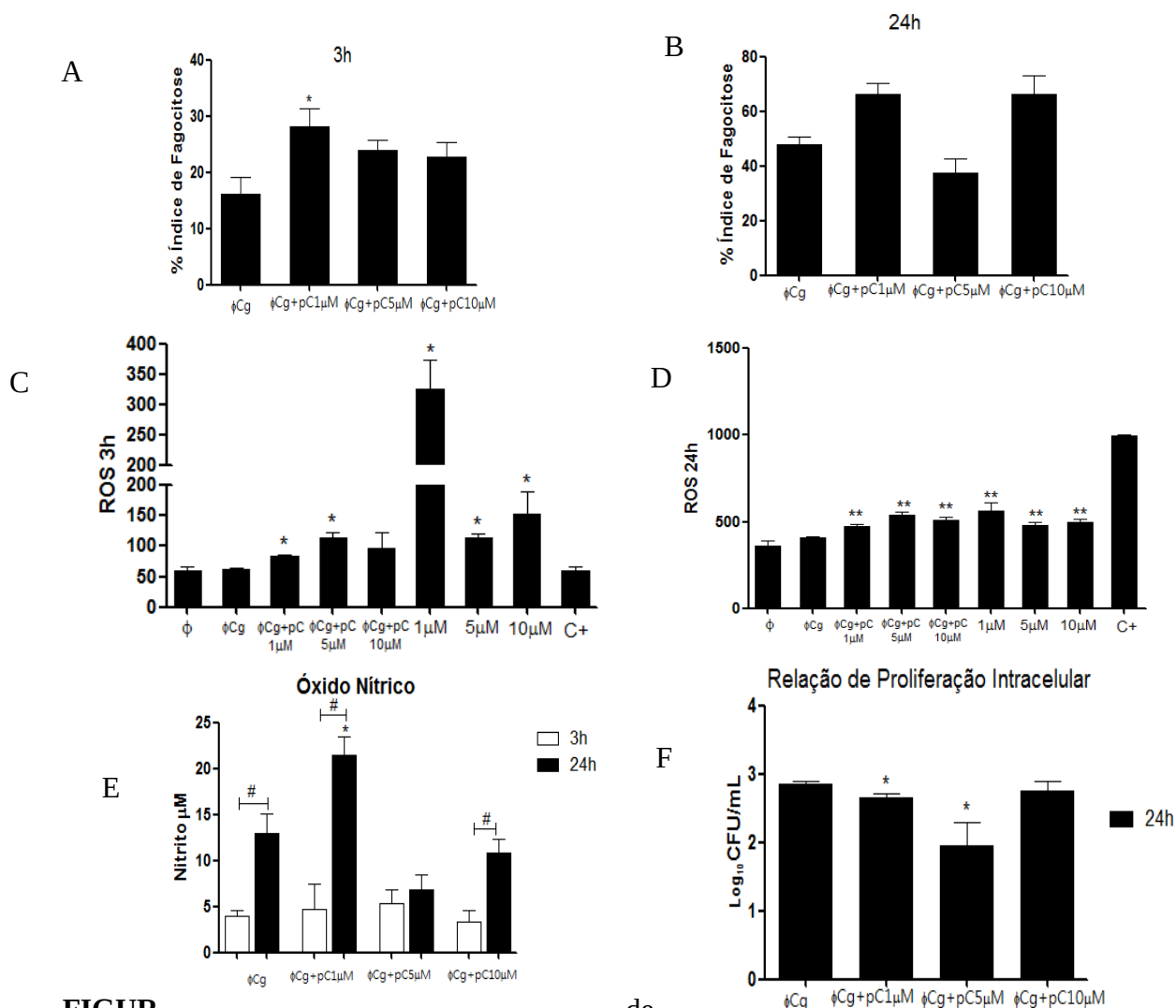


FIGURA 5: Efeito in vitro de

Cryptococcus gattii por macrófagos de medula de camundongos C57/BL6, influenciando a produção de EROs e NO. **(A)** Após 3h horas de incubação, o índice fagocítico é aumentado com o tratamento de pCramoll a 1µM **(B)(C-D)** Os tratamentos com pCramoll potencializa a produção de EROs, concentração dependente, após 3h e 24h de incubação, no interior dos macrófagos infectados com *C. gattii*. **(E)** Após 24h de incubação elevados níveis de NO são produzidos pelos macrófagos tratados com

pCramolla 1 μ M. *p<0.05; **p<0.01 (diferença quando comparados os grupos) e #p<0.05; ##p<0.01 (diferença quando os tempos são comparados).

FIGURA 4

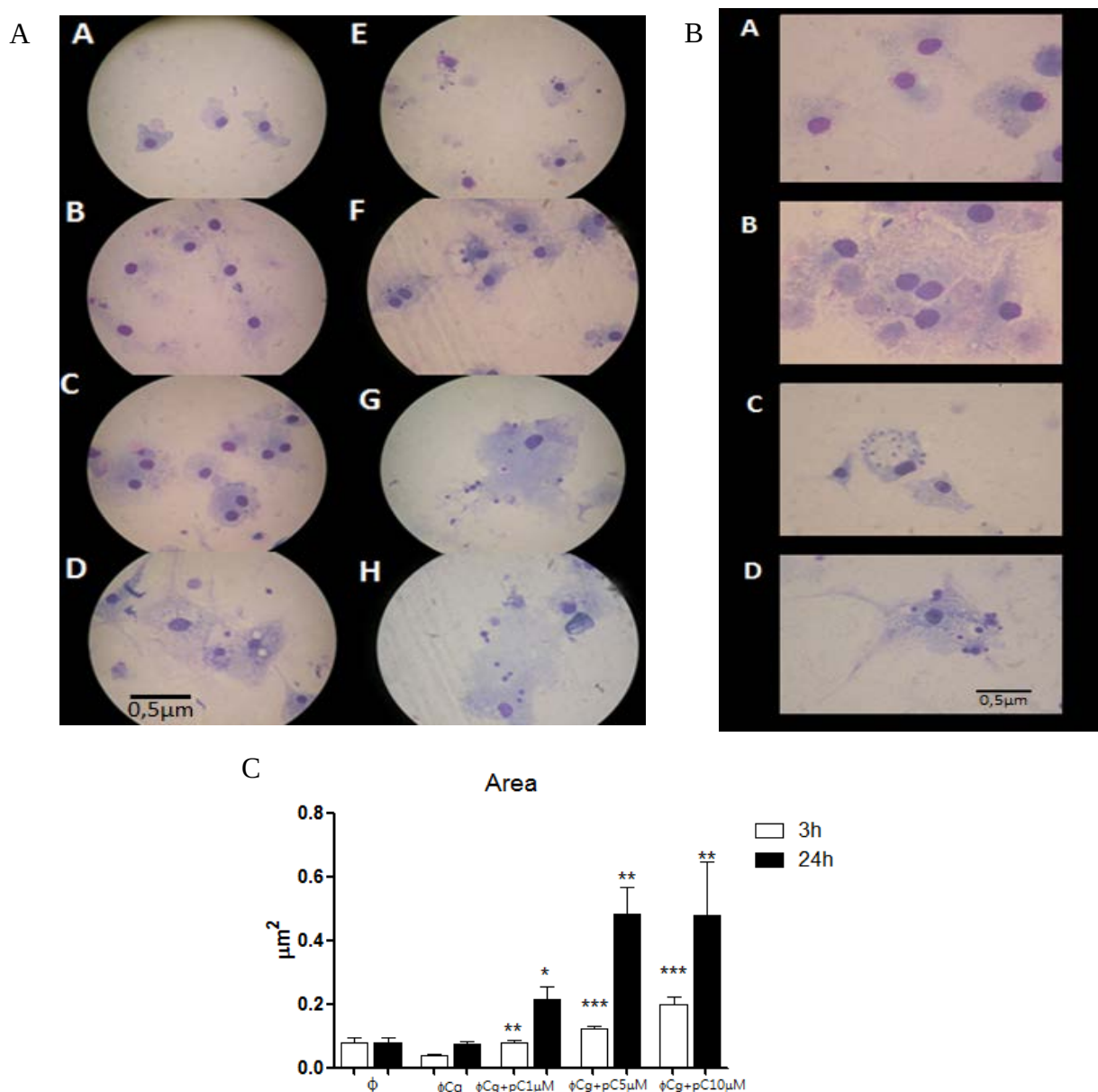


Figura 4: Alteração morfológica de macrófagos de medula de camundongos C57BL/6 infectados com *Cryptococcus gattii* tratados com pCramoll. **(A) A, B, C e D** - Macrófagos após 3h de incubação com *C. gattii*, sem tratamento e tratados com pC1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente. **E, F, G e H** - Macrófagos após 24h de incubação com *C. gattii*, sem tratamento, e também tratados com pC1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, respectivamente. **(B) A, B, C e D** - Macrófagos fagocitando *Cryptococcus gattii* 24h após incubação. **(C)** Área dos macrófagos estimulados com as lectinas e posteriormente infectados com *C. gattii*, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.005.

REFERÊNCIAS

- 149) Baltazar Lde M, Santos PC, Paula TP, Rachid MA, Cisalpino PS, Souza DG, Santos DA. 2014. IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. *Medical Mycology*. 78:352–358.
- 150) Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM. 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *J Leukoc Biol*. 78: 352–358.
- 151) Baviskar SN. 2011. A Quick & Automated Method for Measuring Cell Area using ImageJ. *The American Biol Teach*. 73(9):554-556.
- 152) Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. 2009. Evidence the role of monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun*. 77:120–127.
- 153) Correia MTS, Coelho LCBB. 1995. Purification of a glucose/manose specific Lectin. Isoforma 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratubean). *App Biochem Biotechol*. 55:261-73.
- 154) Da Silva LCN, Correia MTS. 2014. Plant Lectins and Toll-like receptors: implications in therapy for microbial infections. *Frontiers in Microbiology*, 5:20.
- 155) Da Silva LCN, Macêdo CBF, Paula RA, Coelho LCBB, Silva MV, Correia MTS. 2014. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies, 2014:44-54.
- 156) Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. 2014. *Cryptococcus neoformans*, Is a Facultative Intracellular Pathogen in Murine Pulmonary Infection. *Cell Rep*. 8(3): 883–896.
- 157) Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*. 9(3):193-203.
- 158) Lackner P, Beer R, Heussler V, Goebel G, Rudzki D, Helbok R, Tannich E, Schmutzhard E. 2006. Behavioural and histopathological alterations in mice with cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 32(2):177-88.

- 159) Loyola W, Custodio LA, Felipe I, Conchon-Costa I, Carvalho PG, Quirino GF, Silva LF, Gaziri LC. 2012. Artin M enhances TNF- α production and phagocytosis of *Candida albicans* mediated by dectin-1 and mannose receptors. *Int Immunopharmacol.* 12(2):378-383.
- 160) Maciel EVM, Araújo-Filho VS, Nakazawa M, Coelho LCBB, Correia MTS. 2004. Mitogenic Activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals.* (32)57-60.
- 161) Martinez FO, Gordon S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Prime Rep.* 6:13.
- 162) Maxeiner JH, Karwot R, Hausding M, Sauer KA, Scholtes P, et al. (2007) A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. *Nat Protoc* 2: 105–112.
- 163) Melo CML, Porto CS, Melo-junior MR, Mendes CM, Cavalcanti CBB, Coelho LCBB. 2011c. Healing activity induced by Cramoll1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Inter J Pharma.* 408:113-9.
- 164) Mendes FES, Oliveira LVN, Faria ES, Alvarenga DG, Pinto MR, Taborda CP. 2010. Correlation of the in vitro antifungal drug susceptibility with the in vivo activity of fluconazole in a murine model of cerebral infection caused by *Cryptococcus gattii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(12):1525-32.
- 165) Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V. 2014. A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep.* 8(3):883-96.
- 166) Oliveira PS, Rêgo MJ, da Silva RR, Cavalcanti MB, Galdino SL, Correia MT, Coelho LC, Pitta MG. 2013. *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. *Biomed Res Int.* 2013:26396.
- 167) Ferreira de Carvalho Patricio FCB, Lima-Ribeiro MH, Dos Santos Correia MT, Dos Anjos Carneiro-Leão AM, de Souza Albernaz M, Barboza T, de Souza SA, Santos-Oliveira. 2011. Radiolabeling of cramoll 1,4: evaluation of the biodistribution. *R Int J Pept.* 2011:945397.
- 168) Poeta M Del. 2004. Role of Phagocytosis in the Virulence of *Cryptococcus neoformans*. *MINIREVIEW.* 3(5):1067–1075.

- 169) Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J. 2012. Basic *Caenorhabditiselegans* Methods: Synchronization and Observation. *J. Vis. Exp.* (64):e4019.
- 170) Qureshi A, Grey A, Rose KL, Schey KL, Del Poeta M. 2011. *Cryptococcus neoformans* modulates extracellular killing by neutrophils. *Front Microbiol*, 2:193.
- 171) Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. 1997. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *MammGenome*. 8: 711-713.
- 172) Santos JR, Gouveia LF, Taylor EL, Resende-Stoianoff MA, Pianetti GA, César IC, Santos DA. 2012. Dynamic interaction between fluconazole and amphotericin B against *Cryptococcus gattii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 56(5):2553–2558.
- 173) Santos JR, Holanda RA, Frases S, Bravim M, AraujoGde S, Santos PC, Costa MC, Ribeiro MJ, Ferreira GF, Baltazar LM, Miranda AS, Oliveira DB, Santos CM, Fontes AC, Gouveia LF, Resende-Stoianoff MA, Abrahão JS, Teixeira AL, Paixão TA, Souza DG, Santos DA. 2014. Fluconazole alters the polysaccharide capsule of *Cryptococcus gattii* and leads to distinct behaviors in murine Cryptococcosis. *PLoS One*. 19(11):e112669.
- 174) Sharon CAC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, Kidd SE, Bak N, Currie B, Hajkowicz K, Korman TM, McBride WJH, Meyer W, Murray R, Sorrell TC. 2012. Manifestations of *Cryptococcus gattii* Infection: Determinants of Neurological Sequelae and Death. *Clin Infect Dis*. 55(6):789–98
- 175) SHIN S, LIN S. 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J of Applied Microbiology*. 91:1289-1296.
- 176) Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR. 2000. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*. 131:1800–1808.
- 177) Springer DJ, Ren P, Raina R, Dong Y, Behr MJ, McEwen BF, Bowser SS, Samsonoff WA, Chaturvedi S, Chaturvedi V. 2010. Extracellular fibrils of

pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions. *PLoSOne*. 5(6):e10978.

- 178) Zhai B, Zhu P, Foyle D, Upadhyay S, Idnurm A, Lin X. 2013. Fungal and Parasitic Infections: Congenic Strains of the Filamentous Form of *Cryptococcus neoformans* for Studies of Fungal Morphogenesis and Virulence. *Infect Immun*. 81(7):2626-2637.

6. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

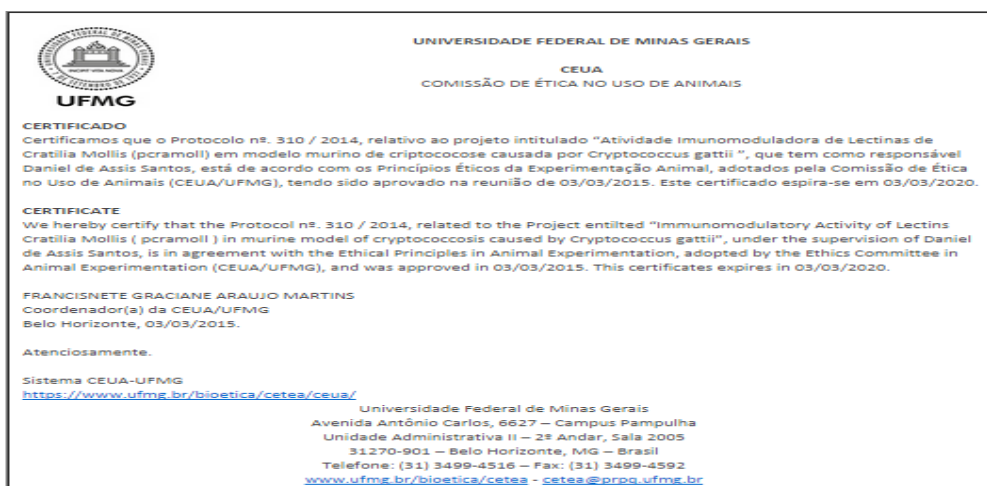
RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS
MENDES, T. C. D. ; SILVA, M. S. ; BARBOSA, A. V. ; **JANDÚ, J. J. B.** ; SILVA, M. V. ; ARAUJO, L. C. A. . Aplicação da análise do perfil de restrição do DNA ribossomal para a identificação de *Zymomonas mobilis* à nível de subespécies.. In: XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2014, João Pessoa. XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2014. v. XIV.

JANDÚ, J. J. B. ; MENDES, T. C. D. ; ARAUJO, L. C. A. ; SILVA, L. C. N. ; ARAUJO, J. M. ; CORREIA, M. T. S. ; SILVA, M. V. . Ação sinérgica da fração acetato de etila de casca *Myracrodroun urundeuva* com antibióticos comerciais contra cocos e bacilos de interesse médico. In: XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2014, JOÃO PESSOA. XIV Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. SÃO PAULO: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2014. v. XIV.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO **JANDÚ, J. J. B.** ; SILVA, L. C. N. ; SILVA, M. V. ; CORREIA, M. T. S. . Antimicrobial activity and synergistic effects of an ethyl acetate fraction from methanol extract of *Myracrodruon urundeuva* bark. *Journal of Medicinal Plant Research JCR*, 2015.

7. ANEXO

CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA



REGRAS DA REVISTA Glycobiology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

[Click here to submit your manuscript.](#)

Manuscripts for *Glycobiology* should be submitted online. Once you have prepared your manuscript according to the instructions given here, please visit the online submission site using the link above. Please note that manuscripts and tables need to be in editable format (.doc, .rtf or .xls) and figures must be of final publication quality (1200 d.p.i. for line drawings and 300 d.p.i. for color and halftone images). Further instructions on submitting your manuscript online can be viewed [here](#).

Please read these instructions carefully and follow them strictly. In this way you will help ensure that the review and publication of your paper are as efficient and quick as possible. The editors reserve the right to return manuscripts that are not in accordance with these instructions. Papers must be clearly and concisely written in English. In the interests of speed, manuscripts are not extensively copyedited, and authors are requested to check their texts carefully before submitting them.

Please note that **all** authors may upload their accepted manuscript PDF to institutional and/or centrally organized repositories (including PubMed Central), but must stipulate that public availability be delayed until **12 months after first online publication** in the journal. For National Institute of Health (NIH) grantees this means that publishing in *Glycobiology* is fully compliant with the NIH Public Access policy (Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PMC automatically, provided you acknowledge your grant - see 'Funding' section below). For full information about this journal's self-archiving policy, please visit our [Author Self-Archiving policy](#) page. In addition, *Glycobiology* offers an open access option for authors who wish to make their papers freely available online immediately. Please see the [Open Access Option](#) section below for more information.

TABLE OF CONTENTS

[Scope and Policy of *Glycobiology*](#)

[Editorial Board](#)

[Conflicts of Interest](#)

[Authorship](#)
[Preparation of Manuscripts](#)
[Submission of Manuscripts](#)
[Color Figures](#)
[Supplementary Data](#)
[Glycomics Data](#)
[Deposition of Sequence or Structural Data](#)
[Offprints](#)
[Copyright](#)
[Open Access Option for Authors](#)
[Policy Concerning Availability of Materials](#)
[Author Self-Archiving/Public Access Policy](#)
[Review of Manuscripts](#)
[Revision of Manuscripts](#)
[Speed of Publication](#)
[Page Charges](#)
[Proofs](#)
[Permissions for Illustrations and Figures](#)

SCOPE AND POLICY OF GLYCOBIOLOGY

Glycobiology provides for the rapid publication (online and print) of papers relating to the structure/function/biosynthesis of glycans in the broadest sense. Any paper providing novel information about the biological significance of glycans or glycosylation is appropriate. This includes, but is not exclusive of, studies pertaining to glycoproteins, glycolipids, proteoglycans, free oligosaccharides, lectins, glycosyltransferases, glycosidases, sugar and sugar nucleotide transporters, or enzymes of complex saccharide metabolism. In addition, papers describing novel methods that contribute meaningfully to the field will be considered.

Glycobiology publishes the following types of articles:

Original Articles / Regular Manuscripts: Original Articles are published in the following subject categories:

Analytical Glycobiology
Cancer Biology
Cell Biology
Computational Biology
Chemical Biology
Genetic Disorders of Glycosylation
Developmental Biology
Glycan Synthesis
Glycan Metabolism
Glycan Recognition
Immunology
Microbial Biology
Neurobiology

Plant Biology
Structural Biology
Systems Biology
Translational Glycobiology
Vascular Biology

The primary criterion for acceptance of an Original Article is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Papers that do not provide novel information about the biological significance of glycans or glycosylation may be rejected at the editorial level.

Communications: Communications are brief articles published in a special section at the front of *Glycobiology*. They are a mechanism for rapid publication of timely findings having significant impact for investigators in the field, and they must represent complete works rather than preliminary findings. Communications should be submitted online by choosing "Communication" in the pull-down menu on the Manuscript Details page. They are published in the same subject categories as Original Articles (listed above). Manuscripts submitted for consideration as Communications should conform to the format of printed articles but are limited to four printed pages or fewer in overall length, including figures.

Submissions should be limited to 4,000 words, including Abstract, Introduction, Results, Discussion (or combined Results and discussion section), Materials and methods, References, and Legends to figures. Please indicate the word count on your title page. Authors may submit a maximum of 4 figures and/or tables. Communications that do not conform to these guidelines will be returned for modification.

Reviews: Reviews summarizing recent findings on the biological significance of glycans or glycosylation are published by invitation and by direct submission. If you are interested in publishing a review in *Glycobiology*, it is highly recommended that prior to writing the review you send an email to the Associate Editor for Reviews describing the topic and authors for the review and why the review is of particular interest to the field. If the Associate Editor feels that the review is a relevant topic and is not redundant with a recently published review (or one currently in review), you will be encouraged to submit a manuscript which will then be peer-reviewed.

GlycoForum Section: The journal will publish meeting announcements and news items relevant to the field. In addition, letters discussing controversial or newsworthy items of interest to glycobiologists will be considered for publication. Suggestions for material to be included in this section are welcomed from the readership. Suggestions or letters should be sent via e-mail directly to the Editor-in-Chief. Please include phone and fax numbers.

EDITORIAL BOARD

Details of the full editorial board of *Glycobiology* can be found [here](#).

CONFLICTS OF INTEREST

At the point of submission, *Glycobiology* policy requires that each author reveal any financial interests or connections, direct or indirect, or other situations that might raise the question of bias in the work reported or the conclusions, implications, or opinions stated—including pertinent commercial or other sources of funding for the individual author(s) or for the associated department(s) or organization(s), personal relationships, or direct academic competition. When considering whether you should declare a conflicting interest or connection please consider the conflict of interest test: Is there any arrangement that would embarrass you or any of your co-authors if it was to emerge after publication and you had not declared it?

As an integral part of the online submission process, Corresponding authors are required to confirm whether they or their co-authors have any conflicts of interest to declare, and to provide details of these. If the Corresponding author is unable to confirm this information on behalf of all co-authors, the authors in question will then be required to submit a completed Conflict of Interest form, available on the Information for Authors page, to the Editorial Office. It is the Corresponding author's responsibility to ensure that all authors adhere to this policy.

If the manuscript is accepted, Conflict of Interest information will be communicated in a statement in the published paper.

AUTHORSHIP

Each author must have contributed substantively to justify inclusion as an author.

Each co-author must have been given access to the submitted version of the manuscript and must have approved their co-authorship and the manuscript itself.

At the time of submission, the corresponding author must upload a valid current email address for each co-author.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be in their final form when they are submitted, so that proofs require only correction of typographical errors. Charges may apply for extensive changes to proofs. All parts of the manuscript (except figures) should be double-spaced throughout and should be in a word-processing file.

Sections of the manuscript

Manuscripts should be subdivided into the following sequence of sections:

- Title page
- Abstract
- Introduction
- Results
- Discussion
- Materials and methods

- Acknowledgments
- Abbreviations
- References
- Legends to figures
- Footnotes
- Tables

Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

General format

All sections of the manuscript must be double-spaced (space between lines of type not less than 6 mm). Margins of 25 mm (1 inch) should be left at the sides, top, and bottom of each page. Please avoid use of footnotes; use instead, and as sparingly as possible, parenthesis within brackets. Underline only words or letters to appear underscored; italicize words and letters to appear in italics. Clearly identify unusual or handwritten symbols and Greek letters. Differentiate between the letter O and zero, and the letters I and l and the number 1. Each table and figure must be called out in the text.

Title page

The title should be short, specific, and informative. The first name, initial(s), and surname of each author should be followed by his or her department, institution, city with postal code, and country. Fax number and phone number of the corresponding author should also be provided, as well as an e-mail address. Any changes of address may be given in numbered footnotes. The author to whom proofs and reprints should be addressed should be indicated. Please provide a running title of not more than 60 characters. If the submission includes supplementary data (see below) indicate this on the title page and list the supplementary data items submitted.

Key words

Up to five key words, which may or may not appear in the title, should be given in alphabetical order, below the title, each separated by a slash (/). In addition to being printed with the article, these key words, together with the title, form the sole basis of the annual Subject Index. Thus, please give them careful consideration.

Abstract

The second page of every manuscript must contain only the Abstract, which should not exceed 250 words. The Abstract should be comprehensible to readers before they have read the paper, and abbreviations and reference citations should be avoided. It is essential that the Abstract clearly states the biological importance of the work described in the paper.

Please note that only text can be included in the abstract - no image files or complex formulas should be included. For simple formulas in the abstract:

- Chemical - do not use <sup> or <inf> in chemical formulas, for example water should be submitted as H₂O, carbon dioxide as CO₂.
- Mathematical - simple mathematical formulas should be submitted with the intended characters, e.g. x². The tags <sup> and <inf> will be converted into parentheses.

Acknowledgments

These should be included at the end of the text and not in footnotes. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies.

References

This journal follows *The Scientific Style and Format: The Council of Science Editors Manual for Authors, Editors, and Publishers* (7th ed.) as a guide for style and citation. Authors are responsible for the accuracy of the references. Published articles and those in press (state the journal which has accepted them and enclose a copy of the manuscript) may be included. In the text a reference should be cited by author and date. Not more than two authors may be cited per reference; if there are more than two authors, use *et al* in the in-text parenthetical citation. At the end of the manuscript the citations should be typed in alphabetical order, with the authors' surnames preceding initials. References should include, in the following order: authors' names (give the full names of the first through tenth authors in each reference), year, complete title of the article, journal title, volume number, inclusive page numbers, and (for books only) name and address of publisher. The name of the journal should be italicized and abbreviated according to the World List of Scientific Periodicals. References will appear in type as below:

- Gregg KJ, Finn R, Abbott DW, Boraston AB. 2008. Divergent modes of glycan recognition by a new family of carbohydrate-binding modules. *J Biol Chem.* 283:12604–12613.
- Kobata A, Mizuochi T, Endo T, Furukawa K. 1989. Function and pathology of the sugar chains of human immunoglobulin G. In: Bock G, Harnett S, editors. *Carbohydrate recognition in cellular function*. Chichester (UK): John Wiley & Sons. p. 224-240.
- Lennarz WJ. 1980. *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*. 2nd ed. New York (NY): Plenum Press.

Personal communications (J Jones, personal communication) must be authorized in writing by those involved, and unpublished data should be cited as (unpublished data). Both should be used as sparingly as possible and only when the unpublished data referred to is peripheral rather than central to the topic under discussion. References to manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (B Jones and L Smith, in preparation) and should NOT be included in the list of references.

Tables

Tables should be typed on separate sheets and numbered consecutively with Roman numerals. Tables should be self-explanatory and include a brief descriptive title. Footnotes to tables indicated by lowercase letters are acceptable, but they should not include extensive experimental detail. Tables must be called out in the text. A summary of the main style points for tables are:

Text citation:	Table I,	Tables II and III
Caption:	Table I. Text (no end full stop),	sentence case.

Ex Table I. Purification of chitinase from *Pterisrhyukyuensis*

Body:

- Include only top line, bottom line, span line, header line
- Units in parentheses in the header
- Footnotes to tables are indicated by lowercase roman letters (end full stop present)
- Identify minus signs in table data and set correctly
- Place a dash, or preferably, an ellipsis (...) or an appropriate abbreviation (e.g., ND for "no data")

Footnotes:

- Letters are preferred to numbers or symbols.
- Assign footnote letters in alphabetic order from left to right and from top to bottom starting with the table title.
- If a source line is needed to acknowledge the source of the information in a table, it may be designated as a footnote to the table title.
- Expanded abbreviations are typically presented below the footnotes, listed sequentially as a sentence, separated by semicolons.

Please follow Chapter 30 of the CSE Manual for further table guidelines.

Illustrations

Wherever possible figures should be in their desired final size, to fit the width of a single column of text (i.e., 88 mm wide). Double-column figures should be avoided, but if used they should be 180 mm maximum width. Any lettering should be approximately 2 mm in height and should be in proportion to the overall dimensions of the drawing. The captions for figures should be typed on a separate sheet of paper, and figures must be called out in the text.

Good quality figure files in jpg or eps format (300-600 dpi) should be submitted from the start, along with the manuscript, so that they can be reviewed by editors and reviewers. For further instructions on preparing illustrations for online submission and review, click [here](#).

Line drawings. These should have clear and sharp lines. No additional artwork, redrawing, or typesetting will be done. Therefore, all labeling should be done on the original line drawing. Faint shading and stippling will be lost upon reproduction and should be avoided. Line drawings must have a resolution of at least 1200 dots per inch at their final size.

Figure legends. These should be on a separate, numbered manuscript sheet. Define all symbols and abbreviations used in the figure. Figures and legends should be intelligible without reading the text of the manuscript.

Conventions

In general, the journal follows the conventions of the *CSE Style Manual* (Council of Science Editors, Reston, VA, 2006, 7th ed.). Follow *Chemical Abstracts* and its indexes for chemical names. For guidance in the case of biochemical terminology, follow the recommendations issued by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, as given in *Biochemical Nomenclature and Related Documents*, published by the Biochemical Society, UK. For enzymes, use the recommended name and EC number assigned by the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978, as given in *Enzyme Nomenclature*, published by Academic Press,

New York, 1980. Genotypes should be italicized; phenotypes should not be italicized. For bacterial genetics nomenclature, follow Demerc et al. 1966. Genetics. 54:61-76.

Abbreviations

Try to restrict the use of abbreviations to SI symbols and those recommended by the IUPAC. Abbreviations should be defined and listed on a separate page together with the Footnotes. Standard units of measurement and chemical symbols of elements may be used without definition in the body of the paper. Acronyms formed from phrases are unacceptable.

Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. This should appear before the 'Acknowledgements' section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: 'This work was supported by ...'
- The full official funding agency name should be given, i.e. 'National Institutes of Health', not 'NIH' (full RIN-approved list of UK funding agencies) Grant numbers should be given in brackets as follows: '[grant number xxxx]'
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: '[grant numbers xxxx, yyyy]'
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus 'and' before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number 'to [author initials]'.

An example is given here: 'This work was supported by the National Institutes of Health [AA123456 to C.S., BB765432 to M.H.]; and the Alcohol & Education Research Council [hfygr667789].'

Oxford Journals will deposit all NIH-funded articles in PubMed Central. See http://www.oxfordjournals.org/for_authors/repositories.html for details. Authors must ensure that manuscripts are clearly indicated as NIH-funded using the guidelines above.

Language Editing

OUP offers pre-submission language editing through Oxford Language Editing, a service for researchers all over the world. Language editing, particularly if English is not your first language, can be used to ensure that the academic content of your paper is fully understood by the journal editors and reviewers. Visit www.oxfordlanguageediting.com to find out more about the freelance editors available and the different services offered. Please note that edited manuscripts will still need to undergo peer-review by the journal.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Authors should submit manuscripts electronically at <http://mc.manuscriptcentral.com/glyco>.

Submission of a paper implies that it reports unpublished work and that it is not under consideration for publication elsewhere. If previously published tables, illustrations, or

more than 200 words of text are to be included, then the copyright holder's written permission must be obtained. Copies of any such permission letters should be faxed to Oxford University Press, *Glycobiology*, at +44 (0) 1865 355712 immediately upon the paper's acceptance, referencing the manuscript number assigned by the online submission Web site.

Preparing the files

- When preparing your final files, please present all sections of the paper in a *single word-processing file*, excluding illustrations. If necessary, tables may be placed in a separate word-processing file.
- When creating and/or editing your manuscript, use the document mode (or equivalent) in the word-processor program.
- Type the title, authors, and affiliations in the journal style (i.e., in upper and lowercase), with bold font for the title and authors.
- The text should be typed *unjustified*, *without hyphenation* (except for compound words) and at *double line spacing*.
- Headings should be typed as follows: main (section) headings in bold upper and lowercase; subheadings in italic upper and lowercase letters with the text beginning on the next line; sub-subheadings in italic upper and lowercase letters with the text continued on the same line.
- Indexing flags should *not* be included in the text.
- Enter only *one* space at the end of sentences and after commas, semicolons, and colons. No spaces should be inserted before these punctuation marks.
- *Switch off* automatic page-numbering. Label the hard copies by hand at the bottom of each page.
- Do not use lowercase l (ell) for 1 (one) or O for 0 (zero). These may look interchangeable but they have different electronic values.
- Check the final copy of your paper carefully because spelling mistakes, inconsistencies, and errors will be faithfully translated into the typeset copy.

COLOR FIGURES

Glycobiology operates a flexible color option. All figures submitted to the journal in color will be published in color online at no cost (unless the author specifically requests that their figures be in black and white online). Authors may choose to also publish their figures in color in the print journal for £250/\$450/€310 per figure: you will be asked to approve this cost in an e-mail after your article is accepted for publication. Color figures must have a resolution of at least 300 dots per inch at their final size. You will be issued an invoice at the time of publication. Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data can be made available by the publisher as online-only content linked to the online manuscript.

Definition

Supplementary data is supporting material that cannot be included in the printed version for reasons of space and is not essential for inclusion in the full text of the manuscript but would nevertheless benefit the reader. It should not be essential to understanding the conclusions of the paper but should contain data that is additional or complementary and directly relevant to the article content.

Examples

More detailed methods, extended data sets/data analysis, tables, or additional figures (including color).

Process

All material to be considered as supplementary data must be submitted at the same time as the main manuscript for peer review. Please indicate clearly the material intended as supplementary data upon submission. On the Title Page of the submitted manuscript indicate that supplementary data is included and list the items. Also ensure that the supplementary data is referred to in the main manuscript at an appropriate point in the text. It must be supplied to the production department with the article for publication, not at a later date. It cannot be altered or replaced after the paper has been accepted for publication.

Files for supplementary data should be clearly marked as such and be accompanied by a summary of the file names and types.

Please note that supplementary data will not be copyedited, so ensure that it is clearly and succinctly presented and that the style of terms conforms with the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any Internet browser.

Acceptable formats

A maximum of 5 files is acceptable to make up the supplementary data unit for an article. The maximum size per file should not exceed 2 MB (though text files should be a great deal smaller), and files must be as small as possible so that they can be downloaded quickly. An HTML index page is usually created to link the supplementary data file(s) to the article. Please provide short (2-4 word) titles for each individual file---these will be used to create links to the files from the index page.

Recommendations

1. Pick a common cross-platform (PC, Mac, Linux/UNIX, etc.) format for your supplementary data to allow the greatest access for your readers.
2. Provide text files in portable document format (.pdf), Microsoft Word (.doc), HTML (.html), or rich text format (.rtf). Files supplied in Word or RTF may be used to create a PDF file.
3. Provide spreadsheet files in Microsoft Excel (.xls) or CSV (.csv) format.
4. Provide image files as tagged image format (.tif), graphic image format (.gif), or JPEG (.jpg). Images should be a maximum size of 640 x 480 pixels (9 x 6.8 inches at 72 pixels per inch).
5. The most commonly accessible format for audio clips is .mp3. Though not recommended, QuickTime, RealMedia, and Windows Media file formats are also acceptable.

6. The preferred and most common format for movie clips is MPEG Movie (.mpg), though QuickTime Video (.mov) and Microsoft AVI Video (.avi) formats are also acceptable.

If you require further help or information regarding submission or preparation of supplementary data, please contact the production editor for *Glycobiology*.

GLYCOMICS DATA

Glycobiology is working with the community to develop the MIRAGE (Minimum Information Required for a Glycomics Experiment) guidelines. Currently, we recommend that authors follow the Athens Guidelines for Publication of Glycomics Data for reporting mass spectral based glycomics data. Additional guidelines will be recommended as they are developed.

DEPOSITION OF SEQUENCE OR STRUCTURAL DATA

Publication in *Glycobiology* implies an obligation on the part of the authors to deposit any novel nucleic acid or protein sequence data referred to in their papers in a public domain data library.

OFFPRINTS

The publishers supply a link to the paper's URL free of charge. Printed offprints of the article or copies of the issue in which the article is published can be ordered using the Oxford Journals Author Services site. You will receive a link to this site from the Production office when your paper has been accepted for publication in the journal. Late orders submitted after the journal is printed are subject to increased prices.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number.

COPYRIGHT

It is a condition of publication in the journal that authors grant an exclusive license to Oxford University Press. This ensures that requests from third parties to reproduce articles are handled efficiently and consistently and will also allow the article to be disseminated as widely as possible. As part of the license agreement, authors may use their own material in other publications, provided that the journal is acknowledged as the original place of publication and Oxford University Press is acknowledged as the publisher.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford Journals authors will be invited to complete an online copyright licence to publish form.

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change. If your article is accepted for publication OUP will contact you using the email address you have used in the registration process. Please note that OUP does not retain copies of rejected articles.

OPEN ACCESS OPTION FOR AUTHORS

Glycobiology authors have the option to publish their paper under the Oxford Open initiative; whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted the corresponding author will be required to accept a mandatory licence to publish agreement. As part of the licensing process you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licences. Authors publishing in *Glycobiology* can use the following Creative Commons licences for their articles:

- Creative Commons Attribution licence (CC-BY)
- Creative Commons Non-Commercial licence (CC-BY-NC)

Please click [here](#) for more information about the Creative Commons licences.

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. The open access charges applicable are:

Regular charge - £1750/ \$2800 / €2275

List B Developing country charge* - £875 / \$1400 / €1135

List A Developing country charge* - £0 /\$0 / €0

*Visit our [Developing Countries](#) page for a list of qualifying countries

Please note that these charges are in addition to any colour/page charges that may apply.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution, and ensure you account for your own local VAT correctly.

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

POLICY CONCERNING AVAILABILITY OF MATERIALS

It is understood that by publishing a paper in *Glycobiology* the authors agree to make freely available to colleagues in academic (nonprofit) research any of the cells, nucleic acids, antibodies, etc., that are not available from commercial suppliers and are required to substantiate the scientific conclusions of the paper.

AUTHOR SELF-ARCHIVING/PUBLIC ACCESS POLICY

For information about this journal's policy, please visit our [Author Self-Archiving policy](#) page.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

Manuscripts submitted should be fully documented, high-quality, original research papers. If the Editors consider a manuscript unsuitable for the scope and content of the

journal, a statement explaining the basis for the decision will be returned within a few days of submission. Otherwise, every paper is independently reviewed by at least two experts in the field. Decision for publication, amendment, or rejection is based upon their reports. On the average, decisions are reached within 4 weeks of the receipt of the paper.

REVISION OF MANUSCRIPTS

When a manuscript is returned to authors for revision prior to final acceptance, the revised version must be submitted within 6 months of the author's receipt of the referees' reports. Revised manuscripts returned after 6 months will be considered as new submissions subject to re-review.

SPEED OF PUBLICATION

Glycobiology Advanced Access articles are initially published in their "Accepted Manuscript" form as soon as possible post acceptance. Subsequently, a copyedited, typeset, corrected version of the "Corrected Proof" is also published on the Advanced Access page. More information, including how to cite Advance Access papers, can be found on the Advance Access page.

PAGE CHARGES

A page charge of \$75 per published page will be levied for all papers. Page charges may be waived at the discretion of the editors in cases in which research funds are not available. At the time their paper is submitted, authors in this situation must provide written documentation specifying the reasons for their inability to pay and requesting a waiver of the page charges. No paper will be rejected due to a lack of funds, but publication may be delayed if page charges are not paid when a waiver is not requested. Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from elsewhere in the EU you or your institution should account for VAT by way of a reverse charge. Please provide us with your or your institution's VAT number. Authors will be able to pay for page charges on the author services website, along with any offprint/issue orders and colour figures.

PROOFS

Authors are sent page proofs. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately for typographical errors and returned within 48 hours by email or fax to the Glycobiology mailbox. Essential changes of an extensive nature may be made only by insertion of a *Note added in proof*. A charge will be made to authors who insist on amendment within the text at the page-proof stage. Excessive alterations may delay publication of the article to a subsequent issue.

PERMISSIONS FOR ILLUSTRATIONS AND FIGURES

Permission to reproduce copyright material, for print and online publication in perpetuity, must be cleared and if necessary paid for by the author; this includes applications and payments to DACS, ARS, and similar licensing agencies where appropriate. Evidence in writing that such permissions have been secured from the rights-holder must be made available to the editors. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by the particular institutions. Oxford Journals can offer information and documentation to assist authors in securing print and online permissions: please see the Guidelines for Authors section. Information on

permissions contacts for a number of main galleries and museums can also be provided. Should you require copies of this, please contact the editorial office of the journal in question or the Oxford Journals Rights department.